



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS OBSERVADOS EN LOS  
FILAMENTOS DE ACTINA EN LA LÍNEA CELULAR RK13  
DURANTE LA INFECCIÓN CON *Candida albicans*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
GABRIELA ORTEGA VASQUEZ

ASESOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

CUAUTITLÁN IZACLLI, EDO. DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

INSTITUTO DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Evaluación de los cambios observados en los filamentos de actina en la línea celular RK13 durante la infección con *Candida albicans*.

Que presenta la pasante: **Gabriela Ortega Vasquez**  
Con número de cuenta: **304101524** para obtener el Título de la carrera: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Carlos Gerardo García Tovar	
VOCAL	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
SECRETARIO	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Azucena Lee Mendoza	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga\*

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán UNAM, con el apoyo de los proyectos:

“Morfología Veterinaria y Biología Celular”  
(Proyecto PIAPI1602)

e

“Implementación de prácticas de laboratorio en las asignaturas de Biología Celular, Biología Molecular y Genómica”  
(Proyecto PIAPIME ID 2.11.04.16)

## **AGRADECIMIENTOS**

### **TUTOR**

**Dr. Carlos Gerardo García Tovar**

Por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

**Dra. Ma. Leonor Quintero Mora**

Por ser pionera en este trabajo, que después de un tiempo se concluyó.

### **Jurado.**

**Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez**

**Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz.**

**Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo.**

**Q.F.B. Azucena Lee Mendoza.**

Por su apoyo, observaciones y mejoras para el presente.

### **Apoyo Técnico y Académico.**

**M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz.**

Por su valiosa asesoría técnica en las diferentes técnicas que se utilizaron para el desarrollo del trabajo y su colaboración en la estructuración del mismo.

**M.V.Z. José Luis Nieto Bordes.**

Por su asesoría técnica en el trabajo con los cultivos celulares.

### **Unidad de investigaciones Multidisciplinarias,**

Laboratorios 4, 2 y 6 por facilitar las instalaciones y el personal para realizar y concluir el trabajo.

### **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C1 y C4**

Por facilitar la creación, desarrollo y formación de estos proyectos.

## DEDICATORIAS

Ante las adversidades a mis **padres**, que se esforzaron en darme lo necesario para seguir adelante, que con formación académica básica, estuvieron para apoyarme en decisiones que no aprobaron. Que hoy en su lugar comprendo que como padres queremos lo mejor para nuestros hijos. Tarde pero les agradezco su fe en mí.

A mis hijas **Itaii** y **Akemi**, que cada una vivió, desvelos, que durmieran solas, A ti “Tita” que te toco terminar una carrera ajena...Te tocara a ti, terminar lo que quieras ser y hacer, ahí estaré para sostener tus sueños... “Chemy”, tu llegada fue difícil, y te aferraste a la vida para hacerme recordar que entre la vida y la muerte estas tú, una segunda oportunidad, para lograr concluir lo que un día comencé, terminar con dos hermosas amigas. Las amo y es por y para ustedes.

A mis **familiares** en general, que me apoyaron en el cuidado de mis niñas durante mi ausencia, así como sus frases indirectas que alientan a cualquiera....A todos aquellos que están y estuvieron al pendiente de que concluyera, también a aquellos que fueron cómplice de mi emoción cuando inicié este carrera y que ahora no están conmigo (Primavera).

**Amigos**, de los pocos que formas en tu estancia en esta gran casa de estudios, gracias por hacer ameno y divertido el camino, y aportar momentos inolvidables.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, **académicos, técnicos, personal** por brindarme la oportunidad de desarrollarme y formarme en la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**,

A **Fernando**, que si no fuera por tu insistencia no me hubiese aventado al ruedo, “gracias por la ayuda”.

Por último dedicada a **Gabriela Ortega Vasquez** que por querer llevar la contraria, le costó mucho esfuerzo, a pesar de las circunstancias, lo lograste y que aún hay camino por seguir, ya no sola, si no de la mano con dos grandes; lo fácil ya los hiciste, lo difícil lo estás haciendo, lo imposible, te tardaras pero lo lograras.

“No importa cuántas veces te equivocas  
o cuanta lentitud progresas,  
Sigues estando muy por delante  
de los que ni lo intentan”.

Anthony Robbins.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
FIGURAS	2
I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	4
III. ANTECEDENTES	
1. Características generales de <i>Candida albicans</i>	5
2. Infecciones causadas por <i>Candida albicans</i> .	6
3. Mecanismos de infección y factores de virulencia de <i>C. albicans</i> .	7
3.1. Morfogénesis	8
3.2. Enzimas	9
a) Proteasas	9
b) Fosfolipasas	10
c) Lipasas	10
3.3. Adhesinas	10
a) ALS	11
b) HwP1p	11
c) Int1p	11
d) Mnt1p	12
3.4. “Swiching” o Variabilidad Fenotípica y Antigénica( Ambiental)	12
a) Adaptación al pH	12
3.5. Formación de Biopelícula	12
4. Adherencia e invasividad <i>C. albicans</i> de comensalismo a patogenicidad	13
4.1. Adhesión	14
4.2. Invasión	14
a) Endocitosis inducida	14
b) Penetración activa	14
4.3. Daños	15

	5.- Citoesqueleto	
	a) Generalidades	16
	b) Filamentos de actina	17
	c) Proteínas de unión a actina	18
	d) Patógenos y filamentos de actina	19
IV	JUSTIFICACIÓN	22
V	OBJETIVOS	23
	1. Objetivo General	
	2. Objetivos Particulares.	
VI	HIPOTESIS	24
VII	DISEÑO EXPERIMENTAL.	25
VIII	MÉTODO	26
	1. Cultivo de <i>Candida albicans</i> y condiciones de crecimiento.	26
	2. Cultivo de la línea celular RK13.	26
	3. Infección de la línea celular RK13 con distintos aislados de <i>C. albicans</i> .	26
	4. Ensayo de Fluorescencia directa para evaluar cambios en los filamentos de actina.	27
IX	RESULTADOS.	28
	1. Identificación de <i>Candida albicans</i> .	28
	2.- Evacuación de la morfología en campo claro durante la interacción levadura- célula.	29
	3.- Evaluación general de los filamentos de actina postinfección con <i>C. albicans</i> .	31
	4.- Evaluación particular de los filamentos de actina postinfección con <i>C. albicans</i>	35
X	DISCUSIÓN.	47
XI	CONCLUSIONES.	50
XII	REFERENCIA.	51

## ABREVIATURA

<b>ABP</b>	proteínas de unión a actina por sus siglas en inglés
<b>ADP</b>	adenindifosfato.
<b>ALS</b>	proteína con un residuo hidrofóbico carboxilo.
<b>Arp2/3</b>	complejo proteico nucleador de la actina para su polimerización.
<b>ATCC</b>	American Type Colection Collage.
<b>ATP</b>	adenintrifosfato.
<b>ELISA</b>	técnica ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas')
<b>FI</b>	filamentos intermedios.
<b>G-361</b>	melanoma de piel humana.
<b>GPI</b>	glicosilfosfatidilinositol.
<b>GTP</b>	guanintrifosfato.
<b>h</b>	hora
<b>HepG2</b>	hepatocelular humano carcinoma de hígado.
<b>Hwp1</b>	gen codifica una manoproteína de la superficie externa.
<b>IFI</b>	inmunofluorescencia indirecta
<b>Int1p</b>	gen ligandos de las proteínas de la matriz.
<b>LIP</b>	lipasa.
<b>Mnt1p</b>	manosil tranferasa proteína de membrana tipo II.
<b>pH</b>	potencial de hidrogeno.
<b>PH</b>	gen activan e inactivan dependiente de las condiciones de pH.
<b>PL</b>	lisofosfolipasa, glucoproteína secretada y detecta en la parte terminal de
<b>PBS</b>	solución saturada de fosfatos
<b>RK13</b>	riñón de conejo
<b>RPMI -1640</b>	su siglas en inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , más conocido por, es un medio celular usado para cultivos celulares
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto.
<b>spp</b>	del latín especies.
<b>SAP</b>	aspartil proteinasas, enzima de secreción.
<b>SFB</b>	suero fetal bovino.
<b>SIRC, MDCK</b>	riñón canino.
<b>SP2 / OAg14</b>	células en suspensión mieloma de ratón.
<b>YPD</b>	por sus siglas en inglés Yeast, peptone, dextrosa.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Morfología de *Candida albicans*.

**Figura 2 .**Etapas de infección por *C. albicans*.

**Figura 3.** Caracterización de distintos aislados de *C. albicans*.

**Figura 4 .**Cultivos de células RK13 infectadas con *Candida albicans*.

**Figura 5.**Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con Faloidina-rodamina en cultivo celular RK13 infectadas con diferentes cepas de *Candida albicans* a una hora.

**Figura 6.**Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con Faloidina-rodamina en cultivo celular RK13 infectadas con diferentes cepas de *Candida albicans* durante dos horas.

**Figura 7.**Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con Faloidina-rodamina en cultivo celular RK13 posinfección de tres horas con diferentes cepas de *Candida albicans*.

**Figura 8.**Cultivo celular RK13 infectada con cepa de referencia ATTC-10231 a una hora posinfección marcaje de actina con Faloidina–rodaminada.

**Figura 9.** Cultivo de células RK13 infectadas con cepa de referencia 10231 dos horas posinfección.

**Figura 10.** Cultivo de células RK13 después de 3 horas de infección con la cepa 10231.

**Figura 11.** Cultivo celular RK13 con cepa 520 a una hora posinfección marcaje de actina con Faloidina-rodaminada.

**Figura 12.**Cultivo celular RK13 con cepa 520 a dos horas posinfección.

**Figura 13.**Cultivo celular de RK13 con cepa 520 tres horas posinfección.

**Figura 14.** Cultivo celular RK13 infectadas con cepa 684 una hora.

**Figura 15.** Cultivo celular RK13 con cepa 684 dos horas posinfección.

**Figura 16.** Cultivo celular RK13 con cepa 684 tres horas posinfección.

**Figura 17.**Cultivo celular RK13 con cepa 627-05 posinfección una hora.

**Figura 18.** Cultivo celular RK13 con cepa 627-05 dos horas posinfección.

**Figura 19.** Cultivo celular RK13 con cepa 627-05 tres horas posinfección.

## I. RESUMEN

Los mecanismos de interacción huésped-patógeno han despertado gran interés, por la alta incidencia a ciertas adaptaciones que han generado los patógenos como es el caso de resistencia ante los fármacos, lo que ha orillado a hacer uso de modelos *in vivo* o *in vitro* y el empleo de cultivos celulares ha facilitado su mantenimiento, control de variables y reproducibilidad de los experimentos.

En este trabajo, se describe un modelo *in vitro*, con cultivo de células RK13, aplicado a evaluar la morfología y comportamiento de los filamentos del citoesqueleto, ante los mecanismos patogénicos de *Candida albicans* en distintos tiempos de exposición.

El trabajo presente se realizó dividiendo los cultivos celulares en distintos grupos: controles sin infectar, infectadas con una cepa de referencia e infectadas con 3 cepas de aislados clínicos, para cada cepa se hicieron observaciones a 3 diferentes tiempos (1, 2 y 3 h postinfección). Las células se cultivaron en cubreobjetos y se infectaron con las diferentes cepas de la levadura, mientras que al grupo control solo se adicionó medio de cultivo. Las células se incubaron bajo las mismas condiciones y tiempos. Se evaluaron los cambios en los filamentos de actina mediante la técnica de fluorescencia directa, marcando los filamentos con faloidina conjugada a rodamina. Los cultivos se valoraron bajo microscopía óptica y posteriormente se observaron con un microscopio de fluorescencia para evaluar los cambios en el citoesqueleto de actina. Los resultados obtenidos fueron que en las células RK13 infectadas se observaron cambios en la morfología celular, rearrreglos de los filamentos de actina formando agregados de actina en los sitios de contacto con las levaduras, desaparición de las fibras de estrés, cúmulos de actina alrededor del tubo germinativo en células que estaban siendo invadidas por *C. albicans*. Se observaron algunas diferencias en los rearrreglos de los filamentos de actina entre las cepas en estudio. En conclusión la exposición de las células RK13 a *Cándida albicans* conduce a alteraciones en la morfología celular acompañados de rearrreglos de los filamentos de actina.

## II. INTRODUCCIÓN

Las células son la unidad básica de la vida, constituida por diversas estructuras como el núcleo, citoplasma, retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, lisosomas, mitocondrias, citoesqueleto y otros orgánulos. (Alberts et al., 2015)

El citoesqueleto es una red compleja de filamentos proteicos que se rearreglan de manera dinámica y continua a medida que la célula cambia de forma, se divide y responde ante estímulos de su ambiente, llevando a cabo la organización de componentes internos, la interacción mecánica, el desplazamiento y la contracción. El citoesqueleto está constituido por tres tipos de filamentos: filamentos intermedios, microtúbulos y filamentos de actina (microfilamentos), formados por proteínas específicas para cada uno de ellos, llevan a cabo diversas funciones y se caracterizan por poseer diferentes propiedades mecánicas. (Cossart et al., 2005)

Los filamentos de actina son esenciales para el desplazamiento de las células, pueden formar estructuras rígidas como las microvellosidades, o bien dinámicas como los haces contráctiles en citoplasma, proyecciones laminares (lamelipodios), digitiformes (filopodios) o en forma de copa (pseudópodos) y el anillo contráctil durante la división celular.

La reorganización de los filamentos de actina juega un papel importante en la difusión de patógenos bacterianos intracelulares como *Listeria*, *Shigella* y *Salmonella* dentro de los órganos infectados (Atre et al., 2008). De una manera similar, se ha observado que la remodelación del citoesqueleto de actina sea un posible mecanismo para la propagación de *C. albicans*, llegando a causar Candidiasis (Cheng et al., 2005). También ha sido reportado un fenómeno de endocitosis a través de la formación de pseudópodos que rodean a las hifas de *Candida albicans* en células no fagocíticas (fibroblastos, epiteliales y endoteliales) que pudieran permitir la colonización de los tejidos hasta llevarlo a la muerte. (Vazquez-Torres y Balish, 1997; Bodo et al., 1995; Drago et al., 2000; Tsarfaty et al., 2000)

*Candida albicans* es un patógeno nosocomial que forma parte de la flora de la piel, las mucosas, el tracto gastrointestinal y el aparato genitourinario del ser humano, es el agente causante más frecuente de severas infecciones fúngicas sistémicas que pueden ser de tipo superficial o profunda (Odds, 1988; Braun et al., 2001; Alvarez-Rueda et al., 2012), este patógeno oportunista está muy extendido y es un riesgo constante para los pacientes inmunocomprometidos o con otros factores graves desencadenantes, siendo esta la especie que origina un mayor número de candidiasis.

Se presentan como organismos unicelulares (levaduras), producen filamentos (hifas y pseudohifas) tanto *in vivo* como *in vitro*. Han desarrollado una gran variedad de mecanismos de señalización y adaptación con el fin de persistir y proliferar en diferentes ambientes, haciendo uso de diversos factores de virulencia asociados con el dimorfismo de *C. albicans*, lo que la hace un colonizador eficaz del cuerpo humano causando finalmente enfermedades.

### III. ANTECEDENTES

#### 1. Características generales de *Candida albicans*

El género *Cándida* es un grupo heterogéneo de levaduras, por carecer de reproducción sexuada se incluyen dentro de los hongos imperfectos, la clasificación taxonómica tomando en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras se las incluye en las subdivisiones: (Brasoli, M., 2013)

Super Reino: Eucarya

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Filo: Ascomycota

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Género: *Candida*

Especie: *albicans*

Las especies de *Candida albicans* son dimórficas, presentando blastosporas y pseudomicelio o micelio verdadero, que lo más frecuente es que exista cuando el hongo se comporta como patógeno.

La estrategia general de identificación de los miembros del género *Candida* se basa en procedimientos convencionales como fermentación y auxonotrofia de azúcares, así también la morfología en un preparado de agar en el cual las colonias obtenidas son generalmente lisas, blandas, brillantes, de color blanco o ligeramente beige, que con el tiempo pueden tornarse rugosas, plegadas o membranosas. Microscópicamente presentan formas esféricas u ovoides, de paredes delgadas, brotantes, con pseudomicelio escaso o ausente (Forbes, 2009).

La identificación específica de *C. albicans* se basa en la formación de tubo germinativo o formación de clamidoconidios, se han implementado técnicas inmunológicas comercializadas con antígenos para la detección de anticuerpos antimananos (ELISA) y antimicelio de *Candida spp* (IFI), de igual manera métodos enzimáticos y otros nuevos avances en técnicas moleculares en hibridación (Prats, 2006).

## **2. Infecciones causadas por *Candida albicans***

Las infecciones causadas por especies del género *Candida* suelen disponerse como organismos unicelulares (levaduras), aunque pueden producir filamentos (hifas y pseudohifas) tanto *in vivo* como *in vitro*. *Candida albicans* es la especie que origina un mayor número de candidosis, quizá el 50% de todas ellas.

El desarrollo de enfermedades por *Candida* depende de la interacción de ciertos factores:

- Factores predisponentes para la infección.
- Patogenicidad intrínseca del microorganismo.
- Mecanismos de defensa del huésped.

De acuerdo a su localización se pueden distinguir las siguientes patologías (Brasoli, 2013).

Cutánea: grandes y pequeños pliegues; en uñas onixis blastomicética y el granuloma candidásico.

Mucocutáneas: Mucosa oral: muguet, glositis, quelitis

Mucosa genital: vaginitis y balanitis

Mucosa digestiva: esofagitis, gastritis, enteritis y lesiones perianales

Mucosa bronquial Candidiasis mucocutánea crónica

Candidiasis

Invasiva y/o localizada (en diferentes órganos)

Candidemia: transitoria o persistente

Candidiasis sistémica o diseminada: Crónica y aguda

### **3. Mecanismos de infección y factores de virulencia de *C. albicans***

*Candida albicans* tiene varios atributos de virulencia para colonizar el huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo.

Existen diversos factores potenciales de virulencia, como la morfología celular, la actividad enzimática extracelular, el cambio fenotípico y los factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas.

Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del huésped.

El delicado equilibrio entre el huésped y el hongo patógeno puede convertirse en una relación parasitaria y resultar en enfermedades graves. A continuación se describen independientemente cada uno de los factores de virulencia:

### 3.1. Morfogénesis

*Candida albicans* es polimórfica, ya que existe en forma de levadura (blastosporas) o como filamentos (pseudohifa o hifa). La morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa que puede convertirse de forma reversible a levaduras, con crecimiento de hifa o pseudohifa.

Según Mitchell et al., (1998), la formación de hifa se estimula a 37°C en presencia de suero, con pH neutro. Los tubos germinativos son más adherentes a las células mamíferas a diferencia de las levaduras y la adherencia es el requisito para la penetración tisular.

Las levaduras producen filamentos dentro de los macrófagos y son capaces de lisar a éstos, por lo tanto, la formación de filamentos es una forma de evadir los mecanismos de defensa del huésped (Cutler JE, 1991; Gow et al., 2002).

Esta conversión es esencial para la virulencia de *Candida albicans*, lo que la capacita para invadir los tejidos. Se ha comprobado que el crecimiento de la forma filamentosa se produce en el estado temprano de la colonización, y le da ventajas sobre la penetración de la célula o tejido. La hifa puede ser idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares, gracias a que su punta es el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, esto facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos. (Hube y Naglik J., 2005; Allistair JP, 1999). Durante la infección este filamento se revierte conforme avanza y quizá sea el resultado de cambios temporales en señales que el hongo recibe de su medio ambiente (Figura 1.)

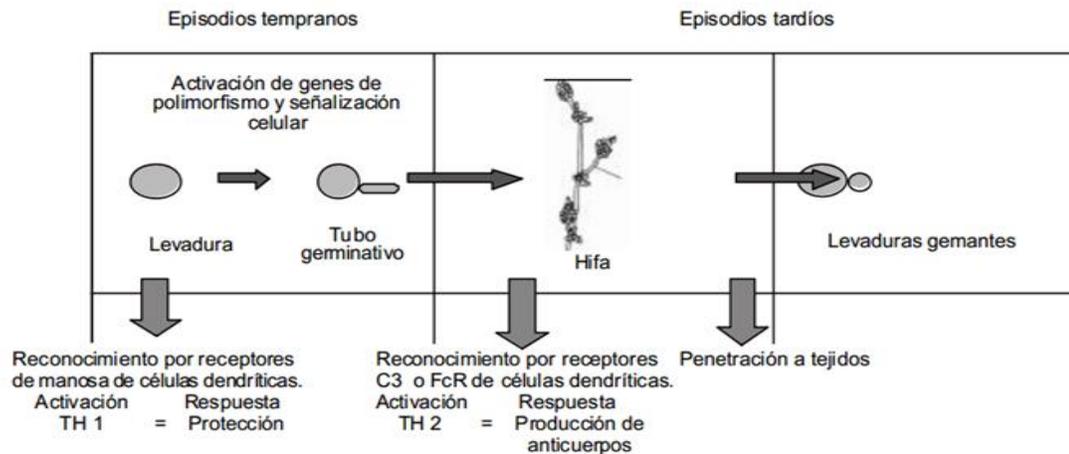


Figura 1. Morfogénesis de *Candida albicans* durante la infección (Tomado de Castrillón, 2005).

### 3.2. Enzimas

Las enzimas pueden proponerse como determinantes de virulencia en *Cándida*, ya que tienen la capacidad de activar o inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Cándida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas.

#### a) Proteasas

Una gran familia de enzimas de secreción, las aspartil proteinasas (Saps) secretadas son codificadas por los genes de la familia SAP; sus distintos miembros se expresan bajo una variedad de condiciones de crecimiento de laboratorio y durante las infecciones experimentales *in vivo* e *in vitro*. Proporcionan al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista. Se ha demostrado que SAP1-3 y SAP6 son importantes en la infección oral, mientras que SAP1 y SAP2 lo son en la candidiasis vaginal. El papel de dichas enzimas es esencial en las infecciones de mucosas en las fases iniciales, pero no cuando el hongo se ha infiltrado en los vasos sanguíneos.

## **b) Fosfolipasas**

Enzimas hidrolíticas secretadas, en particular las fosfolipasas, se han relacionado con la patobiología de *Candida albicans* (Ghannoum MA, 2003). Por análisis de Southern Blot, se ha demostrado la presencia de homólogos de fosfolipasa intracelular (CAPLC1), también se han identificado cuatro fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD), de las cuales sólo la PLB1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia en modelo animal de candidiasis, PLB1A es una glucoproteína de 84 kDa, que tiene actividad de hidrolasa y lisofosfolipasa transacilasa. Se secreta y detecta en la parte terminal de las hifas durante la invasión a los tejidos.

## **c) Lipasas**

Las lipasas secretadas por *Candida albicans* se codifican por una familia de genes con al menos 10 miembros (LIP1-LIP10). El patrón de expresión se ha investigado en infecciones experimentales y en pacientes que sufren candidiasis oral. Se ha demostrado que la expresión de esos genes depende del estado de infección, más que de la localización del órgano.

## **3.3. Adhesinas**

Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del huésped o a sus ligandos específicos. Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV (Sturtevant J, Calderone R. 1997; Hostetter MK, 1994).

Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p. Algunos de los factores de virulencia más ampliamente investigados de *Candida* incluyen su capacidad para adherirse a los tejidos del huésped y de penetrar en estos tejidos (Argimon et al., 2007; Filler, 2006; Gow et al., 2002; Rooney y Klein, 2002).

**a) ALS**

Es una proteína con un residuo hidrofóbico carboxilo terminal que sugiere un ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI). El ligando de unión se asocia con el residuo amino terminal de la proteína (Cutler JE, 1991; Gow, Allistair, Odds ,2002). Las proteínas Als están densamente N- y O-glucosiladas, sobre todo en la región de repetición variable rica en serina/ treonina y en los dominios carboxilo terminal.

**b) Hwp1p**

El gen Hwp1 codifica una manoproteína de la superficie externa que se cree se orienta por su dominio amino terminal expuesto hacia fuera. El carboxilo terminal se integra de manera covalente con el  $\beta$ -glucano de la pared celular.

La proteína codificada por este gen (o Hwp1) sirve como sustrato de las transglutaminasas y, por lo tanto, la unión de la hifa de *C. albicans* a las células epiteliales aunque debería ser estable y no revertirse por el uso de agentes que interrumpen la unión no covalente.

**c) Int1p**

*Candida albicans* se une a varios ligandos de las proteínas de la matriz extracelular, que incluyen fibronectina, laminina y colágenas tipo I y IV.

Las cepas que tienen delección en los genes Int1 son menos virulentas o se adhieren con más lentitud a las líneas celulares epiteliales. También tienen deficiencias en la filamentación en su crecimiento en leche-tween y agar, por lo tanto, el gen Int1 juega un papel importante en la adherencia y filamentación de *C. albicans*. (Gale, 1998).

#### **d) Mnt1p**

Es una proteína de membrana tipo II que se requiere para la manosilación. La proteína que codifica a este gen o Mnt1p, las cepas de *C. albicans* que tienen deleción en el gen  $\alpha$ -1,2 manosil transferasa (Mnt1) son menos capaces de adherirse *in vitro* y son avirulentas (Burman, 1998).

### **3.4. “Switching” o Variabilidad Fenotípica y Antigénica (Ambiental)**

Durante los diferentes estados y tipos de infección las células del hongo necesitan amplia flexibilidad, ya que cada sitio anatómico tiene sus propias presiones ambientales. Por lo que se cree que tenga una gran variedad de genes que codifiquen para factores de virulencia adaptable a un amplio rango de condiciones ambientales, en las que el hongo se encuentra durante su crecimiento *in vivo*.

#### **a) Adaptación al pH.**

*C. albicans* se adapta a los cambios de pH de diversos medios y sustratos, la cual está regulada por dos genes, PHR1 y PHR2 que se activan e inactivan dependiente de las condiciones de pH; PHR1 se activa en ambientes de 5.5 o superiores, mientras que PHR2 en condiciones menores. La supresión de uno o de otro condiciona la morfogénesis y su virulencia.

### **3.5. Formación de Biopelícula**

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos unidos irreversiblemente a una superficie que contiene matriz exopolimérica y muestra propiedades fenotípicas distintivas. Son diferentes de sus contrapartes planctónicas, como el incremento en la resistencia a los agentes antimicrobianos y la protección de las defensas del huésped. (Kobayashi SD y Cutler JE, 1998).

La formación de biopelículas de *C. albicans* se distingue por la adhesión inicial de las células de levadura, seguida por la germinación y formación de microcolonias,

filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración.(Castrillón et al., 2005; Hernandez, 2013).

#### **4. Adherencia e invasividad de *Candida albicans* de comensalismo a patogenicidad**

Un atributo de *Candida albicans* es que correlaciona de forma positiva, su patogenicidad con la capacidad adherente a las células del huésped. Las cepas adherentes de *C. albicans* son más patógenas que las que tienen fenotipo menos adherente. La unión de *Candida* a las células del huésped es la etapa inicial en el proceso infeccioso, lo que permite a los microorganismos sobrevivir dentro del mismo y finalmente, colonizar los tejidos durante el desarrollo de candidiasis. Varios componentes de la pared celular fúngica tales como quitina,  $\beta$ -glucanos, y los lípidos pueden participar en el proceso de adhesión, proteínas y manoproteínas (adhesinas) de superficie específicos son los mediadores más importantes de dicha interacción (De Relleno, 2006). Todas estas proteínas interactúan con componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, fibrinógeno, o colágeno) y una variedad de receptores fagocíticos y no fagocíticos, incluyendo los receptores tipo Toll y proteína de adhesión N – cadherina (Filler, 2006; Relleno y Sheppard, 2006; Phan et al., 2005).

Después de la adhesión de la levadura al receptor de membrana celular, el siguiente paso en el proceso de infección es su internalización en la célula. Una vez dentro de la célula, la mayoría de las levaduras se degrada con el tiempo, aunque algunas pueden sobrevivir (Filler, 2006; Relleno y Sheppard, 2006; Lorenz et al., 2004).

La internalización y la supervivencia de la levadura se puede observar en sistemas *in vitro* en los que los macrófagos u otras células no fagocíticas están infectadas por *C. albicans*. Una vez dentro de la célula, la forma de levadura se diferencia en

la forma de hifas filamentosas y logra inducir al anfitrión a lisis celular (Filler y Sheppard, 2006; Lorenz et al., 2004).

No se sabe si la proliferación comensal de *C.albicans* en las superficies se produce principalmente en la capa mucosa, al igual que otros miembros de la flora microbiana, o si las células fúngicas se encuentran en contacto físico con células epiteliales. Durante la patogénesis, existen tres diferentes etapas dinámicas: Durante estos procesos, la inflamación, es una característica de la enfermedad fúngica y puede ser tomado como la transición de un comensal a una patógena.

#### **4.1 Adhesión**

La adhesión a otras células fúngicas o bacterianas de la flora común es requerida tanto para comensalismo y patogénesis. En especies de *Candida*, la adhesión está mediada por algunos factores de adhesión caracterizados como miembros de la familia Als, Hwp1, EAP y otras proteínas asociadas a la membrana o pared como proteínas GPI (vinculados a la pared celular o membrana celular), que están expuestas a las células de superficie.

#### **4.2 Invasión**

La invasión de *C. albicans* en células no fagocíticas es dependiente de la formación de hifas y pueden ocurrir a través de dos rutas diferentes (figura3):

##### **a) Endocitosis inducida**

Es una actividad impulsada por enzimas invasoras asociadas a la formación de hifa, en particular ALS3, se unen a un receptor de las células epiteliales o endoteliales (E-cadherina, N-cadherina).

##### **b) Penetración activa**

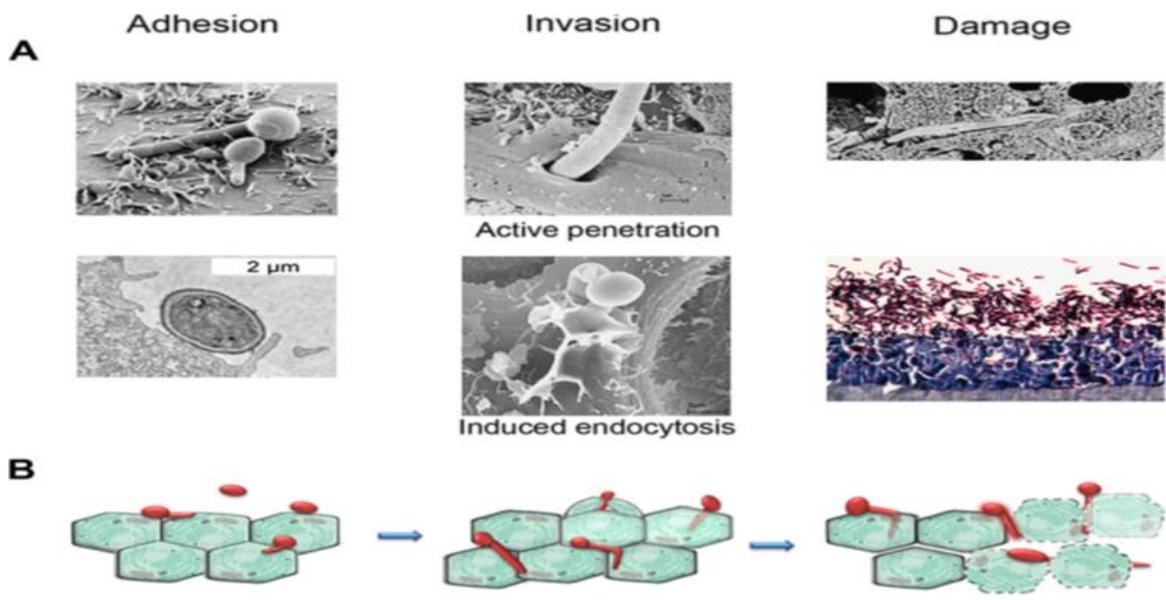
Afecta directamente en las células del huésped, requiere la turgencia de levaduras, la integridad de la pared celular, la extensión de las hifas y otras fuerzas físicas (Naglik J.R., F. Fostira, et al., 2006). Aunque parece obvio que la invasión es la etapa mortal para la célula, *C. albicans* tiene un comportamiento impredecible, ya que como comensal invade moderadamente con el fin de

mantener un punto de apoyo en la proliferación y para evitar ser desprendido de las superficies epiteliales.

### 4.3. Daños

La inducción de daño al huésped es una característica clave de la patogénesis. Estos daños causados directamente por el hongo ocurren cuando las hifas invaden profundamente a las células del huésped (invasión interepitelial) y es potenciada por factores de virulencia tales como la secreción de moléculas. Sin embargo, el daño tisular y la enfermedad no se produce sólo por la actividad directa de los hongos, también implica la activación del sistema inmune, por ejemplo infiltración masiva de neutrófilos, finalmente, una desequilibrada respuesta sistémica pone en peligro la vida causando sepsis.

Por lo tanto, el reconocimiento inmune no sólo puede ser beneficioso y esencial para la lucha contra la invasión de los hongos, sino también ser una parte integral del proceso de la enfermedad. (Naglik, et. al. 2011)



**Figura 2.** .Etapas de infección por *C. albicans*, adhesión, invasión a través de dos rutas diferentes (invasión activa y la endocitosis inducida), y daño tisular. (A) Micrografías de escaneo y transmisión de electrones y la histología del tejido epitelial. (B) Representación esquemática de las tres distintas etapas que incluyen factores y actividades que están involucrados. (Tomado de Naglik, et. al. 2011)

## **5. Citoesqueleto**

### **a) Generalidades**

El citoesqueleto es una red compleja de filamentos proteicos que se rearreglan de manera dinámica y continua a medida que la célula cambia de forma, se divide y responde ante estímulos de su ambiente, llevando a cabo la organización de componentes internos, la interacción mecánica, el desplazamiento y la contracción (Alberts et al., 2015; Cossart et al., 2005).

El citoesqueleto está constituido por tres tipos de filamentos: filamentos intermedios (FI), microtúbulos y filamentos de actina, cada tipo de filamento tiene diferentes propiedades mecánicas y composiciones proteicas distintas. Los filamentos de actina son esenciales para el desplazamiento de las células, pueden formar estructuras rígidas como las microvellosidades, o bien dinámicas como los haces contráctiles en citoplasma, proyecciones laminares (lamelipodios), digitiformes (filopodios) o en forma de copa (pseudópodos) y el anillo contráctil durante la división celular.

Los FI son componentes del citoesqueleto formados por la polimerización de una familia de proteínas fibrosas que resultan en redes transcelulares y son integradores mecánicos del espacio celular. Existen dos grandes clases de FI, los nucleares y los citoplasmáticos; los FI nucleares están formados a su vez por las láminas nucleares que constituyen una maya por la cara interna de la envoltura nuclear. Mientras que los citoplasmáticos incluyen 3 familias de proteínas, las citoqueratinas, las vimentinas y los neurofilamentos, todos ellos formando redes filamentosas que cruzan el citoplasma celular. La función principal es de dar soporte mecánico a la célula. (Batchelor, 2004)

Los microtúbulos son estructuras filamentosas huecas formadas por la polimerización del dímero de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, proteína globular que une GTP. Toman su origen el centrosoma (principal centro organizador de microtúbulos) y se distribuyen por todo el citoplasma. Se relacionan principalmente con la organización interna de la célula, el transporte intracelular, la formación del huso mitótico, el movimiento ciliar y flagelar.

La actina es una proteína globular que une ATP, es una de las proteínas más abundantes de la célula y se presenta en dos formas, actina-G o globular y actina-F o filamentosa. Se localiza en el citoplasma formando los filamentos de actina, principalmente estructurados en forma de red en la corteza celular o bien formando haces paralelos, como aquellos que dan soporte a las microvellosidades o haces contráctiles como las fibras de tensión. Su función es dar forma y movimiento a la célula. (Welch y Mullis, 2002).

En los microtúbulos y en los filamentos de actina, los dímeros de túbulina o monómeros de actina se arreglan en una disposición de cabeza /cola, impartiendo una polaridad molecular y definiendo así dos extremos bioquímicamente diferentes, un extremo positivo (+) y el otro extremo negativo (-). Mientras que en los FI tienen un rearrreglo antiparalelo por lo que no presentan polaridad.

#### **b) Filamentos de actina**

Los filamentos de actina, también conocidos como microfilamentos, forman estructuras muy dinámicas; miden entre los 5-9 nm de diámetro y están formados por la unión no covalente de subunidades de G-actina dispuestas en una doble hélice de 7 monómeros por vuelta. Los monómeros de actina presentan una hendidura hacia el centro de la molécula a la que une ATP o ADP, por lo que la molécula puede hidrolizar ATP o intercambiar ADP por ATP. Su conformación difiere a si está unida a ATP o ADP.

Cuando la G-actina está unida ATP se favorece la incorporación al filamento (polimerización), ya en el filamento los monómeros hidrolizan el ATP a ADP+Pi, este último es dissociado pero el ADP es retenido en el monómero de actina que como consecuencia sufre un cambio de conformación y es eliminado del filamento (despolimerización). Una vez libre puede intercambiar ADP por ATP cuya concentración es más alta en el citoplasma y vuelve a unirse al filamento para polimerizar. (Alberts et al., 2015; Pollard 1986).

Los filamentos de actina, como ya se mencionó son moléculas polares, lo cual tiene implicaciones sobre su dinámica, pueden polimerizar en ambos extremos, pero la velocidad varía, siendo mayor en el extremo (+) que en el extremo (-), de

ahí su nombre. Para que cada uno de los extremos polimerice requiere una concentración mínima de monómeros libres de actina, conocida como concentración crítica, la cual es menor para el extremo (+) lo que significa que se requiere una menor concentración de actina para que este extremo polimerice, por lo que para producir una polimerización en cualquiera de sus extremos se requiere que la concentración mínima de monómeros sea superior a la concentración crítica de cada extremo, por tanto la tasa de polimerización está en función de la cantidad de actina monomérica libre. Las condiciones fisiológicas mantienen la concentración de actina en un nivel estándar que permite la adición de monómeros en el extremo positivo y la eliminación en el extremo negativo, por lo que no hay un crecimiento neto y los filamentos se encuentran en fase de equilibrio y se conoce como treadmilling, es decir, el filamento mantiene su tamaño, pues la velocidad en la que se agregan monómeros en el extremo positivo es igual a la velocidad en la que va perdiendo en el extremo negativo (Alberts et al., 2015)

### **c) Proteínas de unión a actina**

El comportamiento fisiológico de la dinámica de los filamentos de actina es regulado por una serie de proteínas conocidas como proteínas de unión a actina (ABP por sus siglas en inglés), si no se tiene alguna ABP, son completamente inestables y pueden despolimerizarse desde ambos extremos, estas proteínas mantienen la cantidad de monómeros de actina y con ello regular la polimerización de los filamentos (Alberts et al., 2015; Gouin et al., 2005).

Dentro de estas proteínas esta la timosina  $\beta$ -4 que se une a la ADP-actina evitando la polimerización. La profilina se une a la actina no polimerizada formando un complejo y la activa para la polimerización. Ambas proteínas actúan en conjunto manteniendo la concentración efectiva de actina libre para polimerizar. Los mecanismos que afecten el complejo de la profilina-actina modificarán la polimerización de las moléculas de actina.

Otras ABP son las proteínas de caperuza (capping) que se unen en uno u otro extremo del filamento, permiten que el polímero se una a otras estructuras y

controla la adición o pérdida de subunidades por cualquiera de los extremos. La cofilina es una proteína que segmenta los filamentos y favorece la despolimerización de actina.

El complejo Arp2/3 es un complejo proteico que actúa como nucleador de la actina para su polimerización, además que puede unirse a filamentos preformados y formar redes dendríticas (Alberts et al., 2015).

Así mismo existen proteínas motoras, las miosinas, que se unen a los filamentos de actina que permite la formación de haces contráctiles o el transporte intracelular de organelos. Dentro de las estructuras formadas por actina y miosina se tiene como ejemplo la sarcomera que forma la unidad morfofuncional de la contracción del músculo estriado.

En células no musculares los filamentos de actina forman haces que proporcionan soporte mecánico, expansiones citoplasmáticas y forman sistemas contráctiles en conjunto a la miosina para los movimientos celulares, en los filamentos de actina pueden provocar que de la membrana celular se formen estructuras como las microespinas, filopodios y lamelipodios, estructuras que se involucran con la motilidad celular, para fagocitosis, las fibras de actina forman los pseudópodos y en el citoplasma forman haces contráctiles que se cruzan entre si formando estructuras llamadas fibras de tensión, que colaboran al dar soporte a la célula y terminan en la membrana celular en sitios en los que la célula se une al sustrato, las adhesiones focales. Estas fibras de tensión se forman por haces antiparalelos contráctiles, estabilizados a través de ABP's como son  $\alpha$ -actinina y tropomiosina. Entre los haces de actina se unen proteínas motoras, miosinas, que permiten el deslizamiento de unos filamentos en otros produciendo la contractibilidad y tensión de estas fibras (Gouin et al., 2005).

#### **d) Patógenos y filamentos de actina**

La mayoría de los patógenos toman los procesos moleculares de la célula huésped para crear un nicho especializado que mejora su supervivencia. Muchos microbios patógenos que invaden las células no fagocíticas inducen alteraciones

visibles en las estructuras que lo conforman. Numerosos estudios han demostrado que bacterias y hongos manipulan el citoesqueleto de células diana eucariotas no fagocíticas para promover su internalización, la motilidad y supervivencia intracelular (Finlay et al., 1991; Gouin et al., 1999; Hayward y Koronakis, 1999, 2002; Almeida et al., 2000; McGhie et al., 2001; Sukumaran y Prasadarao, 2002; Gruenheid y Finlay, 2003; Benedek et al., 2004; Bodo et al., 1995; Segal y Sandovsky-Losica, 1997; Wasylnka & Moore, 2002; Chen et al., 2003; Ibrahim Granet et al., 2003; Mendes-Giannini et al., 2004)

Actualmente existe gran interés por estudiar los mecanismos moleculares subyacentes en la interacción patógeno-huésped para conocer con detalle los mecanismos utilizados por los patógenos en apropiarse de la maquinaria celular para su beneficio, y para tal fin, tres aspectos fundamentales son blanco perfecto: el citoesqueleto, las vías de señalización y la maquinaria genómica (Chen, 2005; Frankel, 2004). Los agentes patógenos manipulan los filamentos de actina, reprogramando rápidamente y radicalmente a la célula huésped controlando su polimerización y despolimerización con el fin de adherirse, internarse y moverse. Otros cuentan con mecanismos moleculares para exportar proteínas efectoras al citoplasma de la célula y manipular el citoesqueleto para interactuar extracelularmente. (Gruenheid y Finlay, 2003; Gouin et al., 2005; Marjomäki y Schaible, 2005).

El citoesqueleto es uno de los objetivos más importantes para microorganismos durante la unión y la invasión del huésped células. Los estudios de Atre et al., (2008) demostraron que la punta de las hifas induce como consecuencia pseudópodos en las células de córnea y las hifas fúngicas penetran y se infiltran en las células huésped a partir de la punta del pseudópodo. Después la polimerización de la actina local rodeaba las hifas y los filamentos de actina, recién agrupados formaban una estructura rígida en forma de anillo con un diámetro interior de 1.8 a 2.0  $\mu\text{m}$  a través del cual las hifas invadían a la célula huésped.

Este fenómeno se ha observado en células SIRC, MDCK (riñón canino), HepG2 (hepatocelular humano carcinoma de hígado), G-361 (melanoma de piel humana) y células en suspensión SP2 / OAg14 (mieloma de ratón) (Zink et al., 1996; Káposzta et al., 1999; Tsarfaty et al., 2000).

Otros ejemplos, en el caso de las bacterias *Shigella* y *Listeria*, inducen estructuras similares a las colas de cometas (Theriot, 1995) y *Escherichia coli* ocasiona la polimerización, que lleva a la formación de pedestales en las células (Vallance y Finlay, 2000)

Muchos patógenos bacterianos invasores de células epiteliales alteran la polimerización de actina mediante la modulación de la actividad de las proteínas de la familia de las Rho GTPasas. Bacterias invasoras tales como *Salmonella* y *Shigella* modulan la actividad de Cdc42 y Rac1, mientras *Brucella*, *Chlamydia*, *Pseudomonas* y *Bartonella* actúan sobre a Rho (Finlay, 2005). Informes hasta la fecha indican que cada patógeno modula uno o dos miembros de la familia de Rho GTPasas durante la invasión celular.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El género *Candida* ha cobrado importancia como uno de los agentes de infección nosocomiales. Es considerable el aumento de candidiasis superficial y profunda, esta última la más común, observada en pacientes en unidades de cuidados intensivos y otros individuos inmunocomprometidos sometidos a protocolos terapéuticos pesados.

Lo anterior ha llevado a investigar de forma más precisa la patogenia de las infecciones ocasionadas por esta levadura y dentro de este punto, la interacción entre *C. albicans* y las células del organismo que infectan para dilucidar los mecanismos que permiten pasar de un estado inofensivo a un patógeno agresivo. Con el uso de los modelos *in vitro* de infección se ha buscado reproducir la forma en la que los patógenos alteran la estructura celular y en particular se ha descrito a los filamentos de actina como uno de los principales blancos para diferentes patógenos; persiguiendo que los eventos observados en dichos modelos sean lo más parecido a lo que sucede de manera natural y de esta forma poder analizar a nivel celular y subcelular los mecanismos que subyacen a la interacción patógeno-huésped (Álvarez- Rueda, 2012). Es así que en este trabajo buscamos identificar como parte de la patogenia de la infección de los distintos aislados de *C. albicans* los efectos sobre los filamentos de actina de células RK13 en cultivo. Se espera que con los resultados de este trabajo se contribuya a comprender los mecanismos de infectividad de *C. albicans* que ayuden a futuras investigaciones encaminadas a la prevención y tratamiento de las infecciones ocasionadas por este agente patógeno.

## **V. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar y comparar los rearrreglos en los filamentos de actina que sufre la línea celular RK13 al interactuar con *C. albicans* de distintos aislados anatómicos y a diferentes tiempos de infección, mediante ensayos de fluorescencia.

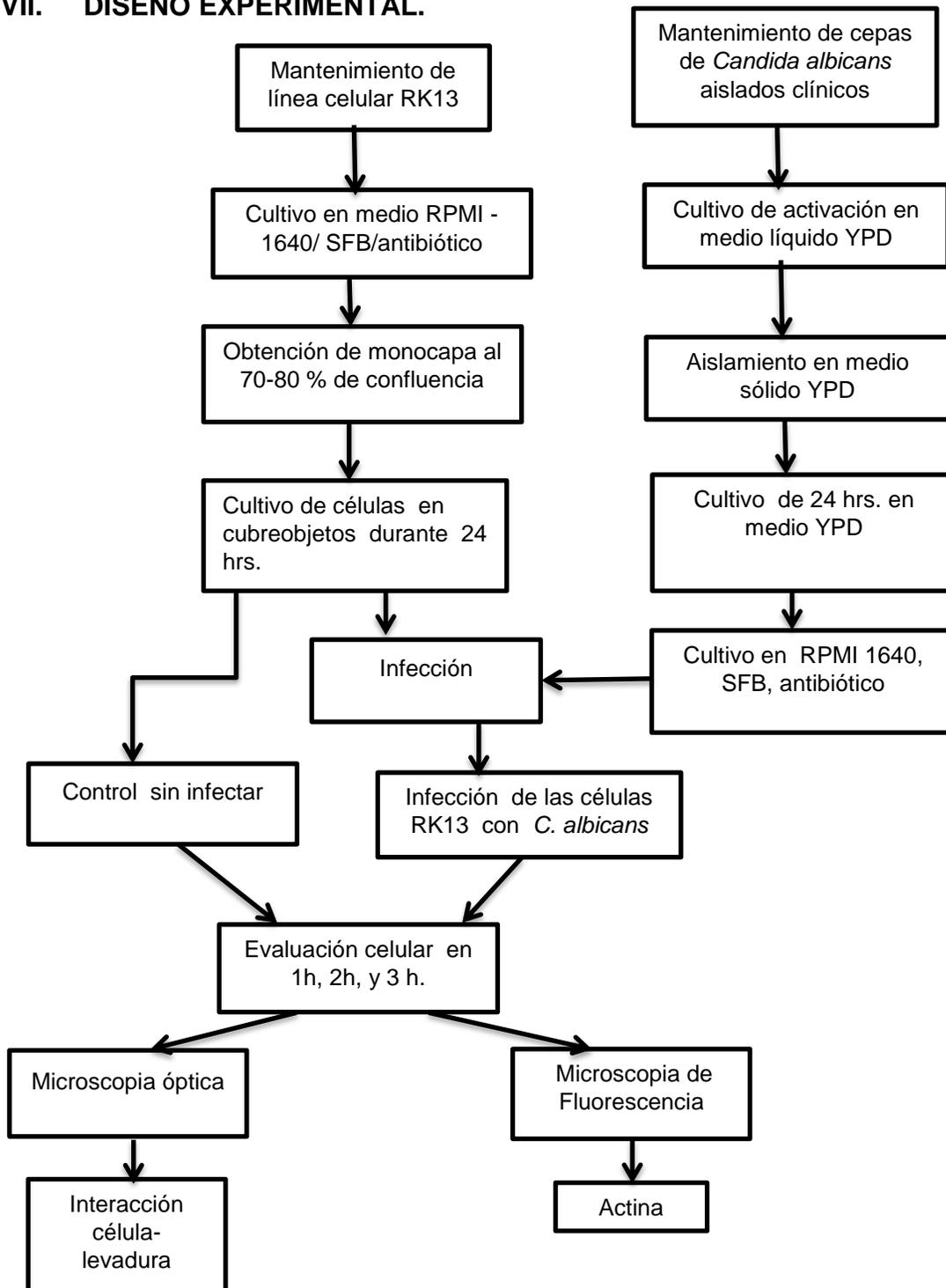
### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar el marcaje de filamentos de actina con faloidina conjugada a rodamina en cultivos de células RK13 mediante la técnica de fluorescencia directa.
- Estandarizar la técnica de infección de cultivos de células RK13 con *Candida albicans* y evaluar la interacción de la levadura con las células en cultivo mediante microscopía óptica.
- Determinar mediante ensayos de fluorescencia directa las alteraciones de los filamentos de actina en células RK13 infectadas con *Candida albicans*.

## **VI. HIPÓTESIS**

*Candida albicans* provoca rearrreglos de los filamentos de actina en la célula huésped RK13, ocasionando alteraciones en las estructuras conformadas por estos filamentos durante el proceso de infección (adherencia e invasión).

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.



## **VIII. MÉTODO.**

### **1. Cultivo de *Candida albicans* y condiciones de crecimiento.**

Se emplearon tres cepas de *C. albicans* de aislados clínicos (donadas por el laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina, UNAM, denominadas 684 y 520, tomadas de cavidad oral y 627-05, obtenida de piel), así mismo se empleó una cepa de referencia *C. albicans* (ATCC 10231) que se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD). El cultivo de mantenimiento de todas las cepas se realizó a 37°C en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 1% dextrosa). Las levaduras se crecieron de forma rutinaria durante toda la noche con agitación continua (250 rpm).

La identificación cualitativa de *Candida albicans* se realizó mediante la formación de tubo germinativo, la cual se consigue suspendiendo las levaduras en medio RPMI 1640 ( $3 \times 10^6$  organismos por ml) complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se incubaron en un agitador rotatorio a 37°C durante 90 min. Se ha reportado que más del 90% de los organismos produce tubos germinales cuando se cultivan bajo estas condiciones (Pacheco et al., 2007).

### **2. Cultivo de la Línea Celular RK13.**

Se empleó la línea celular RK13 (ATCC CCL37) para los experimentos de infección con *Candida albicans*. Las células se propagaron en cajas de cultivo celular y se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 adicionado con SFB al 10% y antibióticos (estreptomina 100 µg/ml-penicilina 100 UI/ml) hasta una confluencia del 70 al 80% de células.

### **3. Infección de la línea celular RK13 con distintos aislados de *C. albicans***

Los ensayos de infección se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito por Atre et al., (2009) con algunas modificaciones. Las células RK13 se cultivaron en monocapa sobre cubreobjetos hasta que alcanzaron una confluencia del 70%, bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se infectaron con *C. albicans* ( $1 \times 10^6$  células) de los distintos aislados clínicos (684,520 y 627-05), utilizando una cepa de referencia (ATCC 10231) a una multiplicidad de infección de 5 y un cultivo

celular control sin infectar. Las infecciones se monitorearon por un período de 1, 2 y 3 horas, para cada una de las cepas utilizadas.

Posteriormente se realizó la evaluación de la interacción de la levadura con las células en cultivo así como los cambios morfológicos ocasionados, para las 4 cepas en estudio y en cada uno de los tiempos de infección señalados. Para esto, se retiró el medio de cultivo y mediante lavados con PBS estéril se eliminaron las levaduras no adheridas. Los ensayos se realizaron por triplicado y se observaron mediante microscopía campo claro.

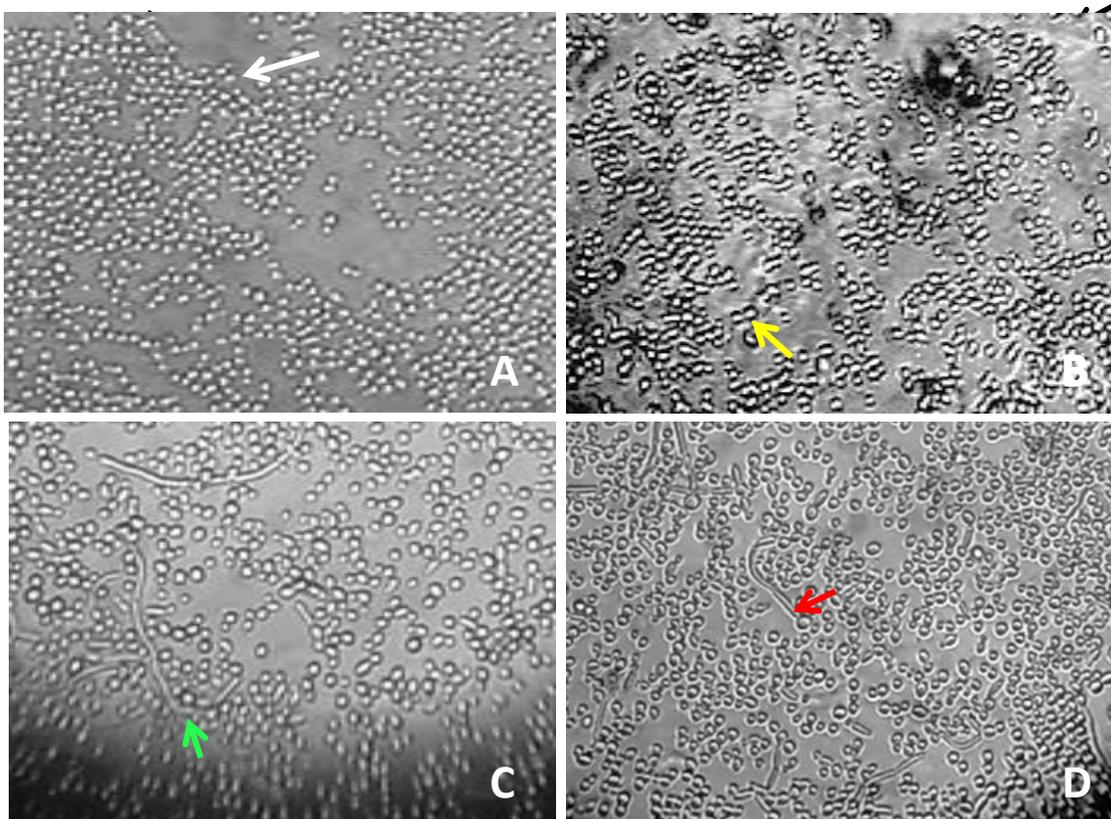
#### **4. Ensayos de fluorescencia directa para evaluar cambios en los filamentos de actina.**

Para evaluación de los cambios en los filamentos de actina en las células RK13 infectadas con *Candida albicans*, las células se propagaron de la forma descrita, se recuperó un cubreobjeto de cada una de las 4 cepas así como del control de células sin infectar, en los tiempos de infección mencionados. Se procedió a fijar con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min. Después se realizaron 2 lavados con PBS 1x y se permeabilizaron con Tritón al 0.5% durante 5 min y se lavaron 2 veces con PBS 1x. Posteriormente se adicionó faloidina conjugada a rodamina (diluida 2:100 en PBS) para marcar los filamentos de actina, se realizaron 2 lavados con PBS 1x y un lavado con agua desionizada. Finalmente los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando medio de montaje adicionado con DAPI para marcar los núcleos (UltraCruz mounting medium for fluorescence with DAPI). Una vez obtenidas las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Marca Carl Zeiss, Modelo Axioscop Axio) para evaluar los cambios en el citoesqueleto de actina provocados por las levaduras.

## IX. RESULTADOS

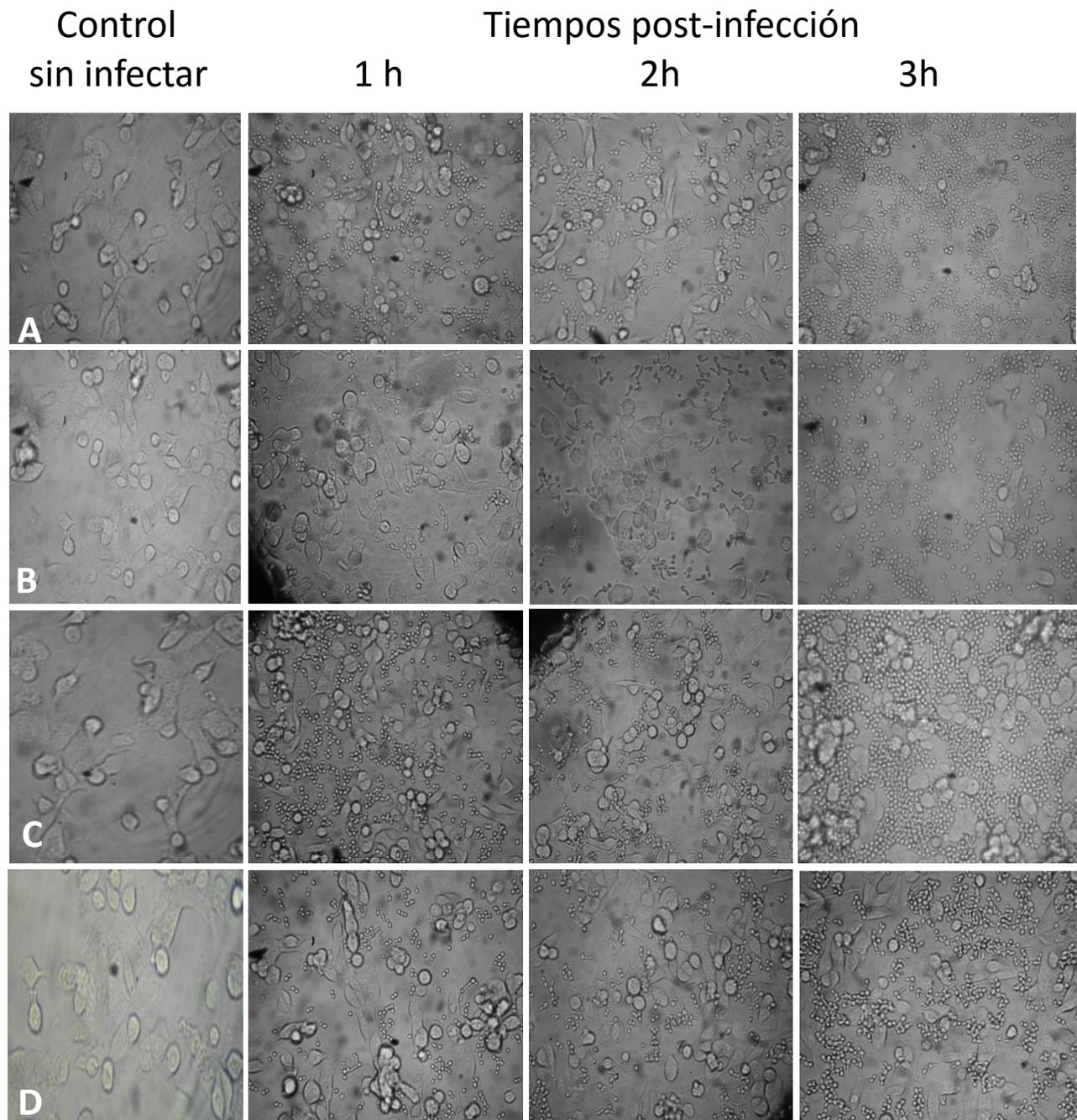
### 1. Identificación de *Candida albicans*

La caracterización bioquímica de *Candida albicans* fue realizada por el laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina, UNAM. En la Figura 3, se muestran las diferentes cepas empleadas en este trabajo experimental, en el panel A: cepa ATCC- 10231 de referencia, B: cepa 520 levadura en gemación, C: cepa 684 presentan formación de tubo germinativo y D: cepa 627-05 formación de tubo germinativo y clamidiosporas. Incubadas en medio de cultivo RPMI, 37°C y 2 hrs.



**Figura 3.** Caracterización de distintos aislados de *C.Albicans*. (A) ATCC -10231 referencia (B) Cepa 520, (C) Cepa 684 y (D) Cepa 627-05, incubadas con RPMI, 37°C y 2 hrs. Micrografía en donde se muestran diferentes estadios con la formación biopelícula (flecha blanca), levadura en gemación (flecha amarilla), clamidiosporas (flecha verde) y de tubo germinativo (flecha roja). Microscopia de campo claro, 40x.

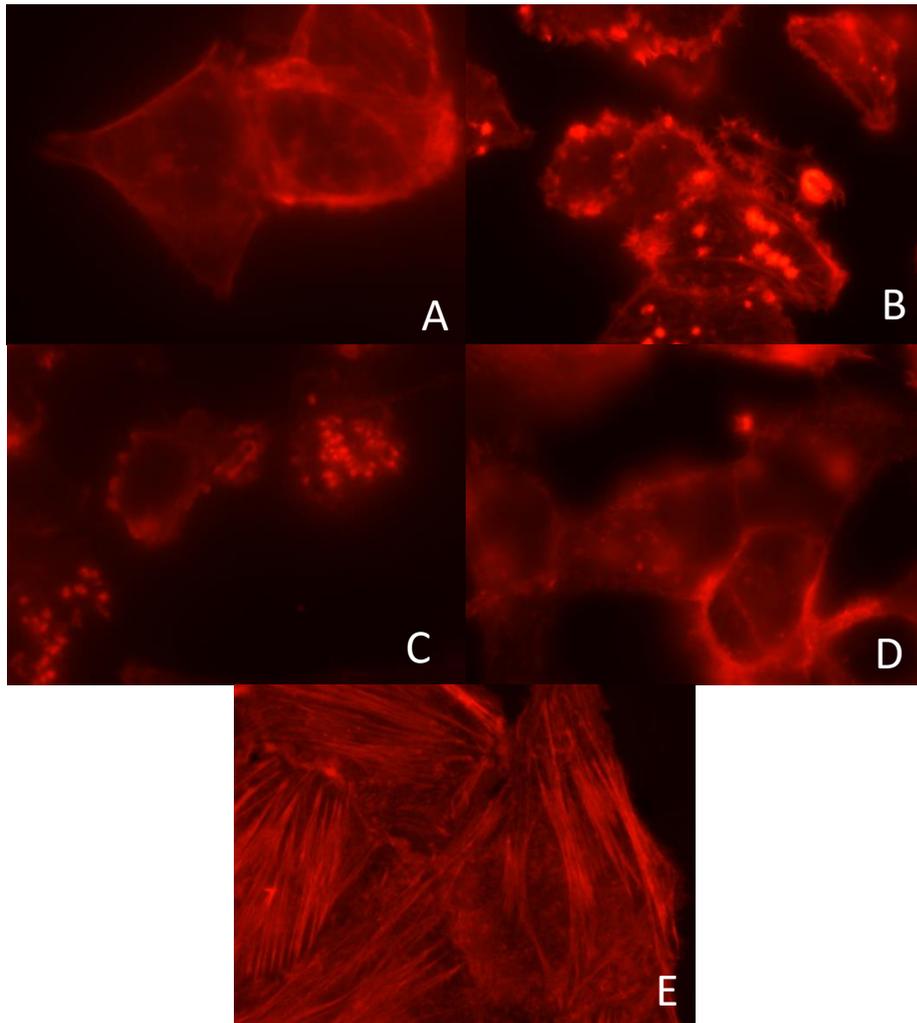
## 2. Evaluación de la morfología durante la interacción levadura-célula



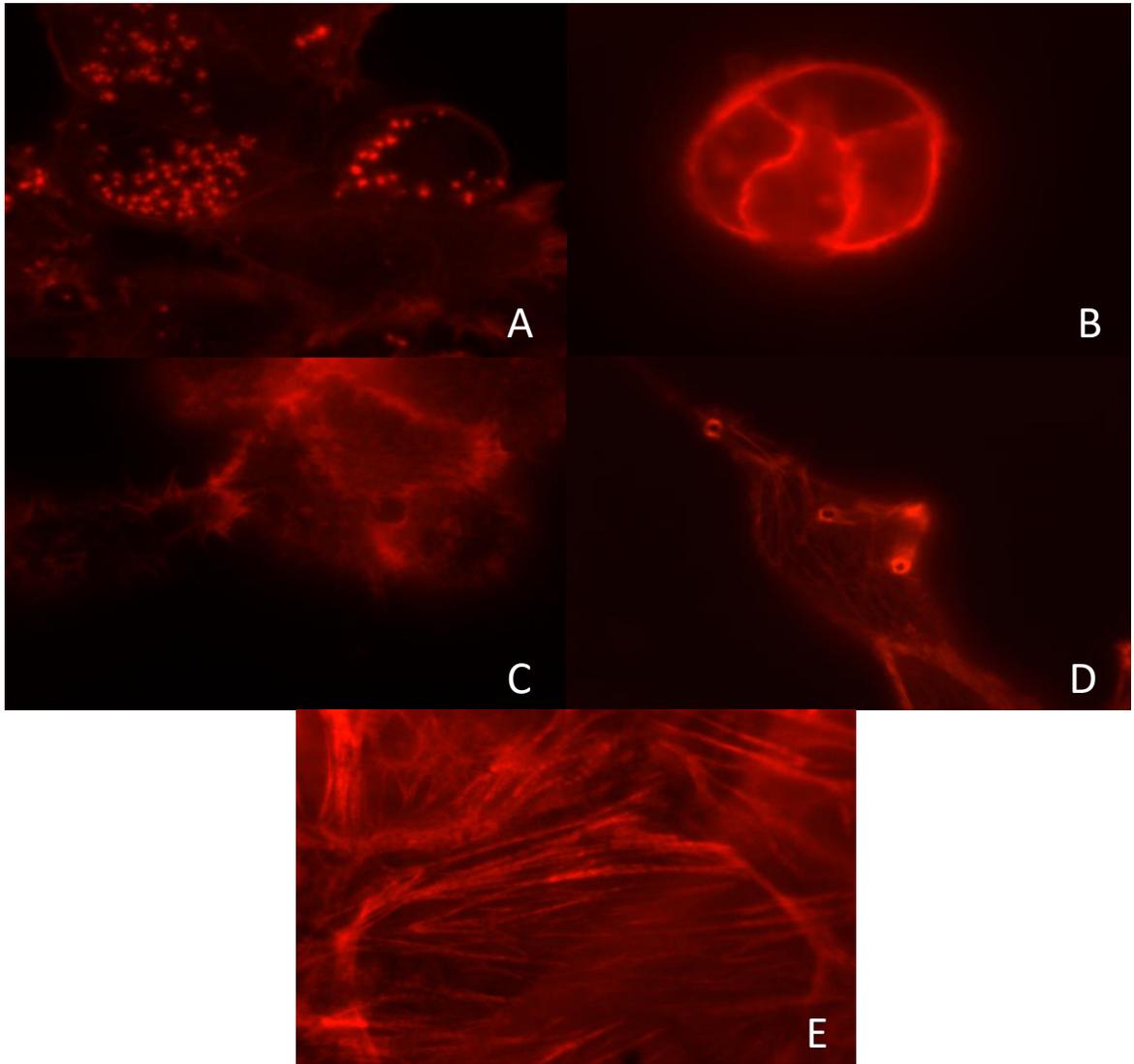
**Figura 4.** Cultivos de células RK13 infectadas con *Candida albicans*. Se muestran microfotografías de cultivos control y cultivos después de 1, 2 y 3 horas de infección. A: cepa de referencia; B: cepa 520; C: cepa 684; D: cepa 627-05  
Microscopía de campo claro, 40X.

En la figura 4 se observa la interacción levadura-célula, en donde diferenciamos la forma de actuar de *C. albicans*, utiliza distintos mecanismos como la adhesión e invasión del tubo germinativo. Durante la primera hora, existen cepas que han modificado su estructura (levadura-hifa / hifa-levadura) (Ver Fig.4 A-D 1h). La diferencia entre este cambio morfo genético varía de acuerdo a las condiciones ambientales (pH, superficie de adherencia), genéticas (deleción en genes), y el sitio anatómico, por lo que el comportamiento ante la célula RK13 es variado. La cepa 10231 de referencia, en la primera hora, se nota la presencia de levaduras con tubo germinativo, en el transcurso del tiempo aumenta esta característica, facilitando así la invasión a la célula hasta desprenderla de la superficie, a las tres horas regresa a su forma de levadura con escasas células viables y redondas que se aglomeran (Fig. 4 A; 1, 2 y 3 h). Mientras que la presencia de hifas de la cepa 520 causa daño inmediatamente, ya que comienza a notarse el redondeo de células; dentro de las dos horas la célula huésped pierde la morfología alargada y se observó el redondeo de las mismas, hacia las tres horas la población de levaduras sin tubo germinativo aumenta y se observa desprendimiento de células RK13 (Fig. 4B; 1, 2, 3 h); Por otra parte los efectos causados por la cepa 684 son más severos, a una hora de exposición la estructura levaduriforme redondea y aglomera las células, hacia las dos horas de exposición, proyectan el tubo germinativo hacia las pocas células viables, para las tres horas se forman biopelículas que intensifican el daño (Fig.4C; 1, 2, 3 h) . Con la cepa 627-05 el cambio morfogénico es lento y se observa hasta las tres horas, pese a este comportamiento, desde la primera hora de exposición se observan los mismos efectos, aglomerado de células redondas; hacia las tres horas de exposición aun continua la invasión (Fig. 4D: 1, 2, 3 h). Comparando con los cultivos celulares control, la organización celular cambia de alargada a redondeada y se observan separaciones entre las células.

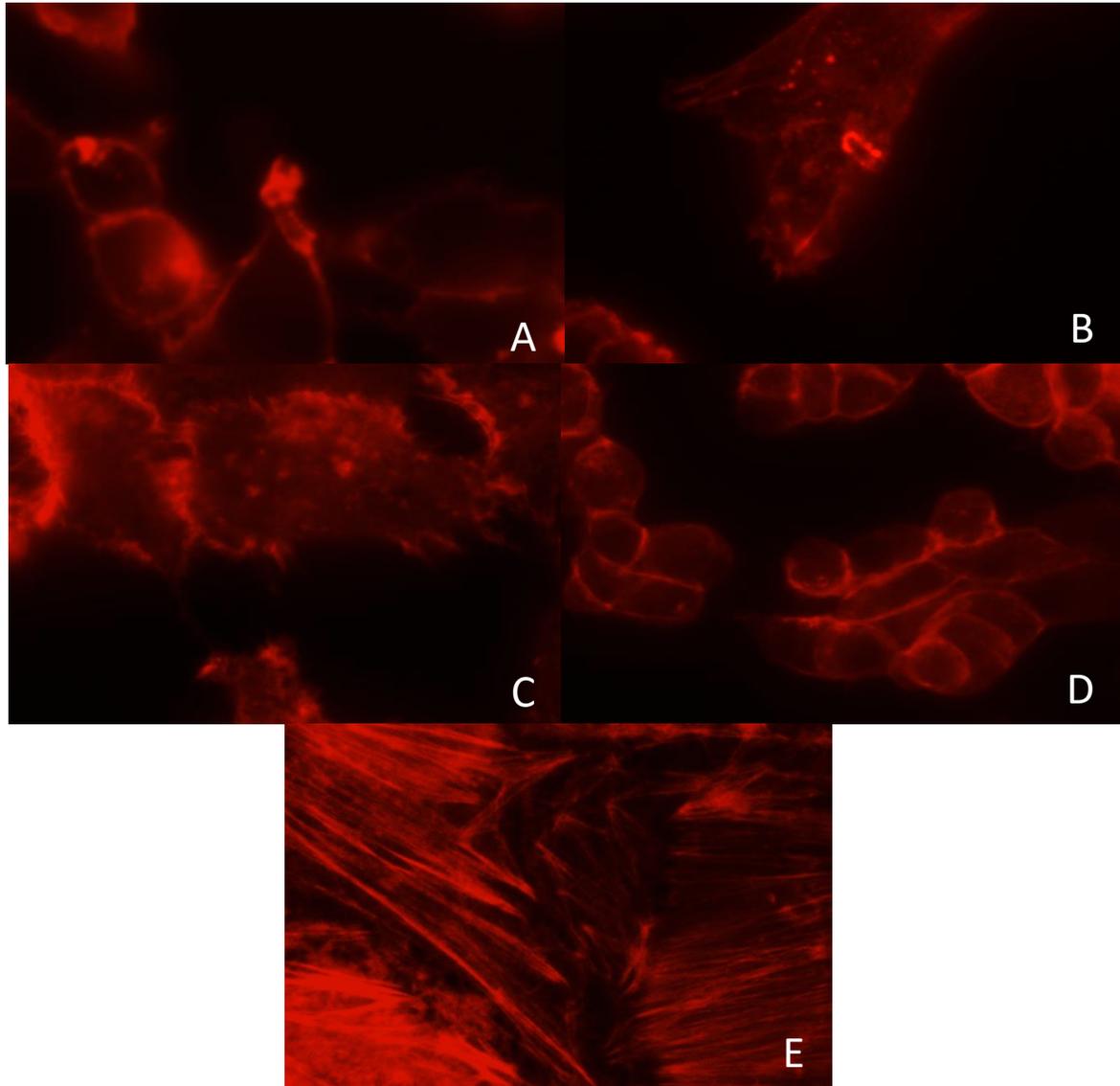
3. Evaluación general de los filamentos de actina postinfección con *C. albicans*.



**Figura 5.** Micrografía de fluorescencia, marcaje de actina con faloidina-rodamina en cultivo celular RK13 infectadas con diferentes cepas de *Candida albicans* a una hora. A) Cepa ATCC-10231, B) Cepa 520, C) Cepa 684 y D) Cepa 627-05. Se observa un reordenamiento de las fibras de actina (Figs. 5A – D), formación de cúmulos de actina en las zonas de adherencia de las levaduras, polimerización de actina al contacto con tubo germinativo, redondeo de células, pérdida de las fibras de estrés y presencia de microespinas. E) Cultivo células RK13 control, exhibe morfología normal con formación de fibras de estrés definidas. 100x



**Figura 6.** Micrografía de fluorescencia, marcaje de actina con faloidina-rodamina en cultivo celular RK13 infectadas con diferentes cepas de *Candida albicans* durante dos horas. A) Cepa ATCC-10231, B) Cepa 520, C) Cepa 684 y D) Cepa 627-05. Se observa pérdida de la fibras de estrés (Figs. 6A – D), cúmulos de actina en zonas adhesión de las levaduras, aglomerados de células redondeadas con corteza celular gruesa, se llegan a observar algunas filamentos de actina dispersos o en arreglos paralelos. E) Células RK13 control, exhibe morfología normal con fibras de estrés definidas. 100x



**Figura 7.** Micrografía de fluorescencia marcaje, de actina con faloidina-rodamina en cultivo celular RK13 postinfección de tres horas con diferentes cepas de *Candida albicans*. A) Cepa ATCC-10231, B) Cepa 520, C) Cepa 684 y D) Cepa 627-05. Se observa un reordenamiento de las fibras de actina y pérdida de fibras de estrés (Figs. 7A–D), formación de cúmulos de actina que rodea al tubo germinativo, aumento del grosor de la corteza celular provocando ligera separación de células, formación de microespinas, redondeo de células E) Células RK13 control, exhibe morfología normal, fibras de estrés definidas, haces de actina, etc. 100x .

Los cambios de actina resultantes de la exposición con el patógeno fueron aparentemente afectando a la integridad de las células, en comparación con las células no expuestas (control). En las Figuras 5, 6, y 7 se muestra el análisis de microscopía de fluorescencia con el marcaje de actina con faloidina-rodamina en las células RK13 y distintas cepas de aislados clínicos de *C. albicans*. En esta interacción se revelaron diferentes arreglos del citoesqueleto de actina, en comparación con las células control. En general, en las células infectadas (Figs. 5, 6 y 7, A, B, C y D), se puede observar que la actina se concentra principalmente alrededor del tubo germinativo, en la periferia de la célula y en los sitios de contacto con levaduras se forman cúmulos de actina, observados con mayor intensidad, asimismo se observa la pérdida de las fibras de estrés y formación de microespinas y también se notó el redondeo de las células enmarcadas por una corteza celular. En los cultivos celulares sin infectar se conserva la morfología celular y la formación de fibras de estrés durante todos los tiempos de exposición (Figs. 5, 6, y 7, E).

En la figura 5 a una hora postinfección, en general, se nota el reordenamiento de los filamentos de actina (Figs. 5 A–D). Se observan con pronunciadas formaciones de cúmulos de actina en los sitios de contacto de las levaduras y con el tubo germinativo (Figs. 5 B y C) y el redondeo de células (Fig. 5D), así también pérdida de las fibras de estrés y formación de microespinas (Figs. 5 B y D) lo que nos puede indicar la contracción de la célula ante la infección.

Hacia las dos horas, se observa un reordenamiento del citoesqueleto de actina (Figs. 6 A–D), de manera similar a lo observado a la hora de infección, con efectos pronunciados con múltiples cúmulos de actina en los sitios de contacto con las levaduras (en su mayoría la forma de hifa) (Fig. 6 A,D), la aglomeración de células con corteza celular gruesa y cúmulos de actina ligeramente perceptibles (Fig. 6B). De igual manera se nota la pérdida de las fibras de estrés permaneciendo solo algunas dispersas en el citoplasma (Fig. 6D) y formación de microespinas (Fig. 6C).

Al término de exposición (tres horas), se observa un reordenamiento de los filamentos de actina con pérdida de las fibras de estrés (Figs. 7A–D), formación de un anillo de actina en el cuello del tubo germinativo (Fig.7A), aumento del grosor de la corteza celular provocando ligera separación de células y redondeo de las mismas (Fig.7 A y D), y la formación de microespinas (Fig. 7C).

Este experimento nos indica que los distintos aislados pueden llegar a utilizar diferentes mecanismos de virulencia que de alguna u otra forma (adherencia, prolongación de tubo germinativo, secreción de metabolitos en el medio) alteran la morfología celular y ocasionan rearrreglos de los filamentos de actina.

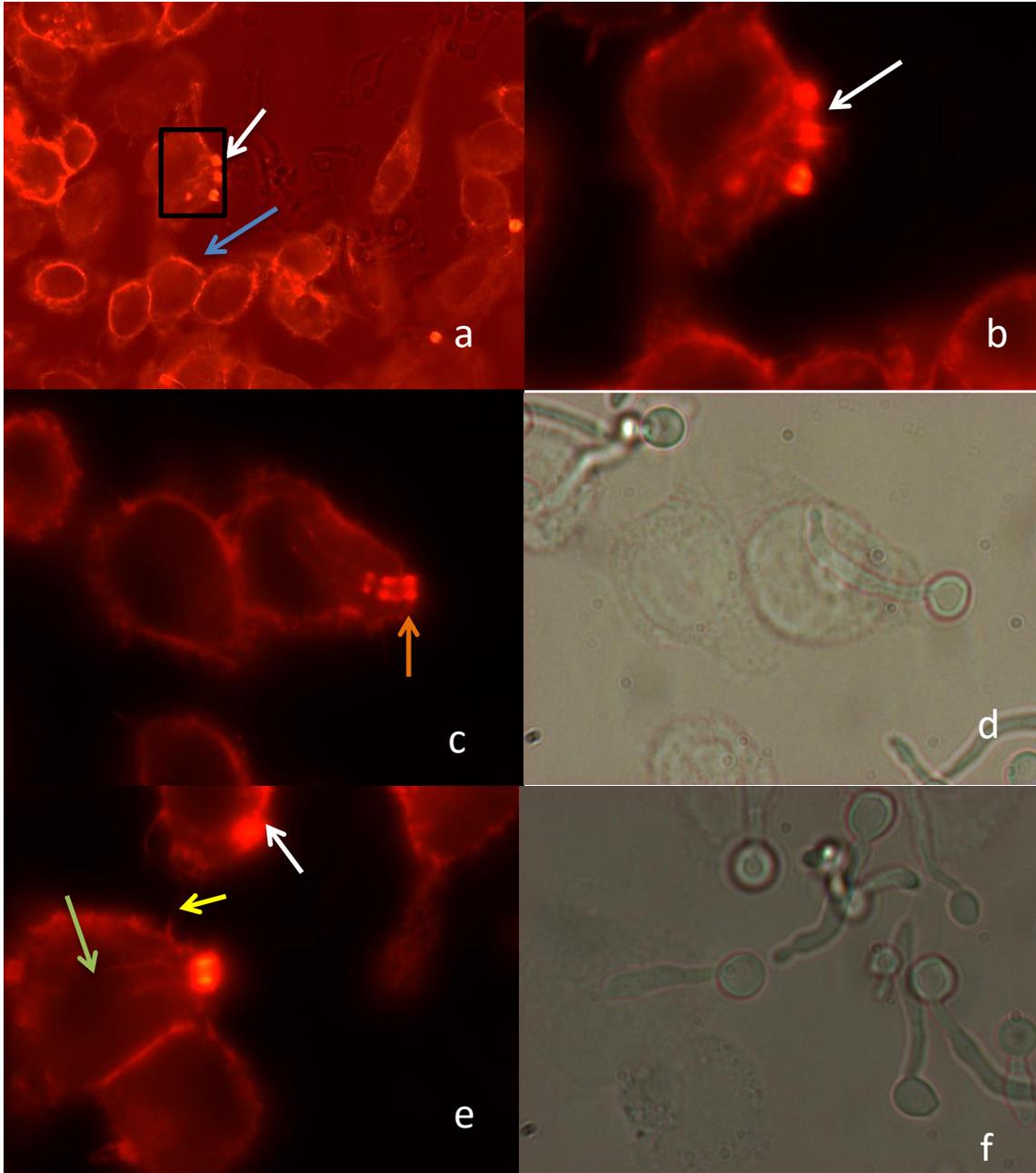
#### **4. Evaluación particular de los filamentos de actina postinfección de diferentes cepas de *C. albicans***

Las figuras 8-19 muestran a detalle los efectos causados por varias cepas de *C. albicans*, donde se observan las modificaciones a diferentes tiempos de infección. En primera instancia es constante la formación de cúmulos de actina que rodean la parte inicial del tubo germinativo y en otros la parte final del mismo, la despolimerización de las fibras de actina, observándose de forma difusa u organizada de forma paralela o radial. En algunas células se resalta la corteza celular al igual que existen proyecciones de actina en formas de microespinas.

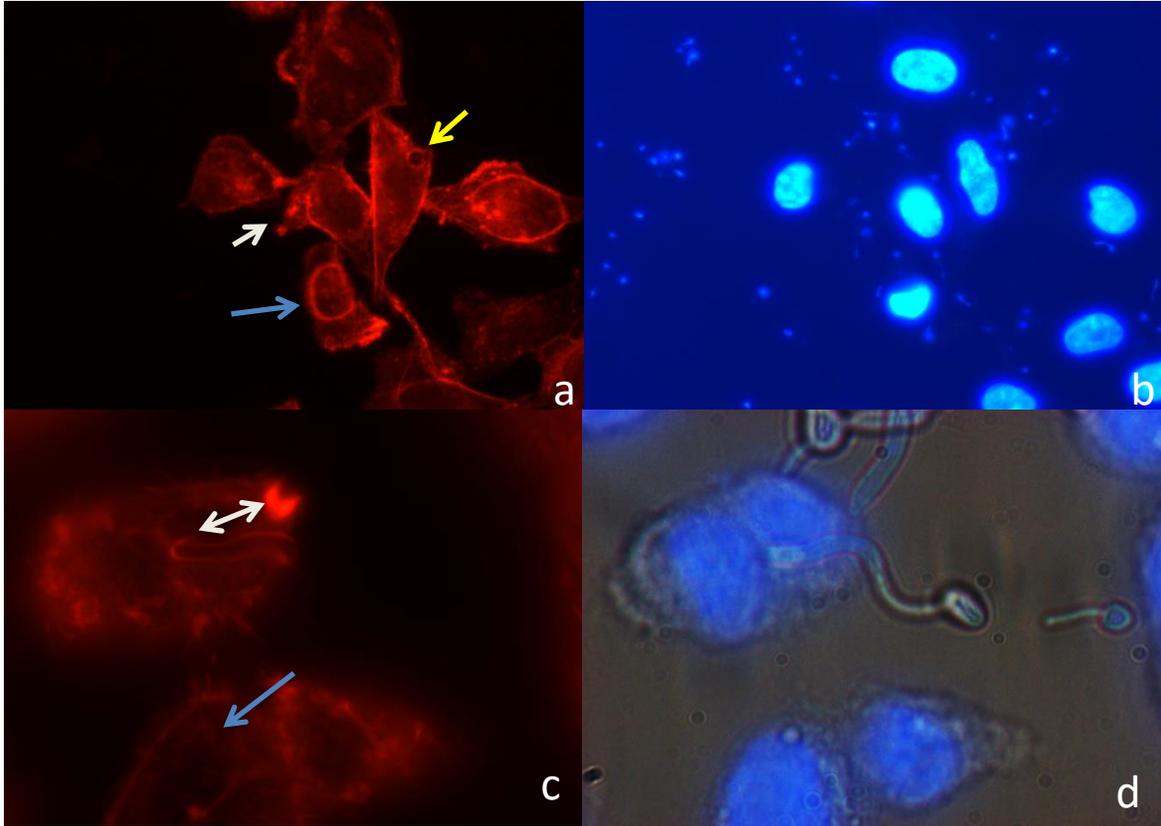
En los cultivos celulares infectados con la cepa de referencia ATCC-10231 se observan los cúmulos de actina en los sitios de contacto con las levaduras (Figs. 8 b, c, e; Fig.9 a, c; Fig. 10 a flechas blancas) y presentan una peculiaridad, la formación de anillos de actina que rodean la parte del cuello del tubo germinativo al contacto con la célula (Fig. 9a, flecha amarilla) durante los tres tiempos de exposición. Por otro lado en el tiempo de exposición se observa el redondeo de células (Fig. 8b, c, e; Fig. 9c; Fig. 10a) con pérdida de las fibras de estrés y presencia de algunos filamentos de actina presentándose de forma dispersa (Figs. 8, 9, 10).

En los cultivos infectados por la cepa 520 se observan estos cúmulos de actina en la parte media y final del tubo germinativo (Figs. 11a, 12a, 13a, flechas blancas), pérdida de las fibras de estrés y formación de microespinas (Fig. 11a, flechas azules). También se llega a notar un engrosamiento de la corteza celular (Fig. 13a, flecha azul). Los cambios efectuados por la cepa 684, van desde la formación de cúmulos de actina tanto en el cuello como la parte final del tubo germinativo (Fig. 14 a, b y c, flechas rojas), de igual manera al contacto con la forma levaduriforme, (Figs. 14 a, b y c, 15 a y c flechas blancas). También se observa la formación de cúmulos de actina en el borde de las células (Fig. 14c, flecha azul). A las dos horas de contacto se notó la formación de anillos de actina (Fig.15 a y c, flecha azul). A las dos y tres horas de infección se observa la formación de microespinas (Figs.15a y 16a, flecha amarilla). En todos los tiempos de infección hubo pérdida de las fibras de estrés.

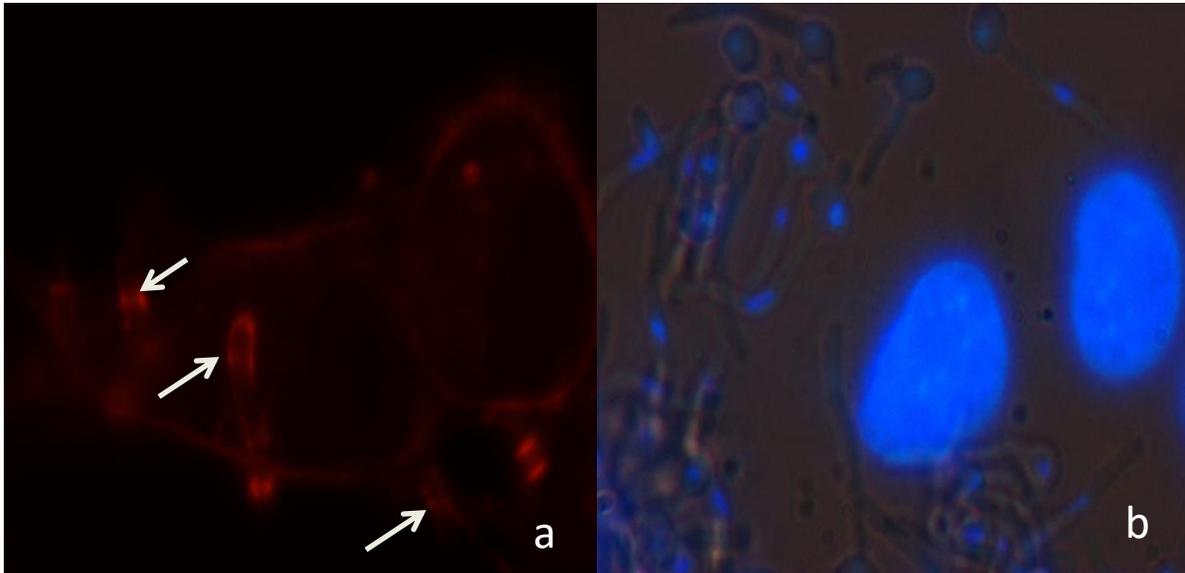
Los cultivos de RK13 infectados con la cepa 627-05, se notó una respuesta más agresiva, ya que desde la primera hora de interacción, las células comienzan a redondearse y la distribución de las fibras estrés se pueden observar de manera difusa (Fig. 17a, flecha verde), redondeo de células con microespinas (flecha amarilla (Fig. 17a, flecha amarilla) y cúmulos de actina en sitios de contacto célula-levadura (Fig. 17a y c, flecha blanca). A la segunda y tercera hora se notan las células redondeadas con anillos de actina en su superficie (Figs. 18a y 19a) y engrosamiento de la corteza celular (Fig. 18a). Los anillos con los bordes enriquecidos en actina, por su número y apariencia recuerdan a las burbujas presentes en células que están entrando en apoptosis. En todas las células se nota la pérdida de las fibras de estrés.



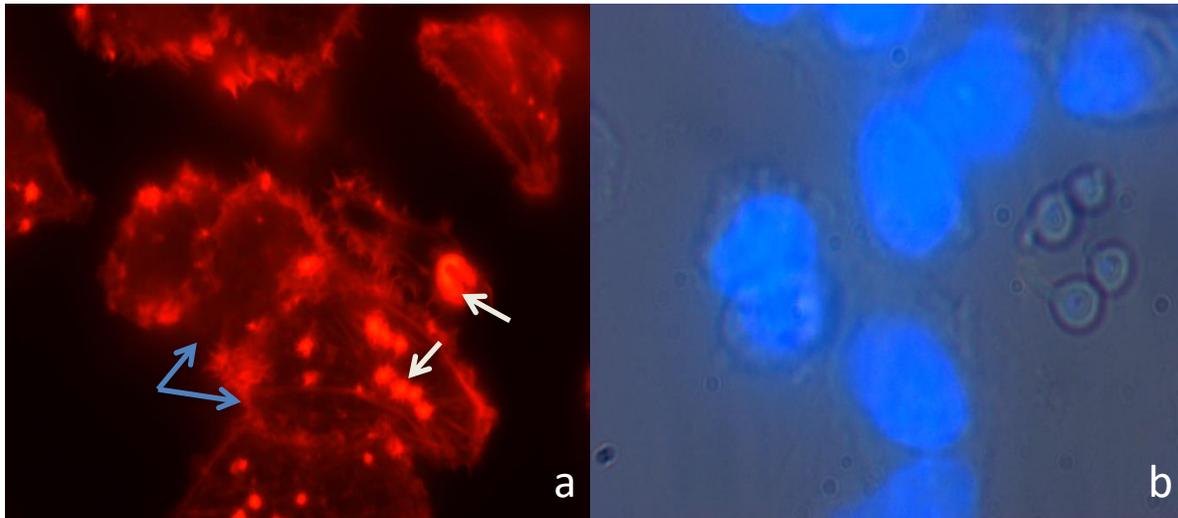
**Figura 8.** Cultivo celular RK13 infectada con la cepa de referencia ATCC-10231 a dos horas posinfección; marcaje de actina con faloidina-rodaminada; a) Micrografía de fluorescencia en donde se observan los cúmulos de actina al contacto con las levaduras (flecha blanca) 40x, células redondeadas y aumento de la corteza celular (flecha azul); b) Observación de la Fig. 8a a mayor aumento, 100x; c) Micrografía de fluorescencia, observándose cúmulos de actina alrededor del tubo germinativo (flecha naranja) d) Micrografía de campo claro de la Fig. 8d; e) Micrografía de fluorescencia, observándose pérdida de las fibras de estrés (flecha verde), cúmulos de actina (flecha blanca) y microespinas (flecha amarilla), f) Micrografía campo claro de la Fig.8e, 100X.



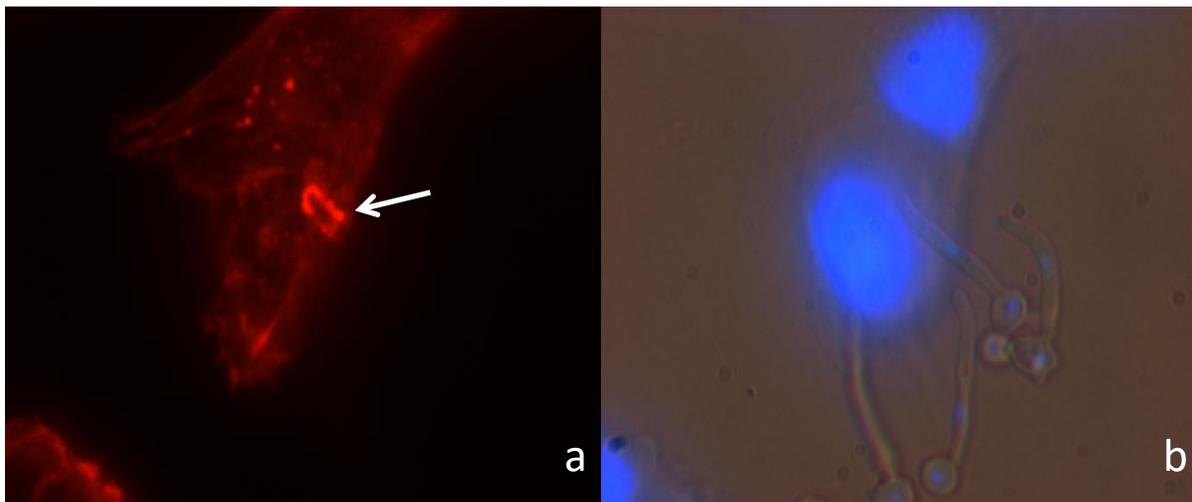
**Figura 9.** Cultivo de células RK13 infectadas con cepa de referencia ATCC-10231 dos horas postinfección. a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose aumento en la corteza celular (flecha azul), cúmulos de actina en contacto célula-levadura (flechas blancas), formación de un anillo de actina (flecha amarilla) y pérdida de la fibras de estrés; b) Micrografía de fluorescencia de la Fig. 9a con marcaje de núcleos con DAPI. 40x c) Micrografía de fluorescencia con marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose cúmulo de actina al contacto con el tubo germinativo (flecha blanca), pérdida de las fibras de estrés (flecha azul); d) Micrografía en donde se empalmaron las imágenes de campo claro y de fluorescencia con marcaje de núcleos con DAPI. Observación a 100x.



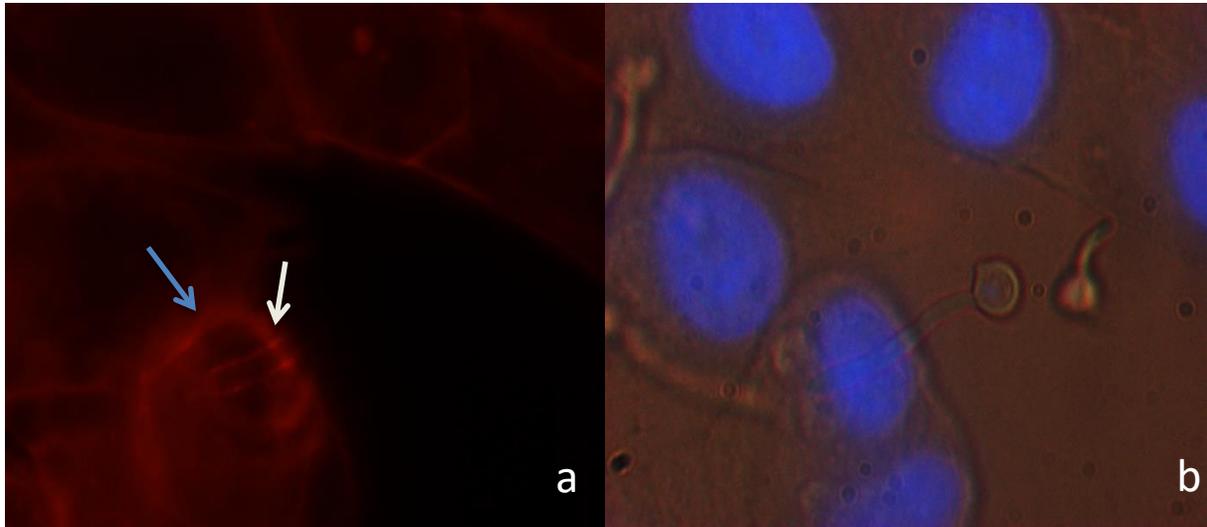
**Figura 10.** Cultivo de células RK13 después de 3 horas de infección con la cepa de referencia ATCC-10231; a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose múltiples cúmulos de actina al contacto con el tubo germinativo (flechas blancas), pérdida de fibras de estrés y redondeo de células; b) Micrografía en donde se empalmaron las imágenes de campo claro y de fluorescencia con marcaje de núcleos con DAPI. Observación a 100x.



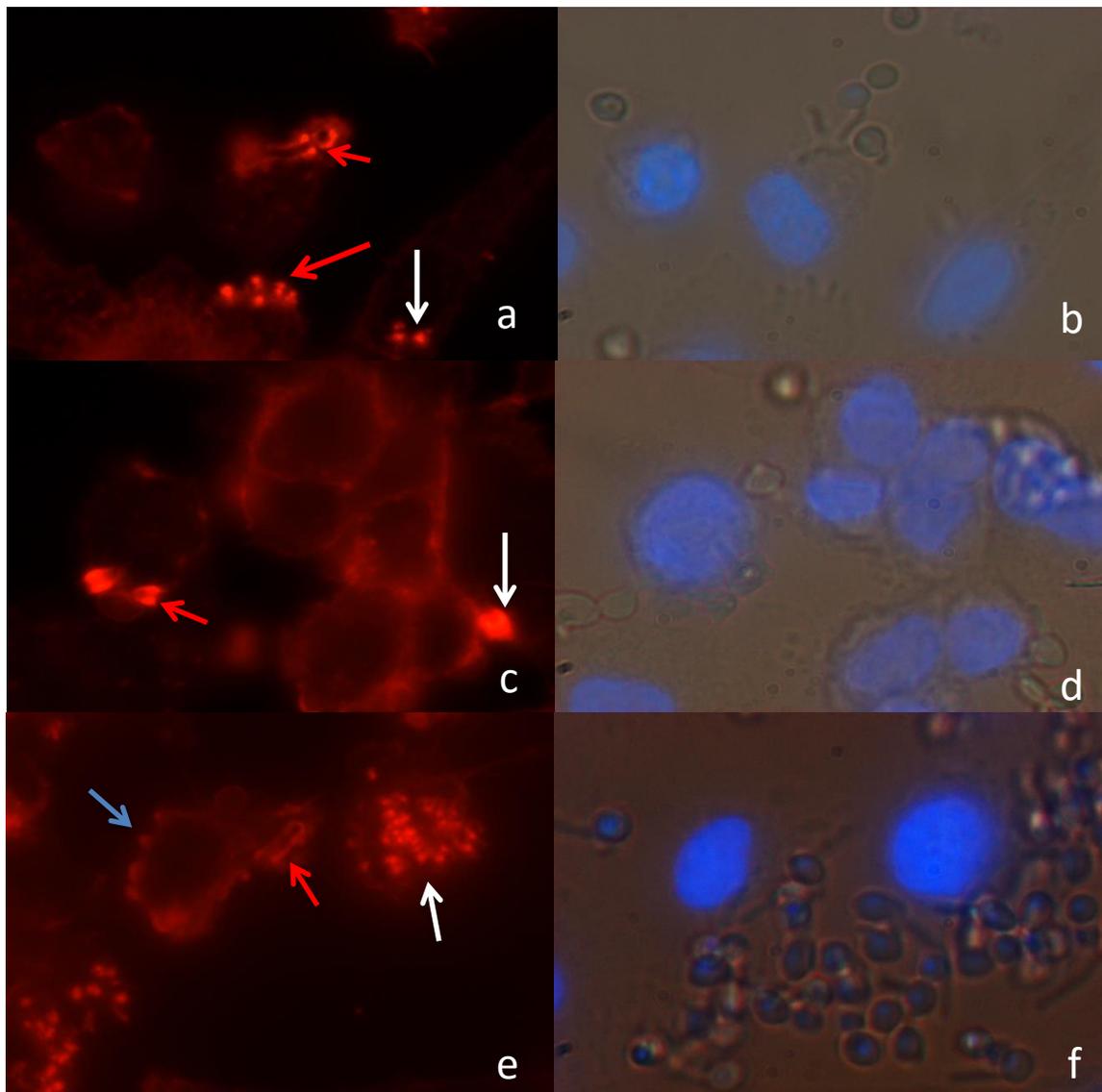
**Figura 11.** Cultivo celular RK13 infectadas con cepa 520 una hora postinfección marcate de actina con faloidina-rodaminada; a) Micrografía de fluorescencia, observándose múltiples cúmulos de actina en zonas de contacto con levaduras (flecha blanca), pérdida de las fibras de estrés, células amorfas con una fina corteza celular y formación de microespinas (flecha azul); b) Micrografía de fluorescencia con marcaje para núcleos con DAPI.100X.



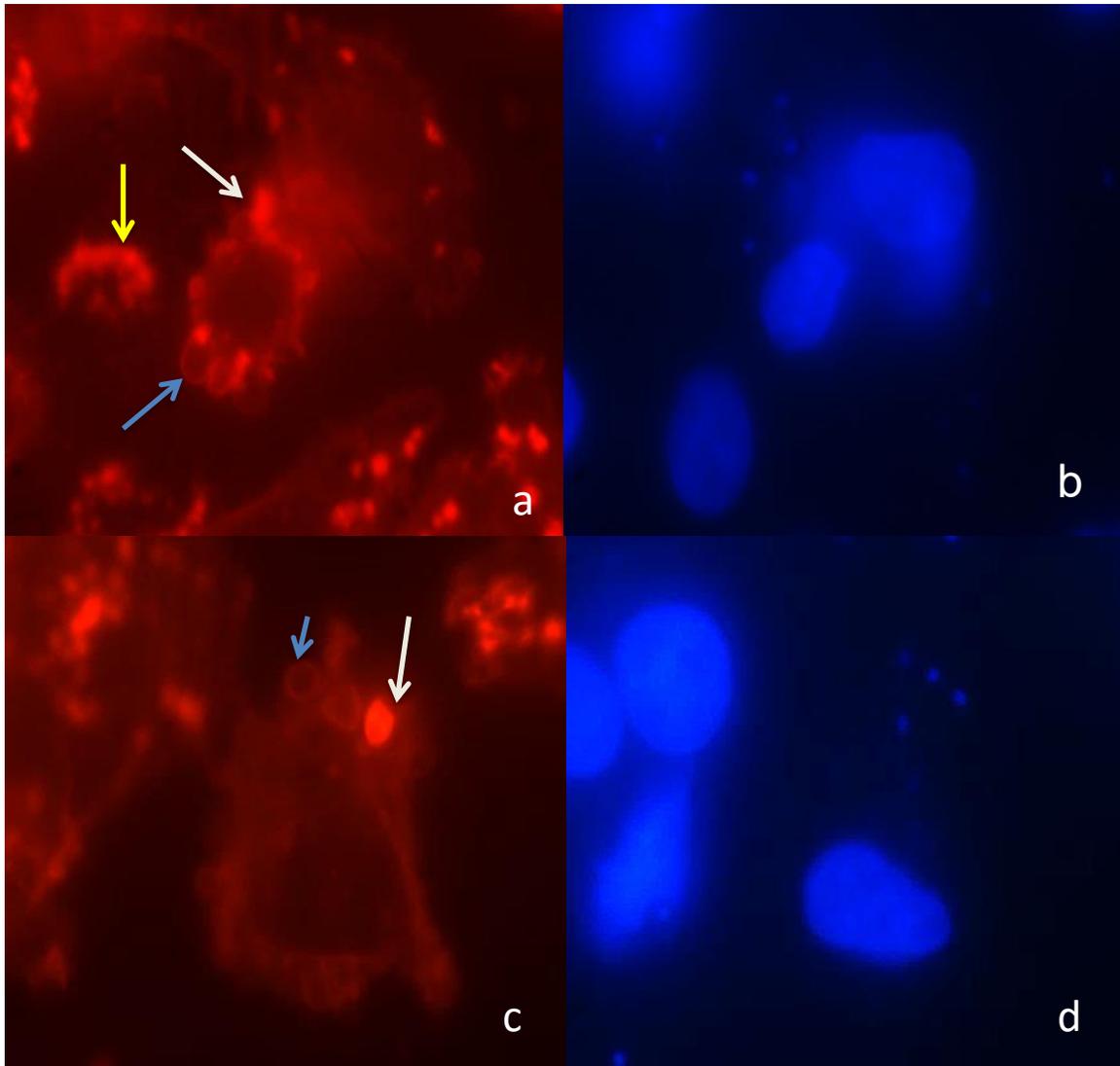
**Figura 12.** Cultivo celular RK13 infectados con cepa 520 a dos horas postinfección marcate de actina con faloidina-rodaminada; a) Micrografía de fluorescencia cúmulos de actina en contacto con el tubo germinativo (flecha blanca); b) Micrografía con empalme de fluorescencia y campo claro con DAPI para núcleos; 100x.



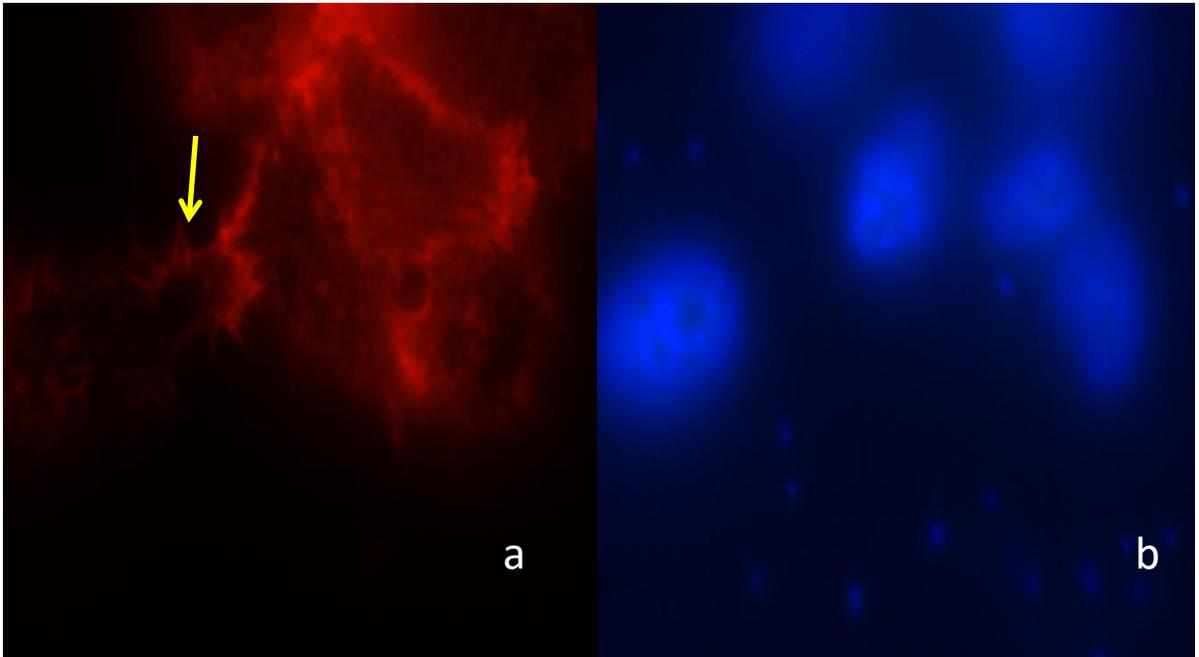
**Figura 13.** Cultivo celular de RK13 infectadas con cepa 520 tres horas posinfección; a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose cúmulos de actina rodeando el tubo germinativo (flecha blanca) y engrosamiento de la corteza celular (flecha azul); b) Micrografía con empalme, fluorescencia y campo claro, marcaje de núcleo con DAPI. Microscopia 100x.



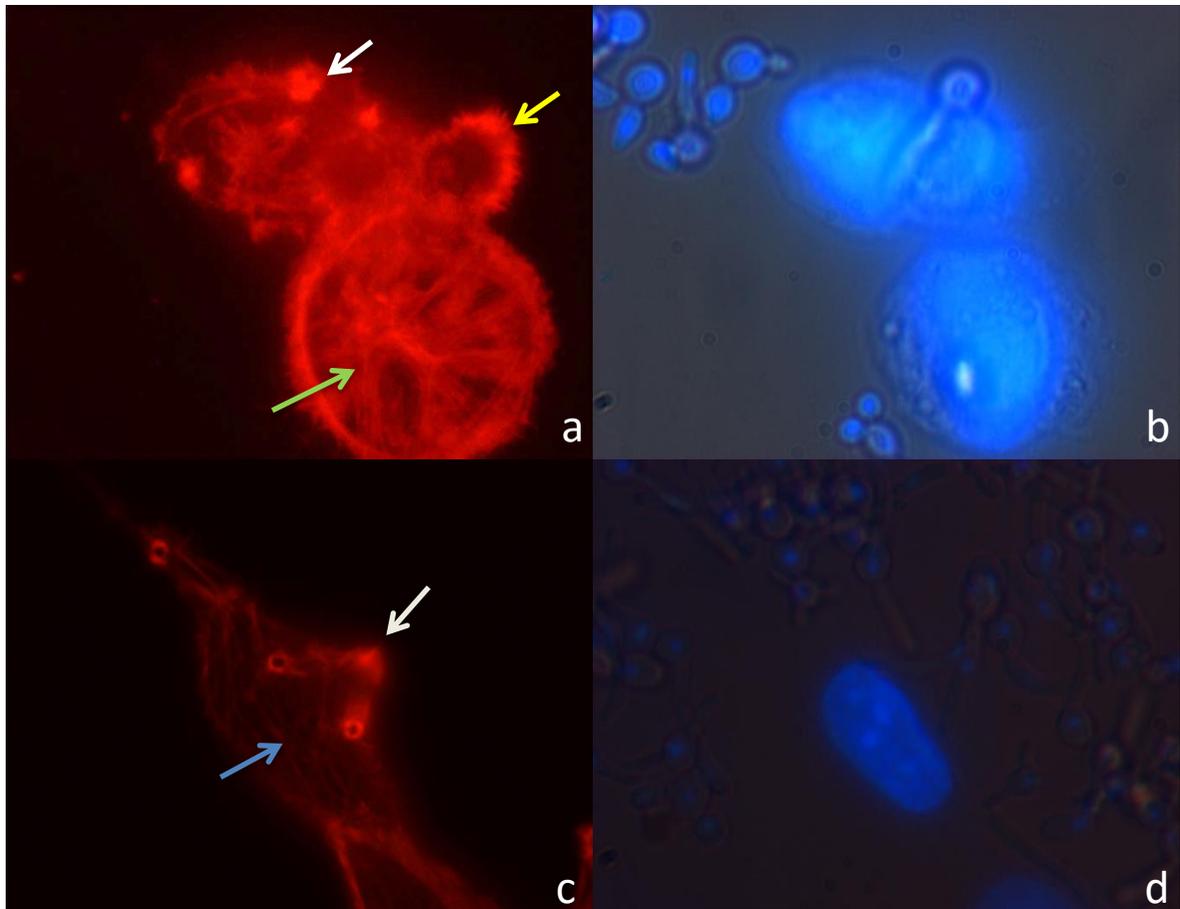
**Figura 14.** Cultivo celular RK13 infectadas con cepa 684 una hora, a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose cúmulos de actina al contacto con el tubo germinativo (flecha roja); b) Micrografía fluorescencia y campo claro, marcaje de núcleos con DAPI; c) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, cúmulos de actina al contacto célula-levadura (flechas blancas) y con tubo germinativo (flecha roja); d) Micrografía de fluorescencia y campo claro empalmadas, tinción de núcleos con DAPI; e) Micrografía de fluorescencia, marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose múltiples cúmulos de actina en sitios de contacto célula-levadura (flecha blanca) y con tubo germinativo (flechas roja), células redondeadas y cúmulos de actina en el borde de la corteza celular (flecha azul). En todas las células se nota la ausencia de fibras de estrés; f) Micrografía fluorescencia y campo claro empalmadas, marcaje de núcleo con DAPI .100x.



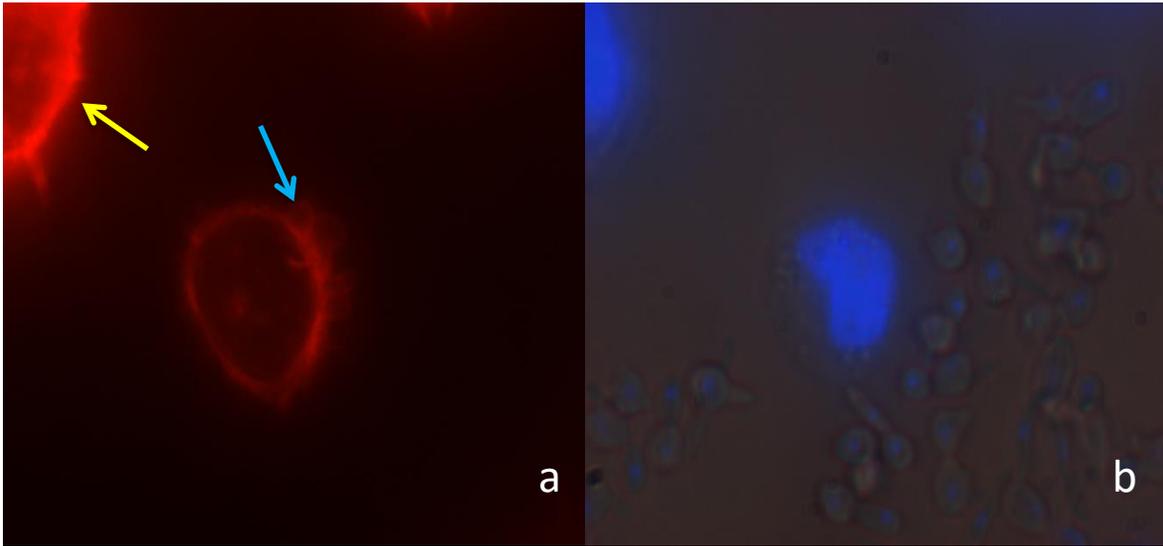
**Figura 15.** Cultivo celular RK13 infectadas con cepa 684 dos horas posinfección, a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose cúmulos de actina (flecha blanca) y formación de microespinas (flecha amarilla) y anillos de actina (flecha azul); b) Micrografía fluorescencia, marcaje de núcleos con DAPI; c) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodamina, cúmulos de actina en los sitios de contacto célula-levadura (flecha blanca) y formación de anillos de actina (flecha azul); d) Micrografía de fluorescencia, tinción de núcleos con DAPI.100x



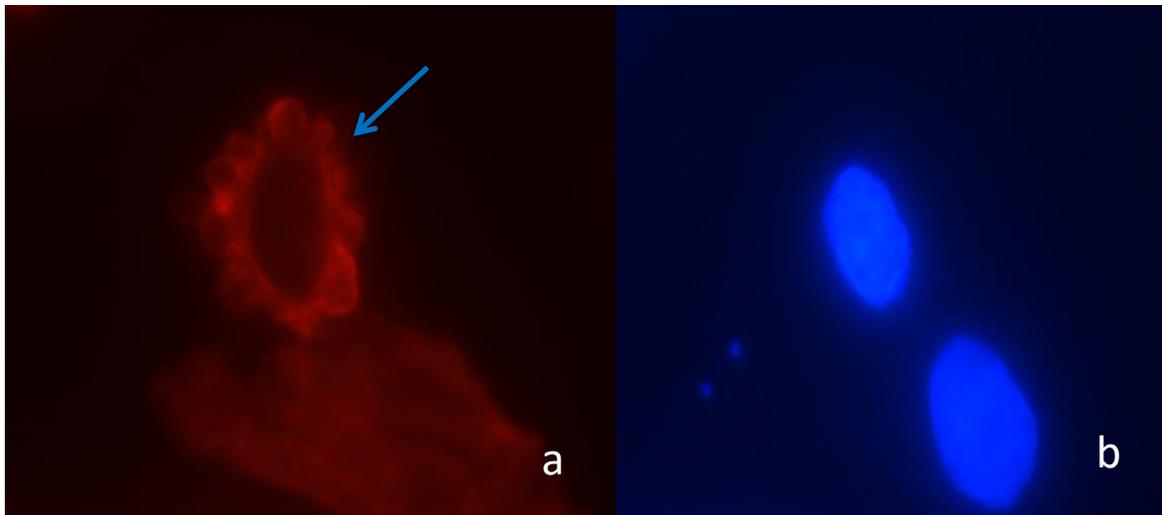
**Figura 16.** Cultivo celular RK13 con cepa 684 tres horas posinfección, a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con aloidina-rodaminada, observándose microespinas (flecha amarilla); b) Micrografía fluorescencia, marcaje de núcleos con DAPI; 100x



**Figura 17.** Cultivo celular RK13 infectadas con cepa 627-05, postinfección una hora. a) Micrografía de fluorescencia con faloidina-rodaminada marcaje de actina, observándose cúmulos de actina en los sitios de contacto célula-levadura (flecha blanca), células redondas, engrosamiento de la corteza celular y microespinas (flecha amarilla) y distribución difusa de los filamentos de actina (flecha verde); b) Micrografía de fluorescencia con DAPI, marcaje de núcleos, de células y levaduras; c) Micrografía de fluorescencia con Faloidina-rodaminada, marcaje de actina con Faloidina-rodaminada, observándose cúmulos de actina alrededor del tubo germinativo (flecha blanca) y presencia desorganizada de algunas fibras de estrés (flecha azul); d) Micrografía de fluorescencia y campo claro empalmadas, marcaje de núcleos con DAPI .100x.



**Figura 18.** Cultivo celular RK13 infectadas con cepa 627-05 dos horas postinfección; a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose, aumento en la corteza celular (flecha amarilla), presencia de proyecciones en forma de anillos sobre la superficie celular (flecha azul); b) Micrografía de fluorescencia y campo claro empalmadas con marcaje de núcleo con DAPI. 100x



**Figura 19.** Cultivo celular RK13 con cepa 627-05 tres horas posinfección; a) Micrografía de fluorescencia marcaje de actina con faloidina-rodaminada, observándose célula redondeada, no hay contacto directo con las levaduras y se nota la presencia de anillos de actina sobre la superficie celular (flecha azul); b) Micrografía de fluorescencia marcaje de núcleo con DAPI. 100x.

## X. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio es evaluar y comparar los cambios en los filamentos de actina que sufre la célula al interactuar con *C. albicans*, mediante ensayos de fluorescencia. La actividad de *C. albicans*, se muestra sobre la organización de la actina componente del citoesqueleto, afectado en las células epiteliales, RK13. Los mecanismos por los cuales los patógenos consiguen acaparar la maquinaria de una célula eucariota, van desde la secreción de biomoléculas, receptores de superficie, morfogénesis, entre otros, desencadenan una serie de reacciones que alteran el equilibrio con la finalidad de proliferar. La célula huésped manobra ante el estrés causado por las condiciones en su exterior e interior; en este último involucra un rearrreglo del citoesqueleto entre la polimerización y la despolimerización de los filamentos de actina (Rocha, RC, et al., 2005).

La interacción de *C. albicans* con RK13 arrojaron diferencias entre las cepas clínicas aisladas. El hongo creció de diferentes formas morfológicas, como levadura, pseudohifas, hifas y clamidosporas (ver Figura 3). Las variantes fenotípicas estudiadas son levaduras e hifas, que desempeñan diferentes roles durante las etapas de adhesión e invasión acompañada de las expresiones genotípicas, que de acuerdo a investigaciones anteriores, los cambios en las condiciones ambientales, en este caso las condiciones producidas en un ambiente *in vitro* son considerados un proceso de adaptación (Calderon, Zavrel, et al., 2010; Velazquez, 2014) y que probablemente este cambio en el ambiente y del origen de anatómico sea la clave de la diversidad de comportamiento entre los aislados clínicos de *Cándida*.

En un sistema eucariota, varias funciones se atribuyen al sistema citoesquelético del que forman parte los filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios (Herrmann y Aebi, 2004; Reisler y Egelman, 2007). Muchos patógenos microbianos durante de la invasión de células producen factores de virulencia que son responsables en la alteración y organización del citoesqueleto (Barbieri et al., 2002). La modificación es principalmente en la forma de la

polimerización y despolimerización de actina, lo que lleva a su reordenamiento. Las infecciones invasivas por el dimorfismo de *C. albicans* son a menudo fatal, y la base molecular de la invasión celular se encuentra bajo investigación en muchos laboratorios.

En los cultivos de células epiteliales y endoteliales, la invasión de las hifas causa el reordenamiento de actina similar a la invasión de la célula bacteriana. En el presente estudio, la investigación con microscopia de fluorescencia detallada ha arrojado imágenes en donde la reorganización de las fibras de actina se produce en redondeo de células y posibles pseudópodos, anillos de actina recién formados que rodea las hifas penetrantes, estos resultados son similares a Atre et al., 2008 donde obtiene estas estructuras a partir de las células de la córnea

El uso de microscopía de fluorescencia con marcaje directo, nos permitió obtener observaciones del citoesqueleto y la organización de la actina. Las observaciones revelaron que *C. albicans* afectó a la organización de la actina en su huésped, lo que resultó en la agregación de actina al contacto directo con la levadura, lo cual es evidencia de que altera los filamentos de actina, (Fig. 5, 6 y 7) Cambios morfológicos en la levadura producen el mismo efecto formando un cúmulo de actina polimerizada, ya se trate en su forma de hifa o de levadura. Atre et al., (2008), también obtienen resultados similares Wasylnka & Moore (2008), pero estos últimos autores trabajaron únicamente con extractos de levadura y concluyen que este efecto se debe a la secreción de metabolitos en el medio. Es así que los cambios observados por nosotros puedan deberse no solo al contacto sino también a la secreción de factores de virulencia que alteran el equilibrio en la célula huésped, este mecanismo de virulencia, en el que se altera la estructura de los filamentos de actina sin contacto con la levadura lo observamos en la figura 11a, con la cepa 520.

Otro factor que modifica los filamentos de actina es la adhesión de algunas formas levaduriformes o hifas, en su mayoría estas últimas (Figs. 8b, 8c, 8e, 10a, 12a, 13a), algunos autores como Kimura, 1980; Raut, 2010; Cuellar, 2012; Velázquez 2014; Naglik, et. al. 2011 hacen referencia al uso de receptores de superficie de la levadura como ALS3 o factores de virulencia como SAP que interactúan con E- y N-cadherina de las células, provocando alteraciones en la vía de señalización en que intervienen Rho GTPasas que afectan la polimerización o despolimerización de los filamentos de actina que al igual que la configuración morfológica son cambios que podemos observar en la segunda hora de infección, provocando la acumulación de actina alrededor del tubo germinativo; como ya se mencionó con anterioridad estos cúmulos de actina son llamados también anillos que solo se observan en el cuello de la levadura. (Figs. 8, 9, 10,14c, 15c)

Otro cambio morfológico es el redondeo de células, esta forma estructural se observa repetitivamente en los aislados clínicos así como en la cepa de referencia (520, 684,627-05), lo cual suponemos pueda ser un efecto de la secreción de metabolitos en el medio que ocasionan este cambio en la morfología de la célula (ver figura 6B) y que sea uno de los mecanismos de la levadura para invadir los tejidos. Este cambio en la morfología, el redondeo de las células y su separación, es compatible con el inicio de daño y muerte celular provocado por las levaduras (Figs. 4B, 5C, 15a, 16a, 17a,18a y 19a).

En particular las cepas estudiadas aparentemente utilizan mecanismos similares (adherencia y cambios morfológicos) para proliferar y no dependen del sitio anatómico aislado, como observamos en nuestros resultados. Sin embargo si se notó una diferencia en el caso de *C. albicans* 627-05 (aislado de piel) que provoca los cambios observados a menor tiempo de infección. Esto tal vez se deba a que utiliza otros mecanismos de adherencia, que algunos investigadores la relacionan con adhesinas como quitina,  $\beta$ -glucanos, lípidos, proteínas y manoproteínas así como también la intervención de receptores de membrana que actúan como los mediadores más importantes de dicha interacción, con efectos letales en la célula.

## **XI. CONCLUSIONES.**

1. Se estandarizó el modelo de infección in vitro de células RK13 con diferentes cepas de *Candida albicans*.
2. Se demostró en los cultivos celulares la interacción de *Candida albicans* con las células RK13.
3. Se identificaron los diferentes estadios de *Candida albicans*: clamidiosporas, formación de biopelícula, formación de tubo germinativo y levaduras en gemación
4. *C. albicans* provocó cambios en la morfología celular con redondeo de las células infectadas.
5. *C. albicans* ocasionó rearrreglos del citoesqueleto de actina: pérdida de fibras de estrés, formación de microespinas y anillos de actina, cúmulos de actina en sitios de contacto con las levaduras y con el tubo germinativo.
6. Los rearrreglos de los filamentos de actina se presentaron tanto en la cepa de referencia como en los tres aislados clínicos, encontrando solo una diferencia que fue la formación de anillos en el cuello del tubo germinativo en cultivos infectados con la cepa de referencia.
7. Los cambios ocasionados por la cepa 627-05 (aislado clínico) fueron más severos y se presentaron a un tiempo más corto.
8. Los rearrreglos del citoesqueleto observados en las 4 cepas utilizadas fueron característicos de la patogenia de la infección por *Candida albicans* como parte de su mecanismo de infección.

## XII. REFERENCIAS

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015). *Molecular Biology of the cell*. Garland Science Ed, 6<sup>th</sup> ed. New York. USA. Chapter 16, p 889-962.
2. Alvarez-Rueda N, Albassier M, Allain S, Deknuydt F, Altare F. (2012). First human model of *in vitro Candida albicans* persistence within granuloma for the reliable study of host-fungi interactions. *PLoS ONE* 7(6):e40185. doi:10.1371/journal.pone.0040185.
3. Atre A.N., Surve S.V., Shouche Y.S., Joseph J., Patole M.S., Deopurkar R.L. (2009). Association of small Rho GTPases and actin ring formation in epithelial cells during the invasion by *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55: 74–84.
4. Batchelor M, Guignot J, Patel A, Cummings N, Cleary J, Knutton S, Holden DW, Connerton I, and Frankel G. (2004). Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. *EMBO Rep.* 5(1): 104-110.
5. Bodo M, Becchetti E, Baroni T, Mocci S, Merletti L, Giammarioli M, Calvitti M, Sbaraglia G. (1995). Internalization of *Candida albicans* and cytoskeletal organization in macrophages and fibroblasts treated with con canavalin A. *Cell Mol. Biol.* 41:297–305
6. Braun B.R., Kadosh D., Johnson A.D. (2001) *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J. Vol* 20 No.17, 4753–4761.
7. Burnham CA, Shokoples SE & Tyrrell GJ (2007) Rac1, RhoA, and Cdc42 participate in HeLa cell invasion by group B streptococcus. *FEMS Microbiol Lett* 272: 8–14
8. Calderone, R.A. (2002). *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, DC.
9. Chen SHM, Stins MF, Huang SH, Chen YH, Kwon-Chung KJ, Chang Y, Kim KS, Suzuki K & Jong AY (2003) *Cryptococcus neoformans* induces

- alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* 52: 961–970.
10. Cheng G., Wozniak K., Wallig M.A., Fidel Jr. P.L., Trupin S.R., Hoyer L.L. (2005). Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect. Immun.* 73:1656-1663.
  11. Cossart P., Boquet P., Normark S., Rappuoli R. (2005). Cellular microbiology, 2<sup>nd</sup>. ed. ASM PRESS Ed. USA.
  12. Drago L., Mombelli B., De Vecchi E., Bonaccorso C., Fassina M.C., Gismondo M.R. (2000). *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor. *Int. J. Antimicrob.* 16: 545–547.
  13. Filler, S.G., Swerdloff, J N., Hobbs. C., Lucket, P.M. (1995). Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63(3):976–983.
  14. Filler S.G., Sheppard D.C. (2006). Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells *PLoS Pathog.*, 2, p. e.129.
  15. Finlay BB (2005) Bacterial virulence strategies that utilize Rho GTPases. *Curr Top Microbiol* 291: 1–10.
  16. Frankel G. and Che HD. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* unraveling pathogenesis *FEMS Microbiol. Rev.* 29:83-98.
  17. Ghannoum MA(2003);. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122143.
  18. Goldberg M.B. (2001). Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 65:595–626.
  19. Gouin E, Welch MD and Cossart P.(2005). Actina-based motility of intracelular pathogens. *Curr. Op. Microbol.* 8:35-45.
  20. Grunheid S and Finlay BB. (2003). Microbial pathogenesis and cytoeskeletal funtion. *Nature.* 422: 775-781.
  21. Kumamoto C.A., Vinces M.D. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 7(11):1546–1554.

22. Lorenz MC, Fink GR (2004). Life and death in a macrophage: role of glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell*; 1: 657-662.
23. Mahmood M., Hiroshi A., Hidetoshi I. (2013). Biological properties of bovine viral diarrhoea virus quasispecies detected in the RK13 cell line. *Arch. Virol.* 158:753–763.
24. Marjomäki V and Schaible UE. (2005). Microbial strategies to exploit host cells. Meeting on Spatial and temporal dynamics of the endomembrane system. *EMBO reports.* 6: 408-412.
25. Naglik JR, Fostira, F., Ruprai J, Staab J.F., Challacombe S.J., Sundstrom P. (2006). *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease *J. Med. Microbiol.*, 55 pp. 1323–1327
26. Odds F.C. (1988). *Candida and Candidosis*. Bailliere Tindall Ed., London.
27. Pacheco M., Pisa D., Gomez P .G., Carrasco L., Juarranz A. (2007). Attachment and entry of *Candida famata* in monocytes and epithelial cells. *Microscopy Res. Technique* 70:975–986.
28. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards Jr JE & Filler SG (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* 5: e64.
29. Pollard TD and Borisy GG. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112: 453-465.
30. Pollard TD and Cooper JA. (1986). Actin and actin-binding proteins: a critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 545-576.
31. Reynaud A.H., Nygaard-Ostby B., Boygard G.K., Eribe E.R., Olsen I., Gjermo P. (2001). Yeasts 253 in periodontal pockets. *J. Clin. Periodontol.* 28:860–4.
32. Rodriguez-Tudela J.L., Cuenca-Estrella M., Farreras P., Rozman C., (2000). *Candidosis sistémicas o profundas*, Medicina Interna. Harcourt S.A., Madrid.

33. Schindler B. and Segal E. (2008). *Candida albicans* metabolite affects the cytoskeleton and phagocytic activity of murine macrophages ;Medical Mycology, 46, 251-258
34. Segal E, Sandovsky-Losica H. (1997). Basis for *Candida albicans* adhesion and penetration. In: Jacobs PM, Nall L (eds). Fungal Disease. New York: Marcel Dekker,; 321334.
35. Sheppard D.C., Filler S.G. (2006). Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. PLoS Pathog. 29(2):e129.
36. Tsarfaty I, Sandovsky-Losica H, Mittelman L, Berdicevsky I, Segal E. Cellular actin is affected by interactions with *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett 2000; 129: 225232.
37. Sandovsky-Losica H, Segal E. Infection of HEp2 epithelial cells with *Candida albicans*: adherence and post adherence events. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46: 470475.
38. Vazquez-Torres A., Balish E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. Microbiol. Mol. Biol. R. 61: 170–192
39. Welch MD and Mullis RD. (2002). Cellular control of actin nucleation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18:247-288.