



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Identificación de microvesículas extracelulares en cepas
clínicas de *Candida albicans***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

ZARAGOZA GARCÍA ISAURA JULIETA

ASESOR:

Dr. Enrique Salas Téllez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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.**

Identificación de microvesículas extracelulares en cepas clínicas de *Candida albicans*.

Que presenta la pasante: **Isaura Julieta Zaragoza García**

Con número de cuenta: **310332024** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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 04 de Diciembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	Dr. Enrique Salas Téllez	
SECRETARIO	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	

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

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar, quiero dar las gracias a mi alma mater: la UNAM quien me permitió formarme en sus aulas desde el bachillerato y posteriormente en esta carrera que tanto me apasiona. Agradezco la ayuda de mis maestros, compañeros, amigos y a la FESC en general por todos los cuantiosos conocimientos, experiencias y oportunidades que me ha otorgado, son incomparables.

Asimismo, reconocer a mi asesor el Dr. Enrique Salas Téllez ya que su apoyo fue crucial para la realización de este proyecto, quiero agradecer a él por cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera en el proceso, agradecerle por la caridad, entusiasmo y destreza con la que enseñó cada clase, discurso y lección, que sembraron en mí el interés por la micología. Gracias a mi maestro por haber aceptado ser mi asesor, gracias a mi maestro por haber elegido tan admirable labor y por haberme permitido los recursos y facilidades en el laboratorio 17 de la UIM para el desarrollo de esta tesis. Mi admiración y respeto hacia usted.

Exaltar el trabajo de los profesores integrantes del jurado. Por el tiempo, disposición e interés invertidos en la revisión de mi tesis: Dra. Alma L. Núñez del Arco; Q.F.B Guadalupe Hernández Torres; Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo y Dr. Tonatiah A. Cruz Sánchez. De todo corazón gracias, por sus valiosas aportaciones y observaciones realizadas.

Gratificar a mis padres: Enrique y Rocío por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a ti mamá por estar dispuesta a alentarme cada larga y agotadora noche de estudio; gracias a ti papá por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias a ambos por cada consejo y regaño, por cada una de sus palabras, ejemplos y acciones que guiaron mi existencia hasta ahora, ya que sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, les admiro infinitamente, es por ello que a manera de devolverles una pequeña parte de todo lo que ustedes han dado por mí, hoy les aseguro que esta hazaña es de ustedes también: ¡lo logramos!

Gracias también a ti hermano: Romeo, siempre dispuesto a escucharme, ayudarme a estudiar o repasar, por prestarme atención cuando te exponía algún tema y aprenderte junto a mí los nombres de todos los microorganismos que veía en clases, gracias por hacer amenos los días y noches de estudio. En general por hacer mi vida más liviana y pintarla de colores a diario. Pues como ya te lo he dicho antes, eres el mejor y más grande regalo que pudieron haberme dado mis padres, eres mi persona favorita en este mundo.

Gracias a Dios por la vida de mí familia, también porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que me aman, y a las que yo más amo en mi vida, gracias a mis padres por permitirme conocer de Dios y de su infinito amor.

Gracias amigos y colegas, éxito siempre!:

Diann y Clariver solo nosotras sabemos bajo qué circunstancias nos conocimos (siempre por llegar tarde a las clases), sin duda fueron las mejores compañeras y amigas que encontré para iniciar esta vida universitaria, siempre tuvimos una dualidad en nuestro ser (que por eso nos entendimos bien) ya que por un lado estaban los días en que estudiábamos a más no poder y éramos muy aplicadas y por otro extremo, nuestro espíritu fiestero. Las quiero mucho, siempre van a tener un lugar especial en mis recuerdos.

Oliver y Jhony porque ustedes me mostraron el lado más divertido de la carrera y es que no todo es seriedad, estrés, dolor y sufrimiento. Ustedes fueron como esa luz al final del túnel porque a pesar de todo, en cualquier momento y lugar uno puede tomarse las cosas menos en serio y aun así disfrutar lo que haces y hacerlo bien, con ustedes las risas nunca faltaron pese a nuestras largas horas de estudio y estrés constante, los llevo siempre en mi corazón, los quiero mil.

Monse Mendoza, ¡amiga! nuestras platicas interminables y que me hacían el trayecto más ameno y corto de regreso a nuestras casas, quizás porque a menudo tenemos cosas en común, como nuestro “novio” Kygo. Siempre voy a agradecer que estuviéramos juntas en esta última etapa que fue la tesis. La verdad no hubiera sido lo mismo sin ti, cuando ya sentía que no daba para más, ahí estabas (poniendo las playlist de Dua Lipa o The Weeknd), de verdad me inspirabas a seguir, ya que también tu experimentación fue difícil y aun así no renunciaste, te quiero mil y en serio gracias por tu confianza y todo. Eres una gran amiga.

Susi Lee y Edith Buendía, ¡amigas! sin ustedes el servicio social simplemente hubiera pasado desapercibido en mi vida, gracias por esperarme afuera del Bicentenario, por las mañanas cuando entrabamos, aunque llegara tarde, o cuando me quede sola en la sección de EGOS y aun a pesar del olor me iban a visitar. En fin, son demasiadas y tan divertidas las anécdotas que vivimos en esos 6 meses (y que gracias a esofloreció esta amistad) que no terminaría aquí, pero ustedes saben que las quiero y admiro, que pese a todo son invaluable los conocimientos y experiencias profesionales que nos llevamos de ahí. Sin duda, fueron las mejores compañeras de servicio.

Nalle Pineda y Dr. Pedro, los mejores compañeros de trabajo que pude encontrar, gracias por hacer mi estancia ahí de lo más ameno, espero la vida nos permita coincidir en más ocasiones, los quiero y aprecio.

Dios, tu amor y bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu voluntad, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta de que los pones frente a mí para que mejore como ser humano, y crezca de diversas maneras.

Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco Dios, no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.

1. Julieta Zaragoza García

Reconocimiento y agradecimiento especiales a los programas:

Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)

PE 209219: *“Aula virtual para el apoyo de la educación en micología medica”*.

Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI) 1845: *“Identificación de los microorganismos involucrados en el biodeterioro y desarrollo de sistemas nano particulados para su control”*.

Por los recursos materiales y facilidades brindados para la realización del presente trabajo, bajo la asesoría del Dr. Enrique Salas Téllez; en el laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Gracias UNAM

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”

*"He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña,
sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la
escarpada"*

- Gabriel García Márquez.

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
II. ÍNDICE DE TABLAS.....	1
III. ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS	2
IV. ÍNDICE DE GRAFICAS.....	3
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1 Aspectos generales.	7
3.1.1 Infecciones fúngicas e importancia en salud pública.....	7
3.2 <i>Candida albicans</i> hongo patógeno más frecuentemente aislado.	7
3.2.1. Genoma de <i>Candida albicans</i>	8
3.2.2. Morfologías de <i>Candida albicans</i>	9
3.3. Epidemiología	11
3.3.1. Candidiasis y candidemias: enfermedades y manifestaciones clínicas.....	14
3.4. Factores de virulencia de <i>Candida spp.</i>	16
3.4.1. Cambio de morfología.	17
3.4.2. Enzimas.....	18
3.4.3. Capacidad de adherencia.....	19
3.4.4. Formación de biopelículas.	20
3.4.5. Otros Factores de virulencia.	22
3.5. Vesículas extracelulares y funciones que desempeñan.	23
3.5.1. Formación y liberación de las microvesículas.	24

3.5.2. Composición de las microvesículas.....	26
4. OBJETIVOS.....	30
5. HIPÓTESIS.....	30
6. METODOLOGÍA.....	31
6.1 Identificación de las muestras empleadas.....	32
6.2 Prueba de la actividad proteolítica de las cepas. Adaptado de (Netzahualcoyotl-Cruz, 2017)	33
6.3 Obtención de microvesículas.....	35
6.4 Tinción de las microvesículas.....	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIONES.....	51
9. REFERENCIAS.....	52

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
SDA	Sabouraud Dextrosa Agar
SAPs	Aspartil proteasas secretadas
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
miRNA	Micro Ácido ribonucleico
IFI	Infecciones Fúngicas Invasoras
CI	Candidiasis invasivas
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ORFs	Open Reading Frame o Marco de lectura abierto
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
PL	Fosfolipasas
VE	Vesículas extracelulares
MVEs	Microvesículas extracelulares
YM AGAR	Agar Yeast Mold
PCR	Polymerase Chain Reaction o Reacción en cadena de la polimerasa.
INP	Información No Proporcionada
ALS	Agglutinin- Like Sequence o Aglutininas como secuencia
QS	Moléculas de Quorum Sensing
MARS	Sustancia Autorreguladora Morfogénica
SOD	Super Oxido Dismutasa
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato

II. ÍNDICE DE TABLAS

Número y título de cuadro o tabla	Página
Tabla 1. Escala para la interpretación de la intensidad enzimática de acuerdo con su valor de Pz	34
Tabla 2. Relación de aislamientos de <i>C. albicans</i> de actividad proteasa débil.	38
Tabla 3. Relación de aislamientos de <i>C. albicans</i> de actividad proteasa moderada.	39
Tabla 4. Relación de aislamientos de <i>C. albicans</i> de actividad proteasa alta.	40
Tabla 5. Origen clínico de las cepas en función del promedio de MVEs presentes	48

III. ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

Número y título de la figura o diagrama	Página
Figura 1. Distintas morfologías de <i>Candida albicans</i>	10
Figura 2. Perspectiva general de la candidemia nosocomial	13
Figura 3. Porcentaje de candidemias producidas por algunas especies de <i>Candida</i> por grupo de edades.	14
Figura 4. Cambio de morfología de <i>Candida spp.</i>	18
Figura 5. Diferentes procesos y fases en el desarrollo de una biopelícula.	21
Figura 6. Vesículas extracelulares.	24
Figura 7. Representación de la biogénesis o formación de diferentes vesículas extracelulares.	25
Figura 8. Representación de una microvesícula.	29
Diagrama 1. Metodología general de la experimentación.	31
Figura 9. Pruebas realizadas para la identificación de las cepas clínicas de <i>C. albicans</i>	32
Figura 10. Actividad proteolítica de diferentes aislamientos de <i>C. albicans</i> en medio con albumina sérica bovina.	34
Figura 11. Microvesículas encontradas en la muestra L17-07-18 de actividad proteasa moderada en agar girasol.	45
Figura 12. Microvesículas de <i>C. albicans</i> de la cepa L17-56-15 con actividad proteasa alta.	46
Figura 13. Microvesícula desarrollada en agar girasol con un clamidoconidia.	46
Figura 14. Desarrollo de microvesículas en agar girasol con tinción de azul de algodón.	47

IV. ÍNDICE DE GRAFICAS

Número y título de grafica	Pagina
Grafica 1. Distribución de cepas conforme a los criterios de intensidad de actividad proteasa propuestos por Hernández-Solis.	37
Grafica 2. Origen clínico de las cepas en función de intensidad de la actividad proteolítica.	42
Grafica 3. Porcentaje de cepas de actividad proteasa moderada en función del promedio de MVEs presentes.	44
Grafica 4. Porcentaje de cepas de actividad proteasa alta en función del promedio de MVEs presentes	45

1. RESUMEN

Las CI representan el 80-90% de las micosis invasivas nosocomiales. Los factores de virulencia de este patógeno oportunista incluyen su habilidad para sobrevivir como comensal, la adherencia a células del hospedador, la secreción de enzimas hidrolíticas y el cambio de morfología. Por todo lo anterior el principal objetivo de esta tesis es demostrar la existencia de vesículas extracelulares en *Candida albicans*, teniendo como hipótesis que entre más alto sea el valor de la actividad proteasa de las cepas a evaluar, será más probable encontrar microvesículas bajo condiciones de desecación y baja concentración de glucosa en el medio. Para la metodología experimental se emplearon 46 cepas clínicas, las cuales fueron resembradas en agar SDA para su crecimiento, por 48h a 35°C y posterior resiembra en agar girasol por triplicado dejándose incubar durante 7 días a 28°C, para finalmente ser identificadas mediante microscopía óptica. Los resultados de las 46 cepas a partir de los criterios de intensidad de actividad proteasa propuestos por Hernandez-Solis, indican la siguiente distribución: el 54.34% de cepas son de actividad proteasa alta; el 28.26% son de actividad moderada y solo el 17.39% son de actividad débil. Por otro lado, de acuerdo con el análisis estadístico que se realizó del origen clínico de las cepas en función de la intensidad de la actividad proteolítica, muestra que en cepas cuyos orígenes fueron secreciones faríngeas y vaginales prevaleció la actividad alta. El análisis de la actividad proteasa en función del promedio de microvesículas presentes en cada muestra, señala que hay un predominio notable de la actividad moderada-alta con un promedio de $\bar{X}=2$ microvesículas. Para finalizar, el análisis estadístico del origen clínico de las cepas en función del promedio de microvesículas presentes, reveló que para todos los orígenes clínicos el promedio que predominó fue de $\bar{X}=2$ microvesículas por campo de visualización.

Por lo anterior, es importante resaltar que las microvesículas pueden entenderse como transportadores multifunción, es decir, la liberación de las mismas les permite, en primer lugar, responder a señales ambientales, en segundo lugar, secretar al exterior componentes propios entre ellos factores de virulencia como lo son las proteasas, por último les permite establecer interacciones con la célula hospedadora.

2. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, diferentes especies de hongos oportunistas han alcanzado una enorme relevancia clínica, como es el caso de *Candida*, en especial la especie *albicans*. Se considera el patógeno oportunista más prevalente en humanos y causa varias formas de candidiasis: desde infecciones superficiales en la piel y mucosas hasta enfermedades sistémicas que ponen en riesgo la vida, en pacientes con el sistema inmune deprimido. Es por ello que *Candida albicans* se ha elegido como modelo de estudio para poder identificar las estructuras que forman parte de sus factores de patogenicidad, denominadas microvesículas, producidas en su pared celular y con ello poder entender mejor las interacciones patógeno-hospedador, así como las condiciones que permiten el desarrollo de estas estructuras y con ello una mayor virulencia, fenómeno que es impedido bajo condiciones normales de inmunidad. (Pérez, 2017)

Por todo lo anterior el principal objetivo de esta tesis es demostrar la existencia de microvesículas extracelulares en *C. albicans*, que podrían servir como medios de diagnóstico de CI o bien como herramientas terapéuticas en un futuro no muy lejano.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Aspectos generales.

3.1.1 Infecciones fúngicas e importancia en salud pública.

Las IFI son un grupo de enfermedades en aumento progresivo en las dos últimas décadas, fundamentalmente en el ámbito nosocomial. Su importancia radica, además, en la morbilidad y mortalidad secundarias a estos procesos, especialmente en el caso de los causados por hongos oportunistas, entre ellas, las candidiasis ya que son los procesos más comunes las cuales inciden más frecuentemente en pacientes con neoplasias hematológicas y en aquellos ingresados en áreas de cuidados intensivos de adultos o niños, sin olvidar la frecuencia en otros pacientes inmunodeprimidos como los que padecen infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) avanzada o los receptores de trasplantes. (Pachon, 2016)

Un aspecto que considerar es la frecuencia creciente de las diferentes especies de *Candida albicans*, menos sensibles a los antifúngicos y que pueden llegar a representar la mitad de los episodios. Entre los hongos filamentosos, deben destacarse las infecciones por especies de *Aspergillus* que inciden en pacientes con neutropenia profunda y prolongada, así como en receptores de trasplantes y otros inmunodeprimidos. Otras micosis invasoras son menos frecuentes, destacando las infecciones por *Cryptococcus neoformans*, sobre todo la forma de meningitis en pacientes con infección por el VIH avanzada, y las infecciones emergentes por otros hongos filamentosos. (Cisneros, 2006)

3.2 *Candida albicans* hongo patógeno más frecuentemente aislado.

C. albicans es un hongo patógeno oportunista del ser humano, que en condiciones normales forma parte de la microbiota habitual del organismo, principalmente de las membranas mucosas de los

tractos gastrointestinal, genitourinario y piel. Sin embargo, en condiciones en las que la respuesta inmune se encuentra disminuida, este hongo es capaz de invadir otros tejidos y órganos de su hospedador llegando a producir infecciones sistémicas que pueden ser graves, causando incluso la muerte del paciente (Geraldine, et al. 2009; Pfaller, et al. 2010).

La mayoría de las especies de *Candida* habitan en el ser humano y otros animales homeotermos, colonizando la boca y aparato digestivo del 30-50% de los individuos. Dicha colonización se produce desde los primeros días de vida y es más relevante en lactantes, niños y ancianos, receptores de antibióticos y quimioterápicos, pacientes con VIH, diabéticos, y mujeres embarazadas (10-40%) (Pemán, et al. 2013).

Las CI representan el 80-90% de las micosis invasivas nosocomiales. La incidencia de CI se incrementó a partir del año 1980, debido a los importantes avances médicos y quirúrgicos, tratamientos oncológicos y trasplantes de órganos sólidos. Desde hace una década la ocurrencia se mantiene estable o ha disminuido, gracias a las mejoras diagnósticas y terapéuticas, pero no habiendo disminución en su mortalidad (Pemán, et al. 2013).

3.2.1. Genoma de *Candida albicans*.

C. albicans es una levadura diploide, con una fase haploide no descubierta hasta el momento y por un largo tiempo fue considerado asexual. Su genoma es de aproximadamente 14,5 Mb y está organizado en ocho pares de cromosomas que albergan alrededor de 6100 genes de un tamaño medio de 1.450 pb. Llamados históricamente del 1 al 7 y R, con 32 Mb y contiene en total 12405 ORF's (Cruz, et al. 2017).

Uno de los hechos más importantes del genoma de *C.albicans*, es la relevancia de los reordenamientos numéricos y estructurales cromosomales que dan lugar a un incremento de la

diversidad genética. Estas alteraciones generan cambios en el fenotipo, permitiendo una mayor adaptación al entorno (Butler, et al. 2009; Selmecki, et al. 2010). Considerando que la variación genética y su evolución en las interacciones huésped/patógeno y el deterioro de la función inmune contribuyen claramente a la gravedad de infecciones por *C. albicans*. (Cruz, et al. 2017).

Otra característica importante es que el hongo posee características que facilitan la transición de un comensal inocuo a patógeno, ya que en muchas de sus especies (como *albicans* o *glabrata*) el codón CUG, que en otras especies codifica para leucina, aquí lo hace para serina. Esta ambigüedad en el uso del codón CUG puede permitirle a *C. albicans*, que bajo condiciones de estrés disminuya la tasa de síntesis de proteínas e induzca la expresión constitutiva de la maquinaria de respuesta a estrés. Así, una respuesta permanente al estrés celular se traduce en una mejor adaptación del hongo a cambios ambientales (Santos, et al. 1999).

3.2.2. Morfologías de *Candida albicans*.

La capacidad de *C. albicans* para cambiar de forma reversible entre la levadura, pseudohifas y morfologías de hifas es ampliamente conocida y es esencial para la patogenicidad en los planos superficiales y sistémicos. La morfogénesis de las hifas se acopla con la virulencia; los genes que controlan la morfología hifal son co-regulados por genes que codifican factores de virulencia. Genes hifa específicos Ume6 y HGC1 son reguladores de la transcripción de las hifas y la morfogénesis. Los niveles de factor de transcripción Ume6 controlan los niveles y la duración de la hifa. (Sjostrom, et al. 2017)

Entre las formas que puede desarrollar como respuesta a estímulos ambientales este hongo polimórfico son: levaduras, hifas, pseudohifas y clamidosporas, tal como se muestra en la Figura 1.

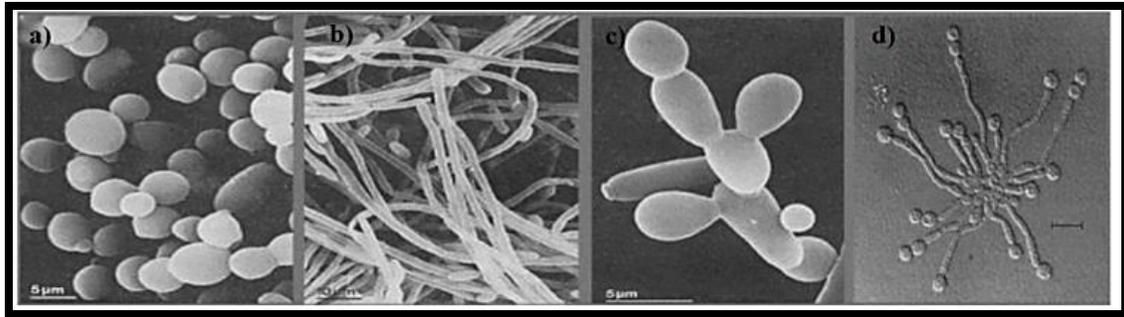


Figura 1. Distintas morfologías de *C. albicans* a) Levaduras; b) Hifas; c) Pseudohifas; d) Clamidosporas (Modificado de Sudbery, et al. 2004)

Las levaduras son formas ovaladas unicelulares que se dividen por gemación y se separan al finalizar la citoquinesis. Las hifas son estructuras multicelulares que presentan un crecimiento hiperpolarizado dando lugar a filamentos en los que las paredes laterales del filamento se mantienen paralelas a nivel del septo. Las pseudohifas se presentan como una forma intermedia entre levaduras e hifas y se caracterizan por presentar constricciones en los planos de división de los diferentes compartimentos celulares y por crecer de forma ramificada (Burnett. 1979; Orlean, et al. 1986; Sudbery, et al. 2001; Sudbery, et al. 2004; Sudbery, et al. 2011). Por último, las clamidosporas se caracterizan por poseer una pared celular gruesa, su formación se da por el engrosamiento de una hifa, el cual se redondea y produce la pared gruesa que las caracteriza, para luego desprenderse al medio y proporcionarle al hongo la resistencia a condiciones desfavorables como el calor y la desecación (García, Vera 1990).

Las especies de *Candida* producen pseudohifas o hifas verdaderas, siendo *C. glabrata* la única excepción. Desde otro punto de vista, *C. albicans* genera tubos germinales y clamidosporas terminales de pared gruesa. La segunda especie más frecuente desde un punto de vista clínico del

género es *C. glabrata*. Esta levadura no genera pseudohifas, ni hifas, y tampoco tubos germinales y clamidosporas.

En condiciones *in vitro*, casi todas las especies de este género dan lugar a colonias lisas de color blanco a crema. *C. albicans* tiene la capacidad de realizar cambios fenotípicos y sufrir un cambio en su morfología colonial, siendo las colonias más rugosas, incluso llegando a ser “vellosas” (Ausina Ruiz, et al. 2006). Es posible que este cambio en su aspecto pueda deberse a una mayor facilidad de esta especie a sufrir cambios en respuesta a una señal ambiental o alteraciones de su micro-ecosistema.

3.3. Epidemiología

En conjunto, las especies de *Candida* representan casi el 80% de todos los hongos patógenos causantes de infecciones nosocomiales puesto que colonizan el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto. También se desarrollan como comensales en la vagina y la uretra, la piel y bajo las uñas del pie y la mano. La candidemia es la forma más común de enfermedad invasiva por esta especie, representando cerca del 15% al 20% de todas las infecciones sanguíneas en los hospitales de los países desarrollados. (Villalobos, et al. 2016).

La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70% de ellas son producidas por *C. albicans* observándose un porcentaje mayor por el serotipo B. Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune.

Por otro lado, el hallazgo de *C. krusei* y *C. glabrata* como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años y son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos (Del Palacio, 2009)

Los casos registrados de candidiasis muestran que el sexo no influye en la frecuencia, a excepción de la candidiasis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación, aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección. (Bouza, 2008)

La tasa de portadores orales es significativamente mayor en poblaciones pediátricas, pacientes ingresados, sujetos infectados por el VIH, personas con dentadura postiza, diabéticos, pacientes sometidos a quimioterapia antineoplásica y antibioterapia. Prácticamente todos los seres humanos pueden albergar una o más especies de *Candida* en su tubo digestivo, y los niveles del estado de portador sano, pueden aumentar hasta los niveles de enfermedad detectable u otra situación de alteración de los mecanismos de defensa del organismo hospedador así que los indicios acumulados permiten esbozar una perspectiva general de la candidemia nosocomial, como a continuación se muestra:

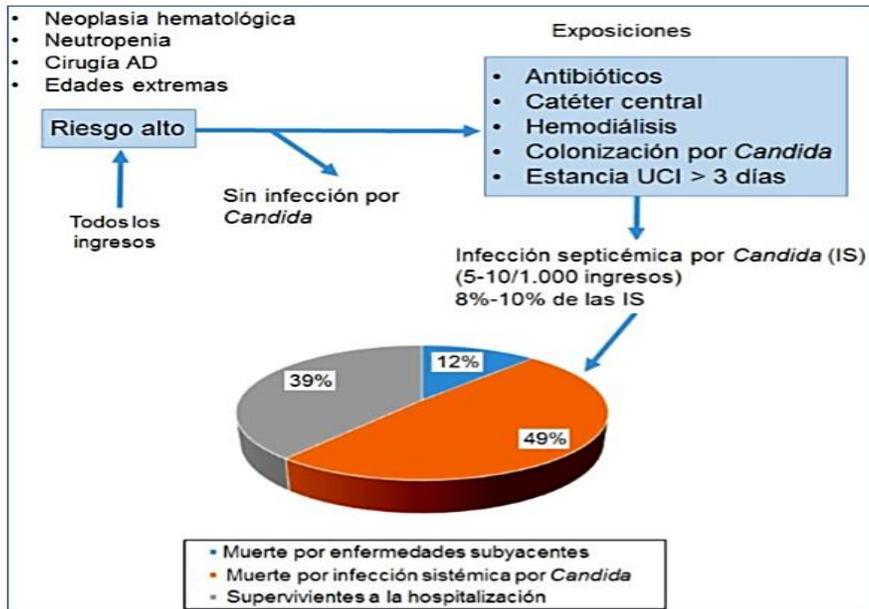


Fig. 2. Perspectiva general de la candidemia nosocomial. AD, aparato digestivo; UCI, unidad de cuidados intensivos. (Adaptado de Pfaller, et al. 2009).

En las últimas dos décadas han ocurrido cambios significativos en la epidemiología de la candidemia, sobre todo relacionados con la frecuencia de las especies involucradas. Se ha observado un descenso de la incidencia de *C. albicans* desde un 90% en los años 70, hasta un 50% o menos en la actualidad, en favor del aumento de otras especies de *Candida* no *albicans*, tales como: *glabrata*, *tropicalis*, *parapsilosis* y *krusei*. La incidencia de candidemia por *C. parapsilosis* ha crecido progresivamente y estudios recientes la ubican como la tercera causa más frecuente de candidemia en el mundo. Además, esta infección conduce a una alta mortalidad atribuible a una estancia hospitalaria prolongada y por lo tanto un aumento en los costos de atención. (Pfaller, 2007)

Mientras que *C. albicans* y *C. parapsilosis* son especies importantes en la etiología de infección sistémica en lactantes y niños, en las personas de mayor edad, se observa una disminución de las infecciones por ambas especies, en paralelo a un notable incremento de las debidas a *C. glabrata*., como se observa en la figura 3. De igual modo, aunque *C. albicans* es la especie dominante de infección septicémica en Norteamérica, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* tienen una mayor frecuencia en Latinoamérica. (Pfaller, 2007)

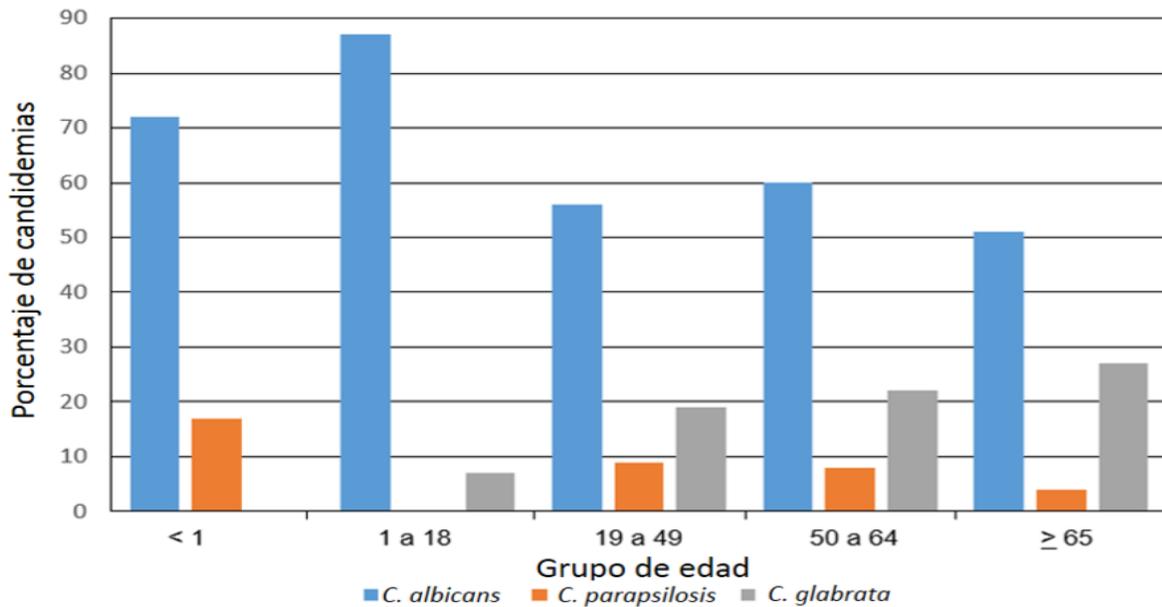


Fig. 3. Porcentaje de candidemias producidas por algunas especies de *Candida* por grupo de edades en Norteamérica. Datos tomados de *Las infecciones emergentes y la epidemiología de organismos inferiores*, 1998 a 2001. (Datos tomados de Pfaller, et al. 2007)

3.3.1. Candidiasis y candidemias: enfermedades y manifestaciones clínicas.

Es una infección primaria o secundaria, causada por levaduras del género *Candida*, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas, muco-cutáneas, profundas o diseminadas (Pappas, 2009).

El principal agente etiológico es *C. albicans*, pero pueden estar implicadas otras especies como: *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. famata*, *C. krusei*; *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, etc. Levaduras de otros géneros distintos de *Candida* como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* pueden dar cuadros clínicos similares a la Candidiasis. (Ponton, 2006)

Por lo mencionado anteriormente, la mayor parte de las infecciones son de origen endógeno a partir de los reservorios muco-cutáneos o cutáneos (introducidos a partir de catéteres u otros dispositivos de uso médico, que interrumpen la barrera cutánea), aunque también pueden ser exógenas, por ejemplo en los hospitales, donde las levaduras pueden ser transmitidas a lactantes a partir de biberones mal esterilizados, o a pacientes transplantados o inmunosuprimidos a partir de materiales quirúrgicos, equipos de diálisis o endoscopios mal descontaminados o por transmisión horizontal a partir de la existencia de infecciones por levaduras en manos o uñas del personal que trabaja en UCI, sin la debida protección.

El espectro de infección abarca desde las enfermedades de las mucosas y cutáneas superficiales, hasta la diseminación hematógena extensa, con afección de órganos vitales como el hígado, el corazón, el bazo, el riñón y el cerebro. La candidiasis invasora o candidemia es una de las manifestaciones más graves de la infección por *Candida spp.*, y su diagnóstico se realiza mediante el aislamiento de dicho microorganismo en hemocultivos. (Ponton, 2007)

Los factores desencadenantes de la enfermedad son generalmente modificaciones en los mecanismos de defensa del huésped, los cuales, secundariamente, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección están en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del huésped.

Las causas predisponentes a candidiasis y candidemias se pueden agrupar en:

- Locales: Maceración de tejidos cutáneos, contacto con agua, mala higiene.
- Fisiológicas: Recién nacidos, vejez (edades extremas), embarazo.
- Endocrinas: Diabetes, hipotiroidismo.
- Alteración de la microbiota normal: Por uso de antibióticos.
- Enfermedades hematológicas: Linfomas, leucemias, anemia aplásica, agranulocitosis, neutropenia, hipo y agamaglobulinemia.
- Factores iatrogénicos: Uso prolongado de corticoides, quimioterápicos, inmunosupresores, agentes citotóxicos, alimentación parenteral, transplantes, cirugía abdominal, utilización de sondas y catéteres, radioterapia, prótesis, hemodiálisis, cateterismo.
- Enfermedades debilitantes: Neoplasias, infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), inanición, quemaduras graves y extensas, drogadicción, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas.

3.4. Factores de virulencia de *Candida spp.*

El potencial patogénico de las levaduras varía considerablemente. Éstas no son un componente pasivo del proceso infeccioso, sino que poseen una serie de factores de virulencia. No existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección. Estos factores incluyen su capacidad para sobrevivir como comensal, la adherencia a células del hospedero, la secreción de enzimas degradativas y el cambio de morfología. Estos factores de virulencia juegan un papel en cada etapa de la infección por *C. albicans*. (Lim, 2012)

3.4.1. Cambio de morfología.

C. albicans puede cambiar su morfología de levadura, redonda u ovoide (blastoconidia) a filamentosa y elongada (hifa y pseudohifa), otorgándole mayor virulencia, capacidad de evadir el sistema inmune y de suprimir la respuesta proinflamatoria del hospedero. Las hifas verdaderas crecen en la presencia de suero a 37 °C, pH de 7 y concentración de CO₂ de 5,5 %. Algunos estímulos para el crecimiento en forma unicelular son temperaturas más bajas, pH más ácido, ausencia de suero y altas concentraciones de glucosa. (Karkowska-Kuleta, 2009)

La forma de levadura es útil para facilitar la diseminación del hongo en el torrente sanguíneo al adherirse de forma significativa a las células endoteliales, mientras que la hifa es responsable de la invasión celular. Este último evento mediante la expresión de superficie de proteínas similares a la invasiva, como *Als 3*, que inducen la endocitosis del hongo por las células del hospedero; la penetración activa entre las células epiteliales gracias a las actividades relacionadas a las hifas como la producción de *SAP*'s y la fijación de ferritina por el receptor de *Als3*, con lo cual el hongo puede captar el hierro que le sirve para su supervivencia. (Almeida, 2009)

Se han estudiado a fondo las vías de señalización que traducen señales ambientales para inducir el cambio de morfología. El contacto de *C. albicans* con superficies abióticas o células del hospedero estimulan la formación de hifas (tigmotropismo) y la inducción simultánea de las adhesinas asociadas a ellas, esto se ilustra en la figura 4 (Kumamoto, 2005). Se reconocen vías de señalización estimuladoras e inhibitoras de este proceso. Una de estas vías está codificada por un primer grupo de genes encargados de la filamentación como *EFG1*, *Ras1*, *CYR1* y *CPHI*, además de peptidoglicanos bacterianos en el suero humano, la nutrición limitada y bajos niveles de oxígeno (Huang, 2012)

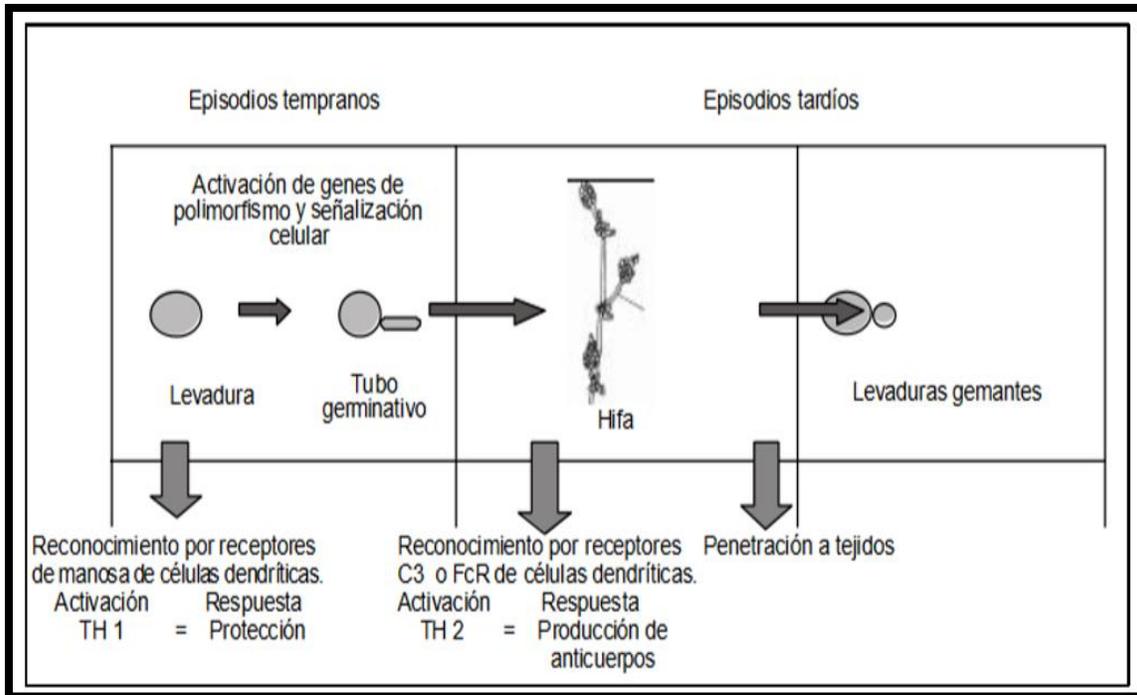


Figura 4. Cambio de morfología de *Candida spp.* Durante la infección.

3.4.2. Enzimas.

Existen dos grandes familias de enzimas degradativas secretadas y algunos de sus miembros han sido asociados con invasión. Corresponden a las SAP (codificadas por 10 genes) y las PL. Las primeras pueden estar unidas o incorporadas en la pared celular o ser secretadas y sirven para que *C.albicans* hidrolice proteínas del hospedero como colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas y nitrógeno; además de otras funciones especializadas durante el proceso infeccioso que incluye digerir o deformar las estructuras en la superficie de las células del hospedador y facilitar la adhesión en los tejidos del mismo, la invasión por degradación o alteración de las estructuras y la destrucción de moléculas del sistema inmunitario del hospedador para evitar o resistir el ataque de éste. Por otro lado, se han identificado cuatro fosfolipasas (Pla, Plb, nPlc y Pld), de las cuales sólo la Plb1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia de *Candida* en modelo animal (Leidich, et al. 1998). Una cepa con la delección de este gen y su

consiguiente menor expresión de la enzima reduce su virulencia hasta en un 60%, comparada con la cepa salvaje. Se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos (Calderone, et al. 2001).

De esta forma puede invadir entre las células epiteliales (Jacobsen, 2012), nutrirse y evadir la respuesta inmune (Monod, 2002). *SAP*'s 1, 2 y 3 son secretadas sólo por levaduras y contribuyen al daño tisular e invasión del epitelio oral y la epidermis. *SAP*'s 4, 5 y 6, producidas por las hifas, son importantes para la infección sistémica. *SAP*'s 9 y 10 están conectadas con la pared celular fúngica al poseer un sitio de unión GPI (Naglik, 2004).

3.4.3. Capacidad de adherencia.

La adherencia a células del hospedero es crucial para iniciar y mantener la relación de comensal, además de servir para la colonización de las células epiteliales, endoteliales, factores solubles, matriz extracelular y materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedero. En ella están implicados mecanismos de diferente naturaleza: unos que establecen uniones de carácter fisicoquímico que acercan el patógeno a la superficie del hospedero, tal como la hidrofobicidad, y otros de naturaleza específica que implican la presencia de adhesinas y receptores en el sustrato.

Hay cuatro componentes proteicos del tubo germinal que conforman una capa externa fibrilar y le confieren hidrofobicidad al hongo, además de funcionar como receptores para proteínas del hospedero como laminina, fibrinógeno y complemento. La hidrofobicidad también se debe a la presencia de la proteína *Csh1p* que contribuye a la adherencia de *C. albicans* a proteínas de la matriz extracelular y al plástico, favoreciendo la formación de biopelículas.

Las adhesinas son biomoléculas que promueven la unión a las células del hospedero a sus ligandos. Se han identificado varias adhesinas como *Ala1p*, *Als1p* y *Hwp1p*, *Csh1*, *Ywp1*, *Pra1* y *SAP*'s, las

cuales son críticas para la colonización e inducción de enfermedad y su correcta función puede ser facilitada por otras proteínas como Ecm33 y Utr2 (Zhu, 2010).

Existe un grupo de adhesinas codificado por la familia de genes *ALS* que transcriben ocho proteínas de la superficie celular ligados a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y cuyos miembros median la unión a diversos sustratos del hospedero. Por ejemplo, las *ALS 1, 3* (expresada en las hifas) y *5* fomentan la fusión a constituyentes de células epiteliales orales, mientras que la *6* y *9* no lo hacen. El sustrato de las *2, 4* y *7* no ha sido determinado aún. Las *ALS* actúan cooperativamente y forman agregados similares a amiloides a lo largo de la superficie celular, facilitando la aglutinación de las células fúngicas. Otras moléculas que promueven la adhesión y penetración de *C. albicans* son los polisacáridos, glicoproteínas y lípidos en su superficie celular (Henriquez, 2006).

3.4.4. Formación de biopelículas.

Las biopelículas de *C. albicans* consisten en una estructura de levaduras e hifas embebidas en una matriz extracelular producida por sí misma y para su formación participan diferentes aspectos como adhesión, crecimiento, germinación, formación de micro colonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración, mismas que contribuyen a la dificultad en el tratamiento de pacientes con infecciones sistémicas, debido a la alta resistencia a la respuesta inmune, a los medicamentos antifúngicos y a que genera una adhesión en las superficies de artefactos médicos como catéteres, tubos endotraqueales, prótesis y válvulas cardíacas (Karkowska-Kuleta, 2009). La formación de la biopelícula está regulada por el factor de transcripción *Bcr1p*. También contribuye a la formación de biopelícula, la adhesina *Hwp1*, una de las adhesinas específicas de hifa (Naglik, 2003).

Para su formación es necesario que las levaduras se unan a la superficie del látex, silicona o plástico por medio de adhesinas, que como Eap1, empiecen a formar tubos germinales, se adhieran fuertemente a las células endoteliales y finalmente originen hifas, las cuales maduran dentro de una matriz extracelular, debido a la interacción entre *Als2* y *3* con *Hwp1* (Tronchin,2008). La producción de farnesol, propicia la liberación de las levaduras recién formadas en la biopelícula para diseminarse y colonizar una nueva superficie (Ver figura 5) (Brand, 2012).

Se ha propuesto que la matriz extracelular de las biopelículas causa la disminución de la difusión o secuestro de los antimicrobianos y posiblemente también existan mecanismos adicionales que facilitan este proceso, como la expresión de genes inducidos por contacto, para adquirir otras propiedades y mediante el cual se adquiere la resistencia a los antibióticos (Donlan, 2002).

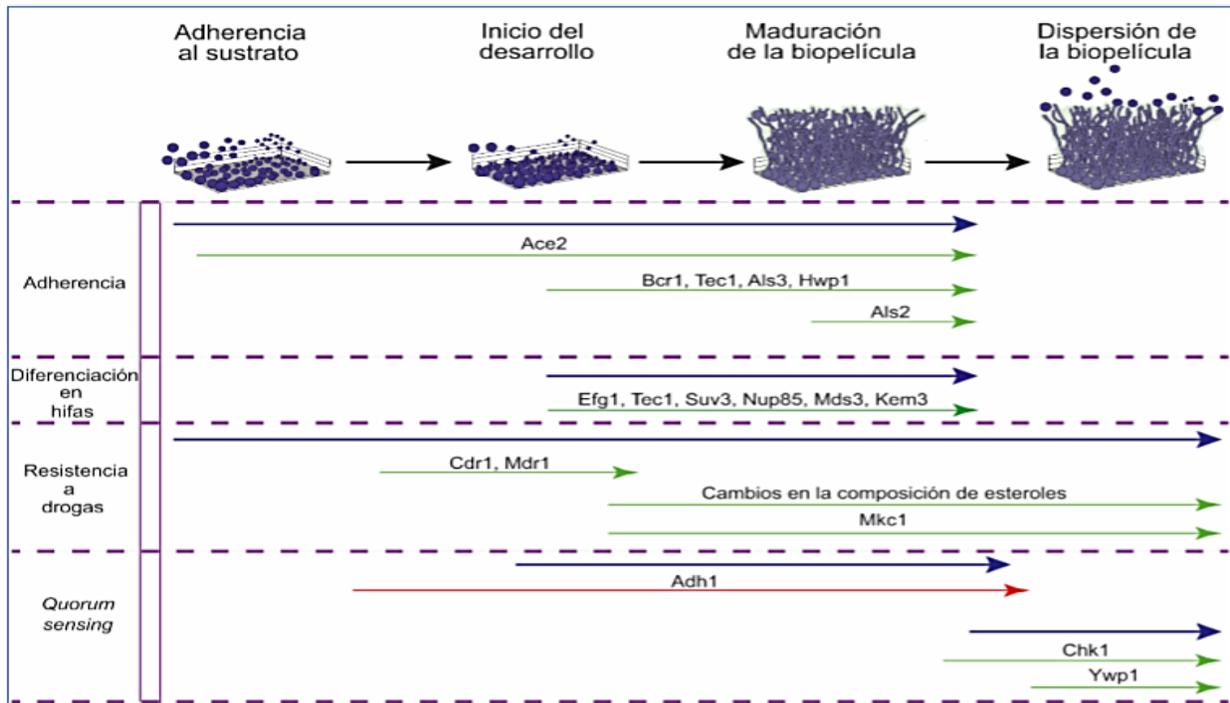


Figura 5. Diferentes procesos y fases en el desarrollo de una biopelícula. (Adaptado de Blankenship, et al. 2006).

3.4.5. Otros Factores de virulencia.

- Niveles altos de *SOD5*: El cual codifica una superóxido dismutasa y catalasa extracelular que neutralizan el ambiente oxidativo de los monocitos, macrófagos y neutrófilos produciendo lisis de estas células y también escapa de los fagocitos al ser expresada en las hifas de *C. albicans* (Jacobsen, 2012). Así mismo, evade la respuesta inmune al inhibir la expresión de péptidos antimicrobianos (Jayatilake, 2009).
- Moléculas de QS: *C. albicans* cuenta con varios compuestos considerados como sustancias MARS tales como: farnesol y triptofol, que bloquean la filamentación, y el tirosol, que la promueve. Farnesol es una molécula lipofílica que se localiza en las membranas del hospedero causando alteración en su fluidez, creando una puerta de entrada para la invasión de este patógeno. Además, modula de forma negativa la respuesta inmune celular *Th1* del hospedero y promueve la *Th2*, haciendo menos efectiva la defensa contra este hongo (Kruppa, 2009).
- Manoproteína extracelular *Cig1*: *C. albicans* necesita hierro para lograr la colonización y proliferación dentro del hospedero, el cual consigue a través de la lisis de eritrocitos gracias a una manoproteína de su superficie celular (Almeida, 2009).
- Calcineurina: Es una enzima de señalización regulada por calcio y es esencial para su sobrevivencia (Gauwerky, 2009).
- Producción de partículas de melanina *in vitro*: Se conoce el rol protector de la melanina frente a enzimas hidrolíticas, antifúngicos, péptidos antimicrobianos, radiación ultravioleta y temperatura (Jayatilake, 2009).

3.5. Vesículas extracelulares y funciones que desempeñan.

Las VEs son estructuras de bicapa lipídica liberadas por diversas células eucariotas como lo son las levaduras, además de los conocidos cuerpos apoptóticos, producen exosomas y ectosomas, orgánulos que han sido estudiados en profundidad en los últimos años (Harding, et al. 2013). Los primeros tienen un diámetro de entre 30-100 nm y son de origen endosomal, siendo liberados por exocitosis a partir de cuerpos multivesiculares. Los ectosomas son de un tamaño mayor (100-1000 nm) y son generados a nivel de la membrana plasmática. Ambos tipos de vesículas son liberadas tanto de forma constitutiva como en respuesta a estímulos (György, et al. 2011).

Sin embargo, cabe mencionar que las VE tienen distintos nombres dependiendo de su célula de origen o su tamaño. Algunos de los nombres comunes atribuidos a estas estructuras son: exosomas, ectosomas, cuerpos apoptóticos, microvesículas, vesículas de membrana externa, nanovesículas entre otros. (Deatherage, 2012)

Antiguamente se consideraba que las vesículas extracelulares eran exosomas producidos por el daño o lisis celular que contenían material de desecho, en la actualidad se sabe que permiten establecer comunicaciones entre células y participan en diferentes procesos biológicos. (Cocucci, et al. 2009; Vlassov, et al. 2012). En la actualidad se puede afirmar que las microvesículas participan en importantes procesos biológicos (metabolismo de carbohidratos y síntesis de proteínas) y de comunicación intercelular. También transportan moléculas de los patógenos al huésped y pueden diseminar antígenos y agentes infecciosos. A continuación, se muestra un esquema de diferentes vesículas extracelulares (Figura 6).

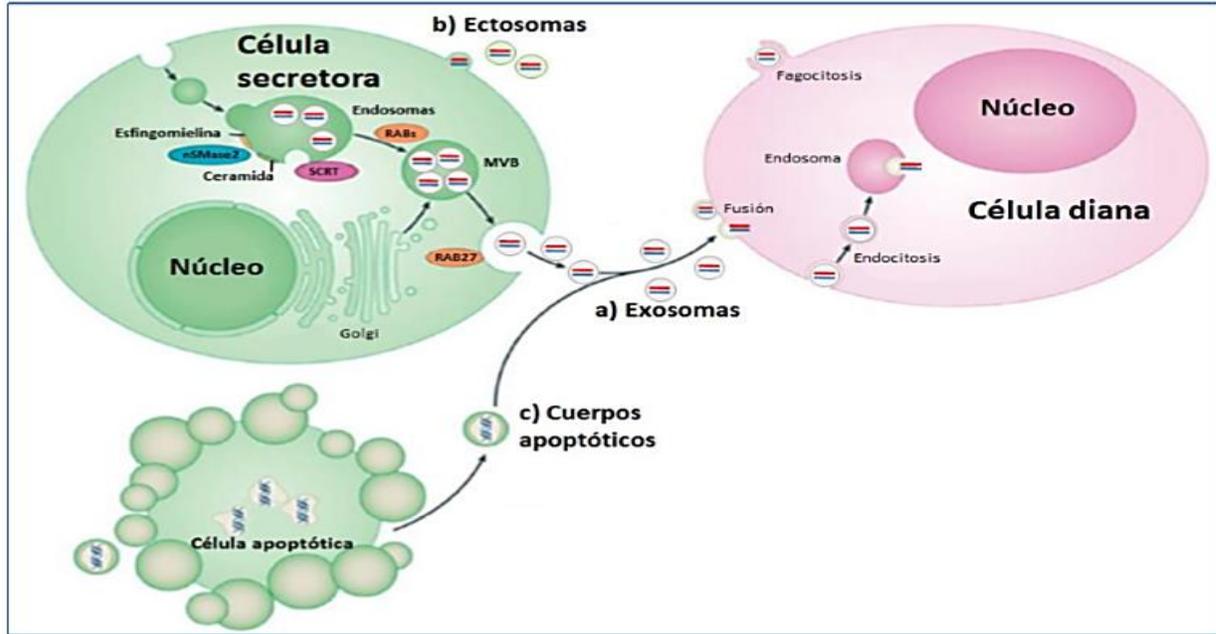


Figura 6. Vesículas extracelulares. Se muestran de forma esquemática los diferentes tipos de vesículas extracelulares producidas por una célula eucariota, representada en verde (modificación de Cocucci, et al, 2009)

3.5.1. Formación y liberación de las microvesículas.

La formación de las MVEs implica la segregación del contenido de los futuros exosomas sobre una región de la membrana endosomal y la posterior invaginación de vesículas de tamaño variable hacia el lumen de un endosoma temprano. Estos mecanismos sugieren una gran complejidad en la composición de los MVEs, incluyendo las membranas y las moléculas citoplasmáticas. (Yuan, et al. 2016). A diferencia de los MVEs destinados a la degradación en el lisosoma, aquellos que se fusionarán con la membrana plasmática presentan una composición lipídica diferente, enriquecida en ergosterol, a continuación, en la Figura 7 se muestra el posible mecanismo de biogénesis o formación de microvesículas.

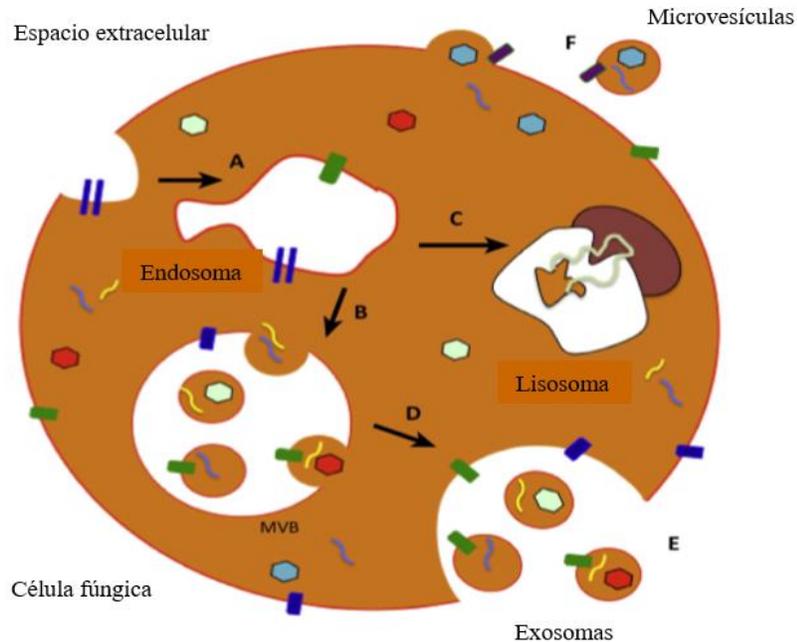


Figura 7. Representación de la biogénesis o formación de diferentes vesículas extracelulares. Adaptado de Coakley, 2015. A) Formación temprana de endosomas dentro de la célula parental, rodeada por una variedad de diferentes moléculas de bioactivación [por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos (indicados por diferentes colores y/o formas)]. (B) En el desarrollo hacia un endosoma tardío, la brotación hacia adentro permite la captura de algunos de los contenidos citosólicos de la célula huésped en las vesículas intraluminales (VIL). El endosoma tardío también se conoce como un cuerpo multivesicular (MVB). (C) Algunos MVB maduros se fusionan con el lisosoma hidrolítico, donde la carga de la vesícula se degrada posteriormente. (D) Los MVB también pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática, liberando sus VIL, ahora conocidos como exosomas, en el espacio extracelular. (E/F) Liberación de los exosomas en el entorno extracelular.

Por otro lado, en cuanto a la liberación de las vesículas extracelulares, poco se sabe de este importante proceso, sin embargo, la literatura apoya tres posibles hipótesis:

a) Las MVEs pueden forzarse a través de la pared por la presión de la turgencia después de la liberación de la membrana plasmática. En este caso su liberación puede estar regulada por el tamaño o grosor de los poros de la pared celular

b) Alternativamente, o, además, las enzimas modificadoras de la pared celular liberadas pueden facilitar un aflojamiento de la pared para permitir la liberación de MVEs, tales enzimas se han encontrado en purificaciones tanto fúngicas como bacterianas (p ej. en gram negativas).

c) Finalmente, las MVEs pueden transitar a través de los canales, y es posible que la deformación de estas permita su paso a través de los poros que son más estrechos que el diámetro las mismas. Las MVEs pueden ser guiadas a los canales por tubulina, que se ha encontrado en muchas preparaciones de proteómica fúngica u otros cables moleculares.

Una mayor permeabilidad de las paredes celulares fúngicas vivas en comparación con las células muertas podría determinar el tamaño de las MVEs que pueden transportarse a través de la pared celular. Además, estas diferencias entre las células fúngicas vivas y muertas pueden explicar la falta de liberación de MVEs por parte de las células fúngicas muertas. Los datos se mezclan para apoyar las hipótesis anteriores con respecto al tránsito de VE a través de la pared celular de los hongos. La pared celular fúngica es un orgánulo dinámico que rodea la membrana plasmática y se remodela constantemente de acuerdo con el ciclo celular, las condiciones metabólicas y ambientales. (Brown, 2015)

3.5.2. Composición de las microvesículas.

La composición de las MVEs es indicativa tanto de su origen (endosomal o a partir de la membrana plasmática) como del tipo celular del que fueron secretadas, así como también puede dar información de su posible papel fisiológico o sus células diana (Van Doormaal, et al. 2009). Las MVEs típicamente presentan proteínas asociadas a endosomas, proteínas que se concentran tanto en endosomas como en la membrana plasmática. El mecanismo por el cual proteínas citosólicas son específicamente incluidas en los exosomas aún no se ha dilucidado, pero se cree que podría involucrar la interacción de proteínas de la membrana exosomal con chaperonas celulares, encargadas de la selección de las mismas.

Estudios proteómicos de MVEs de diferentes hongos muestran la presencia de un considerable número de enzimas asociadas a rutas metabólicas, algunas de estas enzimas son características de especies determinadas. Mientras tanto otras proteínas realizan infinidad de funciones biológicas primarias y secundarias (Jeffery, 2014). Las enzimas más relevantes detectadas, son necesarias para la glicolisis, fermentación, gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato (Nimrichter, et al. 2016). En este grupo de moléculas que han sido detectadas en *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, se encuentran:

- GAPDH: Es una proteína citoplasmática y presente en la MVEs, detectada también en la capa más externa de *C. albicans*, que favorece la adhesión a laminina y fibronectina de células del hospedero (Gozalbo, 1998).
- Enolasa y transaldolasa: La enolasa es una de las moléculas más abundantes en la pared celular y presente en las MVEs de dicha levadura (Angiolella, et al. 1996). De hecho, se considera el principal antígeno que activa el sistema inmune humoral, tanto en ratones como en humanos en candidiasis diseminadas (Sundstrom, et al. 1994; Pitarch, et al. 2008; Pontón. 2009). Autores como Li y colaboradores (2013), sugieren que presentar anticuerpos de *C. albicans* tipo IgG frente a enolasa y aldolasa en combinación podría servir para diagnosticar candidiasis invasiva, es decir podrían servir como marcadores.
- Proteínas del grupo de las Hsp70: *C. albicans* expresa dos de ellas como son la Ssa1 y Ssa2. Ssa2 ha sido localizada en la membrana plasmática, pared celular tanto de las levaduras como de las hifas y en las MVEs (López-Ribot, et al. 1996). Por otra parte, Ssa1 es necesario in vitro para la endocitosis de las células endoteliales y epiteliales. La presencia de Ssa1 en *C. albicans* incrementa su virulencia ya que facilita la candidiasis orofaríngea y la invasión hematológica (Sun, et al. 2010).

En más estudios de *C. albicans* se han detectado también hidrolasas tales como: glicosilasas, lipasas y proteasas, estas enzimas podrían permitir la liberación de las MVEs durante situaciones de estrés celular (Nimrichter, et al. 2016, Sugiyama, et al. 2016).

En cuanto a su composición lipídica, las MVEs se ven enriquecidas (en relación a la membrana plasmática) en esteroides, esfingomielina y derivados de la ceramida. Finalmente, se ha visto que las MVEs presentan una composición glucídica diferencial con respecto a las células de las que se originaron. Los ácidos grasos en estas mismas son en su mayoría saturados o monoinsaturados (Batista, et al. 2011).

Un aspecto de las MVEs que resulta de vital interés es que estas contienen RNA mensajero y pequeños RNAs que son funcionales en la célula diana (Valadi, et al. 2007, Bellingham, et al. 2012). Adicionalmente, otros pequeños RNAs no codificantes, entre los que se encuentran aquellos derivados de RNA de transferencia (descrita a continuación una MVs con sus diversos componentes en la figura 8) también se han detectado dentro de MVEs.

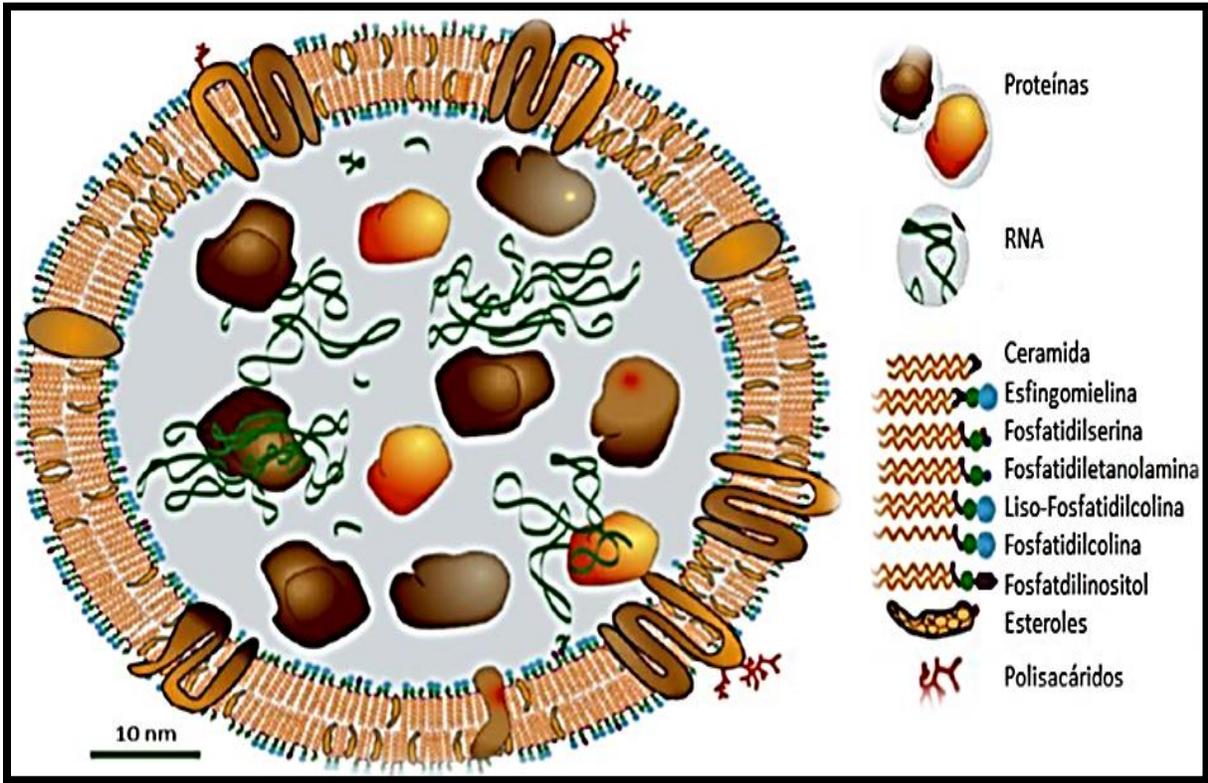


Figura 8. Representación de una MVE fúngica, donde se muestra la composición lipídica de la membrana y el contenido proteico y de RNA, manteniendo las relaciones de tamaño. (Adaptado de Vlassov, et al. 2012).

4. OBJETIVOS

Generales:

- ✚ Demostrar e identificar morfológicamente la presencia de microvesículas en cepas clínicas de *Candida albicans* mediante microscopía óptica, correlacionando la presencia de estas con sus factores de patogenicidad, para evidenciar la relación de actividad proteasa con la presencia de las microvesículas.

Particulares:

- ✚ Evaluar la eficiencia del medio: semilla de girasol con glucosa para favorecer la formación de microvesículas.
- ✚ Implementar una tinción particularmente favorable para teñir las microvesículas presentes en las cepas de *Candida albicans*.
- ✚ Correlacionar cualitativamente la presencia de las microvesículas con la actividad proteolítica de estas, como factor de patogenicidad en cepas clínicas de *Candida albicans*.
- ✚ Comprobar que, bajo ciertas condiciones de estrés en los cultivos, será más factible hallar microvesículas.

5. HIPOTESIS

Si el valor de la actividad de proteasa de las cepas clínicas a evaluar tiende a ser más alto o con mayor intensidad, entonces será más factible encontrar microvesículas extracelulares.

6. METODOLOGÍA

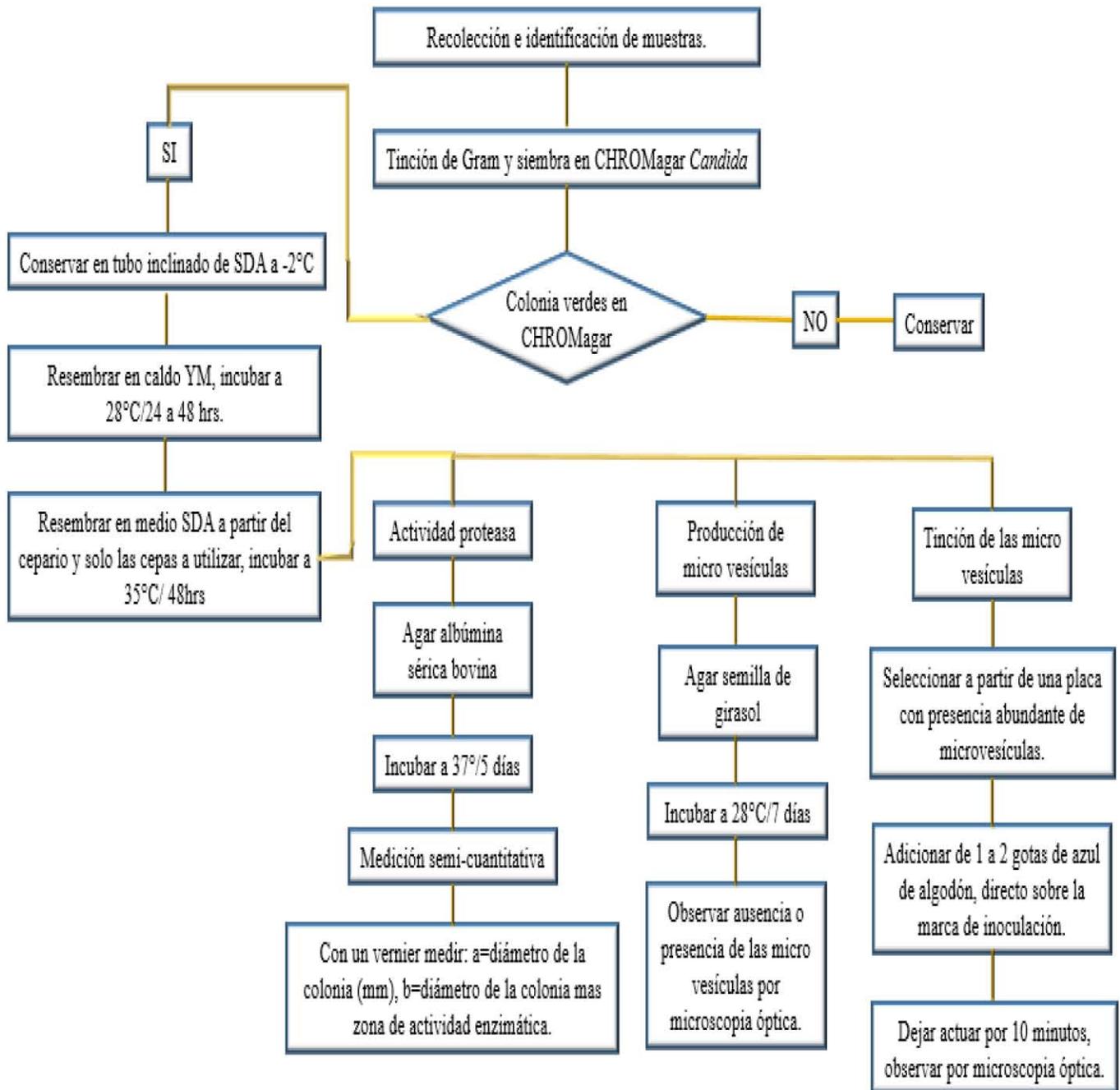


Diagrama 1. Metodología general de la experimentación.

6.1. Identificación de las muestras empleadas.

Una vez recibidas las 46 muestras del Hospital Regional de Tlalnepantla (etiquetadas como *Candida spp*), fueron resembradas en medio SDA por 24 hrs a 37°C. Para posteriormente ser sembradas en CHROMagar Candida con el objetivo de identificar de que especie de *Candida* se trataba, por lo tanto, las cepas cuyo resultado fue color verde (indicador para la especie *albicans*), fueron las seleccionadas para conservar y trabajar con ellas posteriormente. Luego para corroborar que las muestras no estuviesen contaminadas con bacterias se les realizó la tinción GRAM. Por último, gracias a la técnica de biología molecular PCR (identificación hecha en CINVESTAV), se realizó la identificación de las cepas utilizadas para este trabajo y se confirmó que pertenecen al género *Candida* especie *albicans*.

Una vez ya identificadas (fueran o no de la especie *albicans*) fueron resembradas en tubos con medio YM inclinado, se conservaron en un medio que consiste en Litmus Milk-glicerol estéril para ser congeladas a -74°C de temperatura.

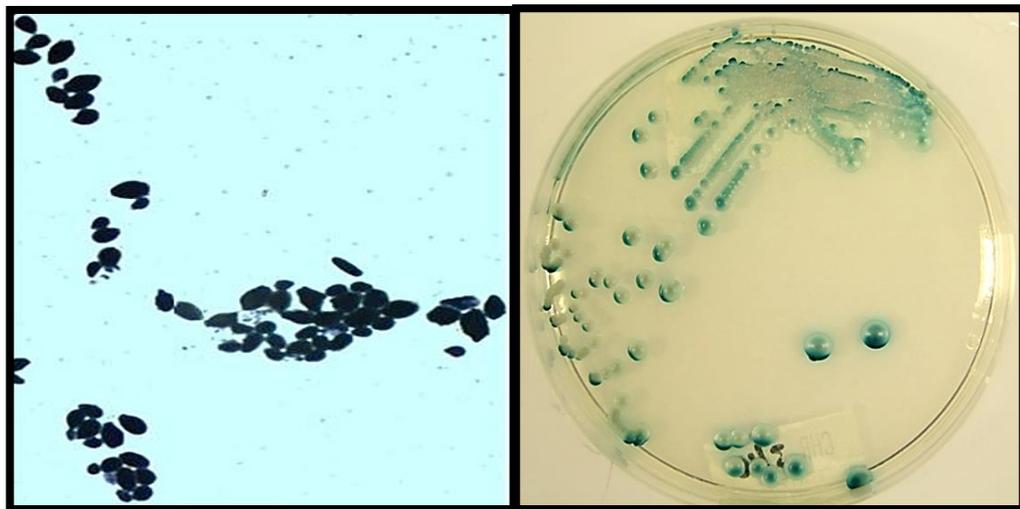


Figura 9. Pruebas realizadas para la identificación de las cepas clínicas de *Candida albicans*. A la izquierda se observa la tinción Gram (100x), a la derecha colonias de color verde claro (obtenidos en CHROMagar Candida)

6.2. Prueba de la actividad proteolítica de las cepas. Adaptado de (Netzahualcóyotl-Cruz, 2017)

- Preparación del medio:

Se utilizó el método en placa, empleando medio de cultivo que contiene: 0.5 g K_2HPO_4 ; 0.04 g $MgSO_4 \cdot H_2O$; NaCl 1g; 0.2 g extracto de levadura; 4 g de glucosa y 4 g de agar bacteriológico por cada 150 ml de agua destilada, esta solución es esterilizada en autoclave a 121°C/15lb/15minutos.

Se pesó 0.5 g de albúmina sérica bovina; que sirve como única fuente de nitrógeno, y se solubilizó en 50 ml de agua destilada tras lo cual se filtró con la ayuda de papel con tamaño de poro de 0.45 μ l (Millipore ®). Se agregó al medio, se disolvió con agitación suave y se dispensó en las cajas estériles de 100 x 15 mm.

- Sembrado

Se prepararon suspensiones de células con SSF estériles igualadas al 0.5 del nefelómetro de McFarland y se inocularon 10 μ l de la suspensión por triplicado en cada placa y se incubaron a 37°C por 5 días.

- Lectura de resultados

Transcurrido el tiempo se tiñeron con amino black al 0.6%; la decoloración se realizó con ácido acético al 20%. Se midieron los diámetros de las colonias y de las zonas claras alrededor de cada una de ellas (Figura 10), con la ayuda de un vernier, y los valores en milímetros (mm) son utilizados para calcular el índice de actividad enzimática (Pz) de la siguiente forma:

$$P_z = \frac{a}{b}$$

Donde:

a= Diámetro de la colonia (mm)

b= Diámetro de la colonia más la zona de precipitación (mm)

Interpretación de resultados:

Valor de Pz	Actividad enzimática (proteasa)
1.0	Sin actividad
$0.900 \leq P_z \leq 0.999$	Muy débil
$0.800 \leq P_z \leq 0.899$	Débil
$0.700 \leq P_z \leq 0.799$	Moderada
$P_z \leq 0.699$	Alta

Tabla 1. Escala para interpretación de intensidad enzimática de acuerdo con su valor de Pz (Hernandez- Solis, 2014)

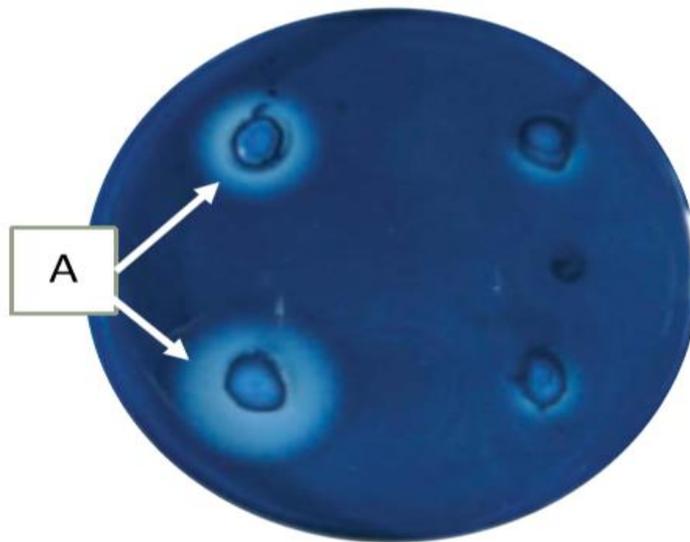


Figura 10. Actividad proteolítica de diferentes aislamientos de *C. albicans* en medio con albumina sérica bovina, después de cinco días de incubación. A: se puede observar un área de actividad que no fue teñida por el colorante tras la incubación. (Ombrella, 2008)

6.3. Obtención de microvesículas.

- Preparación del agar semilla de girasol:

A 500 ml de agua destilada, se agregó 25 g de semilla de girasol pulverizada (completa con cáscara). Hirvió por espacio de 20-30 minutos o hasta la observación de la disolución de los grumos. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar para poder filtrar con gasas y/o tamiz. Una vez filtrado, se adicionó agua destilada hasta completar 500 ml. A lo anterior se añadió: 0.5 de KH_2PO_4 ; 7.5 g de base agar; 0.5 g de glucosa y se mezcló. Se esterilizó en autoclave a $121^\circ\text{C}/15\text{lbs}/15\text{ min}$. Se dejó enfriar a temperatura de $45\text{-}50^\circ\text{C}$ y vertió en cajas Petri de 100x15 mm.

- Sembrado:

Partiendo de un cultivo fresco en medio SDA de entre 24-48 hrs y de cepas cuyo resultado obtenido para la actividad proteasa fuera de moderada y alta (preferentemente), se tomó una asada y se realizó una estría sobre el agar, rasgándolo un poco. Una vez hecha la inoculación, se colocó un cubreobjetos estéril sobre cada estría (se realizaron 3 estrías por caja) de cada cepa clínica. Se incubaron a 28°C de 7-10 días (se estuvo monitoreando por microscopia óptica a partir del séptimo día).

- Lectura de resultados:

Una vez transcurridos los 7 días, se buscaron las micro vesículas en los cultivos por microscopia óptica directamente de las cajas Petri y a través de los cubreobjetos previamente colocados. Se observó al microscopio, primero con el objetivo (10x) para tener una visión de campo más general. Cambió al objetivo

(40x), para seleccionar la mejor área de evaluación. Se realizó la cuantificación de estas con el objetivo de inmersión (100x). Se revisaron al menos 10 campos de las preparaciones con el microscopio óptico (40 x) en las 3 siembras de cada cepa estudiada para obtener un promedio por cada una, siguiendo el método seccional cruzado o el longitudinal. Para de esta forma relacionar la actividad proteasa de las cepas con el crecimiento de las microvesículas, obteniendo el promedio mediante la siguiente formula:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Donde:

$\sum x$ = Sumatoria de las microvesículas encontradas en 10 campos de visualización.

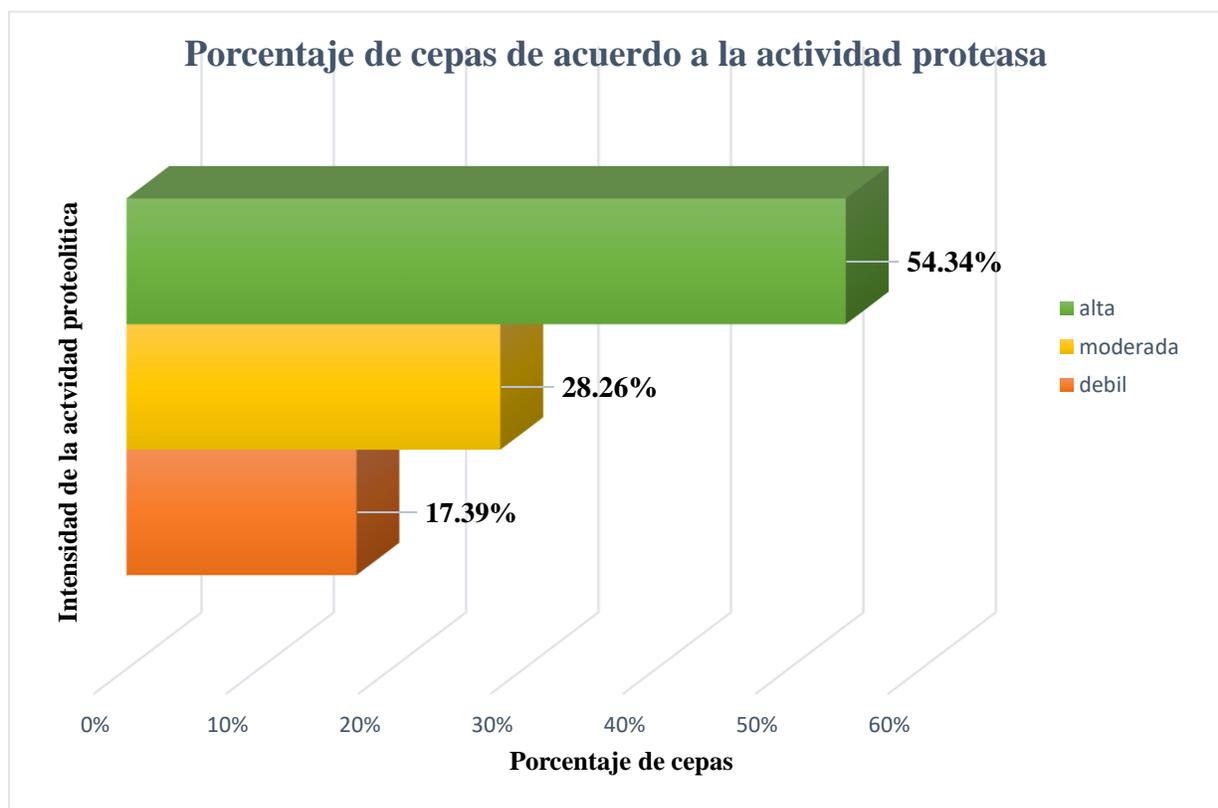
n = número de sumandos.

6.4. Tinción de las microvesículas.

- A partir de una placa con crecimiento sustancioso de microvesículas, con la ayuda de unas pinzas de disección se levantó con cuidado el cubreobjetos (sin rasgar el agar) y se añadió de 1-2 gotas del colorante azul de algodón, directo sobre la marca de inoculación, se volvió a colocar el cubreobjetos sobre la preparación ya teñida. Se dejó actuar durante 10 minutos.
- Una vez pasado el tiempo, se observó la preparación teñida por microscopia óptica (40x) y (100x).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo de este estudio experimental, se emplearon 46 cepas clínicas de *Candida albicans* proporcionadas por el Lab. 17 de la UIM de la FES-C. Con el propósito de comprobar la hipótesis propuesta en esta tesis: a mayor intensidad de la actividad proteolítica mayor cantidad de microvesículas presentes, se dividieron en aquellas que presentaron actividad proteolítica débil, moderada y alta por lo que en las tablas 2, 3 y 4 se desglosa con más detalle la identificación de dichas cepas. A continuación, en la gráfica 1 se muestra la distribución de cepas conforme a los criterios de intensidad de actividad enzimática proteolítica.



Grafica 1. Distribución de cepas conforme a los criterios de intensidad para la actividad proteasa propuestos por Hernández- Solís (2014), donde es evidente la preponderancia de la actividad proteasa alta con 25 cepas (54.34%), seguidas de 13 cepas (28.26%) de actividad moderada y por último 8 de estas (17.39%) presentan actividad proteasa débil.

En las tablas 2, 3 y 4, se describen las características de los aislamientos acorde a su potencial proteolítico referido como factor Pz.

Clave	Sexo	Tipo de Muestra	Diagnóstico confirmatorio	Actividad proteasa (Pz)
L17-3-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>	0.812
L17-10-18	INP	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.841
L17-21-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.807
L17-49-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.842
L17-50-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.846
L17-59-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.827
L17-61-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.862
L17-86-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.8
INP: Información no proporcionada				

Tabla 2. Relación de aislamientos de *Candida albicans* con actividad proteolítica débil. Donde los valores de actividad de proteasa fueron resultado de un cálculo de coeficiente de actividad enzimática (Pz), que se obtiene al dividir el diámetro de crecimiento de la colonia levaduriforme entre el diámetro de la zona de producción enzimática. El índice Pz puede tomar valores que van de cero a uno, correspondiendo aquellos más próximos a cero a niveles máximos de actividad enzimática. Inversamente, aquellos índices con valores próximos a uno son indicativos de un bajo nivel en dicha actividad. En cepas que no muestran actividad enzimática, el índice Pz es igual a uno. De acuerdo con esos criterios, la actividad proteasa débil comprende valores de Pz de 0.800 a 0.899.

Clave	Sexo	Tipo de muestra	Diagnóstico confirmatorio	Actividad proteasa (Pz)
L17-2-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>	0.775
L17-7-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.769
L17-8-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.762
L17-13-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.747
L17-22-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.724
L17-23-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.779
L17-24-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>	0.793
L17-27-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.769
L17-28-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.775
L17-29-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.756
L17-32-18	Femenino	Secreción	<i>Candida albicans</i>	0.729
L17-33-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.77
L17-39-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.701
INP: Información no proporcionada				

Tabla 3. Relación de aislamientos de *Candida albicans* con actividad proteolítica moderada. Conforme a la escala de interpretación de intensidad enzimática de acuerdo con su valor de Pz (Hernandez-Solis, 2014), la actividad proteasa moderada comprende valores de 0.700 a 0.799

Clave	Sexo	Tipo de muestra	Diagnóstico confirmatorio	Actividad proteasa (Pz)
L17-15-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.69
L17-25-18	INP	Secreción	<i>Candida albicans</i>	0.692
L17-36-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.69
L17-37-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.682
L17-47-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.608
L17-52-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.619
L17-53-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>	0.569
L17-54-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.671
L17-55-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.547
L17-56-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.542
L17-60-18	Femenino	Secreción	<i>Candida albicans</i>	0.654
L17-62-18	Masculino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.667
L17-70-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>	0.459
L17-71-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>	0.657
L17-72-18	INP	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>	0.657
L17-76-18	Masculino	Secreción	<i>Candida albicans</i>	0.678
L17-77-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.545
L17-78-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.583
L17-82-18	Femenino	Urocultivo	<i>Candida albicans</i>	0.674
L17-85-18	Femenino	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.489
L17-90-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.677
L17-91-18	Femenino	Vaginal	<i>Candida albicans</i>	0.562
L17-96-18	INP	Faríngeo	<i>Candida albicans</i>	0.674
L17-101-18	INP	INP	<i>Candida albicans</i>	0.561
L17-102-18	Femenino	INP	<i>Candida albicans</i>	0.631
INP: Información no proporcionada				

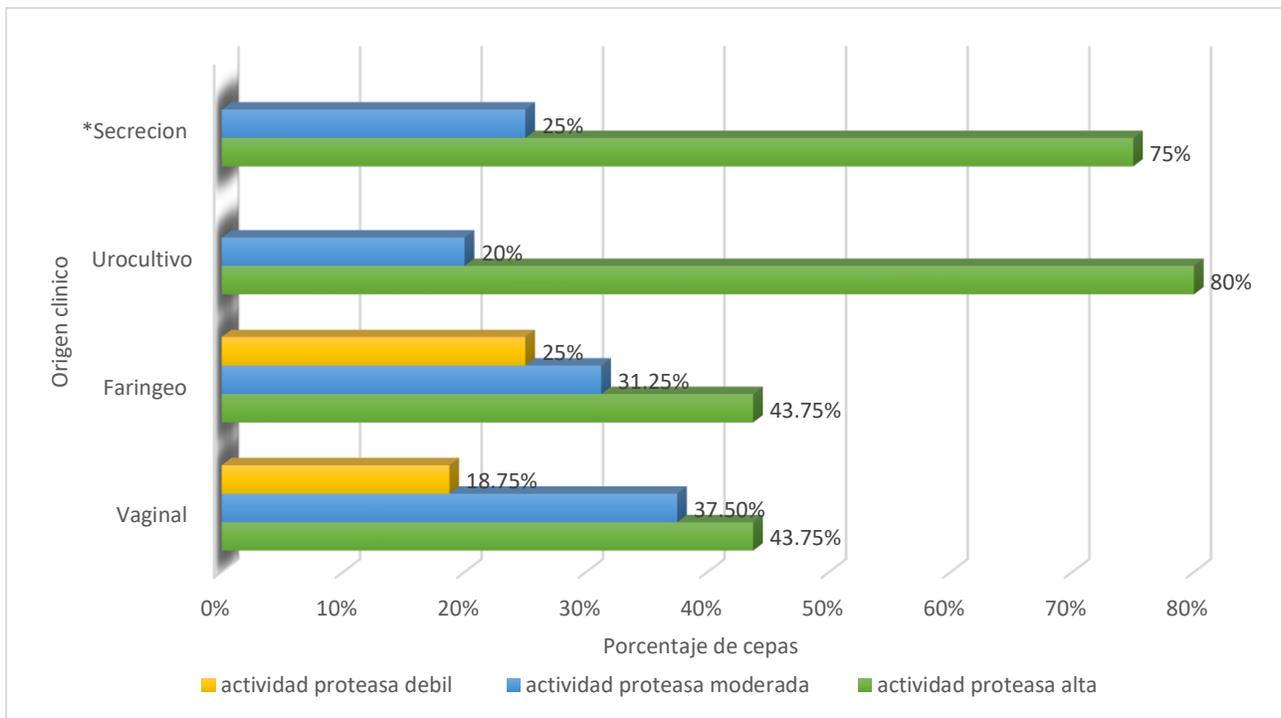
Tabla 4. Relación de aislamientos de *Candida albicans* con actividad proteolítica alta. Conforme a la escala de interpretación de intensidad enzimática de acuerdo con su valor de Pz (Hernandez-Solis, 2014), la actividad proteasa alta comprende valores de $Pz \leq 0.699$.

La producción de vesículas extracelulares (MVEs) desempeñan un papel esencial en la comunicación entre células y el transporte de moléculas diagnósticamente significativas tales como proteínas y/o ácidos nucleicos, particularmente miRNAs y mRNAs. También sirven como vectores y actúan como mediadores de la comunicación intercelular, respuestas inmunes y presentación de antígenos (Gil-Bona, 2018).

Son varios los enfoques de interés para el estudio de las MVEs debido a las propiedades bioquímicas, tal es el caso de la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como las aspartil proteinasas secretoras (SAPs) que también pueden hallarse dentro de las MVEs, y que juegan un papel importante en la patogenicidad de los hongos oportunistas puesto que las SAPs son una familia de enzimas capaces de degradar diversos tipos de sustratos fisiológicamente importantes, entre los que se encuentran componentes celulares de las mucosas y elementos del sistema inmune. Estudios experimentales han demostrado que la elevada producción de SAPs por *C. albicans* mejora la capacidad del microorganismo para colonizar y penetrar tejidos y evadir el sistema inmune del huésped (Hernandez-Solis, 2014) motivo por el que en este trabajo se correlaciona la presencia de microvesículas con la actividad proteolítica previamente determinada. La gráfica 1 muestra la distribución de las cepas conforme a los criterios (alta, moderada y baja) y se aprecia que el 54.34%, es decir poco más de la mitad de las cepas, son de actividad proteolítica alta, además en las tablas 2, 3 y 4 se observan los diversos orígenes de las cepas estudiadas. Por lo tanto, la intensidad de actividad proteolítica de las cepas estudiadas da indicios que provienen de infecciones activas, crónicas y de pacientes inmunosuprimidos. Tsang et al (2007) señalan que las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes diabéticos, con cáncer o VIH mostraron una mayor actividad proteolítica que las cepas aisladas de sujetos sanos, y menciona que esta actividad podría estar relacionada con características propias de estos pacientes, como el pH ácido y la reducción

del flujo salival (en caso de que su origen clínico fuese faríngeo o bucal). Por el contrario, Manfredi et al (2004) no encontraron diferencias entre las cepas aisladas de pacientes diabéticos y sujetos sanos, sin embargo, concluyen que, en pacientes diabéticos, parece ser que la diabetes mellitus podría influir en el mejoramiento de la expresión de los factores de virulencia de *Candida albicans*.

En la gráfica 2 que señala el origen clínico de las cepas en función de la intensidad de su actividad proteolítica, se puede observar que las muestras de origen vaginal y faríngeo presentaron una actividad enzimática proteolítica alta, seguidas por las de urocultivos y secreción, pudiéndose establecer una relación entre la actividad enzimática y el sitio de aislamiento de las levaduras.

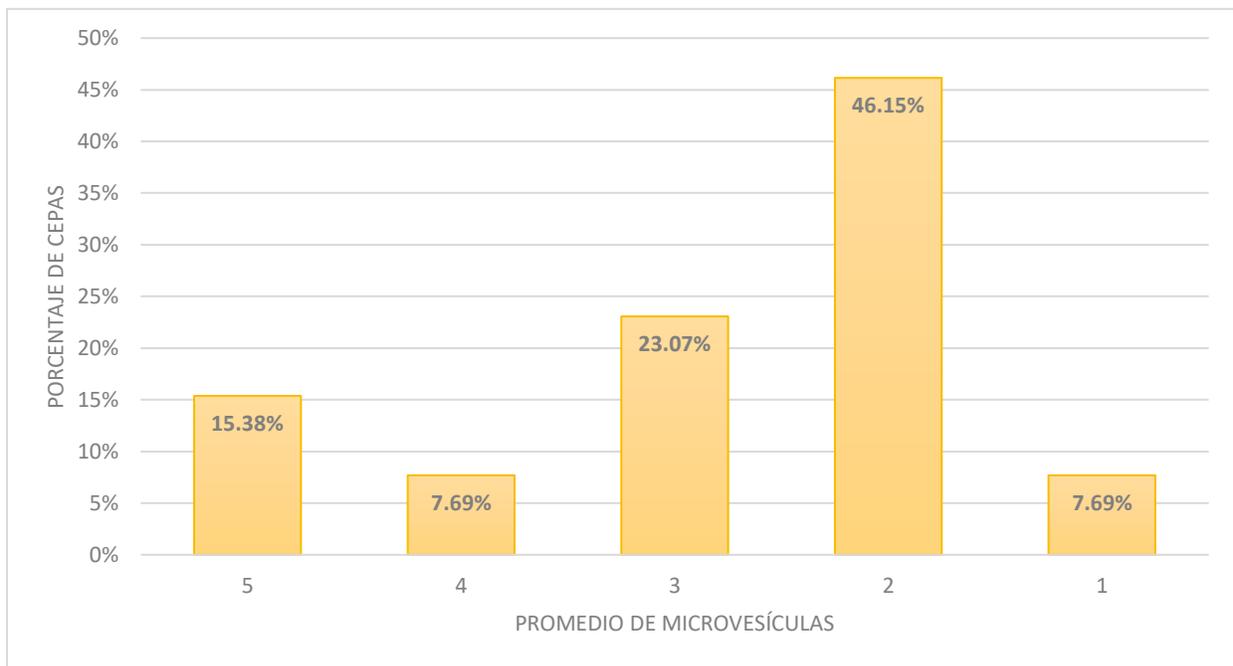


Gráfica 2. Origen clínico de las cepas en función de la intensidad de su actividad proteolítica. Se considero cada origen clínico como el 100% para los diferentes niveles de actividad proteasa.

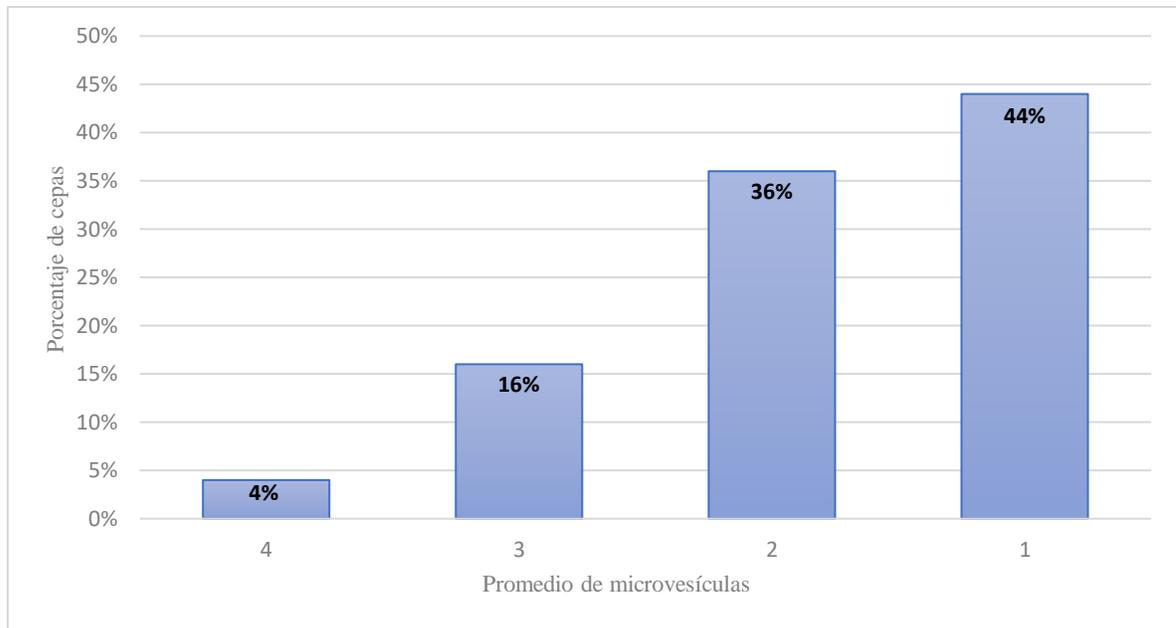
*Secreción: Hace referencia a excreciones de un origen clínico distinto al vaginal, faríngeo y de urocultivo.

Estos resultados son similares a los obtenidos por De Bernardis et al (1999) puesto que en su estudio las levaduras aisladas de secreciones vaginales y de cavidad oral, también presentaron la mayor producción enzimática de proteasas. Pero distintos a los obtenidos por Kantarcioglu et al (2002) cuyos resultados reportaron que las levaduras aisladas de muestras de tracto respiratorio presentaron mayor actividad proteasa, seguidas de muestras urogenitales y cavidad oral, mientras que las levaduras aisladas de muestras de sangre no presentaron actividad enzimática de proteasa. Estos resultados probablemente están relacionados con la especie y variaciones intra especie de la levadura aislada en cada muestra ya que resultados de varias investigaciones han determinado que los aislamientos con elevada actividad proteolítica son más virulentos que aquellos que no la poseen o tienen baja producción enzimática, pero no suministran suficientes datos para relacionar el sitio de infección con la especie de levadura aislada, por lo tanto, la producción de proteasa debe ser considerada como un factor de virulencia más y no como el único factor que influye sobre la patogenicidad de las levaduras (Panizo, 2005). La patogenicidad de *C. albicans*, además de a sus factores de virulencia, está asociada al estado inmunitario del huésped. Se cree que los factores dependientes del huésped tienen suma importancia en la patogenicidad de esta levadura, y que causa la enfermedad cuando las defensas del huésped se encuentran debilitadas (Tabanti, 2004).

Los resultados de la intensidad de la actividad proteasa en función del promedio de microvesículas presentes en cada muestra, revelaron que en las cepas clínicas de actividad proteolítica débil no se encontró presencia de MVEs, mientras que en las cepas de actividad moderada y alta (ver graficas 3 y 4), en general prevaleció el promedio de 2 microvesículas en 10 campos de visualización (la evaluación del crecimiento de micro vesículas se realizó con la búsqueda y conteo de éstas en 10 campos de visualización, obteniéndose para ello un promedio por cada muestra, resultando que 5 microvesículas fue en promedio la cantidad más alta de estructuras encontradas) como se muestra a continuación:



Grafica 3. Porcentaje de cepas de actividad proteasa moderada en función del promedio de MVEs presentes.
Donde se aprecia que predomina notablemente un promedio de $\bar{x}=2$ microvesículas, en un 46.15% de cepas.



Grafica 4. Porcentaje de cepas de actividad proteasa alta en función del promedio de MVEs presentes. Donde se aprecia que predominan los promedios de $\bar{x}=1$ y $\bar{x}=2$ microvesículas con 44% y 36%, respectivamente

Las figuras 11,12 y 13 se refieren a los diferentes promedios de micro vesículas encontradas por campo de visualización:

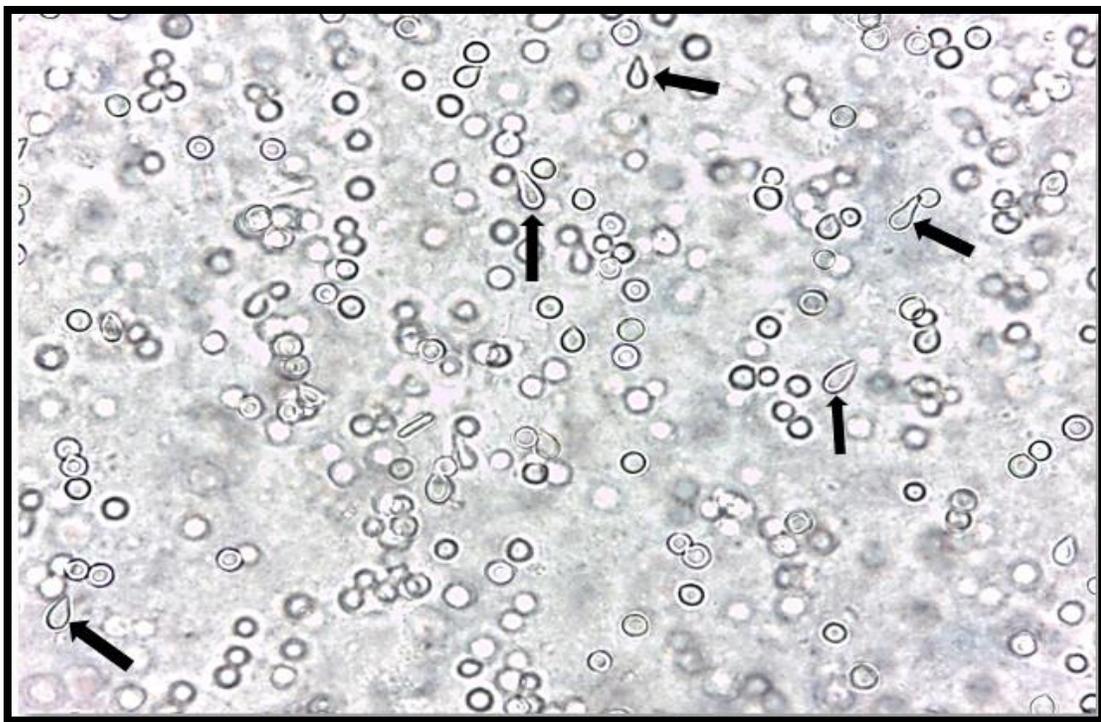


Figura 11. Microvesículas de *Candida albicans*. Se señala con flechas: 5 MVEs encontradas en la muestra #7 de actividad proteasa moderada por microscopia óptica (10x) y a su alrededor clamidoconidias, desarrolladas en agar girasol después de 7 días de incubación

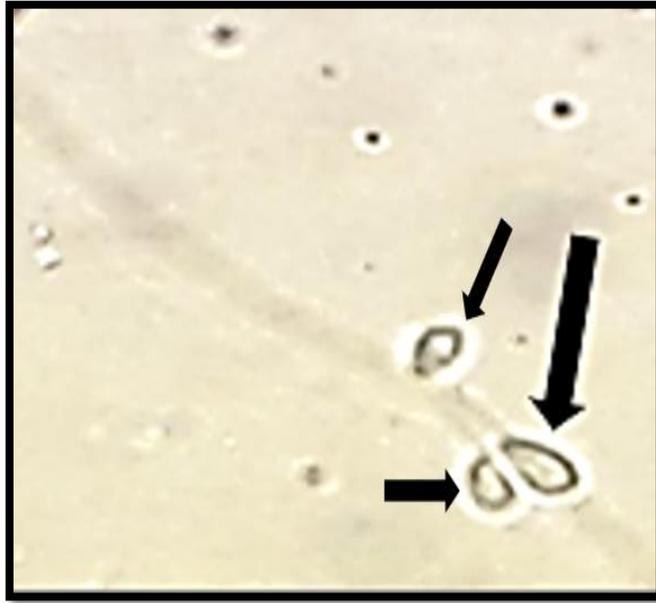


Figura 12. Microvesículas de *Candida albicans*. se señalan con flechas: MVEs en un campo de visualización de la cepa #56 de actividad proteasa alta (40x).



Figura 13. Microvesícula desarrollada en agar girasol, señalada con flecha y debajo, se puede apreciar una clamidoconidia con su doble pared (100x). (La imagen original fue amplificada en un editor de imágenes).

Adicionalmente, se realizó la tinción de las MVEs fúngicas con azul algodón de lactofenol (ver figura 14) ya que, aunque no es considerada una tinción diferencial, posee características tintoriales que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación. (Lopez-Jacome, 2014)



Figura 14. Desarrollo de Microvesículas sobre una hifa en agar girasol, teñidas con azul de algodón (40x) (la imagen original fue ampliada en un editor de imágenes).

Finalmente, se realizó un análisis estadístico de la relación entre el origen clínico de las cepas y el promedio de microvesículas presentes (ver tabla 5) en el que se encontró la misma tendencia que en las gráficas 3 y 4, en cuyo caso para todos los orígenes de las muestras (vaginal, faríngeo, urocultivo y secreciones) prevaleció un promedio de 2 microvesículas con un 32.57%.

Origen clínico	\bar{X} de Microvesículas					
	5	4	3	2	1	0
Vaginal 16 (34.78%)	2 (4.34%)	1 (2.17%)	2 (4.34%)	5 (10.86%)	3 (6.52%)	3 (6.52%)
Faríngeo 16 (34.78%)	---	1 (2.17%)	3 (6.52%)	5 (10.86%)	3 (6.52%)	4 (8.69%)
Urocultivo 5 (10.86%)	---	---	1 (2.17)	1 (2.17)	3 (6.52)	---
Secreción 4 (8.69%)	---	---	1 (2.17)	2 (4.34)	1 (2.17%)	---
Desconocido 5 (10.86%)	---	---	---	2 (4.34%)	2 (4.34%)	1 (2.17%)
Total 99.99%	4.34%	4.34%	15.2%	32.57%	26.07%	17.38%

Tabla 5. Origen clínico de las cepas en función del promedio de microvesículas presentes. Resaltado en negritas, se puede distinguir que, para todos los orígenes clínicos, predominan en promedio $\bar{X}=2$ microvesículas. Cabe mencionar que el 17.38% del total de cepas que no presentaron MVEs, corresponden a cepas de actividad proteasa débil.

Por lo tanto, se puede afirmar que ni la intensidad de la actividad enzimática proteolítica (mientras la actividad sea de moderada-alta), ni el origen clínico de las cepas son factores que estén estrechamente relacionadas con la cantidad de MVEs presentes. Sin embargo, este estudio demuestra claramente que en las cepas con actividad proteasa débil no hay presencia de microvesículas. Esta poca relación que existe entre la actividad proteasa y/o su origen clínico con la presencia de MVEs, posiblemente tiene que ver con el complejo proceso de secreción de los exosomas a través de la pared celular del hongo ya que como lo menciona Pérez, Doñate (2017) en una investigación donde analizan el contenido de los exosomas, las proteínas identificadas corresponden principalmente a componentes citoplasmáticos, de membrana, extracelulares, de pared, mitocondriales, ribosomales y nucleares, siendo las funciones más frecuentes, las

enzimáticas, tales como hidrolasas, transferasas u oxidoreductasas, las estructurales, de transporte y de unión a RNA y proteínas. Dichas proteínas estarían ubicadas, tanto en el interior de las microvesículas (incluyendo la presencia de miRNA), como en localización transmembrana o bien en la superficie de las mismas. Además, en otro estudio realizado por Gil-Bona et al (2018), donde analizan el contenido de las MVEs, variando sus condiciones de crecimiento como: temperatura, tiempo de incubación y medios de cultivo, obtuvieron que la cantidad de proteínas identificadas fue mucho mayor en la cepas cuyas condiciones fueron a temperaturas mayores a 37 °C, durante 72 hrs y en medios enriquecidos, que en las que estaban a 30°C en medio SDA y por 48 hrs (164 y 75 proteínas respectivamente) resultando así que solo compartían el 11% del total de proteínas identificadas bajo ambas condiciones. Estas proteínas comunes incluían proteínas relacionadas con la pared celular y varias proteínas involucradas en el metabolismo (por ejemplo: Eno1, Pkg1, Tdh3 o Ald5), proteínas de respuesta al estrés (p.ej: Hsp70) y de síntesis de proteínas (Eft2) (Gil-Bona, 2018). Estos análisis muestran que las diferentes condiciones de crecimiento determinan el contenido proteico de las MVEs de *C. albicans*, en consecuencia, estas variaciones influyen en la fase de crecimiento y en las necesidades de supervivencia y mantenimiento, siendo diferentes en un cultivo de 72 horas (probablemente la fase estacionaria) que en un cultivo nuevo en fase exponencial. Por esta razón se identificaron más proteínas relacionadas con la respuesta al estrés en el cultivo más antiguo (por ejemplo, Hsp60, Hsp90, Ssb1 o Ssc1), mientras las proteínas transportadoras y de la pared celular fueron más abundantes en el cultivo fresco (por ejemplo, Fet34, Fet99, Zrt2, Cht2 o Cht3). (Gil-Bona, 2018)

Lo anterior es congruente con los resultados experimentales de esta tesis, ya que, si bien no se analizó el contenido de las MVEs, si se evaluó el crecimiento de estas por microscopia óptica, obteniéndose que en los cultivos de más de 7 días y en un medio enriquecido como el agar girasol

(teniendo como límite 14 días) el crecimiento de MVEs fue mayor que en cultivos de 7 días o menos, debido a las condiciones de estrés como se explicó anteriormente.

La secreción de MVEs a través de la pared celular fúngica, es por tanto un proceso complejo, que requiere de la intervención de un gran número de mecanismos, en los que se ven implicados un número elevado de proteínas, por lo que las microvesículas extracelulares podrían ser consideradas como una plataforma multi-antigenica que serviría de punto de partida en la preparación de nuevas vacunas. Además, dicho mecanismo podría ser tomado en cuenta en el diseño de nuevos fármacos antifúngicos, ya que según la hipótesis propuesta por Nimrichter y col. (2016), para que los exosomas puedan atravesar la pared celular del hongo y sean secretados, precisan de una significativa remodelación de la estructura de la pared mediante la hidrólisis de polisacáridos y manoproteínas, lo que expone componentes importantes internos al exterior, lo que haría que la levadura fuese más vulnerable durante este proceso.

8. CONCLUSIONES

1. Las estructuras encontradas mediante microscopia óptica en las cepas estudiadas son llamadas microvesículas, debido a su tamaño (en micras).
2. Se logró el desarrollo de las microvesículas en agar girasol y bajo ciertas condiciones de estrés.
3. Gracias a los criterios de Hernandez-Solis se obtuvieron rangos de clasificación para la intensidad de actividad enzimática proteasa de las cepas empleadas.
4. Se estableció una relación entre la actividad proteolítica de las cepas de *Candida albicans* con el origen clínico de estas y además deducir que las cepas provenían de pacientes con infecciones activas.
5. Se consiguió establecer una relación entre la actividad proteasa de las cepas clínicas de *Candida albicans* con la presencia de microvesículas.
6. Se estableció una relación entre las condiciones de crecimiento de las cepas y la presencia de MVEs y en consecuencia inferir sobre la cantidad de su contenido de proteasas.
7. Se obtuvo una tinción favorable para las microvesículas.
8. A partir del entendimiento de la formación y liberación de las microvesículas por la célula fúngica, se pueden tener las bases para el desarrollo de vacunas o terapias que tengan un encauzamiento antifúngico contra *C. albicans*.

9. REFERENCIAS

- ✓ Albuquerque P, Nakayasu E, Rodrigues M, Frases S, Casadevall A, Zancope-Oliveira R, et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol.* 2008;10(8):1695-1710.
- ✓ Almeida RS, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res* 2009 oct; 9(7):1000–12
- ✓ Batista B, Eng W, Pilobello K, Hendricks-Muñoz K, Mahal L. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4624-4633.
- ✓ Blankenship J, Mitchell A. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(6):588-594.
- ✓ Brand A, Gow NAR. Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr Opin Microbiol* 2009 ago; 12(4):350–7.
- ✓ Bouza E, Muñoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *International J Antimicrob Agents* 2008; 32:S87-S91.
- ✓ Burnett J. Aspects of the structure and growth of hyphas walls. *Fungal walls and hyphal growth* Cambridge University Press. 1979;1:1-25.
- ✓ Calderone A, Fonzi A. Virulence factors of *C. albicans*. *Trends in microbiology.* 2001;9:327-335.
- ✓ Chaffin W. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72:495-544.
- ✓ Cervera C. Candidemia y candidiasis invasora en el adulto. Formas clínicas y tratamiento. *Elsevier Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:483-491.

- ✓ Cisneros J. Infecciones fúngicas invasoras por hongos filamentosos. *Medicine: Servicio de microbiología. Hospital Universitario Reina Sofia, Cordoba.* Vol 9; Num 57.
- ✓ Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, et al. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2005;5:22.
- ✓ Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009 2;19(2):43-51.
- ✓ Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiology and risk factors for non-*albicans* species. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(6):380-384.
- ✓ De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, et al. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 1999; 64: 466-71.
- ✓ Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* 2012; 80:1948-57.
- ✓ Del Palacio A., Villar J. y Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(1):2-7.
- ✓ Donlan R. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):1-19.
- ✓ Ferguson S, Nguyen J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release.* 2016;228:179-190

- ✓ Gaspar GG, Meneguetti MG, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Martinez R. Evaluation of the predictive indices for candidemia in an adult intensive care unit. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(1):77-82.
- ✓ Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today* 2009 feb; 14(3-4):214–22
- ✓ Geraldine B, Rasmussen M, Lin M, Santos M, Sakthikumar S, Munro C, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459:657-662
- ✓ Gil M, Dagan S, Eren R, Gozalbo D. Evaluation of the usefulness of antiglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibodies as a treatment for invasive candidiasis in a murine model. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2006;89(3):345-350.
- ✓ Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra C, Vivanco F, Nombela C, Monteoliva L, et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res.* 2015;14(1):142-153.
- ✓ Gil-Bona A, Amador-Garcia A, Gil C, Monteoliva L. A proteomic view of the cell Surface and the extracellular environment. *Journal of Proteomics* 180 (2018) 70–79.
- ✓ György B, Szabó T, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667-2688
- ✓ Harding C, Heuser J, Stahl P. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol.* 2013;4(4):367-371.
- ✓ Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Crit Rev Microbiol* 2006 dic; 32(4):217–26.

- ✓ Hernandez-Solis Sandra E., Florencio Rueda-Gordilloa y Rafael A. Rojas Herrera. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos con candidiasis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoam Micol.* 2014, 31 (2) 137-14.
- ✓ Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012 ene; 10(1):85–93.
- ✓ Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia* 2009 oct; 168(4):165–73.
- ✓ Jeffery C. An introduction to protein moonlighting. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(6):1679-1683.
- ✓ Kantarcioglu SA, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002; 45: 160-5.
- ✓ Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 2009; 56(2):211–24.
- ✓ Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* 2009 ene; 52(1):1–10.
- ✓ Lim C, Rosli R, Seow H, Chong P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(1):21-31.
- ✓ López-Jacome L, Hernández-Duran M, Colin-Castro C, Ortega-Peña S, Cerón-Gonzales G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad Medigraphic.* Vol. 3, Núm. 1. Enero-marzo 2014, pp 10-18.
- ✓ López-Ribot J, Chaffin W. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1996;178:4724-4726

- ✓ Manfredi M, McCullough M, Vescovi P, Kaarawi A. Update on Diabetes Mellitus and related oral diseases. Sezione di Odontostomatologia, Università di Parma, Viale Gramsci 14, 43100 Parma, Italia. 2004.
- ✓ Netzahualcoyotl C. Determinación de la actividad enzimática en aislamientos de *Candida Albicans* de origen clínico. Tesis de Licenciatura en Bioquímica Diagnostica, FESC-UNAM, 2017.
- ✓ Nguyen DB, Thuy Ly TB, Wesseling MC, Hittinger M, Torge A, Devitt A, et al. Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells. *Cell Physiol Biochem* 2016 Mar 4;38(3):1085-1099.
- ✓ Nimrichter L, de Souza M, Del Poeta M, Nosanchuk J, Joffe L, Tavares Pde M, et al. Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells. *Front Microbiol.* 2016;7:1034.
- ✓ Ombrella A., Racca Liliana y Ramos Laura. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de ph. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 12-16.
- ✓ Orlean P, Ammer A, Watzele M, Tanner W. Synthesis of an O-glycosilated cell surface protein induced in yeast by alpha-factor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1986;83:62636266.
- ✓ Panizo M y col. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida spp.* *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2005; 25:88-95
- ✓ Pappas P y col. Clinical practice guidelines for the management of Candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 2009; 48:503-35.

- ✓ Peman J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasivas por hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(4):213-218.
- ✓ Perez D. Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en especies del género *Candida*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, programa de doctorado en biomedicina y farmacia, 2017.
- ✓ Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133-163.
- ✓ Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics Clin Appl.* 2008;2(4):596-618.
- ✓ Pontón J. El diagnóstico Microbiológico independiente del cultivo en la Candidiasis Invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 20-25
- ✓ Pontón J y Del Palacio A. Diagnóstico precoz de las micosis por hongos levaduriformes. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 181-186
- ✓ Ratajczak MZ, Ratajczak J. Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med.* 2016;5(1):7.
- ✓ Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Nosanchuk JD, Casadevall A. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of VirulenceAssociated Macromolecules Lipid Insights. 2008:27-40.
- ✓ Salavert Lletía M, Jarque Ramos I, Peman García J. Aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clínico-terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24(1):36-45

- ✓ Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2010;9(7):991-1008.
- ✓ Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317-324.
- ✓ Sugiyama T, Thillainadesan G, Chalamcharla VR, Meng Z, Balachandran V, Dhakshnamoorthy J, et al. Enhancer of Rudimentary Cooperates with Conserved RNA Processing Factors to Promote Meiotic mRNA Decay and Facultative Heterochromatin Assembly. *Mol Cell*. 2016;61(5):747-759.
- ✓ Sun J, Solis N, Phan Q, Bajwa J, Kashlev H, et al. Host Cell Invasion and Virulence Mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLOS Pathogens*. 2010;6(11).
- ✓ Sundstrom P, Aliaga G. A subset of proteins found in culture supernatants of *Candida albicans* includes the abundant, immunodominant, glycolytic enzyme enolase. *J Infect Dis*. 1994;169(2):452-456.
- ✓ Tsang, F.C. Chu, W.K. Leung, L.J. Jin, L.P. Samaranayake, S.C. Siu Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus *J Med Microbiol*, 56 (2007), pp. 1393-1398
- ✓ Vallejo M, Matsuo A, Ganiko L, Medeiros L, Miranda K, Silva L, et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -Galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell*. 2011;10(3):343-351.
- ✓ Vargas G, Rocha J, Oliveira D, Albuquerque P, Frases S, Santos S, et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*. 2015;17(3):389-407

- ✓ Van Dongen HM, Masoumi N, Witwer KW, Pegtel DM. Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(2):369386.
- ✓ Van Doormaal F, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller H, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med.* 2009;67(7):266-273.
- ✓ Vlassov A, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(7):940-948.
- ✓ Wolf J, Espadas-Moreno J, Luque-Garcia J, Casadevall A. Interaction of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles with the cell wall. *Eukaryot Cell.* 2014;13(12):1484-1493
- ✓ Yuan MJ, Maghsoudi T, Wang T. Exosomes Mediate the Intercellular Communication after Myocardial Infarction. *Int J Med Sci.* 2016;13(2):113-116.
- ✓ Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* 2010 mar;12(3):273–82