

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE CATALASAS, NUCLEASAS Y BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS POR
EL COMPLEJO *Candida glabrata* IMPLICADOS EN LA INHIBICIÓN DE LAS
TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)**

**PRESENTADO POR:
Q.F.B. FELIPE DE JESÚS GONZÁLEZ CONTRERAS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

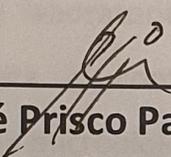
JULIO 2020

**“ANÁLISIS DE CATALASAS, NUCLEASAS Y BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS
POR EL COMPLEJO *Candida glabrata* IMPLICADOS EN LA INHIBICIÓN DE
LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)”**

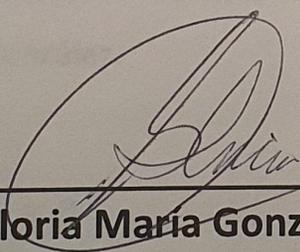
Aprobación de tesis:



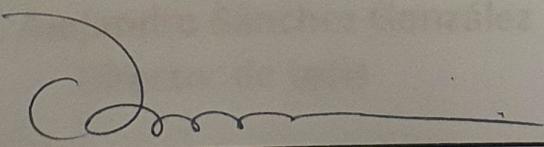
Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director de tesis



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Co-director



Dr. C. Gloria María González González
Miembro de la comisión



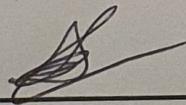
Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“ANÁLISIS DE CATALASAS, NUCLEASAS Y BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS
POR EL COMPLEJO *Candida glabrata* IMPLICADOS EN LA INHIBICIÓN DE
LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)”**

Presentado por:

Q.F.B. Felipe de Jesús González Contreras

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de bacteriología y cultivo celular ambos del centro regional para el control de enfermedades infecciosas perteneciente al departamento de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Este trabajo estuvo bajo la dirección del Dr. C. Alejandro Sánchez González.



Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director de tesis

**“ANÁLISIS DE CATALASAS, NUCLEASAS Y BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS
POR EL COMPLEJO *Candida glabrata* IMPLICADOS EN LA INHIBICIÓN DE
LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)”**

El Q.F.B. Felipe de Jesús González Contreras fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro 928662

La mayoría de la gente dice que es el
íntelecto lo que hace a un gran científico,
están equivocados: es el carácter.

- Albert Einstein

Aprendió tanto de sus errores que cuando
tropezaba, en lugar de caer, volaba.

- Alex Rovira

DEDICATORIA

Principalmente a mis padres por todo el apoyo recibido, por todo su amor y cariño, por ser mi motivación día con día, por ser ese motor para que yo siga adelante, siempre les estaré agradecido por todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanas, quienes me han apoyado y estado conmigo toda la vida, sin ustedes esto tampoco sería posible.

A mi gordita preciosa Yorley y a Mily mis sobrinitas queridas, gracias por haber llegado a darle ese toque de dulzura a nuestras vidas.

A todos esos seres queridos, que a pesar de que ya no están con nosotros, siempre serán recordados con alegría.

A ti AFMO, mi flaquis hermosa, por ser mi fiel confidente, mi amiga, por siempre demostrarme tu amor y cariño incondicional, así como por todos esos años que pasamos juntos. A ti mi flaquita, porque sin ser C3a, C4 ni C5b siempre formarás parte de mi complemento.

A toda mi familia, muchísimas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, a dios porque sin el nada sería posible.

Al Dr. Alejandro por compartir sus conocimientos, por su paciencia y su disposición de tiempo, así como por todo el apoyo brindado.

A la Dra. Gloria, por haberme dado la oportunidad de formar parte del departamento de microbiología.

A mis profesores del departamento: el Dr. Romel, el Dr. Becerril, el Dr. Angel, el Dr. Palma, la Dra. Mariana, la Dra. Alexa, y a el Dr. Roge, por sus conocimientos compartidos durante mi formación estudiantil.

A mi tremendísimo Geraldao, único e inigualable, por su amistad y todos sus conocimientos y anécdotas compartidas en este ramo de la ciencia.

A Anita, por sus buenos consejos y por su amistad.

Al personal del laboratorio: a la tremenda Yesica (compañera 1), al Joelillo por su disposición y su alegría, a Liz de micobacter (compañera 2) a la Química Lydia, al Luisao du nacimiento, a Karencita, a Rebe por su amistad y compañerismo, a MariFer, a Fernando, a Caro, a Chiquito, a Martín, a Marce, a Erika, a Mimi y a la señora Amalia, gracias por toda esa atención amable que tuvieron conmigo; así como a la Química Fátima por sus regaños e historia compartidas en el laboratorio.

A todas aquellas personas compañeros y amigos de la maestría: al Luisinski, al Juanillo, y a la Lizzy chola.

A mis compañeros de generación de maestría me llevo alegrías y experiencias de todos ustedes.

Al profe panchito de ciencias químicas, muchas gracias por todos sus consejos de microbiología básica otorgados en el laboratorio de alimentos, realmente me fueron útiles.

A toda mi razita de la facu: a mi compa el Julion, el orla, la Liz chapa y a la tremendísima Johana.

A todos, realmente gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades <i>Candida</i>	1
1.2 Cuadro clínico de las infecciones causadas por levaduras del género <i>Candida</i> ..	2
1.2.1 Candidiasis sistémica	4
1.2.1.1 Candidemia	4
1.2.1.2 Candidiasis invasora.....	4
1.3 Factores de riesgo para la candidiasis.....	5
1.4 Epidemiología	6
1.5 Generalidades <i>Candida albicans</i>	8
1.6 Generalidades <i>Candida glabrata</i>	10
1.6.1 Factores de virulencia del complejo <i>Candida glabrata</i>	10
1.6.2 Inmunopatogénesis de <i>Candida glabrata</i>	14
1.7 Características generales de los neutrófilos	15
1.7.1 Fagocitosis.....	17
1.7.2 Degranulación	18
1.7.3 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).....	20
1.7.3.1 Estrategias de evasión de las trampas extracelulares de neutrófilos	23
1.8 Antecedentes.....	25
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo general	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1 Estrategia general.....	28
4.2 Determinación de catalasa	29
4.3 Determinación de enzimas hidrolíticas.....	29
4.3.1 Determinación de hemolisinas.....	30
4.3.2 Determinación de fosfolipasas.....	30

4.3.3	Determinación de proteasas	30
4.3.4	Determinación de esterasas	31
4.3.5	Determinación de nucleasas	31
4.4	Producción de biopelículas	32
4.4.1	Medición de la biopelícula	32
4.4.1.1	Cuantificación de biopelícula por cristal violeta.....	32
4.4.1.2	Cuantificación de biopelícula por MTT	33
4.4.1.3	Ensayo de azul alamar.....	33
4.5	Inducción de NETs por cepas del complejo <i>Candida glabrata</i>	34
4.5.1	Obtención y purificación de neutrófilos	34
4.5.2	Preparación de las multiplicidades de infección (MOI)	35
4.5.3	Ensayos de inducción de NETs en cultivos planctónicos fúngicos.....	36
4.6	Caracterización de las NETs por inmunofluorescencia.....	36
4.7	Ensayos de inactivación de catalasas fúngicas.....	37
4.8	Degradación de NETs por nucleasas fúngicas	37
4.9	Ensayos de inducción de NETs por biopelículas fúngicas.....	38
5.	RESULTADOS	39
5.1	Determinación de catalasa	39
5.2	Determinación de enzimas hidrolíticas.....	41
5.3	Producción de biopelículas	42
5.4	Ensayos de inducción de NETs con cultivos planctónicos fúngicos	45
5.5	Caracterización de las NETs por inmunofluorescencia.....	46
5.6	Ensayos de inactivación de catalasas fúngicas.....	49
5.7	Degradación de NETs por nucleasas	51
5.8	Ensayos de inducción de NETs en biopelículas fúngicas	53
6.	DISCUSIÓN	55
7.	CONCLUSIONES	70
8.	PERSPECTIVAS	71
9.	BIBLIOGRAFÍA	72
	APÉNDICES	81
	APÉNDICE A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PAGINA
Figura 1. Cascada de adhesión leucocitaria	16
Figura 2. Inducción de NET por cepas del complejo <i>Candida glabrata</i>	25
Figura 3. Expresión de la enzima catalasa medida con H ₂ O ₂ 3% y triton 1%.	39
Figura 4. Actividad de la enzima catalasa respecto al tiempo.	40
Figura 5. Evaluación <i>in vitro</i> de la secreción de enzimas hidrolíticas por cepas del complejo <i>C. glabrata</i> .	41
Figura 6. Medición de la biomasa total de las biopelículas fúngicas a través de la tinción con cristal violeta 0.1%.	42
Figura 7. Medición de la actividad metabólica a través del ensayo de reducción de MTT.	43
Figura 8. Evaluación de la viabilidad celular con azul alamar en las biopelículas fúngicas.	44
Figura 9. Cinética de formación de NET en las cepas planctónicas a un MOI 1:100 utilizando un ensayo de sytox green.	45
Figura 10. Cinética de formación de NET en las cepas planctónicas a un MOI 1:1 utilizando un ensayo de sytox green.	46
Figura 11. Inmunofluorescencia de neutrófilos no estimulados.	47
Figura 12. Inmunofluorescencia de neutrófilos estimulados con PMA.	48
Figura 13. Inmunofluorescencia de neutrófilos estimulados con <i>C. glabrata sensu stricto</i> .	48

Figura 14. Inmunofluorescencia de neutrófilos estimulados con <i>C. albicans</i> .	49
Figura 15. Cinética de descomposición del H ₂ O ₂ 3% en cepas que no fueron tratadas con aminotriazol.	50
Figura 16. Cinética de la actividad de descomposición del H ₂ O ₂ 3% en cepas tratadas con aminotriazol 100 mM.	50
Figura 17. Degradación de NET por sobrenadantes 10% de las cepas, medidas con sytox green.	52
Figura 18. Inducción de NET en biopelículas fúngicas medidas a 3H.	53
Figura 19. Cinética de formación de NET en biopelículas fúngicas.	54

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	PAGINA
Tabla 1. Cuadro clínico de las infecciones por <i>Candida spp.</i>	2-4
Tabla 2. Preparación del gradiente de Percoll.	35
Tabla 3. Secreción de enzimas hidrolíticas.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

NCA = Especies de <i>Candida no albicans</i> .	Awp = Proteína de la pared tipo adhesina.
UCI = Unidad de cuidados intensivos.	GPI = Glicosilfosfatidilinositol.
Spp = Múltiples especies.	CgYPS = Yapsinas de <i>Candida glabrata</i> .
% = Porcentaje.	IL = Interleucina.
EE. UU. = Estados unidos de América.	HLP = Proteína tipo hemolisina.
Et al. = Y colaboradores.	CTA1 = Catalasa 1.
°C = Grados centígrados.	ROS = Especies reactivas de oxígeno.
ALS = Secuencia tipo aglutinina.	SOD = Superóxido dismutasa.
Hwp1 = Proteína 1 de la pared hifal.	GHS = Glutación.
Hsp = Proteínas del choque térmico.	H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno.
SAP = Aspartil-proteasa secretada.	Bcr1 = Regulador de la pared celular y biopelícula 1.
PL = Fosfolipasa.	Ace2 = Factor transcripcional de la pared celular Ace2.
pH = Potencial de hidrógeno.	Swi/Snf = Complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP (por sus
SDA = Agar Sabouraud dextrosa.	
EPA =Adhesina epitelial.	

siglas en ingles Swith/Sucrose No Fermentable).

Sir= Regulador de información silencioso.

Cst6= Cistatina 6.

GM-CSF= Factor estimulante de la colonia de granulocitos y monocitos.

TNF= Factor de necrosis tumoral.

IFN= Interferón.

PMN= Polimorfonuclear.

LPS= Lipopolisacárido.

fMLP= N-formilmetionil-leucil-fenilalanina.

PSGL-1= Ligando 1 de la glicoproteína P-selectina.

Src = Familia de proteínas quinasas.

Syk= Tirosina-proteína quinasa.

PI3K= Fosfatidilinositol 3-quinasa.

p38= Proteína quinasa activada por mitógeno.

LFA-1= Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria.

MAC-1= Antígeno 1 del macrófago.

ICAM= Moléculas de adhesión intercelular.

NETs= Trampas extracelulares de neutrófilos.

PAMPs= Patrones moleculares asociados a patógenos.

PRRs= Patrones de reconocimiento de patrones.

Phox= Fagocito oxidasa también llamada NADPH oxidasa.

Rac2= Substrato 2 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras.

PIP2= Fosfatidil inositol bifosfato.

PI3K= Fosfatidil inositol 3-cinasa.

GPCR= Receptor acoplado a proteínas G.

PP1= Pirazolpirimidina 1.

CXCL1= Ligando 1 de la quimiocina con motif C-X-C.

GTP= Guanosín trifosfato.

GTPasas= Guanosín trifosfatasa.

SNARE= Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF.

NE= Elastasa de neutrófilo.

BPI= Proteína incrementadora de la permeabilidad celular.

LL37= Péptido antimicrobiano catelicidina de 37 aminoácidos.

DNA= Ácido desoxirribonucleico.

PMA= Forbol- 12-miristato- 13-acetato.

NADPH= Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

PKC= Proteína quinasa K.

RAF=Del acrónimo fibrosarcoma rápido acelerado.

MEK= También conocida como MAPK.

ERK=Quinasa reguladora de la señal extracelular.

PAD-4= Peptidil arginina desiminasa-4.

AKT= Proteína quinasa B.

mTOR= Objetivo mecanístico de la rapamicina.

ATG7= Proteína 7 relacionada a la autofagia.

GXM= Glucoronoxilomanano.

GXMGal= Glucoronoxilomanogalactano.

PRM1= Proteína de fusión de membrana plasmática 1.

UFC/mL= Unidad formadora de colonias por mililitro.

mL= Mililitro.

μL= microlitro.

ATCC= Colección de cultivo tipo americana.

H= Hora.

Lb= Libras.

g= Gramos.

NaCl= Cloruro de sodio.

CaCl₂= Cloruro de calcio.

L= Litro.

MgCl₂= Cloruro de magnesio.

mM= Milimolar.

HCl= Ácido clorhídrico.

N= Normalidad.

RPMI= Del inglés roswell park memorial institute.

MOPS= Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico.

X= Concentración.

RPM= Revoluciones por minuto.

D.O.= Densidad óptica

NM= Nanómetro.

PBS= Solución salina amortiguadora de fosfatos.

MTT= Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

EDTA= Ácido etilendiaminotetraacético.

MOI= Multiplicidad de infección.

AMT= Aminotriazol.

µm= Micras.

mm= Milímetros.

DAG= Diacilglicerol.

VIH= Virus de inmunodeficiencia humana.

MNN= Manosiltransferasa.

ICL1= Isocitrato liasa 1.

TRX= Tiorredoxina.

Aro8= Aminotransferasa aromática 8.

RESUMEN

Q.F.B. Felipe de Jesús González Contreras

Fecha de Graduación: Agosto 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

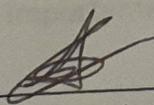
Título del Estudio: Análisis de Catalasas, Nucleasas y/o Biopelículas Producidas por el Complejo *C. glabrata* Implicados en la Inhibición de las Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).

No. Páginas: 83

Candidato al grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

Área de Estudio: Respuesta Inmune Celular frente a Infecciones Fúngicas.

C. glabrata es la 2da causa más común de candidiasis invasiva, en donde los pacientes neutropénicos representan a la población más susceptibles a las infecciones por estas especies de hongos. Los neutrófilos son la primera línea de defensa frente a patógenos fúngicos, donde se han descrito 3 mecanismos principales de respuesta antimicrobiana: fagocitosis, degranulación y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). En nuestro grupo de trabajo recientemente describimos que *C. glabrata* no induce la liberación de las NETs a diferencia de *C. albicans*; sin embargo, no determinamos los mecanismos llevados a cabo por *C. glabrata* para inhibir la formación de las NETs. **OBJETIVO:** Determinar si la catalasa, nucleasa y/o biopelícula del complejo *C. glabrata* están involucrados en la inhibición de las NETs. **MATERIALES Y MÉTODOS:** En la presente tesis evaluamos la expresión de diferentes factores de virulencia en cepas de *C. glabrata* que pudieran inhibir la formación de las NETs. Entre los factores estudiados se analizó la expresión de catalasas mediante ensayos de degradación de H₂O₂, se evaluó la actividad de nucleasas, la expresión de hemolisinas, proteasas, fosfolipasas y esterases mediante ensayos de hidrólisis del sustrato, y se produjeron biopelículas usando RPMI-MOPS. Posteriormente, se analizó la posible participación de estos factores en la inhibición de las NETs mediante la inhibición química de la catalasa; también, se realizaron ensayos de degradación de NETs y se analizó la inducción de NETs en biopelículas en comparación con cepas planctónicas. **RESULTADOS:** Las cepas del complejo *C. glabrata* llevan a cabo la expresión de la enzima catalasa (resistente a la inhibición química), muestran actividad de hemolisinas, proteasas y fosfolipasas; mientras que no muestran actividad de nucleasas ni de esterases. Se encontró que las cepas del complejo *C. glabrata* poseen capacidad diferencial para inducir las NETs dependiendo del inoculo. Demostramos que las cepas de *C. glabrata* no secretan nucleasas dado que no tienen la capacidad de degradar NETs inducidas. Finalmente encontramos que las biopelículas del complejo *C. glabrata* retardan la liberación de las NETs. **CONCLUSIÓN:** Las biopelículas del complejo *C. glabrata* tienen la capacidad de disminuir la cantidad de NETs a diferencia de los otros factores evaluados, los cuales parecen no tener un rol en esta inhibición. Por otro lado, sugerimos la posible existencia de otros mecanismos expresados por cepas de *C. glabrata* que le permiten inhibir la formación de estas NETs y con ello contribuir a la patogénesis de la enfermedad.


Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director de tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades *Candida*

El género *Candida* comprende alrededor de 200 especies dentro de las cuales 58 se comportan como patógenos oportunistas en animales y humanos; siendo las principales especies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* y *Candida dublinensis* las que mayormente predominan en las infecciones humanas (representando el 95%). Usualmente el género *Candida* posee las siguientes características: crecen en forma de levaduras, son de morfología celular variable (elípticas, globosas, cilíndricas o triangulares), se reproducen de manera asexual por gemación en un proceso holoblástico, y la mayoría de las especies patógenas llevan a cabo la formación de pseudohifas o hifas verdaderas bajo condiciones ambientales particulares, siendo *Candida glabrata* la única especie que no lleva a cabo este proceso [1].

Las infecciones fúngicas causadas por *Candida spp.* son una causa creciente de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados a nivel mundial, con una prolongada estancia hospitalaria. Aunque *Candida albicans* ha permanecido como el agente predominante de infecciones nosocomiales en las últimas décadas, recientemente se ha descrito un cambio epidemiológico importante hacia especies de *Candida no-albicans* (NCA) [2,3].

1.2 Cuadro clínico de las infecciones causadas por levaduras del género *Candida*

La candidiasis es un tipo de micosis producida por diversas especies oportunistas del género *Candida* presentando una amplia variedad de manifestaciones clínicas, las cuales se encuentran resumidas en la tabla 1. De todas ellas se ha visto que la infección que más prevalece es la infección sistémica.

Tabla 1. Cuadro clínico de las infecciones por <i>Candida spp</i>		
Tipo	Subtipo	Características
1. Candidiasis mucocutánea	1.1 Candidiasis orofaríngea	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se localiza en el paladar y la lengua. ▪ Presencia de una capa blanca, adhesiva y membranosa. ▪ Se presenta sobre una base enrojecida de la piel.
	1.2 Candidiasis gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Puede abarcar el esófago, estomago o el intestino ▪ Entre la principal sintomatología se encuentra la odinofagia, disfagia, dolor torácico, hemorragias, nauseas o vomito. ▪ El hongo se puede manifestar causando lesiones ulcerativas.
	1.3 Candidiasis vulvovaginal	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La mucosa vaginal y la vulva exhiben enrojecimiento del tejido (eritema), el cual se extiende a pliegues inguinales y el periné. ▪ Generalmente se presenta dispareunia y leucorrea, en donde esta última se caracteriza por la presencia de un fluido espeso y grumoso, con aspecto lechoso, además de manifestar placas pseudomembranosas. ▪ En la mayoría de los casos hay presencia de prurito intenso.
	1.4 Balanitis	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hay presencia de placas eritematosas, micropústulas, erosiones y fisuras. ▪ En algunos casos, puede haber presencia de leucoplasmas alrededor de todo el glande, prepucio y el surco balanoprepucial.

	1.5 Candidiasis bronquial y pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se manifiesta con cuadros de tos constante con expectoración mucoide y sanguinolenta, dolor torácico y fiebre nocturna. ▪ La infección se localiza en todo el árbol bronquial ▪ Genera cuadros de alergia ▪ En la candidiasis pulmonar, esta puede afectar 2 o más lóbulos pulmonares y en algunos casos ocasionar un derrame pleural. ▪ Se puede presentar diseminación sanguínea y al sistema nervioso central (SNC).
2. Candidiasis cutánea	2.1 Candidiasis intertriginosa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Afecta principalmente a los pliegues del cuerpo, formando placas eritematosas, descamación fina, fisuras, vesículas, pústulas y costras hemáticas. ▪ Entre los principales síntomas están el prurito y ardor en ocasiones, además de presentar maceración intensa con escamas gruesas y blanquecinas.
	2.2 Onicomicosis	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se exhibe principalmente en manos y uñas, donde la infección comienza por el pliegue periungueal. ▪ Genera inflamación y enrojecimiento, ocasionando dolor. ▪ Cuando la levadura invade la uña, produce un color parduzco sobre la placa ungueal, la cual se engruesa, endurece y forma estrías o surcos.
	2.3 Candidiasis del área del pañal	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Es ocasionada a consecuencia de la dermatitis del pañal, dado que la orina conserva húmeda esta zona, presentándose la etiología por <i>Candida</i> en el 80-85% de los casos. ▪ Hay presencia de placas eritematosas y escamosas, acompañada de vesículas, pústulas y en algunas ocasiones costras hemáticas. ▪ Los principales síntomas son el prurito intenso y ardor.
	2.4 Candidiasis pustulosa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Característica de pacientes adictos a las drogas administradas por vía intravenosas; o bien en pacientes inmunosuprimidos.

		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se presenta de manera habitual en la barba, cuero cabelludo y axilas; aunque también puede ser observada en extremidades inferiores, durante procedimientos inmunosupresores. ▪ Se determina por la presencia de lesiones pustulosas, o micro nodulares; en ocasiones acompañadas de fiebre, siendo este proceso relacionado a la infección sistémica.
3. Candidiasis sistémica	Candidemia y candidiasis invasora	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se caracteriza por la presencia de levaduras del género <i>Candida</i> en el torrente sanguíneo y su posterior invasión a órganos profundos en el hospedero. ▪ Se presenta como una sepsis, sepsis grave o shock séptico de origen nosocomial. ▪ Entre los principales órganos afectados, tenemos al cerebro, riñón, pulmón, ojos, corazón, bazo e hígado [1].

1.2.1 Candidiasis sistémica

1.2.1.1 Candidemia

Consiste en la presencia de levaduras del género *Candida* en el torrente sanguíneo.

Puede ser transitoria o persistente. Desde el punto clínico se manifiesta como sepsis, sepsis grave o shock séptico de origen nosocomial [1,5].

1.2.1.2 Candidiasis invasora

Consiste en la invasión de levaduras del género *Candida* a través del torrente sanguíneo a otros órganos profundos en el hospedero. Entre los órganos afectados más frecuentes se encuentran: cerebro, riñón, pulmón, ojos, corazón, bazo e hígado. Las principales

manifestaciones clínicas de la candidiasis invasora se basan de acuerdo con el órgano que afectan, siendo las más comunes: meningitis, pielonefritis, cistitis, bolas fúngicas, peritonitis, neumonía, endoftalmitis, endocarditis, osteomielitis. Otros síntomas que pueden aparecer: fiebre persistente que no responde a los antibióticos, mialgias, disfunción renal, rash. Por su parte, la candidiasis diseminada crónica es exclusiva de pacientes neutropénicos u oncohematológicos, afectando principalmente a el hígado y el bazo, presentando manifestaciones como la hepatoesplenomegalia [1, 4].

1.3 Factores de riesgo para la candidiasis

Entre los factores de riesgo asociados a las infecciones por levaduras del género *Candida* se encuentran: la hospitalización prolongada, estancia prolongada en la UCI, uso de catéteres intravasculares, uso de sondas vesicales, la nutrición parenteral, intervenciones quirúrgicas, el uso de drogas antimicrobianas o antifúngicas, pacientes que padecen enfermedades inmunosupresoras, pacientes que reciben tratamiento con quimioterapia, radioterapia, corticoesteroides, fármacos neoplásicos o inmunosupresores. Entre otros factores de riesgo se encuentran los niños menores a 1 año, infantes prematuros, pacientes de edad avanzada, pacientes que padecen diabetes, pacientes con enfermedades hepáticas, pacientes con enfermedades renales, pacientes que padecen pancreatitis, pacientes que han recibido transfusiones sanguíneas, pacientes trasplantados y aquellos pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica. De todas estas condiciones, los pacientes más susceptibles a las infecciones por *Candida spp* son aquellos pacientes neutropénicos o inmunocomprometidos [4, 6, 7].

1.4 Epidemiología

Las especies de *Candida* son una causa creciente de infección nosocomial del torrente sanguíneo donde corresponden a un 8-10 % del total; esto ha aumentado a través de las décadas en donde la tasa de mortalidad se encuentra entre 35-60 %, siendo la incidencia anual de infecciones por *Candida* de 8 por cada 100.000 habitantes. La incidencia global de la candidiasis invasiva es de 72-290 infecciones por un millón de personas al año, correspondiendo a una causa común de morbilidad y mortalidad; donde se estiman aproximadamente 700.000 casos a nivel global [1, 2, 4, 6, 7].

Un estudio realizado en EE. UU. que analizo 24,179 casos de infecciones nosocomiales reporto a la candidemia como la cuarta causa de ingreso hospitalario; y por su parte otro estudio llevado a cabo en este mismo país, señalo que la candidiasis invasiva representa el 9% de las infecciones del torrente sanguíneo [4, 8]. En Suiza, se reportaron a las infecciones por levaduras del género *Candida* como la séptima causa más común de infecciones intrahospitalarias en torrente sanguíneo, observándose un total de 1137 episodios de candidemia [2,9]. Por su parte en Colombia se observa una distribución similar siendo la quinta causa de infecciones en torrente sanguíneo, donde se han reportado incidencias de 2.3 casos/1.000 pacientes por día en la UCI [4, 12]. Países como: Noruega, Dinamarca e Islandia reportaron un incremento en la incidencia, siendo esta de 2-3/100.000 habitantes por año. En España e Italia de acuerdo con ensayos multicéntricos en 5 hospitales, se señaló una incidencia de 1.55/1000 admisiones hospitalarias, detectando un total de 995 casos positivos [4, 10]. En Corea del Sur la incidencia fue de 29/100.000 habitantes por año. En Australia un estudio realizado

durante 2001 y 2004 demostró una incidencia de 1.81/100.000 habitantes por año, detectando 1095 casos [4, 11]. Un estudio realizado en América central donde se incluyó a 7 países marco una incidencia anual de: 1.95/1.000 camas en argentina, 1.72/1.000 camas en Venezuela, 1.38/1.000 camas en honduras, 0.90/1.000 camas en Ecuador y 0.33/1.000 camas en Chile [4].

De todas estas infecciones por especies del género *Candida*, la especie más comúnmente aislada es *Candida albicans*, ya que puede llegar a aislarse hasta en 85%; Mientras que *Candida glabrata* se ha convertido en la segunda causa más común de candidiasis invasiva en los EE. UU y Europa [1, 6, 7].

Por su parte aquí en México, la incidencia reportada es de 8.6/100.000 habitantes por año [13] y de acuerdo con un estudio realizado por Pineda-Diaz *et al.* 2017 llevó a cabo la detección de *Candida glabrata* en mujeres sanas y en mujeres con un cuadro recurrente de candidiasis vulvovaginal; siendo *Candida glabrata* la especie aislada hasta en el 80% de los casos, siendo el principal agente etiológico de este cuadro recurrente [14].

1.5 Generalidades *Candida albicans*

Es un hongo dimórfico (crece a 35-37°C en forma de levadura y a 25-30°C en forma micelial en un medio pobre de nutrientes y cohesivo), forma parte de la microbiota orofaríngea, gastrointestinal y del aparato reproductor femenino. Como se encuentra presente en mucosas, por ende, la enfermedad se asocia con cambios en la levadura, en el hospedero, o en ambos; en donde la modificación de la forma levaduriforme a la forma micelial (hifas), está relacionada fuertemente con la invasión y/o el potencial patógeno [15]. Posee adhesinas que son un conjunto de proteínas especializadas que favorecen la unión con otras células, superficies inertes y células del hospedero. Las adhesinas más estudiadas son aquellas proteínas con secuencia similar a la aglutinina (ALS), las cuales están conformadas por una familia de 8 miembros (ALS1-7 y ALS9); y de todas ellas la adhesina ALS3 asociada a la hifa es primordial para la adhesión. Otra adhesina fundamental es la Hpw1 (proteína ligada-glicosilfosfatidilinositol asociada a la hifa), la cual puede ser utilizada como un substrato para las transglutaminasas de los mamíferos, promoviendo a unión covalentemente de las hifas de *C. albicans* con las células del huésped. Se ha demostrado que tanto ALS3 como Hpw1 colaboran en la formación de la biopelícula. De igual manera, estas especies expresan invasinas que le permiten entrar a las células del hospedero (ya sea por endocitosis o por penetración activa), se han descrito 2 invasinas principales: ALS3 (también funciona como adhesina) y Ssa1 que es un miembro que se expresa en la superficie celular perteneciente a la familia de las proteínas de choque térmico (Hsp70); en donde ALS3 y Ssa1 se anclan a la E-cadherina de las células epiteliales del huésped y se cree inducen endocitosis por un mecanismo

dependiente de clatrina. Además, posee la capacidad de formar biopelículas tanto en superficies vivas e inertes, siendo estas estructuras las que le permiten resistir a agentes antimicrobianos y al sistema inmune del hospedero en comparación con las células planctónicas. Por otro lado, las hifas secretan diversos factores de virulencia que facilitan la penetración en las células del hospedero; entre las que se encuentran las proteasas aspárticas secretadas (SAP), una familia de proteínas conformada por 10 miembros (SAP1-10) en donde SAP1-8 son liberadas al medio, mientras que SAP9 y SAP10 se encuentran fijadas a la superficie celular. Por su parte, las fosfolipasas (PL) se componen por 4 clases diferentes (A-D), estas son proteínas secretadas que favorecen a la patogenicidad de estas especies ya que actúan hidrolizando los fosfolípidos de la membrana celular del hospedero. A su vez, *C. albicans* es capaz de adaptarse los diferentes cambios de pH en el hospedero, en donde se han identificado a 2 proteínas de la pared celular, PHR1 y PHR2 como las principales; en donde PHR1 es expresada a un pH neutro-alkalino (infecciones sistémicas) y PHR2 es expresada a pH ácido (infecciones vaginales) [16-21].

1.6 Generalidades *Candida glabrata*

Candida glabrata forma parte de un complejo que está integrado por 3 especies: *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida bracarensis* y *Candida nivariensis* [22, 23]. Son levaduras de menor tamaño en comparación con las otras especies de *Candida* (1-4 μm). Crecen en el agar sabourad dextrosa (SDA) formando colonias brillantes, lisas y cremosas; y en el medio cromogénico (CHROMagar *Candida*) se aprecian de color blanco, purpuraroso. Tienen la capacidad de fermentar y asimilar únicamente la glucosa y la trehalosa; lo que las hace fenotípicamente indistinguibles. Poseen un genoma haploide a diferencia de *C. albicans* y las otras especies que tienen un genoma diploide. Además, de que carecen de presentar las formas filamentosas (hifas verdaderas o pseudohifas). Filogenéticamente se encuentra relacionada a *Saccharomyces cerevisiae*; donde a diferencia de esta, *Candida glabrata* ha perdido genes necesarios para el metabolismo de la galactosa, fosfato, nitrógeno, azufre, así como para la biosíntesis de la piridoxina, entre otros. Es una especie robusta capaz de sobrevivir en superficies inertes hasta por más de 5 meses [24, 25].

1.6.1 Factores de virulencia del complejo *Candida glabrata*

De acuerdo con modelos animales, *Candida glabrata* parece no mostrar características de virulencia; sin embargo, los altos índices de mortalidad y su rápida capacidad que tiene para diseminarse demuestran todo lo contrario [26, 27]. Uno de los principales factores de virulencia de *Candida glabrata* es su capacidad de adherirse fuertemente a diferentes sustratos, que le permiten colonizar tejidos del hospedero, así como superficies inertes; para conseguir esto expresa adhesinas codificadas por genes de la

familia EPA, cuyas estructuras son similares a la de las proteínas ALS de *C. albicans*. Esta familia de genes EPA está integrada por 17-23 genes de acuerdo con la cepa, siendo EPA1, EPA6 y EPA7 las adhesinas más importantes. Se han descrito 18 genes EPA en *Candida glabrata sensu stricto*, 12 genes EPA en *Candida braccarensis* y 9 genes EPA en *Candida nivariensis* [24, 25, 28]. Otra familia de adhesinas descritas por Groot *et al.* 2008 [28-30] son las proteínas Awp las cuales están conformadas por 7 adhesinas (Awp 1-7).

De igual manera, en el género *Candida* la secreción de enzimas hidrolíticas como las proteasas, fosfolipasas, hemolisinas, y lipasas juegan un rol clave en la virulencia ya que le permiten invadir y destruir tejidos del hospedero, o bien le permiten sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos. Como principales factores de virulencia, poseen proteasas las cuales poseen un variado número de sustratos, donde actúan degradando estructuras de proteínas como la albúmina, inmunoglobulinas u otras proteínas del sistema inmunológico [24, 31-33]. Algunos autores han reportado que *Candida glabrata* es incapaz de secretar proteasas. Asimismo, se ha observado que estas especies poseen yapsinas que son un tipo de aspartil-proteasas que se encuentran ancladas a su pared celular-ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), las cuales están conformadas por 11 miembros (CgYPS1-11) teniendo una especificidad hacia residuos de aminoácidos básicos. Estas yapsinas están involucradas en la supervivencia de *C. glabrata* en macrófagos, en la remodelación de la pared celular, en la homeostasis del pH intracelular, en la homeostasis de las vacuolas para el correcto funcionamiento de estas, así como también son requeridas para suprimir la producción de IL-1 β en macrófagos [34, 35].

Por otro lado, la secreción de fosfolipasas le permite hidrolizar los fosfolípidos en ácidos grasos contribuyendo de esta manera al daño en la membrana celular del hospedero, facilitando la invasión de manera efectiva en los tejidos envueltos; mientras que las lipasas actúan hidrolizando moléculas de triacilglicerol [24].

Se ha descrito que las hemolisinas en las especies de *Candida* son empleadas para degradar moléculas de hemoglobina para la obtención de hierro, para su utilización en procesos metabólicos; en donde la actividad hemolítica puede estar regulada por la presencia de glucosa en el medio. Se ha caracterizado al gen de la proteína tipo hemolisina (HLP) como el encargado de la actividad hemolítica *in vitro* de *Candida glabrata* [24, 36].

Se ha visto, que las cepas de *Candida glabrata* llevan a cabo la expresión de genes de catalasa, como es el caso del gen CTA1, el cual le permite resistir al estrés oxidativo a través de la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales poseen la capacidad de dañar biomoléculas y destruir patógenos fagocitados. Aunque se ha visto que *Candida glabrata*, posee otros mecanismos para suprimir el estallido respiratorio como las superóxidos dismutasas (SODs), estas proteínas se han clasificado en 3 familias: cobre/zinc (Cu,ZnSOD), hierro o manganeso (FeSOD o MnSOD) y níquel (NiSOD) las cuales catalizan la dismutación del O_2^- en H_2O_2 y con ello protegiéndola del daño oxidativo del O_2^- ; así como también poseen 2 sistemas de balanceo-redox: un sistema de glutatión (GSH) y tiorredoxina, siendo primordialmente el GSH el que le permite detoxificar ROS y otros xenobióticos. De igual manera se ha descrito que *Candida glabrata* lleva a cabo la producción de un pigmento, producto de la degradación del

triptófano, el cual le confiere protección frente al H₂O₂, así como al ataque por parte de los neutrófilos [37, 54, 55].

Otro importante factor de virulencia en *Candida glabrata* es su capacidad de formar biopelículas; en donde como primer paso para su formación se da una adhesión tanto a superficies vivas o inertes, posteriormente las células adheridas comienzan a proliferar para formar microcolonias y consecutivamente se lleva a cabo la producción de la matriz extracelular, la cual está compuesta en su mayoría por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, así como una abundante presencia de β-glucanos (componentes de la pared celular); y por último se lleva a cabo el desprendimiento de algunas células para la colonización de otros sitios. Una característica particular de las biopelículas de *Candida glabrata* es la presencia de células de levadura únicamente, a diferencia de las otras especies de *Candida* que presentan la formación de pseudohifas e hifas verdaderas. De esta forma, estas biopelículas actúan como un mecanismo de resistencia frente a agentes antifúngicos, al actuar como una barrera que impide la penetración de los fármacos, así como también, pueden actuar como un mecanismo para evadir la respuesta inmune. Se ha reportado que Bcr1 es uno de los principales factores transcripcionales que regulan la formación de biopelículas en las especies de *Candida*; mientras que en *Candida glabrata* se ha mencionado que tanto Ace2, el complejo de Swi/Snf, el complejo Sir y Cst6, son reguladores transcripcionales importantes de la formación de biopelículas [25, 27, 38].

1.6.2 Inmunopatogénesis de *Candida glabrata*

Se conoce poco acerca de cómo es la respuesta del hospedero a la interacción con *Candida glabrata*, se ha descrito que la levadura tiene la capacidad de adherirse al epitelio, y a través de un mecanismo desconocido lleva a cabo la penetración, donde una posible vía podría ser debido a una alteración de las barreras primarias o a través de un proceso de endocitosis. También se ha observado que *Candida glabrata* tiene la capacidad de incrementar la cantidad de GM-CSF y producir una baja cantidad de otras citocinas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ò IL-8). Dentro de esta respuesta inmunológica, se ha observado que la composición de la pared celular de *Candida glabrata* puede activar de manera eficiente la fagocitosis, donde el receptor de dectina-1 parece jugar un rol clave en la respuesta del hospedero, llevando a cabo el reconocimiento e internalización de *Candida glabrata*; donde esta última, también tiene la capacidad de inhibir la maduración del fagosoma, donde a través de un proceso de autofagia, remodelado de la cromatina, producción de pigmento y una mayor expresión de catalasa, le permiten sobrevivir y replicarse para poder colonizar otros órganos [39-43].

1.7 Características generales de los neutrófilos

Los neutrófilos son células sanguíneas pertenecientes a la familia de los granulocitos, los cuales tienen la característica particular de presentar un núcleo multilobulado (3-5 lóbulos), y generalmente son denominados polimorfonucleares (PMN). Representan del 40-60% del total de leucocitos, siendo los más abundantes; y en un individuo sano el número promedio es de 4,400 neutrófilos / μL ; su tiempo de vida media en circulación sistémica es de 8-12 horas aproximadamente y de 1 a 2 días en los tejidos. Estas células forman parte esencial de la respuesta inmunológica innata, al ser una de las primeras líneas de defensa, además de que tienen la capacidad de ser movilizados a los sitios de infección o de inflamación aguda, en donde serán activados al reconocer señales derivadas de microorganismos (LPS, fMLP) como del hospedero (interleucinas 1- β , 6, 8 y 17). Los neutrófilos son leucocitos que tienen la capacidad de rodar a través del endotelio, en un proceso denominado como cascada de adhesión leucocitaria; durante esta las células endoteliales llevan a cabo la expresión de moléculas de adhesión como las P-selectinas y E-selectinas; los cuales interactúan con el ligando-1 de la glicoproteína P selectina (PSGL-1) y la L-selectina moléculas expresadas constitutivamente en el neutrófilo, dando como resultado un rodamiento característico. Conforme el neutrófilo va rodando a lo largo del endotelio, se activan una variedad de proteínas quinasas (Src, Syk, PI3K, p38) los cuales inducen un cambio en la biología del neutrófilo promoviendo la expresión de proteínas de la familia de las integrinas β 2 (LFA-1, MAC-1 y gp150/95) que a su vez interactúan con otras proteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas (ICAM-1 y 2) de las células endoteliales, dando como

resultado una firme adhesión y una migración transendotelial. Una vez translocados, estos neutrófilos se encontrarán en un ambiente enriquecido de citocinas, quimioatrayentes y/o productos derivados de microorganismos, los cuales serán los encargados de su activación completa, para finalmente llevar a cabo estrategias para la contención de estos patógenos. Actualmente se han descrito 3 mecanismos de respuesta antimicrobiana: la fagocitosis, la degranulación y la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) [44-49].

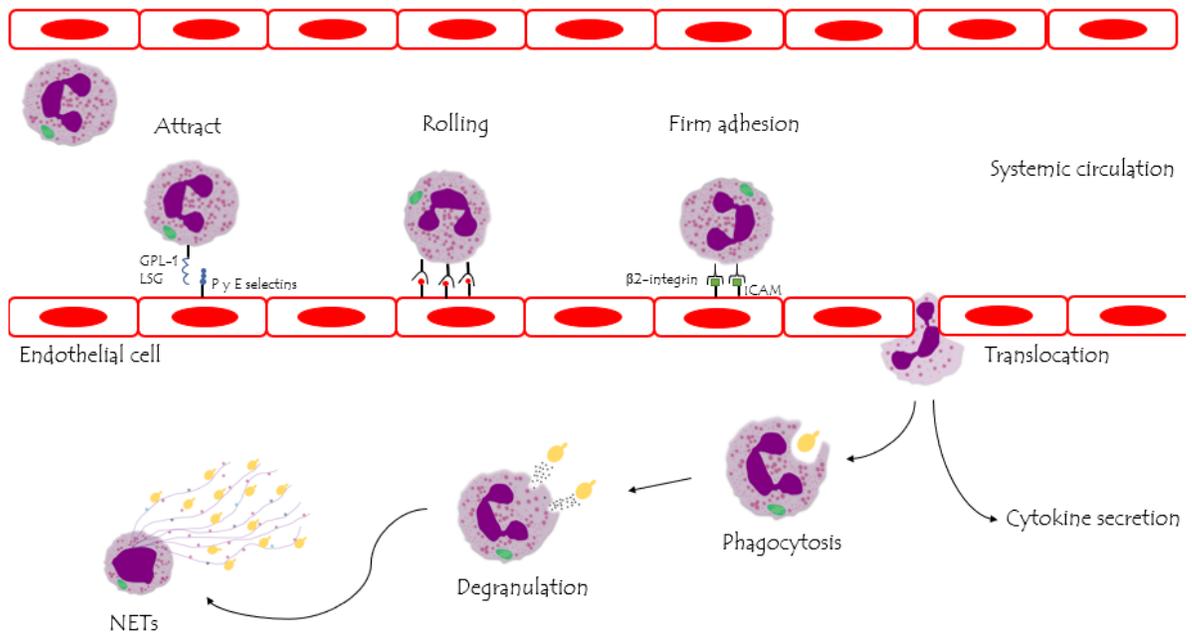


Figura 1.- Cascada de adhesión leucocitaria

1.7.1 Fagocitosis

La fagocitosis se puede definir como el engullimiento de otras células o microorganismos; siendo este uno de los principales mecanismos de respuesta antimicrobiana del neutrófilo, así como la eliminación de desechos celulares. Para ello, el neutrófilo tiene la capacidad de reconocer, engullir y eliminar a los patógenos. El reconocimiento de moléculas presentes en los microorganismos, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), es llevado a cabo por receptores especializados del neutrófilo, denominados comúnmente receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Una vez reconocidas estas moléculas por los PRRs, se lleva a cabo un proceso de internalización del patógeno, llevando a cabo la formación de una vacuola fagocítica, conocida como endosoma temprano, el cual constituye un ambiente inocuo para el patógeno, sin embargo, conforme la vesícula avanza hacia el interior celular va adquiriendo propiedades letales para el microorganismo, proceso denominado como maduración del fagosoma. En este proceso de maduración del fagosoma, los gránulos se fusionan con la vacuola fagocítica y a la par ocurre el ensamble del complejo de la NADPH oxidasa, el cual está conformado por diferentes subunidades: gp91^{phox}, p22^{phox}, Rac2, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}; la cual se encuentra distribuida en la membrana plasmática y en la membrana fagosómica, y cuya función es bombear electrones en la vacuola para la generación de ROS y con ello, crear un ambiente tóxico para los microorganismos. Es importante señalar, que no todos los microorganismos acceden a este ambiente salvaje en el fagosoma ya que muchos de ellos han desarrollado estrategias para su

supervivencia dentro de estas vacuolas, como la inhibición de la maduración del fagosoma o modificando el ambiente de este [50-53, 55].

1.7.2 Degranulación

La degranulación es otro mecanismo empleado por los neutrófilos, en el cual estos liberan su contenido granular a través de un proceso de exocitosis hacia el espacio extracelular. Existen diferentes tipos de gránulos: 1) gránulos primarios, también conocidos como gránulos azurofílicos, los cuales contienen elastasa, mieloperoxidasa, catepsinas y defensinas; 2) gránulos secundarios, denominados como gránulos específicos; 3) gránulos terciarios; que se componen principalmente de lactoferrina y metaloproteasas de matriz-9 (gelatinasa), en donde ambos poseen contenidos similares pero difieren por sus densidades; y 4) vesículas secretoras las cuales contienen albumina sérica humana u otras proteínas derivadas del plasma; siendo principalmente estas un reservorio para moléculas implicadas en la migración del neutrófilo. La migración y la exocitosis del contenido granular requieren incrementos en el contenido de Ca^{2+} intracelular; en donde existen múltiples receptores en la superficie de los neutrófilos que conducen a estos, además de que existe un orden en la liberación de los gránulos, siendo las vesículas secretoras las primeras en liberarse, seguidas de los gránulos terciarios, secundarios y primarios. De igual manera se ha observado que la producción de fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) inducido por la activación del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)- γ es necesaria para la exocitosis del contenido granular. Se le ha atribuido un papel a los lípidos de la membrana como elementos esenciales en el proceso de degranulación, siendo la fosfolipasa D principal involucrada en la liberación de gránulos primarios y

secundarios. Entre otros mecanismos, se le ha implicado a la familia Src de tirosinas quininas en el control de la exocitosis de productos granulares del neutrófilo; dentro de esta familia se ha agrupado a 3 miembros las cuales pueden ser activados a través del receptor acoplado a proteínas G (GPCR): 1) Hck el cual transloca la población de gránulos primarios, 2) Fgr que se ha relacionado con la exocitosis de gránulos secundarios, la cual actúa río arriba de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAP) y 3) Lyn el cual hasta la fecha no se ha relacionado con una población de gránulos en particular, pero se ha observado que la inhibición de la familia Src PP1 conduce a una disminución en la liberación de gránulos primarios, secundarios, terciarios, así como vesículas secretoras. También se ha visto que ciertas proteínas de andamiaje, específicamente las β -arrestinas son necesarias para activar vías de señalización que conducen a la liberación de gránulos primarios y secundarios en los neutrófilos; estas β -arrestinas son un grupo de fosfoproteínas citosólicas que funcionan desacoplando los receptores activados conectados a las proteínas G de las proteínas G heterotriméricas, uniéndose directamente a la cola citoplasmática del receptor CXCR1. Estas β -arrestinas pueden actuar en 2 sitios de la célula: en un receptor en la membrana plasmática o bien en la membrana de los gránulos. También se ha observado que la exocitosis requiere de la unión de proteínas GTP a moléculas efectoras intracelulares, siendo las guanosinatrifosfatasas (GTPasas), las involucradas en la translocación de los gránulos y en su liberación. Existen diferentes tipos de GTPasas: las más estudiadas son las proteínas G heterotriméricas las cuales se encuentran unidas a la membrana plasmática que traducen señales del receptor al citoplasma y las GTPasas monoméricas relacionadas

con ras que pueden residir en el citoplasma, en el citoesqueleto de actina o en la membrana celular; en donde es probable que la migración de gránulos requiera de la remodelación del citoesqueleto de actina, o bien de movimientos de los microtúbulos. Como paso final de la exocitosis, este proceso involucra un reconocimiento entre los gránulos secretores y las membranas blanco, donde existen un conjunto de receptores intracelulares que conducen el ensamble y fusión de los gránulos; siendo estos receptores intracelulares un complejo de fusión de proteínas unidas a la membrana denominados como moléculas SNARE [56-64].

1.7.3 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

EL tercer mecanismo de respuesta antimicrobiana por parte de los neutrófilos es la liberación de las NETs descritas por Brinkmann *et al.* 2004 [65]. Estas NETs consisten en un material fibroso compuesto por cromatina descondensada, decorada con proteínas granulares y citosólicas, dentro de las cuales se encuentran la elastasa de neutrófilo (NE), la mieloperoxidasa (MPO), catepsina G, histonas nucleares (H1, H2A, H2B, H3, H4), calprotectina, α -defensinas, lactoferrina, proteína incrementadora de la permeabilidad celular (BPI), gelatinasa, catelicidina (LL37), actina, tubulina, entre otras. Se ha descrito que las NETs tienen 2 funciones principales: la de atrapar y capturar al microorganismo; así como ejercer un efecto microbicida directo sobre ellos. La liberación de NETs ocurre principalmente a través de un proceso de muerte celular denominado "NETosis". Hasta el momento se han descrito 2 mecanismos para la liberación de las NETs: NETosis vital y NETosis suicida [66-69].

La NETosis vital consiste en la liberación de cromatina nuclear, así como su contenido granular a través de vesículas, mediante un mecanismo que no requiere de especies reactivas de oxígeno (ROS), teniendo como característica particular la ausencia de muerte celular, y con ello la presencia de neutrófilos anucleados denominados kinetoplastos que siguen teniendo capacidad fagocítica, quimiotáctica y de eliminar patógenos; además de que este proceso ocurre dentro de un lapso 5-60 minutos [66, 70, 71]. De igual forma, se ha propuesto la liberación de DNA mitocondrial por neutrófilos viables para la formación de NETs; sin embargo, esto ha sido tema de controversia por diversos artículos dada la poca cantidad de mitocondrias en los neutrófilos, por el pequeño tamaño del DNA mitocondrial, por la ausencia de histonas y de marcadores mitocondriales en estas NETs [72, 73].

Por su parte, en la NETosis suicida ocurre una ruptura de la membrana celular y por ende se lleva a cabo la muerte del neutrófilo. En este proceso, ocurre una activación del neutrófilo por parte de diferentes estímulos (IL-8, TNF- α , cristales de urato, cristales de colesterol, lipopolisacárido, inmunocomplejos, plaquetas, β -glucanos, ionomicina, PMA, entre otros componentes fúngicos, bacterianos, víricos y parasitarios), algunos de los principales eventos que ocurren durante esta, es la activación de la proteína quinasa C (PKC) y de la vía RAF/MEK/ERK que conducen al ensamble del complejo de la NADPH oxidasa, la cual será la encargada de generar ROS las cuales están implicados en la desintegración de la membrana nuclear, de la membrana citoplasmática y en la desintegración de la membrana de los gránulos. La liberación de las proteínas gránulares de sus vesículas promueve la descondensación de la cromatina, durante este proceso la

mieloperoxidasa lleva a cabo la cloración de las histonas, lo cual promueve a su vez un incremento de la actividad de la elastasa, iniciando la degradación de las histonas. De manera sinérgica se ha visto que en respuesta a ciertas toxinas que incrementan las concentraciones de calcio, las enzimas peptidil arginina deiminasa (PAD-4) dependientes de calcio, favorecen la descondensación de la cromatina en un proceso denominado como citrulinación de histonas, en donde actúan transformando los residuos de arginina de las histonas en residuos de citrulina mediante el intercambio de un grupo amino por un grupo ceto, dicho proceso induce la pérdida de la carga positiva de las histonas y con ello las interacciones entre el DNA y estas proteínas. Posteriormente que la cromatina es descondensada inicia una expansión nuclear aconteciendo un mezclado con el contenido granular y citoplasmático; y eventualmente ocurre la extrusión de este DNA. Se ha visto que la autofagia es otro mecanismo implicado en la formación de las NETs, en donde se han propuesto moléculas relacionadas con este proceso, tales como: la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), AKT, el objetivo mecanístico de la rapamicina (mTOR), la proteína 7 relacionada a la autofagia (ATG7), así como las ROS las cuales son conocidas por inducir autofagia, la cual a su vez es requerida para mantener el estallido respiratorio y tolerar el estrés inducido por ROS [66, 74-82].

En los últimos años, se ha observado que la progresión y una mala regulación en la eliminación de estas NETs están asociados al desarrollo de ciertas enfermedades dentro de las cuales destacan: el lupus eritematoso sistémico, la fibrosis quística, la artritis reumatoide, la vasculitis sistémica, la psoriasis, la gota, la metástasis del cáncer, así como la preclamsia [83].

1.7.3.1 Estrategias de evasión de las trampas extracelulares de neutrófilos

Existen reportes de mecanismos utilizados por los microorganismos para evadir este tipo de respuesta en los neutrófilos, uno de ellos es la expresión de la enzima catalasa, la cual actúa suprimiendo el estallido respiratorio, esto debido a que lleva a cabo la degradación del H₂O₂ el cual actúa como un intermediario en la formación de ROS, los cuales, están implicados en la liberación de las NETs [72]. Por su parte, también se ha visto que la expresión de nucleasas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Prevotella intermedia*; y la nucleasa secretada por *Candida albicans*, promueve la degradación las NETs previamente formadas para escapar de su efecto [84-87]. De igual manera se ha reportado que la capsula de polisacáridos y la modificación de los ácidos lipoteicoicos de *Streptococcus pneumoniae* reducen la captura por las NETs [88]. En organismos fúngicos, se ha reportado que la capsula de polisacáridos de *Cryptococcus neoformans* la cual se compone de glucoronoxilomanano (GXM) y de gluconoroxilomanogalactano (GXMGal), inhibe la liberación de las NETs, siendo principalmente el GXM, el asociado con esta inhibición [89]. También se ha notificado que la formación de biopelículas en general, son mecanismos empleados para evadir la respuesta inmune innata del hospedero; previamente se ha reportado que las biopelículas de *Candida albicans* suprimen la liberación de las NETs; siendo este fenómeno conservado entre las especies de *Candida albicans*, así como dependiente del contacto con los neutrófilos, además de que requiere conservar una arquitectura intacta, dado que una disrupción en esta, conduce a la liberación de las NETs incrementando la susceptibilidad de muerte por parte de los neutrófilos. Este mecanismo de inhibición de

las NETs en las biopelículas de *C. albicans* parece estar correlacionado con la producción de polisacáridos de matriz que difieren de los polisacáridos de la pared celular, estando este fenómeno asociado a la presencia de PRM1 el cual codifica para un transportador encargado de la manosilación de la pared celular durante el crecimiento planctónico, mientras que en la formación de biopelículas es una enzima crítica para la producción de α -mananos que son ensamblados con β -glucanos extracelulares para formar un complejo de manano-glucano, siendo este polisacárido el propuesto con contribuir a la inhibición de las NETs [90-93].

1.8 Antecedentes

Como antecedente directo realizado por nuestro grupo de trabajo, llevamos a cabo un estudio, donde previamente encontramos que las especies de *Candida* tienen capacidades diferentes para inducir la liberación de las NETs [94]. En este estudio se probaron 30 aislamientos clínicos de cada una de las diferentes especies, entre las cuales figuraban: *C. albicans*, *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata sensu stricto*; observando que esta última no tiene la capacidad de inducir la formación de las NETs. De esta manera, para observar si esta era una característica conservada entre las cepas de este complejo, se incluyeron a las otras 2 especies que forman parte del complejo, como lo son: *C. bracarensis* y *C. nivariensis*; observando que estas 2 si tienen la capacidad de liberar las NETs. Cabe señalar que en este trabajo no se evaluaron los mecanismos implicados en la inhibición de las NETs por parte de *C. glabrata sensu stricto*, sin embargo, creemos que esta última está inhibiendo vías alternas de formación de las NETs, es por ello el interés del presente trabajo.

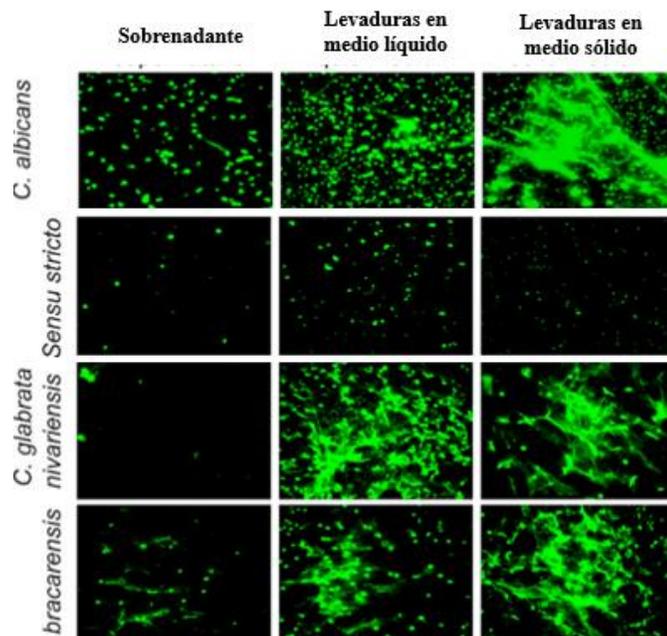


Figura 2.- Inducción de NETs en cepas del complejo *Candida glabrata*

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Las especies del género *Candida* son una causa creciente de infecciones nosocomiales, en pacientes críticamente enfermos, siendo éstas asociadas con una alta mortalidad, morbilidad y costo de atención por paciente. En las últimas décadas, especies del complejo *Candida glabrata* han adquirido relevancia clínica, siendo una causa común de candidiasis invasiva.

Actualmente es poca la información que se conoce acerca de los factores de virulencia del complejo *Candida glabrata* que están implicados en la inhibición de las NETs.

Obtener información acerca de estos factores expresados por el complejo *Candida glabrata* asociados con la inhibición de las NETs, será de vital importancia para comprender la patogenia de la infección y establecer medidas para su control.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si las catalasas, nucleasas y biopelículas del complejo *Candida glabrata* están involucrados en la inhibición de las trampas extracelulares de neutrófilos.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Analizar la expresión de catalasas, nucleasas y formación de biopelículas en cepas del complejo *Candida glabrata*.
- 2) Examinar la formación de NETs de las cepas del complejo *Candida glabrata*.
- 3) Evaluar los mecanismos de inhibición de las NETs.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, se estableció la siguiente estrategia general: partiendo del modelo presentado por nuestro grupo de trabajo, donde se utilizaron cepas de *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida braccarensis* y *Candida nivariensis*; primero se determinó la expresión de algunos factores de virulencia tales como enzimas hidrolíticas, catalasa, nucleasa y formación de biopelículas; posteriormente se procedió a realizar ensayos de inducción de NETs en las cepas de este complejo, primero en cultivo planctónico; una vez realizados estos ensayos se inhibió a la enzima catalasa y se evaluó la actividad de la enzima, se realizaron ensayos de degradación de NETs con sobrenadantes de los cultivos y finalmente se evaluó la inducción de NET en las biopelículas de este complejo.

4.2 Determinación de catalasa

A partir de cultivos de 24-48H sembrados en placas de agar Sabouraud dextrose (SDA), se realizó un ajuste de inóculo al 20%T_{600 nm} (3x10⁶ UFC/mL) en 3 mL de solución salina estéril 0.85%. Posteriormente se colocaron junto con 100 µL de tritón X-100 1% en tubos 13x100, a los cuales posteriormente se le añadieron 500 µL de H₂O₂ 3% a cada uno. Se incubaron a temperatura ambiente y se realizó la lectura cada 15 minutos durante 2 horas, midiendo la distancia del burbujeo producido. En este ensayo se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control [95].

4.3 Determinación de enzimas hidrolíticas

Para el análisis del perfil enzimático, se determinó la expresión de hemolisinas, fosfolipasas, proteasas, nucleasas y esterases. Para ello, se sembraron las cepas en caldo Sabouraud dextrose 2% por 24H a 37°C, transcurrido este tiempo se realizó un ajuste de inóculo al 20%T_{600 nm}, para posteriormente tomar 10 µL (para el caso de las hemolisinas) y 5 µL (para el resto de las pruebas) de esta suspensión y se sembraron en placas con medio de cultivo que contenían el sustrato para estas enzimas, así como discos de papel filtro; finalmente se incubaron las placas a 37°C durante 2, 5, 7 y 10 días para cada ensayo respectivamente; utilizando una cepa de *Candida albicans* como control de referencia [96, 97].

La medición de este ensayo se evaluó de acuerdo con el índice Pz, el cual se basa en la siguiente relación:

$$\text{Índice } Pz = \frac{\text{diámetro de la colonia}}{\text{diámetro de la colonia} + \text{halo}}$$

En donde ya se encuentran reportados los siguientes rangos:

Índice Pz	Actividad
< 0.69	Muy fuerte (++++)
0.70 – 0.79	Fuerte (+++)
0.80 – 0.89	Moderada (++)
0.90 – 0.99	Débil (+)
1	Nula (-)

4.3.1 Determinación de hemolisinas

Para el análisis de la actividad hemolítica se utilizaron placas de SDA (BD Bioxon) suplementadas con glucosa (Sigma aldrich) al 3% y sangre de carnero al 7%, en donde fueron sembrados sobre las placas e incubadas por 2 días a 37°C, siendo la presencia de un halo translucido alrededor de la colonia el indicador de una actividad positiva; utilizando una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control [98].

4.3.2 Determinación de fosfolipasas

Para el análisis de la actividad de fosfolipasas, se emplearon placas de agar SDA (BD Bioxon) enriquecido con una solución de yema de huevo al 8% estéril y se sembraron e incubaron por 5 días a 37°C, siendo las cepas productoras de fosfolipasas las formadoras de un halo de precipitación denso alrededor de la colonia [99].

4.3.3 Determinación de proteasas

Para el estudio de la actividad proteolítica se utilizó el medio de caseína, el cual estaba formulado con una solución A: que contenía 1g dextrosa (Sigma aldrich), 2g agar bacteriológico (BD Bioxon) y 50 mL agua destilada; así como por una solución B: que

contenía 1.5g de leche descremada comercial y 50 mL agua destilada, se esterilizaron por separado en autoclave a 110°C / 10 lb/ 10 minutos. Una vez esterilizados se mezclaron a una temperatura 45°C aproximadamente y se vaciaron en cajas. Posteriormente se sembraron y fueron incubadas por 7 días a 37°C; en donde la presencia de un halo translucido alrededor de la colonia nos indicaba una actividad positiva [1].

4.3.4 Determinación de esterasas

Para el análisis de la actividad de esterasas, se lleva a cabo utilizando un medio de opacidad, formulado de la siguiente manera: 10g bactopectona, 5g NaCl, 0.1g CaCl₂, y 15g agar bacteriológico disueltos en 1L agua destilada (ajustando a un pH 6.8), esterilizando en autoclave, para finalmente adicionar 5 mL/L de tween 80 (Sigma aldrich) estéril al medio templado. Se sembraron e incubaron por 10 días a 37°C, en donde las cepas productoras de esta enzima llevan a cabo la hidrolisis del sustrato de prueba, llevando a cabo la liberación de ácidos grasos que se unen al calcio produciendo un halo de precipitación alrededor de las colonias [100, 101].

4.3.5 Determinación de nucleasas

Para la medición de la actividad de nucleasas, se empleó Agar DNA (BD Difco) sin verde de metilo, adicionado con CaCl₂ y MgCl₂ 5 mM; en donde las placas fueron sembradas e incubadas por 2 días a 37°C. La lectura se lleva a cabo añadiendo una solución de HCl 1N al medio, en donde la presencia de un halo translucido nos indicaba una actividad

positiva. Para este ensayo se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control positivo [86].

4.4 Producción de biopelículas

Para efectuar estos ensayos, las cepas fueron sembradas en placas de agar SDA (BD Bioxon) por 24-48H, posteriormente una colonia fue subcultivada en RPMI-MOPS 1X (GIBCO™ – Sigma aldrich) ajustado a pH 7.2 e incubada a 37°C con agitación 200 RPM durante 18-24H. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó un ajuste de inóculo a 1 D.O._{600 nm} y se realizó una dilución 1:10 en medio RPMI-MOPS 1X, para posteriormente sembrar 250 µL de esta suspensión en placas de 96 pozos (Corning™) y esta placa fue incubada por 24H a 37°C.

4.4.1 Medición de la biopelícula

4.4.1.1 Cuantificación de biopelícula por cristal violeta

Una vez concluidas las 24H de incubación se llevó a cabo la medición de la masa celular, en donde las placas de 96 pozos con la biopelícula previamente crecida fueron lavadas con 250 µL de PBS 1X, se descartó el sobrenadante y posteriormente fueron secadas por 30 minutos a 37°C. Una vez seca, se tiñó con una solución acuosa de cristal violeta 0.1% durante 15 minutos y se realizó un lavado con 250 µL H₂O MQ estéril por triplicado. Se desechó este sobrenadante y se dejó secar nuevamente durante 30 minutos a 37°C. Una vez seca la placa se añadieron 250 µL etanol al 96% por 15 minutos para decolorar, y se realizó la medición en un lector de placas a 595 nm.

4.4.1.2 Cuantificación de biopelícula por MTT

De igual manera, se realizó un ensayo para evaluar la actividad metabólica en la biopelícula, utilizando el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio el cual es reducido a cristales de formazan (compuesto insoluble) debido a la actividad mitocondrial. Para ello, transcurridas las 24H de incubación se descartó el sobrenadante de los pozos, se realizó un lavado con 250 μ L PBS 1X y posteriormente se le añadieron 125 μ L de RPMI-MOPS 1x y 125 μ L de una solución de MTT 0.01%. Las placas fueron incubadas por 4 horas a 37°C, y una vez finalizado este tiempo se disolvieron los cristales generados con 50 μ L de DMSO, siendo las concentraciones de formazan determinadas por espectrofotometría a 490 nm. Los resultados fueron normalizados frente a la cepa de *Candida albicans* quien era nuestro control positivo.

4.4.1.3 Ensayo de azul alamar

Como parte de la medición de la biopelícula, se realizó un ensayo para evaluar la viabilidad de las levaduras en la biopelícula, utilizando el ensayo de reducción de azul alamar; el cual se fundamenta en la transformación de la resazurina en resorufina debido a la actividad mitocondrial; siendo este último un compuesto altamente fluorescente a 590 nm. Para ello, las biopelículas de 24H fueron lavadas con 250 μ L de PBS 1X, se le añadieron 225 μ L de RPMI-MOPS 1X y fueron agregados 25 μ L de azul alamar (para quedar al 10% del volumen del cultivo en el pozo). Las placas fueron incubadas en oscuridad por 4H a 37°C y la medición se realizó por espectrofotometría UV-Vis. Se utilizo la siguiente fórmula para evaluar el porcentaje de reducción: %Reducción = (Abs 595 nm muestra / Abs 595 nm control) x 100.

4.5 Inducción de NETs por cepas del complejo *Candida glabrata*

4.5.1 Obtención y purificación de neutrófilos

Se obtuvieron muestras de sangre periférica obtenidas a través de punción venosa en tubos con EDTA (BD Vacutainer). Por otro lado, se preparó un gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) utilizando las siguientes concentraciones: 45%, 54%, 63% y 72% las cuales fueron preparadas a partir de una solución de trabajo al 100% (tabla 2). Se tomaron 2 mL de cada solución preparada y se colocaron en tubo cónico de 15 mL comenzando con la de mayor concentración a la de menor concentración. Una vez preparado el gradiente se colocaron 2 mL de la sangre venosa colectada con anticoagulante sobre la superficie del gradiente siendo muy cuidadosos, para posteriormente realizar una centrifugación a 600 gravedades durante 20 minutos (sin freno ni aceleración). Una vez transcurrido el tiempo, con una pipeta Pasteur se colectaron los neutrófilos separados los cuales estaban comprendidos entre la interfase del 63 y 72% (justo por arriba de los eritrocitos) y se colocaron en un nuevo tubo cónico de 15 mL, para consecutivamente realizar un lavado con una solución de Hanks 1X (GIBCO™) a través de centrifugación a 300 gravedades durante 10 minutos (9 aceleración y 9 desaceleración). Se decantó el sobrenadante y los neutrófilos lavados fueron resuspendidos en una solución de Hanks 1X suplementado con 10% del suero autólogo y 5 μ L Hoechst 33342 (Thermo scientific). Ya por último se llevó a cabo un conteo utilizando la cámara de Neubauer por microscopia de fluorescencia, al igual que se determinó la viabilidad de las células a través de la tinción con azul tripano.

Tabla 2. Preparación del gradiente de Percoll			
Solución de Percoll	Percoll	Hanks 1X	Hanks 10X
45%	1.89 mL	2.05 mL	210 µL
54%	2.268 mL	1.68 mL	252 µL
63%	2.646 mL	1.26 mL	252 µL
72%	3.024 mL	0.84 mL	336 µL

4.5.2 Preparación de las multiplicidades de infección (MOI)

A partir de cultivos de 24H, se midió la absorbancia a 600 nm y con base en ello se contabilizaron las células que se tenían, dada la relación que existe que 1 D.O. = 4×10^6 UFC/mL. Las células fueron centrifugadas a 4000 RPM durante 5 minutos para la obtención del paquete celular y estas fueron resuspendidas en 1 mL de Hanks 1X. Se realizaron los cálculos para obtener un inóculo de 1×10^7 UFC/mL lo cual equivale a una MOI 1:100. Para preparar una MOI equivalente a 1:10 se colocaron 100 µL de la suspensión 1×10^7 UFC/mL (MOI 1:100) con 900 µL de Hanks 1X en tu tubo eppendorff de 2 mL. De igual manera, para la obtención de una MOI 1:1 se colocaron 100 µL de la MOI 1:10 (1×10^6 UFC/mL) con 900 µL de Hanks 1X en tu tubo eppendorff.

4.5.3 Ensayos de inducción de NETs en cultivos planctónicos fúngicos

Para estos ensayos, los neutrófilos resuspendidos en Hanks 1X fueron ajustados a una concentración final de 1×10^5 células/pozo. Posteriormente fueron sembrados 50 μL /pozo en una placa de 96 pozos o 100 μL /pozo en una placa de 24 la cual contenía un cubreobjeto redondo. De igual manera fueron añadidos 180 μL /pozo (placa de 96) o 360 μL /pozo (placa de 24) de los tratamientos los cuales eran: las diferentes MOI de las cepas del complejo *Candida glabrata*, Hanks 1X estéril y PMA 40 nM (Sigma aldrich). A cada uno de los tratamientos se les añadió 10 μL sytox green (Thermo scientific) y estos fueron incubados en oscuridad durante 1-6H a 37°C. La medición se lleva a cabo por fluorescencia a 460/538 nm realizando lecturas cada hora. De igual forma, se analizó la morfología celular utilizando un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axioplan, West Germany).

4.6 Caracterización de las NETs por inmunofluorescencia

Para estos ensayos, se realizaron ensayos de inducción de NETs por 3H como anteriormente se mencionó (punto 4.5.3) en una placa de 24 pozos con cubreobjetos redondos 13 mm. Posteriormente las cepas fueron fijadas con 100 μL paraformaldehído 4% durante 15 minutos. Las laminillas fueron colocadas en una cámara de humedad y lavadas 2 veces con 100 μL del buffer de bloqueo (leche descremada 3% en PBS 1X). Posteriormente las células fueron permeabilizadas con 100 μL tritón 0.1% en buffer de bloqueo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizo de nuevo 2 lavados con el buffer de bloqueo, para posteriormente añadir 100 μL de anti-elastasa (conejo anti-humana, monoclonal) previamente diluida 1:100 y se incubaron las laminillas por 24H a

4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados con buffer de bloqueo, para posteriormente añadir 100 µL de Alexa Fluor 488 (ratón anti-conejo) diluido 1:500 que emite fluorescencia verde como anticuerpo secundario, y se incubó por 1H a temperatura ambiente en oscuridad. Las laminillas finalmente se montaron en un portaobjetos con 10 µL de Prolong Gold Antifade (Thermo fisher) y se analizaron en microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axioplan, West Germany).

4.7 Ensayos de inactivación de catalasas fúngicas

Para evaluar la resistencia de las catalasas fúngicas a la inhibición por agentes químicos, se realizó un ensayo de inhibición enzimática; en donde previamente cultivos de las cepas del complejo *Candida glabrata* fueron incubados por 24H a 37°C con aminotriazol (AMT) 100 mM. Para estos ensayos se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control.

4.8 Degradación de NETs por nucleasas fúngicas

De igual manera para confirmar los ensayos de la actividad de la enzima nucleasa realizados en placa, se optó por utilizar un ensayo más sensible como lo es medir indirectamente la actividad de esta enzima por fluorescencia. Para ello a partir de cultivos de 24-48H crecidos en SDB, se obtuvieron los sobrenadantes utilizando discos de filtro de membrana 0.2 µm. Por otro lado, se realizaron ensayos de inducción de NETs utilizando PMA, un potente inductor de las NETs-ROS dependiente, el cual se sabe es un análogo del diacilglicerol que activa la proteína quinasa K, que lleva a cabo el ensamble de la NADPH oxidasa y con ello la liberación de las NETs. Para los ensayos de inducción

de NETs, estos fueron realizadas en placas de 96 pozos y se incubaron por 3H a 37°C, siguiendo la metodología previamente descrita (punto 4.5.3). Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron los tratamientos los cuales eran DNAsa 1U/mL y los sobrenadantes de las cepas a una concentración final del 10%, se incubaron por 10 minutos y a continuación se añadieron 10 µL de EDTA disódico 2 mM para frenar la actividad de la enzima nucleasa. Finalmente se realizaron lecturas en un fluoroskan (Thermo scientific) a 485/538 nm. Como controles para este ensayo, se utilizaron DNAsa 1U/mL, sobrenadantes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de *Candida albicans*.

4.9 Ensayos de inducción de NETs por biopelículas fúngicas

Para evaluar este otro mecanismo asociado con la inhibición de las NETs, se llevó a cabo la producción de biopelículas por 24H (punto 4.4), transcurrido este tiempo se desechó el sobrenadante del medio y se realizaron 2 lavados con 250 µL PBS 1X, se descartó el sobrenadante y se añadieron 50 µL/pozo (para una placa 96) o 100 µL/pozo (para una placa de 24) de neutrófilos purificados ajustados a 1×10^5 células/pozo; consecuentemente se añadieron 180 µL/pozo (para una placa de 96) o 360 µL/pozo (para una placa de 24) de Hanks 1X a cada una de las biopelículas y en seguida se agregaron 10 µL/pozo de sytox green. Se incubaron de 1-6H a 37°C en oscuridad, y eventualmente se realizaron lecturas en fluoroskan a 485/538 nm cada hora. Como control positivo se utilizó PMA 40 nM, al igual que se utilizó una cepa de *Candida albicans* como referencia.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Determinación de catalasa

Analizamos la actividad de la enzima catalasa tanto en *S. aureus*, *C. albicans*, como en las cepas del complejo *Candida glabrata* observando que todas las especies analizadas llevan a cabo la expresión de dicha enzima, produciendo un burbujeo, la cual es producto de la degradación del peróxido de hidrogeno, provocando así la liberación de oxígeno molecular el cual posteriormente forma una emulsión con el tritón al 1% (figura 3). Como control negativo se utilizó una cepa de *S. pyogenes*.



Figura 3.- Expresión de la enzima catalasa medida con H₂O₂ 3% y tritón 1%

De igual manera, al momento de realizar estas pruebas observamos que la actividad de la catalasa tanto en *C. albicans* como en las cepas de nuestro complejo *C. glabrata* es dependiente del tiempo como se puede observar en la figura 4; mientras que en nuestro control positivo el cual es *S. aureus* la actividad de esta enzima se mantiene constante. Al momento de realizar el análisis estadístico encontramos una correlación entre el tiempo y el burbujeo producido en las cepas de nuestro complejo ($P < 0.05$).

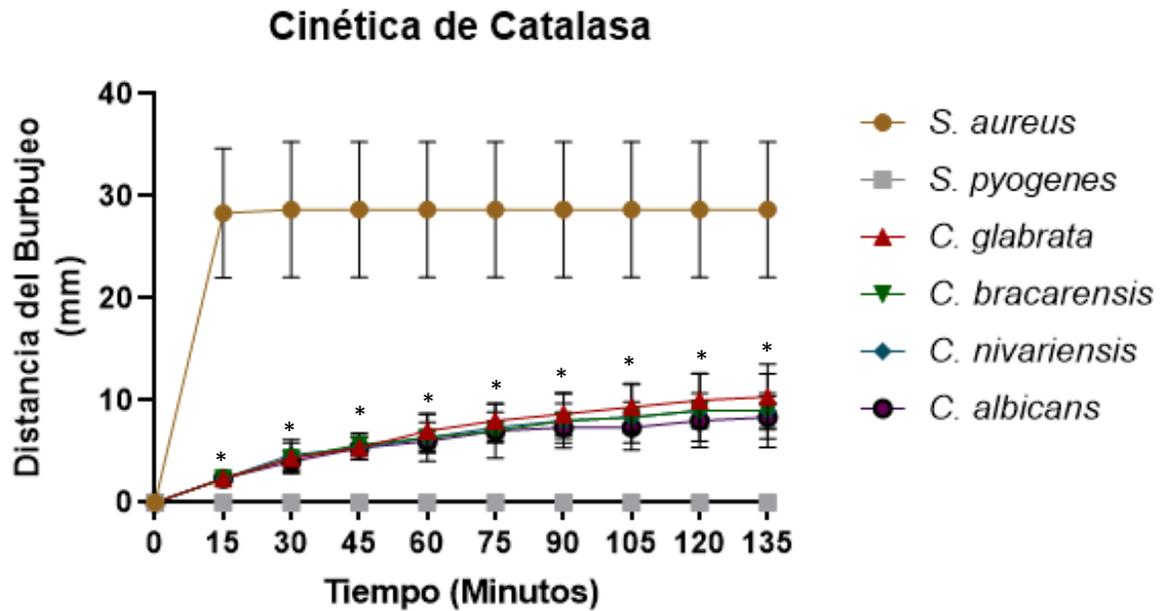


Figura 4.- Actividad de la enzima catalasa respecto al tiempo

5.2 Determinación de enzimas hidrolíticas

Adicionalmente, evaluamos la secreción de enzimas hidrolíticas en las cepas del complejo *Candida glabrata*, no encontrando diferencias en la expresión de dichos factores de virulencia. La actividad de estas enzimas fue determinado a través del índice Pz, encontramos que las cepas del complejo *Candida glabrata* llevan a cabo una expresión muy fuerte de hemolisinas, una expresión fuerte de proteasas, una expresión muy fuerte de fosfolipasas, además de que no expresan esterazas ni tampoco nucleasas (tabla 3).

Tabla 3. Secreción de enzimas hidrolíticas ¹				
Enzimas hidrolíticas	<i>Candida glabrata sensu stricto</i>	<i>Candida bracarensis</i>	<i>Candida nivariensis</i>	<i>Candida albicans</i>
Hemolisinas	++++	++++	++++	++++
Fosfolipasas	++++	++++	++++	++++
Proteasas	+++	+++	+++	+++
Esterasas	-	-	-	-
Nucleasas	-	-	-	-

¹ medición realizada a través del índice Pz = diámetro de la colonia / diámetro de la colonia + halo

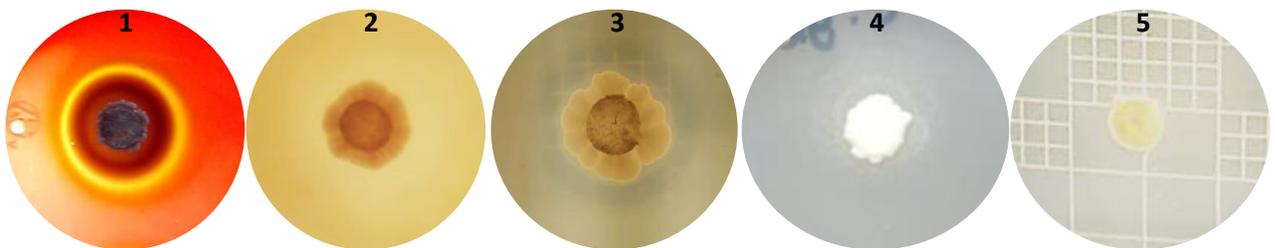


Figura 5.- Evaluación *in vitro* de la secreción de enzimas hidrolíticas por cepas del complejo *Candida glabrata*: 1) hemolisinas, 2) fosfolipasas, 3) proteasas, 4) esterazas y 5) nucleasas.

5.3 Producción de biopelículas

Como parte de este trabajo, se llevó a cabo la producción de biopelículas fúngicas, siendo evaluadas a través de ensayos de tinción con cristal violeta, esto para la medición de la masa celular, la cual fue determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm. Como se observa en la figura 5, encontramos una fuerte producción de biopelícula por parte de nuestro control positivo (*C. albicans*); a diferencia de las cepas de nuestro complejo que tienden a formar biopelícula en menor proporción que *C. albicans*; siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Por otro lado, encontramos que existían diferencias estadísticas en la producción de biopelícula entre *C. glabrata sensu stricto* y *C. nivariensis* ($P < 0.05$), no observando diferencias entre la producción de biopelículas de *C. glabrata sensu stricto* y *C. bracarensis* ($P > 0.05$)

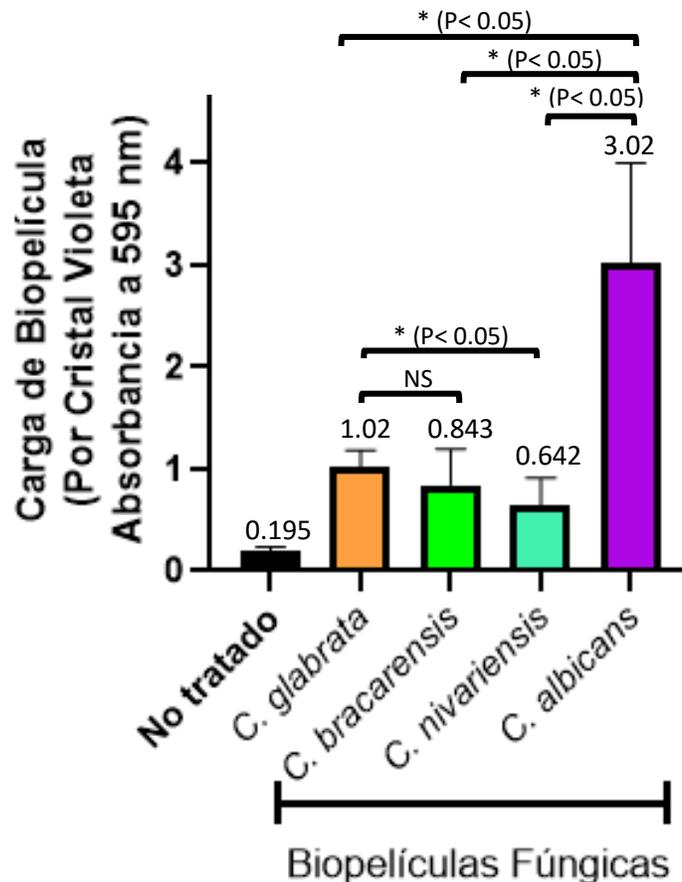


Figura 6.- Medición de la biomasa total de las biopelículas fúngicas a través de la tinción con cristal violeta 0.1%

Una vez evaluada la biomasa total de esta biopelícula, a continuación, estimamos la actividad metabólica de las células fúngicas que se encuentran conformando la biopelícula mediante ensayos de MTT, dicho ensayo se basa en la medición por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm de la reducción de una sal de tetrazolio en cristales de formazan como producto de la actividad mitocondrial. Como se puede observar en la figura 7, encontramos que la biopelícula producida por nuestro control positivo (*C. albicans*) presenta un metabolismo activo; a diferencia de las biopelículas producidas por nuestro complejo, las cuales presentan un metabolismo menor, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

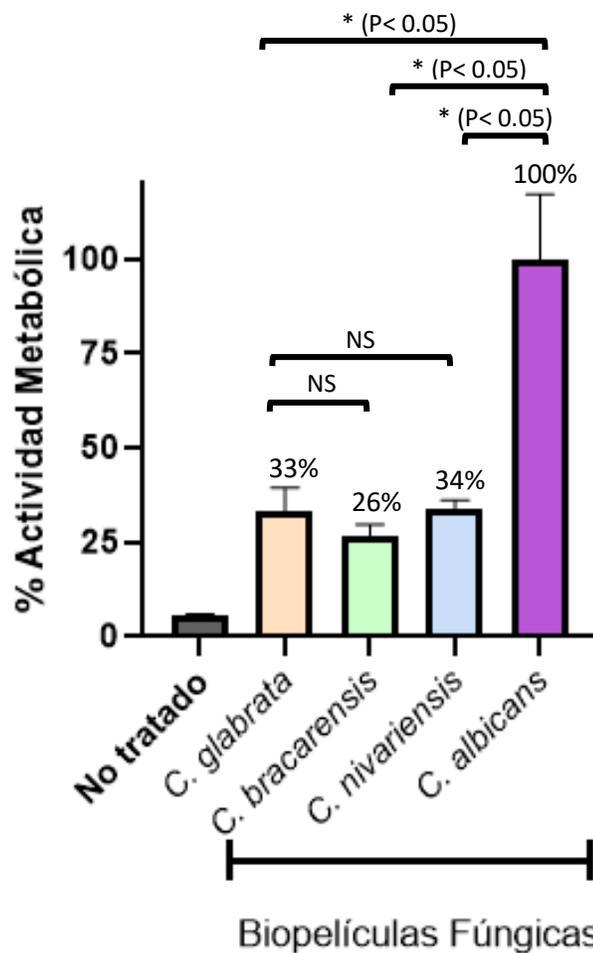


Figura 7.- Medición de la actividad metabólica a través del ensayo de reducción de MTT

Para descartar que este metabolismo reducido fuera ocasionado por una muerte de las levaduras que están conformando la biopelícula, realizamos ensayos de viabilidad con azul alamar; el cual se fundamenta en la transformación de la resazurina en resorufina debido a la actividad mitocondrial, siendo este ensayo medido a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm. Como se puede observar en la figura 8, para todos los aislados se obtuvieron porcentajes de viabilidad inclusive superiores a nuestro control positivo, no existiendo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre nuestros tratamientos. Por lo tanto, con este ensayo confirmamos que las levaduras del complejo que se hallan formando biopelículas se encuentran vivas.

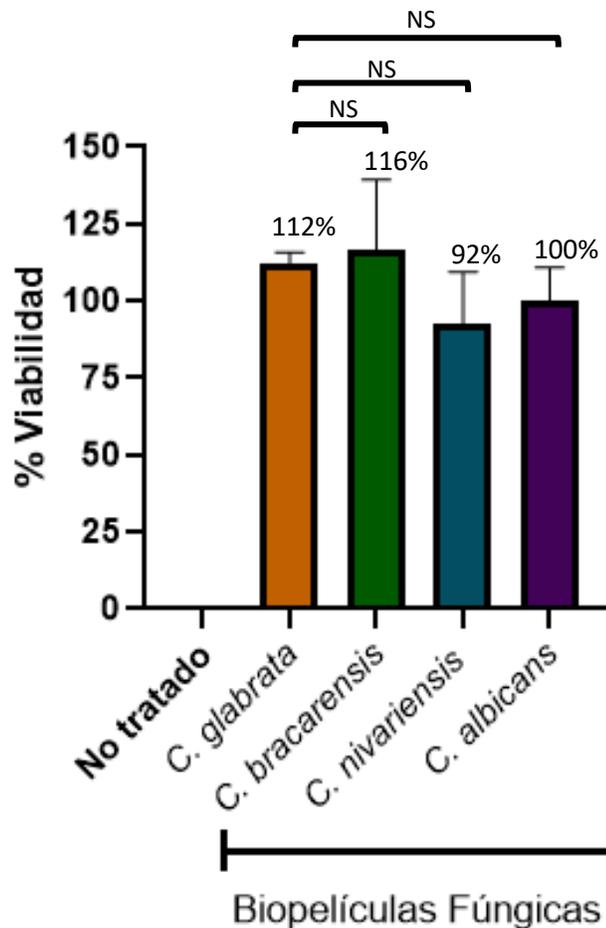


Figura 8.- Evaluación de la viabilidad celular con azul alamar en las biopelículas fúngicas

5.4 Ensayos de inducción de NETs con cultivos planctónicos fúngicos

Una vez evaluados los posibles factores implicados en la inhibición de las NETs, procedimos a realizar los ensayos de inducción de NETs. Las NETs fueron observados por espectroscopia de fluorescencia utilizando sytox green, el cual es un colorante impermeable a las células vivas que tiene afinidad por el DNA extracelular, y cuando se intercala entre los azúcares de este, tiene la capacidad de emitir fluorescencia. En estos ensayos se utilizaron diferentes multiplicidades de infección (1:100 y 1:1) de las cepas crecidas en cultivos planctónicos y se realizó una cinética midiendo a diferentes tiempos la liberación del DNA extracelular por fluorescencia.

Como se puede observar en la figura 9, a un MOI 1:100 (1×10^7 UFC/mL) tanto en la cepa de *C. albicans* como en las cepas de nuestro complejo *C. glabrata* se observa una menor inducción de NETs comparada con nuestro control positivo el PMA; todo esto parece indicar que a inóculos altos existe liberación de NETs, pero estas van retrasadas o están siendo suprimidas por nuestras cepas.

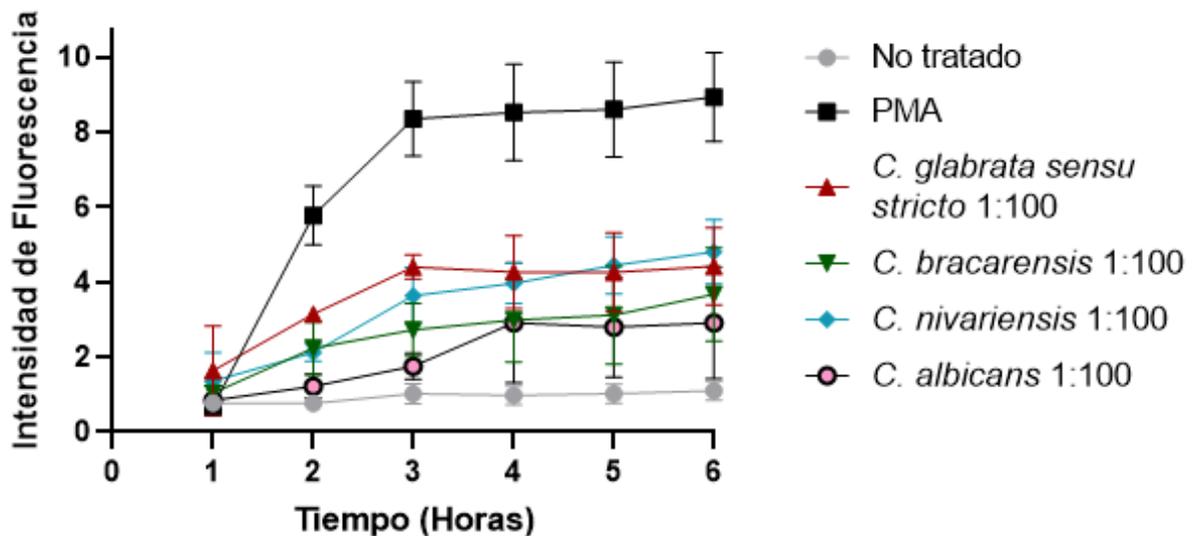


Figura 9.- Cinética de formación de NETs en las cepas planctónicas a un MOI 1:100 utilizando un ensayo de sytox green.

Por otro lado, en la figura 10 se puede apreciar como a un MOI 1:1 (1×10^5 UFC/ mL) tanto en *C. albicans* como en las cepas de nuestro complejo *C. glabrata* no se induce la liberación de las NETs, encontrando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) comparado con nuestro control positivo el PMA a diferentes tiempos.

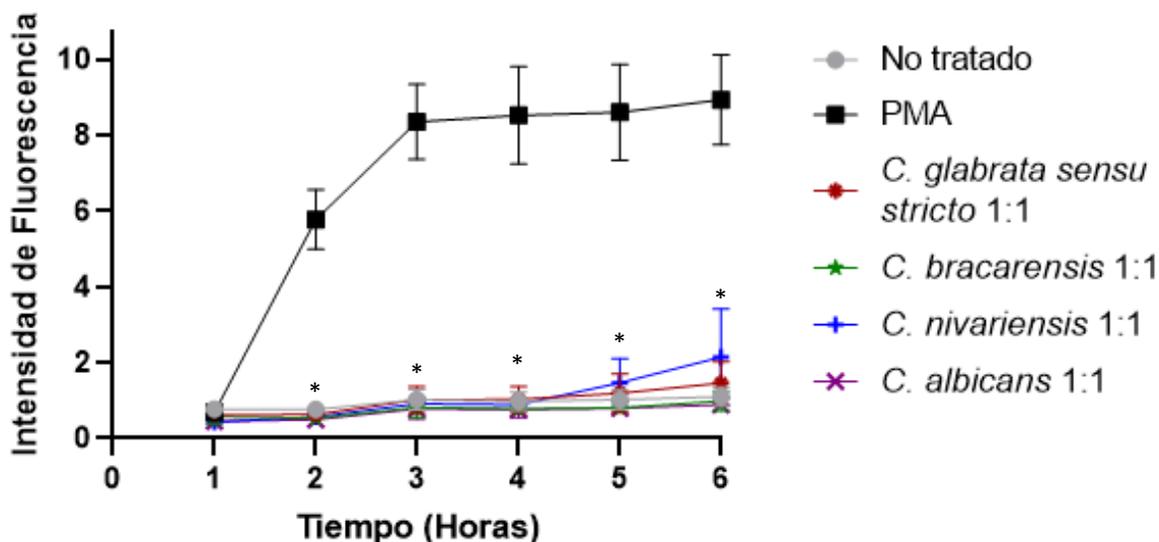


Figura 10.- Cinética de formación de NETs en las cepas planctónicas a un MOI 1:1 utilizando un ensayo de sytox green.

5.5 Caracterización de las NETs por inmunofluorescencia

Para caracterizar la formación de las NETs y con ello descartar que este DNA extracelular provenga de otras fuentes, se llevó a cabo el marcaje de la elastasa de neutrófilo (NE) por inmunofluorescencia. La NE es un sello distintivo de las NETs, ya que es una serin proteasa exclusiva del neutrófilo y que se puede observar en conjunto con el DNA extruido; por otra parte, se tiñó el DNA con Hoechst como colorante de contraste.

Como se visualiza en la figura 11, en neutrófilos no estimulados (incubados únicamente con Hanks 1X) que fueron teñidos con Hoechst (fluorescencia azul) y que fueron marcados con un anticuerpo anti-NE (fluorescencia verde), se puede observar como el DNA permanece en el núcleo, y de igual manera se observa como la elastasa de neutrófilos permanece localizada dentro de los gránulos.

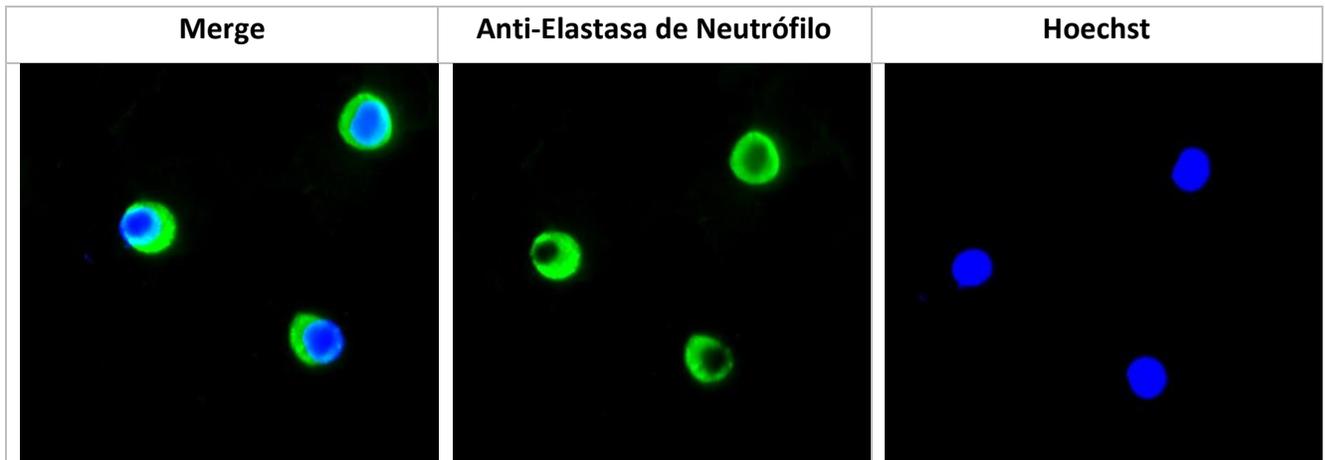


Figura 11.- Inmunofluorescencia de neutrófilos no estimulados.

Por otro lado, en neutrófilos estimulados con PMA, un análogo del diacilglicerol (DAG) que es permeable a las células y que tiene la capacidad de activar a la proteína kinasa C (PKC) y con ello activar la vía de las MAP kinasas (Raf/MEK/Erk) que conllevan a el ensamble del complejo de la NADPH oxidasa para la generación de NETs dependientes de ROS; observamos como se lleva a cabo la extrusión del DNA y de igual forma vemos como la elastasa de neutrófilo se encuentra en conjunto con este DNA extruido (figura 12); corroborando con esto que el DNA extracelular es proveniente de una NETs.

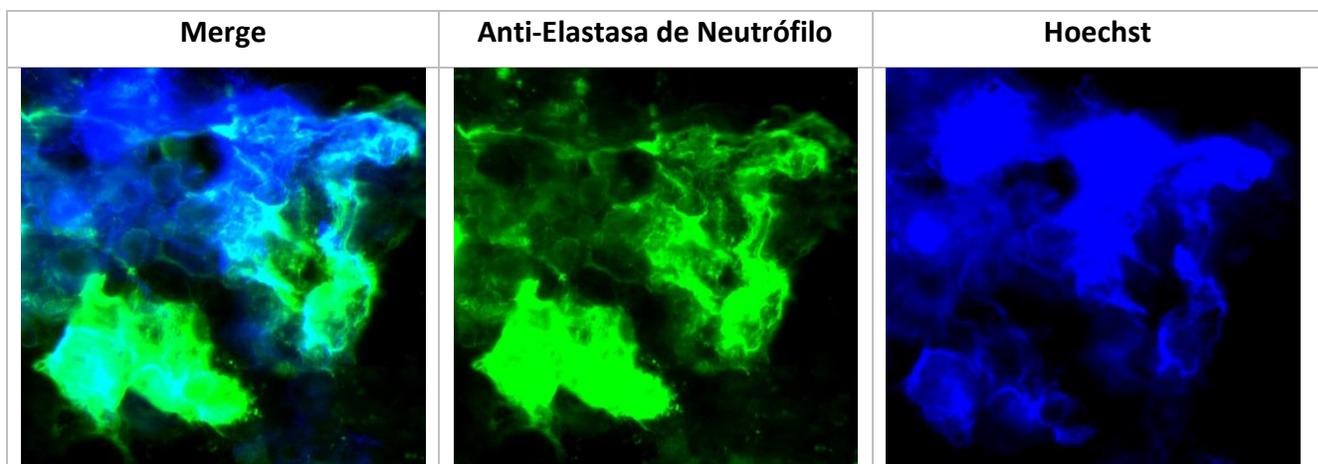


Figura 12.- Inmunofluorescencia de neutrófilos estimulados con PMA.

Por su parte, en neutrófilos estimulados con *C. glabrata sensu stricto*, pudimos percatarnos de como el DNA permanece dentro del núcleo y la elastasa de neutrófilo permanece restringida dentro de los gránulos (figura 13); siendo todo esto muy similar a los neutrófilos no estimulados, donde no se visualiza la formación de las NETs.

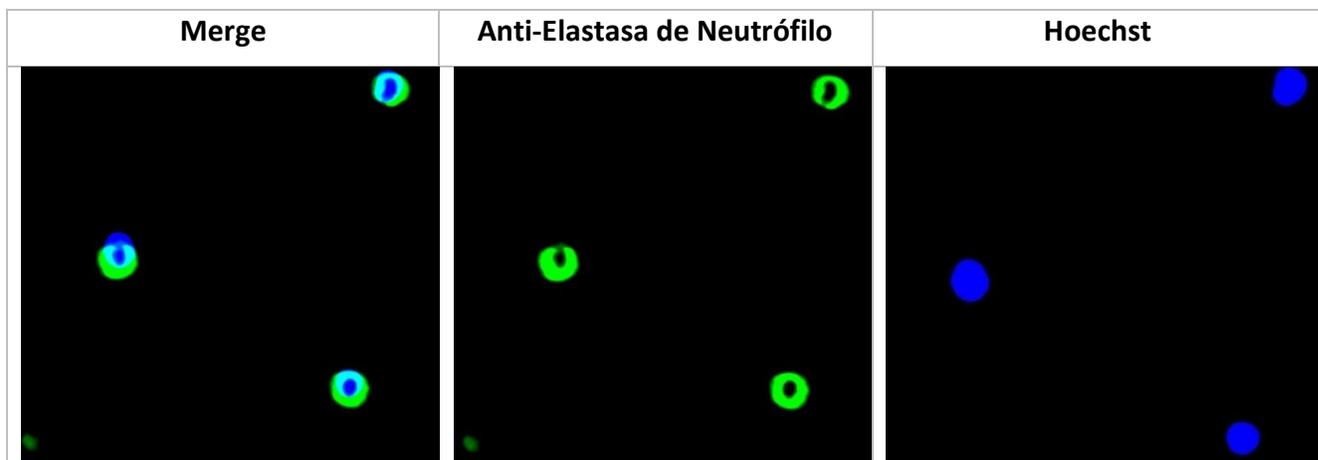


Figura 13.- Inmunofluorescencia de neutrófilos estimulados con *C. glabrata sensu stricto*.

Por último, en neutrófilos estimulados con *C. albicans*, nos dimos cuenta de que existe extrusión del DNA pero en menor medida que el PMA, y así mismo apreciamos como la elastasa se encuentra agrupada con este DNA; es de señalarse que en la inmunofluorescencia se puede observar como las levaduras de *C. albicans* se encuentran contenidas por estas redes consistentes en NETs (figura 14).



Figura 14.- Inmunofluorescencia de neutrófilos estimulados con *C. albicans*.

5.6 Ensayos de inactivación de catalasas fúngicas

Posteriormente, una vez realizados los ensayos de inducción de NETs y caracterizadas estas por inmunofluorescencia, procedimos a evaluar los mecanismos implicados en la inhibición de las NETs; siendo uno de nuestros ensayos la inhibición de la enzima catalasa utilizando aminotriazol, un compuesto químico previamente reportado en la literatura, que se une de manera covalente e irreversible al sitio activo de la enzima. Para ello, incubamos a nuestras cepas ajustadas al 20%T_{600 nm} (3×10^6 UFC/mL) con aminotriazol a una concentración 100 mM por 24H; para finalmente medir la actividad de catalasa con peróxido de hidrogeno 3% y tritón 1%. Como se puede observar en la figura 15 y 16, existe una reducción en la actividad de degradación del peróxido de hidrogeno, tanto en

nuestros controles (*S. aureus* ATCC 25923 y un aislamiento clínico de *P. aeruginosa*), en *C. albicans*, como en las cepas de nuestro complejo *C. glabrata*. Resulta sorprendente como a pesar de que a nuestras cepas se les dio un tratamiento con un inhibidor irreversible de la enzima catalasa; sigue habiendo actividad de descomposición del peróxido de hidrogeno aún y con una cantidad más alta del inhibidor (100 mM), de la reportada en la literatura.

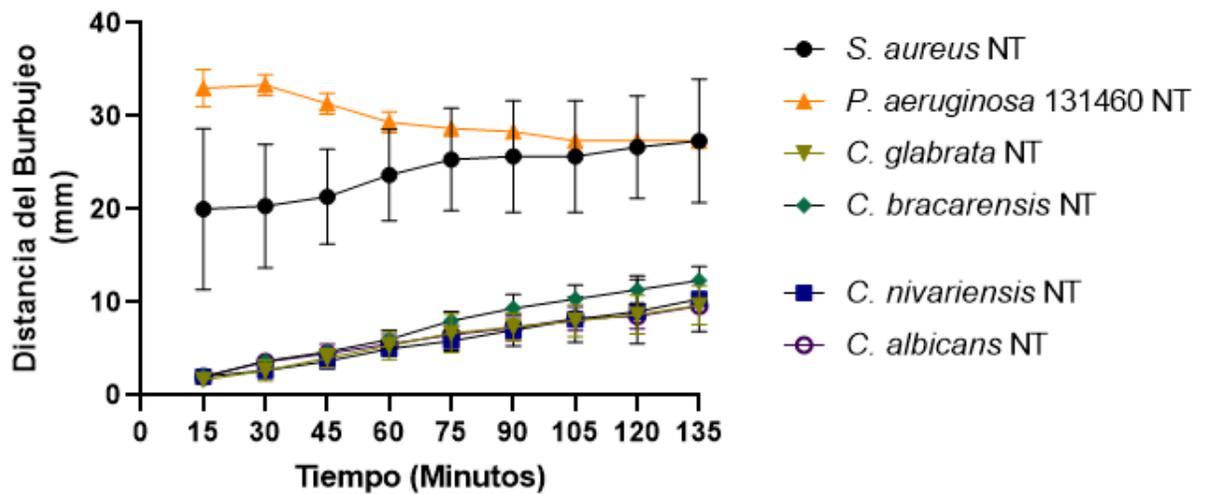


Figura 15.- Cinética de la actividad de descomposición del H₂O₂ 3% en cepas que no fueron tratadas con aminotriazol.

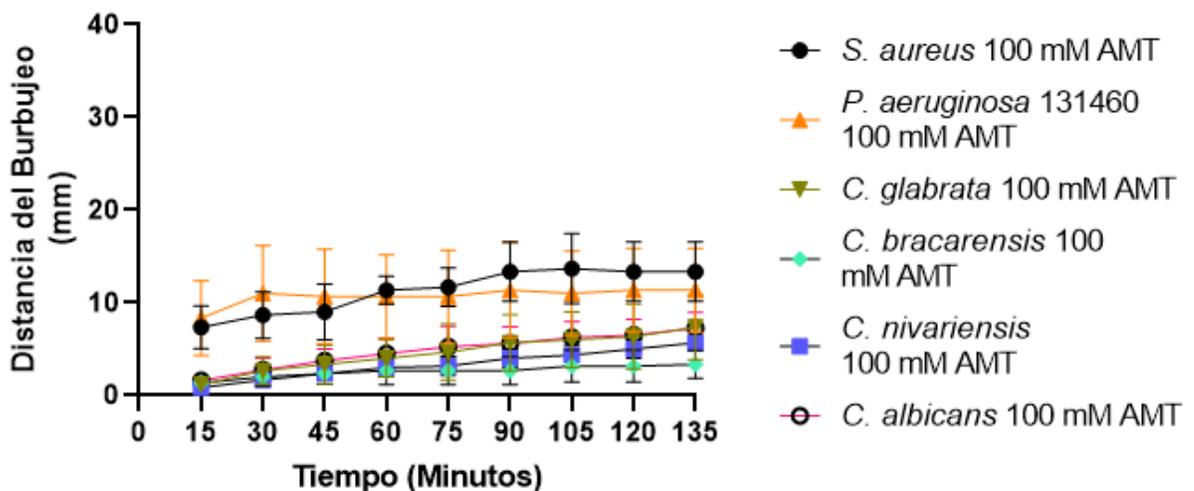


Figura 16.- Cinética de la actividad de descomposición del H₂O₂ 3% en cepas tratadas con AMT 100 mM.

5.7 Degradación de NETs por nucleasas

Un posible mecanismo por el cual no se observa la formación de NETs en las cepas del complejo *Candida glabrata* es por la posible degradación de NETs por nucleasas fúngicas. A pesar de que los ensayos de hidrólisis de DNA en placa no mostraron actividad de nucleasas decidimos realizar un ensayo de degradación de NETs para corroborar la secreción de nucleasas ya que, este último es un método más sensible que permite la detección de bajas cantidades de nucleasas que no es posible con los ensayos en placa de cultivo. Para obtener las nucleasas secretadas al medio por las cepas del complejo *C. glabrata*, primero se crecieron en medio y posteriormente se recuperaron los sobrenadantes de nuestras cepas utilizando discos de filtro de membrana 0.2 μm . Posteriormente, se indujo la producción de NETs químicamente con PMA por 3H, y añadimos los sobrenadantes de las cepas, se incubaron por 15 minutos y se detuvo la actividad de la nucleasa con EDTA disódico 2 mM. Finalmente se determinó la presencia de las NETs con sytox green. El fundamento de este ensayo consiste en que una vez que el DNA extracelular proveniente de las NETs es degradado por una nucleasa fúngica; esta genera fragmentos más pequeños, lo cual va a permitir que más moléculas de sytox se unan a estos fragmentos, debido a que se exponen más sitios de unión al DNA, lo cual se va a observar como un aumento en la intensidad de fluorescencia. Como se puede apreciar en la figura 17, en los neutrófilos estimulados únicamente con PMA; es decir, donde se encuentran las NETs intactas, se observa un porcentaje alto de fluorescencia emitido. Por otra parte, en las NETs a las cuales se le adiciono DNAsa 1U/mL, se puede observar un incremento en la intensidad de fluorescencia, producto de la degradación

de las NETs, siendo este incremento significativo comparado contra las NETs intactas ($P < 0.05$). De manera similar, en las NETs a la cual se les añadió sobrenadantes al 10% de *S. aureus* ATCC 25923 y *C. albicans*, se observa este incremento en la intensidad de fluorescencia debido a la degradación de las NETs, siendo este incremento significativo comparado contra las NETs intactas ($P < 0.05$). Por otro lado, en las NETs tratadas con los sobrenadantes al 10% de las cepas de nuestro complejo *C. glabrata*, se puede observar un comportamiento muy similar en la intensidad de fluorescencia con las NETs intactas, no encontrando diferencias significativas ($P > 0.05$), con lo cual se deduce que las cepas de nuestro complejo *C. glabrata* no llevan a cabo la degradación de las NETs formadas.

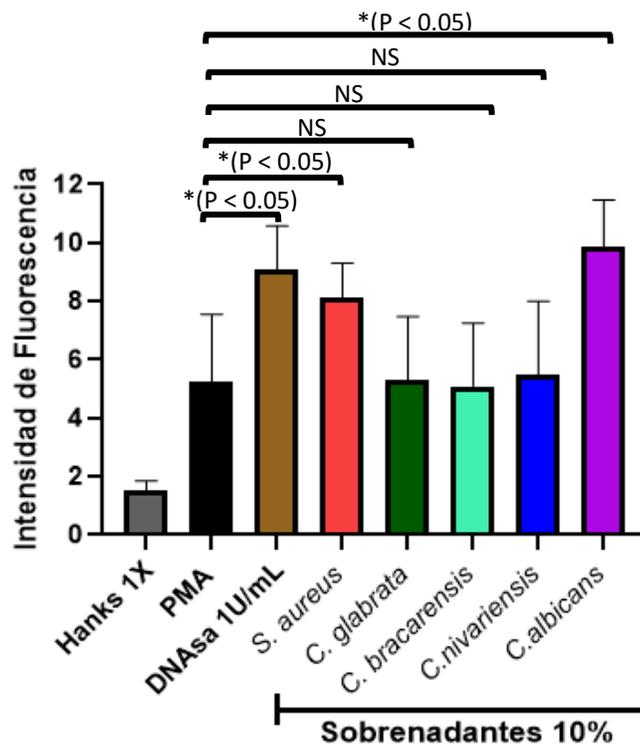


Figura 17.- Degradación de NET por sobrenadantes 10% de las cepas, medidas con sytox green.

5.8 Ensayos de inducción de NETs en biopelículas fúngicas

Finalmente, evaluamos la inducción de NETs en biopelículas fúngicas; para ello, se llevó a cabo la producción de biopelículas como anteriormente se mencionó (punto 4.8), y de igual manera se llevó a cabo la purificación de neutrófilos los cuales se expusieron a estas biopelículas por 3H, realizando la medición a través de un ensayo de sytox green por espectroscopia de fluorescencia. Como se puede observar en la figura 18, solamente observamos liberación de NETs en nuestro control el PMA. Por otro lado, en las biopelículas producidas por nuestra cepa de *C. albicans* no encontramos liberación de estas NETs, siendo esto estadísticamente significativo ($P < 0.05$) cuando lo comparamos frente al PMA. Por su parte, en las biopelículas producidas por nuestro complejo *C. glabrata*, encontramos que no existe liberación de estas NETs, siendo estadísticamente significativo ($P < 0.05$) cuando se compara frente a nuestro control positivo (PMA).

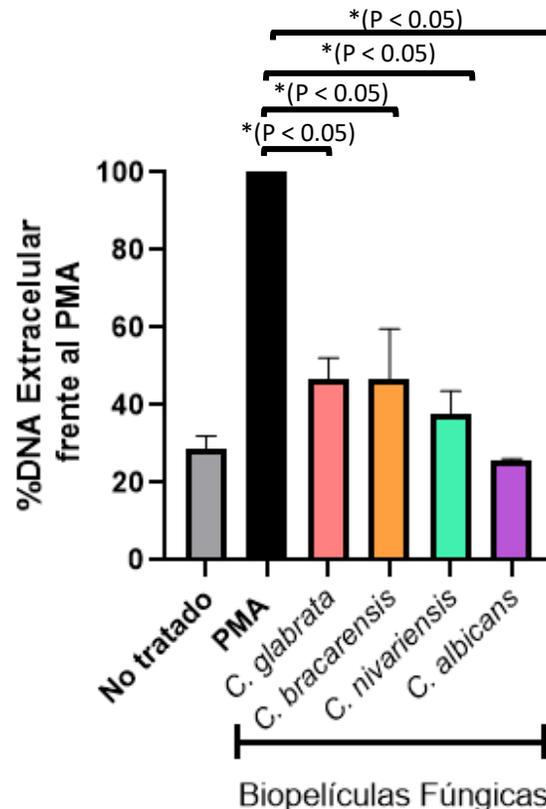


Figura 18.- Inducción de NETs en biopelículas fúngicas medidas a 3H.

De esta manera y para analizar si existe una inhibición parcial o un retraso en la liberación de las NETs, llevamos a cabo una cinética midiendo ahora a diferentes tiempos estas NETs. Como se puede apreciar en la figura 19, obtuvimos liberación de estas NETs en nuestro control positivo el PMA; aunque, por otro lado, en la biopelícula producida por nuestra cepa de *C. albicans* confirmamos que existe una inhibición de las NETs, existiendo diferencia estadísticamente significativa, comparada con nuestro control positivo ($P < 0.05$). Mientras que en las biopelículas producidas por nuestro complejo *C. glabrata* encontramos que existe inducción de NETs, pero en menor medida, comparada con nuestro control positivo (PMA) en donde no existe diferencia significativa ($P > 0.05$), encontrando de esta manera que existe un retraso en la liberación de las NETs, debido a que si extrapolamos estos resultados con nuestro control positivo (el PMA), en cierto punto se alcanzaría la liberación de las NETs.

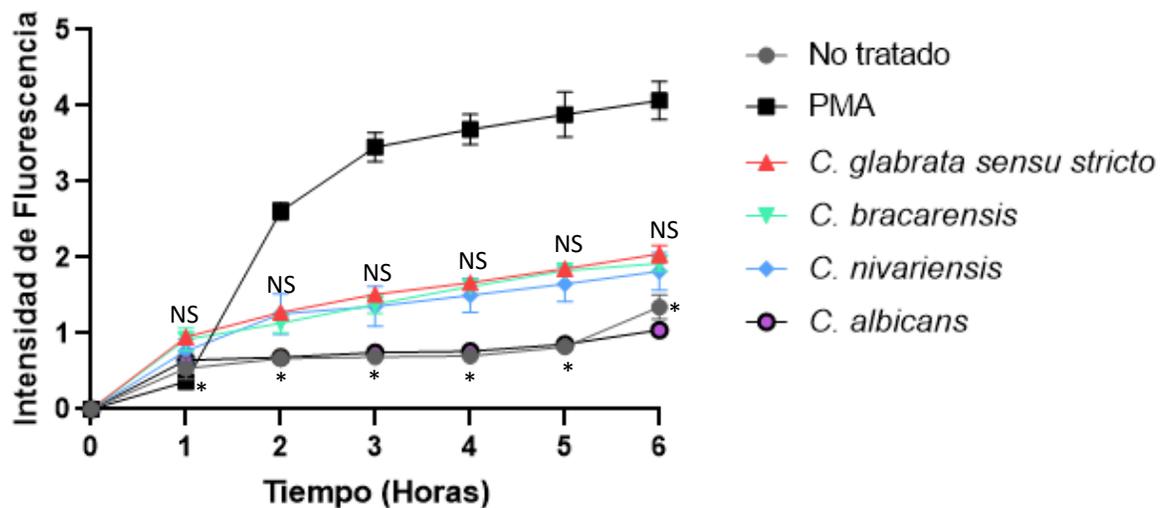


Figura 19.- Cinética de formación de NETs en biopelículas fúngicas.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, las especies del complejo *C. glabrata* han adquirido relevancia clínica siendo actualmente la 2da o 3era causa más común de Candidiasis invasiva después de *C. albicans*. Dado que los neutrófilos son una de las primeras líneas de defensa frente a patógenos fúngicos, es de gran interés conocer la respuesta inmunológica montada por parte de los neutrófilos frente a estas levaduras. Recientemente nuestro grupo de trabajo encontró que las especies de *Candida* tienen capacidades diferentes para inducir la formación de las NETs (**Campos-García et al. 2019**). En ese trabajo se evaluó a las especies del complejo *C. glabrata*, encontrando que la especie de *C. glabrata sensu stricto* no induce la liberación de las NETs; pero es de señalarse, que no se evaluaron los mecanismos implicados en este proceso. Es por ello, que en este trabajo evaluamos algunos de los posibles mecanismos que pudiera estar utilizando *C. glabrata sensu stricto* para inhibir las NETs, utilizando como modelo a las cepas del complejo *Candida glabrata*, las cuales son fenotípicamente indistinguibles, pero muestran características genotípicas heterogéneas.

Hablando acerca de los mecanismos de inhibición, existen reportes en otros microorganismos que la expresión de la enzima catalasa, puede actuar suprimiendo el estallido respiratorio para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales están implicadas en la formación de estas NETs a través de la vía de ROS (**Bekeschus et al. 2016**). Para ello, como primer paso, evaluamos la actividad de catalasa

en las cepas de nuestro complejo *C. glabrata*, encontrando que nuestras 3 especies, expresan actividad de catalasa, siendo esta actividad dependiente del tiempo, ya que se va incrementando de manera logarítmica conforme avanza el tiempo (figura 4). Esto resulta de gran interés, debido a que como se sabe, la catalasa actúa degradando el peróxido de hidrógeno, el cual es un intermediario en la formación de las ROS, las cuales conducen a una vía para la liberación de las NETs (**Fuchs et al. 2007**).

Existen reportes que las cepas de *Candida glabrata*, llevan a cabo la expresión de una sola catalasa (CTA1) la cual se localiza en el citosol y se acumula en los peroxisomas durante su respiración o debido a su inducción en el interior de células fagocíticas, permitiéndole su sobrevivencia. **Cuellar-Cruz et al. 2008** previamente encontraron que *C. glabrata* induce la expresión de la catalasa, la cual le permite adaptarse a altas concentraciones de peróxido de hidrogeno, siendo esta respuesta adaptativa dependiente de YAP1 y de Skn7p y parcialmente dependiente de Msn2p y Msn4p, los cuales son factores de transcripción en respuesta al estrés oxidativo [37]. De igual manera, en este estudio encontraron que esta catalasa de *C. glabrata* es requerida para la resistencia al peróxido de hidrogeno *in vitro*; sin embargo, no es necesaria para su virulencia en el modelo *in vivo*. En otro estudio realizado por **Roetzer et al. 2010**, encontraron que la expresión de la catalasa es regulada por el estrés oxidativo y por el estrés de la fuente de carbono, expresándose hasta 10 veces más; encontrando además que las células de *C. glabrata* cuando son fagocitadas inducen la expresión de esta enzima, siendo esta localizada en el citoplasma y en los peroxisomas [102]. Otro estudio realizado por **Figueiredo-Carvalho et al. 2017**, menciona que aislamientos clínicos de *C.*

glabrata, son buenos productores de catalasa; sin embargo, no existe correlación entre la actividad de esta enzima con la susceptibilidad antifúngica evaluada [103]. Por otro lado, ya se ha documentado la expresión de catalasa en otros organismos fúngicos, como es el caso de *C. albicans* (**Rubin- Bejerano et al. 2003; Enjalbert et al. 2007**); donde esta juega un papel en la resistencia al estrés oxidativo, previniendo la muerte mediada por ROS en los neutrófilos; aunque de forma muy similar con *C. glabrata*, la interrupción de esta enzima no parece atenuar la virulencia en un modelo murino (**Pradhan et al. 2017**); de manera interesante se ha visto que el peróxido de hidrogeno puede promover la transición morfológica de levadura a hifa (**Nakagawa et al. 2008 ; Nasution et al. 2008**). Por otro lado, en *Aspergillus fumigatus*, un hongo filamentoso, se ha reportado la presencia de 3 catalasas, una catalasa conidial y 2 catalasas miceliales; encontrando que estas 2 ultimas, protegen temporalmente al hongo del estallido respiratorio de acuerdo con el modelo experimental de aspergilosis invasiva (**Paris et al. 2003**). De igual forma, en *Cryptococcus neoformans*, se ha reportado la presencia de 4 catalasas (CAT1, CAT2, CAT3, CAT4); siendo únicamente la CAT1 la que muestra actividad *in vitro*, y de acuerdo con cepas mutantes para estas catalasas, estas no exhiben fenotipos de estrés oxidativo; y tampoco están asociadas a la virulencia de acuerdo con el modelo murino experimental de criptococosis (**Giles et al. 2006**).

Otro posible mecanismo implicado en evadir las NETs es la secreción de nucleasas, enzimas encargadas de la ruptura de enlaces fosfodiéster sobre cadenas de ácidos nucleicos; las cuales le confieren la habilidad de escapar del atrapamiento por las NETs a ciertos microorganismos (**Thammavongsa et al. 2013, Doke et al. 2017, Beiter et al.**

2006, Buchanan et al. 2006, Zhang et al. 2017). Para ello, en este trabajo evaluamos la expresión de nucleasas en las cepas del complejo *C. glabrata* usadas en nuestros experimentos, a través de ensayos de hidrólisis del sustrato en placa; encontrando que ninguna de ellas lleva a cabo la expresión de dicha enzima. Para descartar otro posible factor de virulencia implicado en la inhibición de estas NETs en las cepas que utilizamos del complejo *C. glabrata*; se evaluó la producción de otras enzimas hidrolíticas como: hemolisinas, fosfolipasas, aspartil-proteasas y esterases; encontrando que las cepas usadas son muy fuertemente productoras de hemolisinas y fosfolipasas, son fuertemente productoras de proteasas, y no son productoras de esterases. Dado que no existen diferencias en la expresión de estas últimas 4 enzimas hidrolíticas (hemolisinas, fosfolipasas, proteasas y esterases), y debido a que no existen reportes aun, no podemos relacionar a una de estas enzimas en particular con la posible inhibición de las NETs. En comparación, en un estudio realizado por **Figueiredo-Carvalho et al. 2017** encontró que en 91 aislamientos de *C. glabrata* estos fueron productores de hemolisinas (98.9%), proteasas (95.6%) y esterases (56%); y que estos no mostraron actividad de fosfolipasa. Mientras tanto, **Treviño-Rangel et al. 2019** recientemente encontró que en 107 aislamientos clínicos de *C. glabrata sensu stricto*, estos mostraron actividad de aspartil-proteasa (100%), fosfolipasas (78.5%), esterasa (12.1%), y de hemolisinas (95.3%); y ninguna cepa mostro actividad de nucleasa. De igual manera, **Deorukhkar et al. 2014** encontró que de 93 aislamientos clínicos de *C. glabrata*, estos fueron productores de aspartil-proteasas (60.2%), fosfolipasas (65.5%) y hemolisinas (66.6%). De forma similar, **Atalay et al. 2015** encontró que de 14 aislamientos clínicos de *C. glabrata*, estas

mostraron actividad de aspartil-proteasas (28.5%), fosfolipasa (35.7%) y de esterasa (7.1%). Por otro lado, hasta ahora no existen reportes de que especies de *C. glabrata* produzcan nucleasas; concordando hasta ahora nuestros resultados con otros autores, como es el caso de **Melo-Riceto et al. 2015** en donde partiendo de 5 aislamientos clínicos de *C. glabrata* encontró que estas no llevan a cabo la producción de nucleasas. Por su parte, si se ha encontrado actividad de nucleasas en otros organismos fúngicos, tal y como lo documentan **Zhang et al. 2017**, donde previamente encontraron que el hongo oportunista *C. albicans* lleva a cabo la secreción de una nucleasa que le confiere un rol para escapar de las NETs; a diferencia de nuestra cepa de *C. albicans* que de acuerdo con estos ensayos de hidrólisis en placa no mostro actividad de nucleasa. De manera similar, **Menezes et al. 2016** encontró que a partir de 75 aislamientos clínicos de *C. albicans* de pacientes VIH positivos, estas mostraban actividad de nucleasa (32%), mientras que en 41 aislamientos clínicos de *C. albicans* de pacientes VIH negativos, en estos también se observaba actividad de nucleasa (12.2%). Por otra parte, también se ha observado que otros organismos fúngicos producen nucleasas; tal y como lo mencionan **Sanchez et al. 2010**, donde encontraron actividad de nucleasa en 73 cepas de *C. neoformans* y en 12 cepas de *C. gattii*.

Por otro lado, las biopelículas fúngicas, se han definido como comunidades biológicas de células unidas entre sí, embebidas sobre una matriz extracelular la cual es producida por ellas mismas; teniendo 2 funciones principales: la de actuar como una barrera frente agentes antifúngicos; o bien, la de resistir al ataque por parte de las células del sistema inmune innato. De esta manera, se han descrito como un mecanismo que modifica la

liberación de las NETs, de igual manera a lo reportado en las biopelículas de *C. albicans* y en la producción de una matriz extracelular por *A. fumigatus* (**Johnson et al. 2016, Kernien et al. 2017, Lee et al. 2015, Kernien et al. 2018, Urban C. & Nett J. 2019**).

Para ello en este trabajo, por un lado, se evaluó la producción de biopelículas por medio de la tinción de cristal violeta, ensayos de MTT para la medición de la actividad metabólica, y ensayos de azul alamar, para la evaluación de la viabilidad celular; encontrando de esta manera que nuestra cepa control *C. albicans* muestra una fuerte producción de biopelícula, siendo las células que conforman esta biopelícula metabólicamente activas, además de ser viables. Por su parte, en las cepas de *C. glabrata* usadas en este trabajo, encontramos que tienden a formar menos biopelículas comparada con *C. albicans*; y de igual manera las levaduras de nuestro complejo muestran una actividad metabólica reducida comparada con *C. albicans*; sin embargo, poseen viabilidades similares o inclusive mayores que *C. albicans*, descartando con ello que este metabolismo reducido se debiera a una muerte de las levaduras que se encuentran conformando la biopelícula. Nuestros resultados difieren un poco a lo reportado por otros autores, ya que **Guembe et al. 2016** encontró que en 39 aislamientos clínicos de *C. glabrata* estas fueron productoras de biopelícula baja (92.3%) y moderada (7.7%), de acuerdo con ensayos de cristal violeta. De forma similar, **Rodriguez et al. 2018** encontró una baja producción de biopelícula en una cepa *C. glabrata* ATCC 2001, mientras que en una cepa mutante para manosiltransferasas (*C. glabrata* Δ MNN2) observaron una mayor producción de biopelícula, de acuerdo con ensayos de inmunofluorescencia y de cristal violeta. También, otro estudio realizado por

Pathak et al. 2012 encontró una baja producción de biopelícula en 4 aislamientos clínicos de *C. glabrata*, con base en ensayos de cristal violeta. Por otro lado, en un estudio realizado por **Marak M. & Dhanashree B. 2018** previamente encontraron que en 3 especies de *C. glabrata* aisladas, estas no mostraron producción de biopelícula, acorde con ensayos de cristal violeta. Comparando nuestros resultados del análisis de la actividad metabólica por el ensayo de reducción de MTT, **Johnson et al. 2017** encontraron que diferentes cepas de *C. glabrata* muestran una actividad metabólica alta, la cual correlaciona con la formación de biopelícula, utilizando a diferencia de nosotros ensayos de reducción de XTT. Por otro lado, **Chew et al. 2019**, encontró que el metabolismo en las biopelículas de *C. glabrata* dependía de la fuente de carbono siendo alto cuando la fuente de carbono se compone de glucosa o glicerol, y siendo moderado cuando este se compone de acetato, lactato, etanol u ácido oleico; encontrando de igual manera, que hay una reducción en la producción de biopelícula en una mutante para una enzima del ciclo del glioxilato (*C. glabrata* Δ ICL1) utilizando como fuente de carbono acetato, lactato, etanol y ácido oleico. La posible diferencia de nuestros resultados con lo reportado anteriormente se puede deber a que se utilizaron condiciones diferentes a las nuestras para los ensayos de producción de biopelículas.

Se ha reportado que diversos patógenos inducen la liberación de las NETs, siendo esta una respuesta clave, ya que tiene la capacidad de inmovilizar y eliminar a una amplia gama de microbios (bacterias, hongos, protozoarios y virus), previniendo con ello la capacidad de diseminación de estos patógenos (**Yang et al. 2016**). Por ello, en este estudio se evaluó la interacción del neutrófilo, a través de la formación de las NETs en

cepas planctónicas del complejo *C. glabrata*, encontrando que a inóculos altos (1×10^7 UFC/mL) existe una ligera inducción de estas; sin embargo, estas tienen la capacidad de ser suprimidas o retrasadas comparadas con nuestro control positivo el PMA. Por otro lado, cuando evaluamos esta formación de NETs en las cepas de nuestro complejo, pero ahora utilizando un inóculo bajo (1×10^5 UFC/mL), encontramos que no existe liberación del DNA, de acuerdo con nuestros ensayos de sytox green. Por su parte en nuestra cepa de referencia *C. albicans*, encontramos resultados muy similares, observando que, a inóculos altos existe una menor liberación de las NETs, comparada con nuestro control positivo, pero a un inóculo bajo, no existe liberación de las NETs. Cabe señalar que el posible mecanismo implicado en la inhibición o retraso de las NETs de este trabajo es la actividad de la enzima catalasa. Por otro lado, una limitante de este estudio es que no se evaluó la viabilidad celular en las cepas de nuestro complejo, después de la interacción con los neutrófilos. Un estudio similar, realizado por **Johnson et al. 2017** recientemente encontró que cepas planctónicas de *C. glabrata* llevan a cabo la liberación de las NETs, en menor medida que su control positivo el PMA, y que cuando incrementan las concentraciones de *C. glabrata* se elevan los niveles de DNA extracelular. En este estudio, observaron que *C. glabrata* induce la liberación del DNA extracelular de forma más rápida (1H), independiente de ROS, comparado frente al PMA, el cual induce de manera más tardía la liberación del DNA extracelular de manera ROS dependiente. De igual forma en este estudio, se encontró que la formación de las NETs en cepas planctónicas de *C. glabrata* es en parte dependiente de ROS, ya que la inhibición farmacológica de la NADPH oxidasa perjudica parcialmente la liberación de las NETs;

encontrando, que existen otras vías para la formación de estas, siendo una de ellas, a través de procesos de fagocitosis, ya que cuando tratan a los neutrófilos con citocalasina D (un inhibidor de la fagocitosis) observan que hay un bloqueo casi completo en la liberación de las NETs.

En este trabajo caracterizamos la formación de las NETs, mediante el marcaje de la elastasa a través de ensayos de inmunofluorescencia. La elastasa es una serin proteasa exclusiva de los neutrófilos que, en la formación de las NETs tiene la capacidad de migrar hacia el núcleo, donde actúa degradando las histonas, favoreciendo este proceso la descondensación de la cromatina; y también se puede observar en conjunto con el DNA extracelular; siendo de esta forma un sello distintivo para la caracterización de las NETs. En neutrófilos no estimulados observamos que el DNA permanece dentro del núcleo, mientras que la elastasa permanece localizada dentro de los gránulos, no existiendo migración. Por otro lado, en neutrófilos estimulados con PMA, un inductor de las NETs-ROS dependientes, observamos que existe un desempaquetamiento de la cromatina y la elastasa de neutrófilo se encuentra en conjunto con esta cromatina descondensada, confirmando con ello la liberación de las NETs. Por su parte, en neutrófilos estimulados con nuestra cepa de *C. glabrata sensu stricto*, encontramos que no existe descondensación de la cromatina, permaneciendo está en el núcleo, y de igual manera, encontramos que la elastasa permanece dentro de los gránulos, no existiendo liberación de las NETs. Por otro lado, en nuestra cepa control (*C. albicans*) encontramos que existe descondensación de la cromatina, en menor proporción que el PMA, y de igual forma observamos como la elastasa de neutrófilo se encuentra en conjunto con esta cromatina

descondensada, además de que se puede observar como las levaduras están siendo contenidas por estas trampas extracelulares.

Es de señalar, que las cepas del complejo *C. glabrata* difieran de otras especies de *Candida*; siendo células de menor tamaño (1-4 μm), además de que no presentan formas filamentosas. De igual manera, ya se ha descrito que los componentes de la pared celular de *C. glabrata*, específicamente los β -glucanos median el reconocimiento en los neutrófilos a través del receptor de Dectin-1, siendo este receptor el que le confiere mayor sensibilidad al huésped para detectar infecciones sistémicas por este hongo levaduriforme (Chen *et al.* 2017). Branzk *et al.* 2014, encontraron que los neutrófilos pueden sensar de manera selectiva el tamaño de los microorganismos, como sucede en respuesta a las hifas de *C. albicans* las cuales al ser estructuras grandes (> 9 μm) , estas son reconocidas a través del receptor de Dectin-2 y llevan a cabo la liberación de las NETs; mientras que en microorganismos pequeños (como pudiera ser el caso de *C. glabrata*), estos son reconocidos a través del receptor de Dectin-1 predominando respuestas de fagocitosis e inhibiendo con ello la NETosis. Siendo una limitante de este trabajo, que no evaluamos si las cepas de nuestro complejo *C. glabrata* están siendo eliminadas a través de procesos de fagocitosis; o bien, están inhibiendo la maduración del fagosoma.

En este trabajo, de igual forma se evaluaron los mecanismos implicados en la inhibición de las NETs. Como sabemos, la importancia de las ROS en la defensa frente a patógenos es crucial, tal y como se puede ver en los pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica, los cuales se caracterizan por presentar mutaciones en los genes de la NADPH

oxidasa en los neutrófilos, teniendo con ello una actividad antimicrobiana disminuida y siendo incapaces de formar NETs; padeciendo de esta manera infecciones recurrentes; siendo la terapia génica la encargada de restablecer la formación de estas NETs obteniendo con ello resultados favorables en la eliminación de *A. nidulans* en estos pacientes (**Bianchi *et al.* 2009**). Ahora bien, dado que encontramos actividad de la enzima catalasa en las cepas de nuestro complejo, uno de nuestros ensayos se enfocó en evaluar el papel de esta enzima en la liberación de las NETs-ROS dependientes. Para ello, utilizando el aminotriazol (AMT), un inhibidor irreversible de la catalasa, que se une de manera covalente al centro activo de la enzima; probamos la capacidad que tenía de inhibir a la enzima, exponiéndolo a nuestras cepas, y evaluando con ello la actividad a través de la degradación del peróxido de hidrógeno. Con esto obtuvimos que a pesar de que nuestras cepas fueron tratadas overnight con el inhibidor, cuando medíamos la actividad, seguía existiendo degradación del peróxido de hidrógeno, pero en menor medida. Esto se puede deber a que en *C. glabrata* la catalasa no es el único mecanismo que tiene para suprimir el estallido respiratorio. Se sabe que *C. glabrata* expresa 2 superóxido dismutasas (SOD1 y SOD2), las cuales se inducen en ausencia de glucosa, siendo SOD1 la que convierte el ion superóxido en peróxido de hidrógeno, pero sin embargo no responden a este. También se sabe que *C. glabrata* expresa un sistema de glutatión (GSH1 y GSH2) el cual le permite detoxificar ROS (incluyendo el peróxido de hidrógeno) u otros xenobióticos. Por otra parte, se ha visto que el sistema citoplasmático de tiorredoxina (TRX2 y TSA1) juega un papel menor en la adaptación al peróxido de hidrógeno; sin embargo, en conjunto estos 3 sistemas (GSH, tiorredoxina y catalasa)

podrían complementarse para resistir frente al estrés oxidativo (**Briones-Martin-Del-Campo et al. 2014, Roetzer et al. 2011, Holmgren et al. 2005**). Por otro lado, **Brunke et al. 2010** documentaron la presencia de un pigmento derivado de la degradación del triptófano a través de la vía de Ehrlich en *C. glabrata* el cual es impulsado por una aminotransferasa aromática (Aro8), lo cual le confiere una resistencia incrementada al peróxido de hidrogeno y con ello una mayor supervivencia al ataque por parte de los neutrófilos humanos. En conjunto todos estos mecanismos podrían estar implicados en la supresión de la liberación de las NETs a inóculos altos, o bien en la inhibición de las NETs a inóculos bajos en las cepas de nuestro complejo; todo esto, a pesar de que existe la secreción de otros factores de virulencia que promueven la formación de las NETs; tal y como se ha documentado en las proteasas aspárticas secretadas por el hongo *C. albicans*, las cuales activan la liberación de las NETs a través de mecanismos dependientes e independientes de ROS (**Zawrotniak et al. 2017**); o bien, a través de la producción de fosfolipasas, a las cuales se les ha asociado con este proceso de liberación de las NETs (**Campos-Garcia et al. 2019**). Por otro lado, el proceso de liberación de NETs rápida en organismos fúngicos como en *C. albicans* se ha asociado a la presencia agregados y a componentes fúngicos tal como los β -glucanos los cuales son reconocidos a través del receptor del complemento 3, proceso que no requiere de la participación de ROS (**Byrd et al. 2015**); siendo esto lo que podría explicar el proceso de liberación de NETs en las cepas del complejo *C. glabrata* a un inóculo alto; proceso donde no se observa un incremento. Una de las perspectivas de este trabajo, consiste en la medición

de la formación de las NETs en las cepas de nuestro complejo *C. glabrata* tratadas con AMT; o bien, la determinación de ROS en los neutrófilos.

En este trabajo también se evaluó el papel de las nucleasas como un posible mecanismo de evasión de las NETs por las cepas de nuestro complejo *C. glabrata*. Dado que no encontramos actividad de nucleasas en nuestras cepas de acuerdo con los ensayos de hidrolisis del sustrato en placa; quisimos corroborar estos resultados con un ensayo más sensible como lo es evaluando la degradación de las NETs preinducidas químicamente con PMA, y utilizando espectroscopia de fluorescencia a través de un ensayo de sytox green. De esta manera, se observó que únicamente en nuestro control positivo la nucleasa, los sobrenadantes de *S. aureus* y de *C. albicans* llevaron a cabo la degradación de estas NETs, no observándose este fenómeno en las cepas de nuestro complejo *C. glabrata*. Hasta la fecha, no existen reportes de que las cepas del complejo *C. glabrata* secreten nucleasas como mecanismo para escapar del ataque mediado por las NET. Solamente se han descrito en otros organismos fúngicos, tal y como lo documentan **Zhang et al. 2017** quienes demuestran que *C. albicans* lleva a cabo la secreción de una nucleasa la cual le permite escapar de estas NET, utilizando a diferencia de nosotros un ensayo de inmunodifusión radial. De manera similar, se ha descrito que otros microorganismos tales como *P. intermedia*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* llevan a cabo la secreción de nucleasas las cuales actúan degradando las NETs previamente formadas, para escapar de la captura y eliminación promovida por estas estructuras (**Doke et al. 2017, Beiter et al. 2006, Buchanan et al. 2006**). Por su parte, se ha descrito que *S. aureus* lleva a cabo la secreción de una nucleasa la cual le permite degradar estas NETs

formadas, para posteriormente transformarlas en desoxiadenosina, un componente que promueve la citotoxicidad en macrófagos (**Berends et al. 2010, Thammavongsa et al. 2013**).

Por último, en este trabajo encontramos que las biopelículas del complejo *C. glabrata* inducen la liberación de las NETs, pero en menor proporción que el PMA; esto fue corroborado, al realizar una cinética midiendo a diferentes tiempos estas trampas, encontramos que las biopelículas de nuestro complejo *C. glabrata* retrasan la liberación de las NETs, ya que las están induciendo de manera más lenta que nuestro control el PMA. Esto resulta interesante ya que se podría decir que esta inducción lenta podría ser un mecanismo de evasión utilizado por las cepas de nuestro complejo *C. glabrata*, para resistir la muerte mediada por los neutrófilos como anteriormente se ha descrito para las biopelículas producidas por otras especies de *Candida* (**Katragkou et al. 2010; Xie et al. 2012; Johnson et al. 2016**). Nuestros resultados son muy similares a los publicados por **Johnson et al. 2017**, quienes describieron que las biopelículas de *C. glabrata* inducen la liberación retrasada de las NETs, como mecanismo de supervivencia para resistir la muerte de los neutrófilos; siendo este mecanismo de inducción, independiente de una vía de ROS, pero dependiente de la fagocitosis.

De igual manera, ya se ha descrito que las biopelículas de *C. albicans* inhiben la formación de las NETs, a través del contacto-dependiente y de una estructura intacta de la biopelícula, estando este fenómeno asociado a la supresión en la producción de ROS; siendo un complejo de manano-glucano el principal componente de la matrix extracelular de la biopelícula el relacionado con la inhibición, además de que contribuye

con la virulencia en vivo (**Johnson *et al.* 2016; Kernien *et al.* 2017**). Sin embargo, se desconoce si existe una producción de polisacáridos similares al complejo manano-glucano en las biopelículas de *C. glabrata* relacionados con esta liberación de las NETs retardadas.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

- Las cepas del complejo *C. glabrata* expresan actividad de catalasa, la cual es dependiente del tiempo.
- Las cepas del complejo *C. glabrata* muestran actividad de hemolisinas, fosfolipasas, y proteasas, pero no de esterases y nucleasas.
- Las cepas del complejo *C. glabrata* llevan a cabo la producción de biopelículas, mostrando una actividad metabólica reducida y altos niveles de viabilidad celular.
- Se encontró que las cepas del complejo *C. glabrata* durante su forma planctónica llevan a cabo la inducción de NETs a inóculos altos, pero no a inóculos bajos.
- Se caracterizaron a las NETs a través del marcaje de la elastasa por inmunofluorescencia.
- Se observó que las cepas del complejo *C. glabrata* muestran actividad de detoxificación del peróxido de hidrogeno aun en presencia de un inhibidor de catalasa.
- No se observó degradación de las NETs por las cepas del complejo *C. glabrata*.
- Las biopelículas producidas por el complejo *C. glabrata* llevan a cabo la liberación retardada de las NETs.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

- Evaluar la producción de superóxidos dismutasas y de sistemas de reducción (glutación y tioredoxina), como otros mecanismos implicados en la detoxificación de ROS y en la inhibición de las NETs por las cepas del complejo *C. glabrata*.
- Evaluar la producción de ROS en los neutrófilos expuestos a las cepas del complejo *C. glabrata*.
- Evaluar el porcentaje de muerte mediada por los neutrófilos en las cepas del complejo *C. glabrata*.
- Evaluar las vías de liberación retardada de las NETs en las biopelículas producidas por el complejo *C. glabrata* (dependientes o independientes de ROS).
- Caracterizar la formación de las NETs en las biopelículas del complejo *C. glabrata* a través del marcaje de la elastasa mediante ensayos de inmunofluorescencia.
- Analizar la presencia de complejos manano-glucano en las biopelículas producidas por el complejo *C. glabrata* como principales componentes relacionados con la liberación retardada de las NETs.
- Evaluar la virulencia y la respuesta del neutrófilo en las biopelículas del complejo *C. glabrata in vivo*.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz, J. Alexandro. (2015). *Micología Médica Básica*. [Internet]. 5ta Ed. McGraw-Hill; México, D.F. ISBN: 978-607-15-1270-3
2. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3(4), 57.
3. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS (2013). Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*; 62:10–24.
4. Lazo, Víctor, Hernández, Gina, & Méndez, Rafael. (2018). Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(1), 75-85
5. Centro nacional de excelencia tecnológica en salud. (2012). Diagnóstico y tratamiento de candidiasis invasiva en el adulto. México. *Catalogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-562-12*.
6. Yapar N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and clinical risk management*, 10, 95–105.
7. McCarty TP, Pappas PG (2016). Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 30, 103-124
8. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39 (3): 309-17
9. Oscar Marchetti, Jacques Bille, Ursula Fluckiger, Philippe Eggimann, Christian Ruef, Jorge Garbino, Thierry Calandra, Michel-Pierre Glauser, Martin George Täuber, Didier Pittet, Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS) (2004). Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 38, Issue 3, Pages 311–320,
10. Bassetti, M., Merelli, M., Righi, E., Diaz-Martin, A., Rosello, E. M., Luzzati, R., ... Tumbarello, M. (2013). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *Journal of clinical microbiology*, 51(12), 4167–4172
11. Chen, S., Slavin, M., Nguyen, Q., Marriott, D., Playford, E. G., Ellis, D., ... Australian Candidemia Study (2006). Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerging infectious diseases*, 12(10), 1508–1516.

12. Cortés J, Jaimes J, Leal A. (2013). Incidence and prevalence of candidemia in critically ill patients in Colombia. *Rev Chilena Infectol*; 30 (6):599-604
13. Corzo-León DE, Armstrong-James D, Denning DW (2015). Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses* 58(5): 34-44.
14. Pineda-Díaz, J, Gómez-Meraz, Y, Xoconostle-Cázares, B, & García-Mena, J. (2017). Detección de *Candida glabrata* en mujeres mexicanas sanas y con candidiasis vulvovaginal recurrente. *Ginecología y obstetricia de México*, 85(2), 71-79.
15. Ryan, K. J.; Ray, C.G. (2010). Sherris Medical Microbiology. NY, EUA. 5ta Ed. McGraw Hill. ISBN: 978-0-07-160402-4 [Citado el día 24 de junio del 2019]
16. Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128.
17. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*;48(6):365– 77
18. Calderone RA, Fonzi WA. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 327-35
19. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-28
20. Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez C. (2009). Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 505-12
21. Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-43
22. Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. (2006). *Candida bracarenensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56(Pt 1):313
23. Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Perez-Roth E, del Pilar Arevalo M. (2005). Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol*. 43(8):4107–11.
24. Rodrigues, C.F., Silva,S. & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 33: 673-688
25. Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., Silva, S., & Henriques, M. (2017). *Candida glabrata* Biofilms: How Far Have We Come?. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3(1), 11.

26. Nash, E. E., Peters, B. M., Lilly, E. A., Noverr, M. C., & Fidel, P. L., Jr (2016). A Murine Model of *Candida glabrata* Vaginitis Shows No Evidence of an Inflammatory Immunopathogenic Response. *PLoS one*, 11(1), e0147969.
27. Paul L. Fidel, Jessica L. Cutright, Larry Tait, Jack D. Sobel, A Murine Model of *Candida glabrata* Vaginitis, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 173, Issue 2, February 1996, Pages 425–431,
28. Timmermans, B.; De Las Peñas, A.; Castaño, I.; Van Dijck, P. (2018). Adhesins in *Candida glabrata*. *J. Fungi*. 4, 60.
29. de Groot, P. W., Kraneveld, E. A., Yin, Q. Y., Dekker, H. L., Gross, U., Crielaard, W., ... Weig, M. (2008). The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryotic cell*, 7(11), 1951–1964.
30. Kraneveld, E.A., de Soet, J.J., Deng, D.M. et al. (2011). Identification and differential gene expresión of adhesin-like wall proteins in *Candida glabrata* biofilms. *Mycopathologia*. 172: 415.
31. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-28
32. Remold H, Fasold H, Staib F. 1968. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 167: 399-406
33. White TC, Agabian, N. 1995. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *Journal of Bacteriology*, 177: 5215–5221
34. Rasheed, M., Battu, A., & Kaur, R. (2018). Aspartyl proteases in *Candida glabrata* are required for suppression of the host innate immune response. *The Journal of biological chemistry*, 293(17), 6410–6433.
35. Bairwa G., Rasheed M., Taigwal R., Sahoo R., and Kaur R. (2014) GPI (glycosylphosphatidylinositol)-linked aspartyl proteases regulate vacuole homeostasis in *Candida glabrata*. *Biochem. J.* 458, 323–334
36. Luo G, Samaranayake LP, Cheung BP, Tang G (2004) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production. *APMIS* 112:283–290
37. Cuellar-Cruz M.; Briones-Martin-Del-Campo M.; Cañas-Villamar I.; Montalvo-arredondo J.; Riego-Ruiz L.; Castaño I.; De Las Peñas, A. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Ctap1, and is controlled by the transcription factors Yap1, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot cell* 7(5):814-25.
38. Cavalheiro M and Cacho-Teixeira M (2018). *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*. Vol. 5: Art. 28

39. Kasper, L.; Seider, K. and Hube B. (2015). Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Research*, Vol 15 (5).
40. Nandan-Rai, M. *et al* (2012). Functional genomic analysis of *Candida glabrata*-macrophage interaction: role of chromatin remodeling in virulence. *PLoS Pathogens*. 8 (8): e1002863.
41. Chen, S. M., Shen, H., Zhang, T., Huang, X., Liu, X. Q., Guo, S. Y., ... An, M. M. (2017). Dectin-1 plays an important role in host defense against systemic *Candida glabrata* infection. *Virulence*, 8(8), 1643–1656. doi:10.1080/21505594.2017.1346756
42. Ifrim DC, Bain JM, Reid DM, et al. Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. *Infect Immun*. 2014; 82:1064–73
43. Seider, K. et al (2011). The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *J Immunol*. 187(6):3072-86.
44. Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 25; 11(8):519-531
45. Amulic B1, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459-89.
46. Papayannopoulos, V., and A. Zychlinsky. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 30: 513-521.
47. Rosales C. (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?. *Frontiers in physiology*, 9, 113. doi:10.3389/fphys.2018.0011
48. Li, R., & Tablin, F. (2018). A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Frontiers in veterinary science*, 5, 291. doi:10.3389/fvets.2018.00291
49. Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual review of pathology*, 9, 181–218. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
50. Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14), 1299–1306. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.014
51. Segal A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology*, 23, 197–223. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653
52. Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2011). Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends in immunology*, 32(8), 350–357. doi:10.1016/j.it.2011.04.009
53. Hayashi F. et al. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*; 102: 2660-2669

54. Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Juarez-Cepeda, J., Gutierrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2014). The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), 67–71. doi:10.1016/j.riam.2013.09.012
55. Brunke S, Seider K, Almeida RS, Heyken A, Fleck CB, Brock M, et al. (2010). *Candida glabrata* tryptophan-based pigment production via the Ehrlich pathway. *Mol Microbiol*; 76:25–47
56. Lacy P. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 2(3), 98–108. doi:10.1186/1710-1492-2-3-98
57. Borregaard N, Cowland JB. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 89:3503–21.
58. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood*. 1994; 83:1640–9.
59. Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev*. 2003; 83:581–632.
60. Gutkind JS, Robbins KC. Translocation of the FGR protein-tyrosine kinase as a consequence of neutrophil activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:8783–7.
61. Kaldi K, Szeberenyi J, Rada BK. Contribution of phospholipase D and a brefeldin A-sensitive ARF to chemoattractant-induced superoxide production and secretion of human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2002; 71:695–700
62. Mohn H, Le Cabec V, Fischer S, Maridonneau-Parini I. The src-family protein-tyrosine kinase p59hck is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation. *Biochem J*. 1995;309(Pt 2):657–65
63. Mocsai A, Jakus Z, Vantus T. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol*. 2000; 164:4321–31.
64. Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. 1993; 150:1535–43.
65. Brinkmann V. *et al.* (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.
66. Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **18**, 134–147
67. de Buhr, N., & von Köckritz-Blickwede, M. (2016). How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *Journal of immunology resear.ch*, 4604713.

68. Papayannopoulos V. and Zychlinsky A. (2009). "NETs: a new strategy for using old weapons," *Trends in Immunology*, vol. 30, no. 11, pp. 513–521, 2009
69. Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., ... Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000639.
70. Pilsczek F., Salina D., Poon K. et al., (2010). "A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*," *The Journal of Immunology*, vol. 185, no. 12, pp. 7413–7425.
71. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122(16):2784-94.
72. Yousefi S., Mihalache C., Kozłowski E., Schmid I., and Simon H., (2009). "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps," *Cell Death and Differentiation*, vol. 16, no. 11, pp. 1438–1444,
73. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*. 18(4):581-8.
74. Petretto A, Bruschi M, Pratesi F, Croia C, Candiano G, Ghiggeri G, et al. (2019) Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS ONE* 14(7): e0218946.
75. Tobón V. et al. (2016). Role of nadph oxidase system in the neutrophil extracellular Traps (NETs) formation. *Rev. Cubana de Hematología, Inmunol y Hemator*. 32(1):43-56
76. Hakkim, A., Fuchs, T., Martinez, N. *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 7, 75–77
77. Tobias A. Fuchs, Ulrike Abed, Christian Goosmann, Robert Hurwitz, Ilka Schulze, Volker Wahn, Yvette Weinrauch, Volker Brinkmann, and Arturo Zychlinsky. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 176, No. 2, January 15, 2007 231–241
78. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191(3):677–691
79. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J et al (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117(3):953–9590
80. Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., & Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of experimental medicine*, 207(9), 1853–1862.

81. Hemmers, S., Teijaro, J. R., Arandjelovic, S., & Mowen, K. A. (2011). PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS one*, 6(7), e22043.
82. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E et al (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 21(2):290–304
83. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. (2015). Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 14 (7): 633-640.
84. Thammavongsa et al. (2013). Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science*. Vol. 342 (6160): 863-866.
85. Beiter K. et al. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Current Biology*. Vol 16 (4): 401-407
86. Doke, M., Fukamachi, H., Morisaki, H., Arimoto, T., Kataoka, H., & Kuwata, H. (2017). Nucleases from *Prevotella intermedia* can degrade neutrophil extracellular traps. *Molecular oral microbiology*, 32(4), 288–300.
87. Zhang, X., Zhao, S., Sun, L., Li, W., Wei, Q., Ashman, R. B., & Hu, Y. (2017). Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *American journal of translational research*, 9(1), 50–62.
88. Wartha F. et al. (2006). Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cellular Microbiology*. Vol 9 (5): 1162-1171
89. Rocha, J. D., Nascimento, M. T., Decote-Ricardo, D., Côrte-Real, S., Morrot, A., Heise, N., ... Freire-de-Lima, C. G. (2015). Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. *Scientific reports*, 5, 8008.
90. Johnson, C. J., Cabezas-Olcoz, J., Kernien, J. F., Wang, S. X., Beebe, D. J., Huttenlocher, A., ... Nett, J. E. (2016). The Extracellular Matrix of *Candida albicans* Biofilms Impairs Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005884.
91. Kernien, J. F., Johnson, C. J., & Nett, J. E. (2017). Conserved Inhibition of Neutrophil Extracellular Trap Release by Clinical *Candida albicans* Biofilms. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3(3), 49.
92. Urban C. and Nett J. (2019). Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Seminars in Cell & Development Biology*. Vol 89: 47-57

93. Kernien, J. F., Snarr, B. D., Sheppard, D. C., & Nett, J. E. (2018). The Interface between Fungal Biofilms and Innate Immunity. *Frontiers in immunology*, *8*, 1968. doi:10.3389/fimmu.2017.01968
94. Campos-Garcia, L., Jimenez-Valdes, R. J., Hernandez-Bello, R., Palma-Nicolas, J., Gonzalez, G. M., & Sanchez-Gonzalez, A. (2019). *Candida albicans* and non-*albicans* Isolates from Bloodstream Have Different Capacities to Induce Neutrophil Extracellular Traps. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *5*(2), 28.
95. Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K., Hironaka, I., Kamata, Y., ... Mizunoe, Y. (2013). A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Scientific reports*, *3*, 3081.
96. Koga-Ito C. Y. et al. (2006). Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. *61* (4): 219-23.
97. Treviño-Rangel R. et al. (2019). In Vitro Determination of Hydrolytic Enzymes and Echinocandin Susceptibility in Mexican Clinical Isolates of *Candida glabrata* Sensu Stricto. *Jundishapur J Microbial*. *12* (6): e85092
98. Luo, G., L.P. Samaranayake, and J.Y. Yau, (2001). *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol*. *39*(8): p. 2971-4
99. Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. *13*(1): p. 122-43
100. Kumar, C.P., et al., (2006). Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. *Rev Iberoam Micol*. *23*(2): p. 101-3.
101. Slifkin, M., (2000). Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol*. *38*(12): p. 4626-8.
102. Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P., & Schüller, C. (2010). Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cellular microbiology*, *12*(2), 199–216.
103. Figueiredo-Carvalho, M., Ramos, L. S., Barbedo, L. S., de Oliveira, J., Dos Santos, A., Almeida-Paes, R., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2017). Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. *Mediators of inflammation*, *2017*, 8952878.
104. Pradhan, A., Herrero-de-Dios, C., Belmonte, R., Budge, S., Lopez Garcia, A., Kolmogorova, A., Lee, K. K., Martin, B. D., Ribeiro, A., Bebes, A., Yuecel, R., Gow, N., Munro, C. A., MacCallum, D. M., Quinn, J., & Brown, A. (2017). Elevated catalase expression in a fungal pathogen is a double-edged sword of iron. *PLoS pathogens*, *13*(5), e1006405.
105. Rubin-Bejerano I, Fraser I, Grisafi P, Fink GR (2003). Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*;100: 11007–11012.

106. Enjalbert B, MacCallum DM, Odds FC, Brown AJ (2007). Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun.*;75:2143–2151.
107. Nakagawa Y (2008). Catalase gene disruptant of the human pathogenic yeast *Candida albicans* is defective in hyphal growth, and a catalase-specific inhibitor can suppress hyphal growth of wild-type cells. *Microbiol Immunol.* ;52: 16–24.
108. Nasution O, Srinivasa K, Kim M, Kim YJ, Kim W, Jeong W, Choi W (2008). Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.*;7: 2008–2011.
109. Pathak, A. K., Sharma, S., & Shrivastva, P. (2012). Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 20(1), 70–75.
110. Guembe M, Cruces R., Pelaez T., Muñoz P., Bouza E. (2017). Assesment of biofilm production in *Candida* islots according to species and origino f infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 35 (1), 37-40.
111. Marak M. & Dhanashree B. (2018). Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp isloted from clinical sample. *International Journal of Microbiology*. 2018, 7495218.
112. Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., & Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, 114(13), 2619–2622.
113. Byrd, A. S., O'Brien, X. M., Johnson, C. M., Lavigne, L. M., & Reichner, J. S. (2013). An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(8), 4136–4148.
114. Zawrotniak, M., Bochenska, O., Karkowska-Kuleta, J., Seweryn-Ozog, K., Aoki, W., Ueda, M., Kozik, A., & Rapala-Kozik, M. (2017). Aspartic Proteases and Major Cell Wall Components in *Candida albicans* Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 414.
115. Bekeschus S. et al. (2016). Neutrophil extracellular traps formation is elicited in response to cold physical plasma. *Journal of Leukocyte Biology*, Vol 100 (4): 791-799.

APÉNDICES

APÉNDICE A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.

Agar Sabouraud Dextrose: Pesar 65g del medio de cultivo (BD Bioxon) y añadir 1L agua destilada; posteriormente calentar hasta disolverlo completamente y esterilizar en autoclave a 121°C/ 15 Lb/ 15 minutos. Finalmente se vierte el medio en placas Petri.

Caldo sabourad glucosado 2%: Pesar 5g de peptona de caseína, 5g de peptona de carne y 20g de glucosa, disolver en 1L de agua destilada, distribuir 4 mL en tubos de 13 x 100 y finalmente esterilizar en autoclave.

Solución salina 0.85%: Pesar 0.85g de NaCl grado reactivo y disolver en 100 mL de agua destilada.

Tritón X-100 1%: Colocar 0.1 mL tritón X-100 absoluto y disolver con 9.9 mL de PBS 1X.

H₂O₂ 3%: Colocar 1 mL de H₂O₂ 30% con 9 mL agua destilada.

Medio para hemolisinas: Pesar 65g de agar Sabouraud dextrose y 30g de glucosa disolver con 930 mL de agua destilada calentando en baño de agua. Esterilizar en autoclave y una vez atemperado añadir 70 mL (aproximadamente 1400 gotas) de sangre total de manera estéril y vaciar en placas Petri.

Medio para fosfolipasas: Pesar 65g de agar Sabouraud dextrose, 30g de glucosa, 58.44g de NaCl, 0.55g de CaCl₂ y disolver en 920 mL de agua destilada calentando en baño de agua. Esterilizar en autoclave y una vez atemperado añadir 80 mL de yema de huevo de manera estéril.

Medio para proteasas: Pesar 1g de glucosa, 2g de agar bacteriológico y disolver con 50 mL de agua destilada. Por otro lado, pesar 1.5 de leche descremada comercial y disolver con 50 mL de agua destilada. Esterilizar por separado en autoclave, una vez estéril y atemperadas, mezclar ambas soluciones y vaciar en cajas Petri.

Medio para esterasas: Pesar 10g de bactopectona, 5g de NaCl, 0.1g de CaCl₂ y 15g de agar bacteriológico, disolver en 1L de agua destilada calentando en baño de agua. Esterilizar en autoclave y vaciar en placas Petri.

Medio para nucleasas: Pesar 42g de agar para dnasas sin verde metilo (BD Difco), 0.5549g de CaCl₂, y 0.4761g de MgCl₂, disolver en 1L de agua destilada calentando en baño de agua, y finalmente esterilizar en autoclave.

HCl 1N: Disolver 3.06 mL HCl concentrado con 96.94 mL de agua destilada.

MOPS 10X (0.2M): Pesar 4.1853g de ácido 3-(N-mofolino)-propano sulfónico, disolver en 90 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.2, finalmente ajustar a un volumen de 100 mL y esterilizar en autoclave.

RPMI-MOPS 1X: Diluir 4 mL del MOPS 10X con 36 mL de RPMI 1640 1X (suplementado con glutamina sin rojo fenol).

Solución salina tamponada con fosfatos (PBS) 10X: Pesar 80g de NaCl, 2g de KCl, 14.2g de Na₂HPO₄ y 2.45g KH₂PO₄, disolver en 900 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.4; finalmente ajustar el volumen a 1L y esterilizar en autoclave.

PBS 1X: diluir 100 mL del PBS 10X con 900 mL de agua destilada de manera estéril.

Cristal violeta 0.1%: Pesar 2.0399 g de cristal violeta y disolver con 50 mL de agua destilada.

MTT 0.01%: Disolver 1 vial de 5mg de MTT con 50 mL de PBS 1X.

Hanks 1X: Diluir 100 mL de Hanks 10X con 900 mL de PBS 1X.

PMA stock (2 mM): Disolver 1 vial de PMA (1 mg) con 810 uL de DMSO y distribuir 10 µL en tubos eppendorff de 1 mL.

PMA 20 µM: Diluir una alícuota de 10 µL PMA 2 mM con 990 µL de Hanks 1X.

PMA 40 nM: Colocar 2 µL PMA 20 µM en 998 µL Hanks 1X.

Sytox green diluido: Diluir 10 µL Sytox green concentrado (5 mM) con 990 µL Hanks 1X.

DNAsa 1U/mL: Colocar 1 μL DNAsa 100 U/ μL en 99 μL RPMI 1640 o PBS 1X.

EDTA disódico 2 mM: Pesar 0.0058g de EDTA disódico y disolverlo en 10 mL Hanks 1X.

Buffer de bloqueo: Pesar 3g de leche descremada comercial y disolver con 100 mL de PBS 1X.

Triton 0.1%: Diluir 1 μL de tritón X-100 absoluto en 999 μL de PBS 1X.

Anti-elastasa (Conejo anti-humano) 1:100: Diluir 5 μL de anticuerpo concentrado en 495 μL de buffer de bloqueo.

Alexa Fluor 488 (Ratón anti-conejo) mezclado con Alexa Fluor 568 (Conejo anti-ratón) 1:500: Colocar 3 μL de cada anticuerpo secundario concentrado con 1294 μL de buffer de bloqueo.

AMT 3000 mM: Pesar 2.5224g de aminotriazol y disolver en 10 mL de agua destilada (Opcional: esterilizar por filtración, o bien esterilizar el agua).