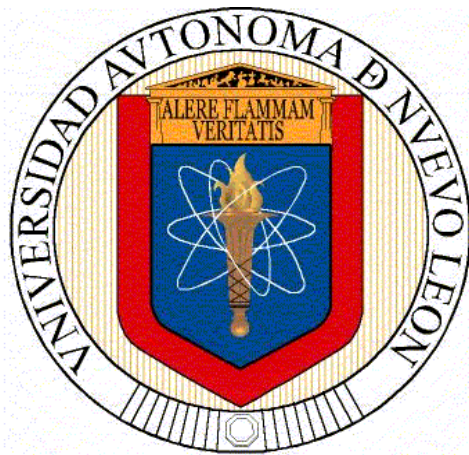


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS
ESPECIES DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis* Y SU
PARTICIPACIÓN EN EL DAÑO TISULAR Y PRODUCCIÓN DE
CITOCINAS EN UN MODELO MURINO DE
CANDIDOSIS DISEMINADA**

POR

M.C. ROGELIO DE JESÚS TREVIÑO RANGEL

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

JULIO, 2015

**“DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS ESPECIES
DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis* Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DAÑO
TISULAR Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN UN MODELO MURINO DE
CANDIDOSIS DISEMINADA”**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Gloria María González González
Director de Tesis



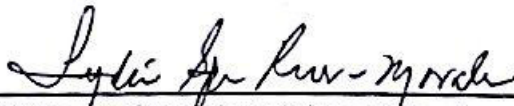
Dr. C. Adrián Giovanni Rosas Taraco
Co-Director de Tesis



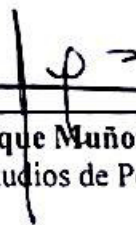
Dr. C. Carmen Amelia Molina Torres
Comisión de Tesis



Dr. C. Jaime García Juárez
Comisión de Tesis



Dr. C. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Comisión de Tesis



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

**“DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS ESPECIES
DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis* Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DAÑO
TISULAR Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN UN MODELO MURINO DE
CANDIDOSIS DISEMINADA”**

Presentado por: M.C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Este trabajo contó con la aprobación del Comité de Ética y Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.) con el número de registro: MB12-002. La ejecución experimental tuvo lugar en el Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, así como en el Laboratorio de Histotecnología del Departamento de Histología y el Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Inmunología, todos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. El trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dr. C. Gloria María González González y la co-dirección del Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco.



Dr. C. Gloria María González González
Director de Tesis

“Cuantos hombres se precipitan hacia la luz, no para ver mejor sino para brillar”

Friedrich Nietzsche (1844-1900)

DEDICATORIA

A todos quienes siempre han creído en mí, especialmente a Dios y mi familia.

רצונו

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios todopoderoso por siempre iluminar el sendero de mi vida y permitirme alcanzar una meta más.

A toda mi familia por su enorme paciencia, apoyo incondicional y amor verdadero.

A toda mi comisión de tesis: la Dra. Gloria González por creer en mí y confiarme nuevamente esta línea de investigación, así como a los Doctores Adrián Rosas, Julio Sepúlveda (†), Jaime García, Lydia Rivera, Carmen Molina y al M.C. Víktor Romero por su sabia guía y valiosos consejos a lo largo de la realización de este trabajo.

A todos los profesores del Departamento de Microbiología, quienes me inculcaron el respeto y amor hacia esta fascinante disciplina, además de enseñarme a ser un mejor profesionalista y a nunca desistir ante las adversidades que eventualmente pudieran presentarse en el sinuoso camino de la investigación científica.

A todo el personal técnico del departamento, en especial a Ángeles Quijano y Monserrat Valle, por todo el apoyo brindado y por su invaluable amistad.

Al “*Dream Team*” y a mis amigos y compañeros microbiólogos: Christian Campos, Samantha Flores, Paola Bocanegra, Mariana Elizondo, Byron Bodden, Rita Moreno, Álvaro Colin, Lizbeth Campos, Luis Cortéz, Alexandra Montoya, Carolina Luna, Sonia Aguilar, Saira Martínez y Naidhy Reyes, quienes definitivamente hicieron más divertida esta gran aventura.

Al CONACyT por el soporte económico otorgado durante mi formación.

A todos... ¡MUCHAS GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes históricos	1
1.2 Características microbiológicas de <i>C. parapsilosis</i>	1
1.3 Variabilidad genética de <i>C. parapsilosis</i>	3
1.4 Factores de virulencia de <i>C. parapsilosis</i>	6
1.4.1 Adherencia	6
1.4.2 Formación de biopelículas	7
1.4.3 Secreción de enzimas	8
1.4.3.1 Proteinasa aspárticas	8
1.4.3.2 Fosfolipasas y estererasas	10
1.4.4 Formación de pseudohifas/“cambio fenotípico”	10
1.5 Ensayos <i>in vitro</i> de virulencia en el complejo <i>C. parapsilosis</i>	11
1.6 Espectro clínico de la infección por <i>C. parapsilosis</i>	12
1.7 Epidemiología de la candidiasis	13
1.7.1 Prevalencia	13
1.7.2 Factores de riesgo	17
1.8 Diagnóstico micológico	19
1.8.1 Métodos microbiológicos convencionales	19
1.8.1.1 API 20C AUX	20
1.8.1.2 MicroScan	21
1.8.1.3 Vitek	21
1.8.2 Ensayos moleculares	22
1.9 Modelos animales de candidiasis sistémica	23
2.0 Respuesta inmune contra la candidiasis diseminada	25
2.0.1 Reconocimiento de <i>Candida</i> y respuesta inmune anti- <i>Candida</i>	25
2.0.2 Respuestas críticas para controlar la candidiasis invasiva	29
2.0.2.1 Células	29
2.0.2.2 Citocinas pro-inflamatorias derivadas de monocitos	30
2.0.2.3 Respuestas inmunes adaptativas	31

2. JUSTIFICACIÓN	33
3. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos específicos	35
5. MATERIAL Y MÉTODOS	36
5.1 Estrategia experimental	36
5.2 Aislamientos del complejo <i>C. parapsilosis</i>	36
5.3 Determinación de enzimas líticas	37
5.3.1 Oxidasa	37
5.3.2 Catalasa	38
5.3.3 Ureasa	38
5.3.4 Coagulasa	38
5.3.5 Gelatinasa	39
5.3.6 DNasa	39
5.3.7 Proteinasa aspártica	39
5.3.8 Fosfolipasa	40
5.3.9 Esterasa	40
5.4.0 Hemolisina	40
5.4 Cuantificación de biopelícula	41
5.4.1 Inducción y cuantificación de biopelícula	41
5.4.2 Amplificación y secuenciación del gen <i>BCR1</i>	43
5.5 Evaluación de patogenicidad <i>in vivo</i>	45
5.5.1 Declaración de Ética	45
5.5.2 Animales	45
5.5.3 Infección experimental	46
5.5.4 Carga fúngica tisular	48

5.6 Análisis histopatológico	48
5.7 Determinación de citocinas	49
5.8 Análisis estadístico	49
6. RESULTADOS	51
6.1 Determinación de enzimas líticas	51
6.2 Cuantificación de biopelícula	54
6.3 Evaluación de patogenicidad <i>in vivo</i>	57
6.4 Análisis histopatológico	60
6.5 Cuantificación de citocinas	66
6.5.1 Detección de citocinas inflamatorias desde etapas tempranas de la infección	66
6.5.2 La esplenomegalia es paralela a los niveles de TNF- α e IL-22	72
6.5.3 TNF- α e IL-22 podrían controlar la carga fúngica	72
7. DISCUSIÓN	73
8. CONCLUSIONES	87
9. PERSPECTIVAS	88
10. REFERENCIAS	89
APÉNDICES	107
Apéndice A. Preparación de reactivos y soluciones	107
Apéndice B. Técnicas histológicas	114
Técnica histológica de inclusión en parafina	114
Técnica de rutina con hematoxilina y eosina (H-E)	116
Técnica histoquímica con ácido peryódico de Schiff (PAS)	117
Técnica histoquímica con plata metenamina de Grocott	118
Apéndice C. Producción científica	120

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Perfiles enzimáticos globales de los aislamientos clínicos incluidos en este trabajo.	52
2.	Categorización de la producción de biopelícula de aislamientos del complejo <i>C. parapsilosis</i> , evaluados en base a su actividad metabólica.	56
3.	Perfiles enzimáticos de las cepas utilizadas en los estudios <i>in vivo</i> .	58
4.	Carga fúngica tisular en ratones infectados sistémicamente con inóculos de 1.5×10^7 UFC/ratón.	59
5.	Hallazgos histopatológicos encontrados en cortes seriados de riñón obtenidos durante el transcurso de la infección murina diseminada con cepas del complejo <i>C. parapsilosis</i> .	66

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Microfotografía de <i>C. parapsilosis</i> .	2
2.	“Cambio fenotípico” en <i>C. parapsilosis</i> .	3
3.	Porcentajes de aislamientos de <i>Candida</i> spp. en sangre a nivel mundial (1991-2008).	14
4.	Reportes mundiales de candidosis (1992-2006).	15
5.	Comparación de la distribución de <i>Candida</i> spp. entre Brasil y México.	16
6.	Galería API 20C AUX.	20
7.	PRRs y vías de señalamiento intracelular que conducen a la diferenciación de células T cooperadoras (Th) antifúngicas.	27
8.	Inmovilización animal en dispositivo aireado especial que permite la libre manipulación de la cola del roedor.	47
9.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad fosfolipasa, esterasa, aspartil proteinasa y hemolítica de los aislamientos incluidos en este trabajo.	53
10.	Cuantificación de biopelícula en aislamientos clínicos de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto, <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> por tinción con cristal violeta y actividad metabólica.	55

11. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de pulpa roja de bazo teñidos con H-E y PAS obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. 61
12. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de bronquiolos pulmonares teñidos con H-E y PAS obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. 62
13. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de la triada porta hepática teñidos con H-E y PAS obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. 63
14. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de corteza renal teñidos con H-E y PAS obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. 64
15. Composición comparativa entre órganos de cortes histológicos teñidos con PAS obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. 65
16. TNF- α expresado localmente en riñón, pulmón y bazo en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. 68
17. IL-22 expresada localmente en riñón, pulmón y bazo en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C.*

- parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. 69
- 18.** IFN- γ expresado localmente en riñón, pulmón y bazo en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. 70
- 19.** IL-17A expresada localmente en riñón, pulmón y bazo en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. 71

LISTA DE ABREVIACIONES

A	Absorbancia	MLST	Tipificación de secuencias multilocus
ADN	Ácido desoxirribonucleico	mM	Concentración milimolar
ADS	Agar dextrosa de Sabouraud	nm	Nanómetros
AFLP	Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica	pb	Pares de bases
APD	Agar papa dextrosa	PBS	Salina amortiguada de fosfatos
ASB	Albúmina sérica bovina	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ATCC	Colección americana de cultivos tipo	pH	Potencial de hidrógeno
BCRI	Regulador de biopelículas y pared celular 1	RAPD	ADN polimórfico aleatoriamente amplificado
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato	RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
DE	Desviación estándar	RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
DO	Densidad óptica	rpm	Revoluciones por minuto
ELISA	Enzimoimmunoensayo absorbente	s	Segundos
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (Latín: “y otros”)	SADH	Deshidrogenasa alcohólica secundaria
g	Gramos	T	Transmitancia
h	Horas	TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β
IL-10	Interleucina-10	TMB	Tetrametilbencidina
IL-17A	Interleucina-17A	TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
IL-22	Interleucina-22	U	Unidad
INF-γ	Interferón-γ	UFC	Unidad formadora de colonia
ITS	Espaciador transcripcional interno	UV	Ultravioleta
L	Litros	μg	Microgramos
M	Concentración molar	μL	Microlitros
min	Minutos	%	Por ciento
mL	Mililitros	°C	Grados Celsius

RESUMEN

M.C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Fecha de Graduación: Julio, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del Estudio: DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS ESPECIES DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis* Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DAÑO TISULAR Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN UN MODELO MURINO DE CANDIDOSIS DISEMINADA

Número de páginas: 128

Candidato al Grado de DOCTORADO en CIENCIAS con orientación en Microbiología Médica

Área de estudio: Micología Médica.

Propósito y Método de estudio: Actualmente se cuenta con escasa información referente a los factores de virulencia de las especies que conforman el complejo *Candida parapsilosis*. Ensayos previos *in vitro* ponen de manifiesto diferencias importantes en la virulencia de estas especies, por lo que analizar su comportamiento *in vivo* brindará nuevo conocimiento referente a la patogénesis de la infección diseminada por estos microorganismos. El desarrollo de un modelo murino de candidiasis diseminada permitirá estudiar el daño tisular ocasionado durante el proceso infeccioso, además de la producción de citocinas involucradas en la defensa del hospedero frente a la infección por estos patógenos. El objetivo de este trabajo fue determinar la producción de factores de virulencia de las especies del complejo *C. parapsilosis*, así como su participación en el daño tisular y producción de citocinas en un modelo murino de candidiasis diseminada.

Contribuciones y Conclusiones: Los perfiles enzimáticos de las cepas analizadas en este estudio exhibieron diferencias importantes respecto a sus actividades *in vitro* de proteinasa aspártica, fosfolipasa, esterasa y hemolisina. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en términos de carga fúngica tisular, histopatología y producción de citocinas cuando se probaron *in vivo*. El riñón fue el principal órgano dañado durante el reto, siendo el blanco de la infección indistintamente de la cepa ensayada. Las tres especies del grupo “psilosis” poseen posiblemente un potencial patogénico similar en la infección diseminada en hospederos inmunocompetentes, induciendo por igual una respuesta inmunológica pro-inflamatoria como principal mecanismo antifúngico mediador frente al reto sistémico.



Dr. C. Gloria María González González
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos

Candida parapsilosis es un hongo levaduriforme que fue aislado por primera vez en 1928 por Ashford como una especie de *Monilia* incapaz de fermentar la maltosa, a partir de las heces de un paciente con diarrea en Puerto Rico [1, 2]. La especie fue nombrada originalmente *Monilia parapsilosis* para distinguirla del aislamiento más común, *Monilia psilosis*, conocida hoy en día como *Candida albicans*.

1.2 Características microbiológicas de *C. parapsilosis*

Las células de *C. parapsilosis* pueden adoptar formas ovales, redondeadas o incluso cilíndricas (**Figura 1**). Cuando crece en agar dextrosa de Sabouraud (ADS), las colonias normalmente se tornan blanquecinas, cremosas, brillantes y de textura lisa o rugosa [3]. A diferencia de *Candida tropicalis* y *C. albicans*, que pueden existir en múltiples estructuras morfogénicas, *C. parapsilosis* no forma hifas verdaderas, por lo que puede existir ya sea en fase levaduriforme, generando fenotipos coloniales que van desde texturas lisas hasta con forma de “copos de nieve”, o bien en su forma pseudohifal, dando lugar a colonias con estructuras peculiares que pueden ser

concéntricas o bien con forma de “crepé”, mediante un fenómeno conocido como “cambio fenotípico” [4, 5] (**Figura 2**). Las pseudohifas se han observado en agar harina de maíz y pueden ser identificadas fácilmente con microscopía de luz [4]. La formación de pseudohifas en *C. parapsilosis* se encuentra vinculada de manera importante a un conjunto específico de aminoácidos, particularmente citrulina, la cual origina cambios importantes en la morfología celular y colonial del organismo [6].



Figura 1. Microfotografía de *C. parapsilosis* [7]. a) fase levaduriforme, b) forma pseudohifal.

En comparación con otras especies del género anamórfico *Candida*, *C. parapsilosis* presenta un extenso patrón de distribución en la naturaleza, a diferencia de *C. albicans* y *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* no es un patógeno antropofílico obligado, ya que ha sido aislada de diversas fuentes no humanas [2] como animales domésticos, insectos, tierra, así como ambientes marinos [8]. *C. parapsilosis* es un comensal humano normal y es uno de los hongos frecuentemente aislados del lecho ungueal de manos de seres humanos [3]. Su colonización transitoria del integumento humano es base de numerosos debates en cuanto a si *C. parapsilosis* es un patógeno o sólo un espectador (“*bystander*”) en ciertas infecciones [3].

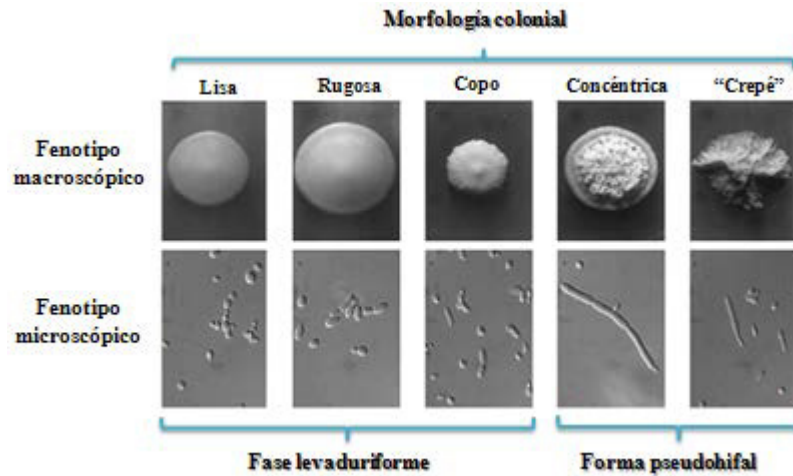


Figura 2. "Cambio fenotípico" en *C. parapsilosis* [5].

En años recientes y con base en una amplia batería de ensayos moleculares, se reportó que *C. parapsilosis* es un complejo, el cual se encuentra integrado por tres distintas especies genéticamente heterogéneas entre sí.

1.3 Variabilidad genética de *C. parapsilosis*

En 1987, Scherer y Stevens [9] establecieron que los métodos moleculares de identificación microbiana ofrecían ventajas potencialmente importantes por encima de los métodos microbiológicos convencionales, motivo por el cual propusieron la aplicación de la técnica RFLP para el análisis de 19 aislamientos clínicos identificados convencionalmente por medio del sistema API 20C AUX como *C. parapsilosis*. En este estudio se descubrieron tres distintos patrones de restricción no reportados previamente en la literatura, con lo cual se sugirió que *C. parapsilosis* poseía una elevada variabilidad genética, mayor incluso que la reportada hasta entonces para *C. albicans* y *C. tropicalis*. Posteriormente, en 1992, Lehmann *et al.* [10] utilizando RAPD para el estudio de 8

aislamientos clínicos identificados de manera convencional con sistemas API 20C AUX como *C. parapsilosis*, encontraron tres distintos patrones, los cuales fueron clasificados dentro de tres grupos diferentes bajo la misma especie *parapsilosis* (*C. parapsilosis* grupo I, *C. parapsilosis* grupo II y *C. parapsilosis* grupo III). En el estudio se concluyó que había al menos tres “especies” fenotípicamente indistinguibles caracterizadas como *C. parapsilosis* cuando esta levadura era identificada por medio de procedimientos microbiológicos convencionales.

Por su parte, en 1995 Lin *et al.* [11] basados en perfiles de actividad enzimática, particularmente de las enzimas: estearasa, superóxido dismutasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, además de la secuenciación del ITS1; y Roy y Meyer [12] en 1998, apoyados en estudios de homología del ADN y patrones de restricción, confirmaron la existencia de tres distintos genotipos de *C. parapsilosis* pobremente relacionados a nivel de especie, apoyando con esto su división temprana en tres especies separadas, independientes filogenéticamente una de la otra.

Encontrando ya de manifiesto la heterogeneidad genética existente en *C. parapsilosis*, en 2004, Rycovska *et al.* [13] estudiaron la variabilidad polimórfica del ADN mitocondrial entre los distintos grupos del complejo *C. parapsilosis*, encontrando que dicho genoma se componía de una secuencia génica semejante en los tres grupos de *C. parapsilosis*, pero poseía además importantes modificaciones en la arquitectura molecular particular de cada grupo. Los investigadores descubrieron que el ADN mitocondrial de *C. parapsilosis* grupo I y *C. parapsilosis* grupo III era linearizado y presentaba en sus extremos telómeros mitocondriales de 738 pb en el grupo I y 620 pb en el grupo III. Por otro lado, *C. parapsilosis* grupo II poseía ADN mitocondrial

circularizado de un tamaño aproximado a las 23 kilobases. Estos hallazgos permitieron la caracterización de los tres grupos de *C. parapsilosis*, por lo que el análisis de perfiles de ADN mitocondrial vino a representar una poderosa herramienta molecular con aplicaciones potenciales en la genotipificación de *C. parapsilosis*.

Finalmente, en 2005 Tavanti *et al.* [14] tras analizar 32 aislamientos clínicos identificados convencionalmente con sistemas API-20C AUX como *C. parapsilosis* con diversas técnicas moleculares tales como RAPD, MLST, RFLP (con la amplificación del gen *SADH* y su posterior digestión con *BanI*) y secuenciación de los ITS's, encontraron que tras comparar la secuencia del ITS1 de los tres grupos de *C. parapsilosis* con la de otras 15 distintas especies de *Candida* y *Saccharomyces cerevisiae*, *C. parapsilosis* grupo II y *C. parapsilosis* grupo III se encontraban más relacionadas filogenéticamente con respecto a *C. parapsilosis* grupo I y que la distancia filogenética que separa a *C. dubliniensis* de *C. albicans* es la misma que separa los tres grupos de *C. parapsilosis*. Motivo por el cual fue necesaria una re-estructuración del complejo *C. parapsilosis*, para lo cual los investigadores propusieron que todos los organismos anteriormente conocidos como *C. parapsilosis* grupo I se designen únicamente como *C. parapsilosis* en sentido estricto y propusieron la creación de dos nuevas especies: *Candida orthopsilosis*, para designar a aquellos organismos anteriormente conocidos como *C. parapsilosis* grupo II y *Candida metapsilosis*, para designar a aquellos organismos conocidos con anterioridad como *C. parapsilosis* grupo III. Dichos nombres asignados fueron irónicamente elegidos por la manera en la cual los prefijos “ortho”, que originalmente significaba “derecho” o “correcto” y “meta”, “con” o “después”, han sido

utilizados por los químicos, junto con “para” para denotar las diferentes posiciones que pueden tomar diversas funciones químicas en un anillo aromático [14].

1.4 Factores de virulencia de *C. parapsilosis*

La patogénesis de la candidiasis invasiva debida a *C. parapsilosis* se basa en diversos factores de virulencia del organismo, primordialmente su adherencia a las células del hospedero, su capacidad de producir extensas biopelículas, así como la secreción de ciertas enzimas hidrolíticas [3]. Adicionalmente, se ha señalado la capacidad de *C. parapsilosis* para la generación de pseudohifas/“cambio fenotípico” como otro importante factor de virulencia de este organismo [15]. A pesar de intensos esfuerzos encaminados a la elucidación de los mecanismos de patogenicidad inherentes en hongos, particularmente en *C. albicans*, se conoce relativamente poco acerca de los factores de virulencia de *C. parapsilosis* [3].

1.4.1 Adherencia

La colonización e infección por *C. parapsilosis* dependen de la habilidad del hongo para adherirse a las células y tejidos del hospedero, particularmente superficies mucosas [3]. La adherencia a dispositivos médicos facilita la formación de biopelículas y ocasiona daño en el hospedero [3]. La hidrofobicidad de la superficie celular se ha asociado con la adherencia inicial de *C. parapsilosis* a superficies [16], así como la producción de limo se ha relacionado con la tendencia del organismo para adherirse a catéteres plásticos [17].

1.4.2 Formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos asociadas a superficies dentro de una matriz extracelular, y son el tipo más prevalente de crecimiento microbiano [18]. La generación de biopelículas en *C. albicans* se encuentra asociada con el cambio dimórfico de levadura a crecimiento hifal, y la estructura de la biopelícula generada involucra dos capas distintas: una delgada, capa basal constituida básicamente de levaduras, y una gruesa, capa hifal menos compacta [19]. En contraste, *C. parapsilosis* produce cuantitativamente menos biopelícula y de menor complejidad que *C. albicans* [20, 21]. Ciertos fenotipos filamentosos (pseudohifales) de *C. parapsilosis*, sin embargo, generan más biopelícula y son más invasivos en agar que cepas que predominantemente permanecen en fase levaduriforme [4].

La formación de biopelículas se encuentra precedida por la adherencia a tejidos o dispositivos médicos, resultando presumiblemente en un cambio en la morfología y comportamiento del organismo [3]. Las biopelículas de *C. parapsilosis* pueden presentarse en diversos dispositivos médicos, incluyendo catéteres venosos centrales y periféricos, catéteres de hemodiálisis y diálisis peritoneal, dispositivos prostéticos intracardiacos y articulaciones prostéticas [22]. Como comensal de la piel humana, el organismo puede adquirirse por contacto directo con dispositivos médicos previo o durante el uso en el paciente, particularmente en ambientes hospitalarios donde ocurren lapsos en la higiene propia de las manos [3]. Aislamientos de *C. parapsilosis* con gran producción de biopelícula han sido asociados con brotes nosocomiales [23].

La formación de biopelículas es un importante factor de virulencia para varias especies de *Candida*, ya que confiere resistencia significativa a la terapia antifúngica

convencional, la cual incluye anfotericina B y compuestos azólicos, limitando la penetración de las sustancias a través de la matriz y protegiendo así las células de la respuesta inmune del hospedero [3]. Las capacidades de diferentes aislamientos de *C. parapsilosis* para causar enfermedad en varios tejidos pueden estar influenciadas por su habilidad para formar biopelículas [3].

BCR1 (“*Biofilm and Cell wall Regulator 1*”, por sus siglas en Inglés) es un factor transcripcional fúngico conservado requerido para la formación de biopelículas tanto en *C. albicans* como *C. parapsilosis* [24-26]. Algunos blancos moleculares importantes de Bcr1 en *C. albicans* incluyen genes codificantes para adhesinas y proteínas de pared celular, lo cual sugiere que Bcr1 se encuentra involucrado en la etapa temprana de adhesión del desarrollo de biopelículas [25-27]. Por otra parte, el proceso de formación de biopelículas en *C. parapsilosis* puede ser dependiente e independiente de *BCR1* [28].

1.4.3 Secreción de enzimas

En años recientes las enzimas de patógenos microbianos secretadas extracelularmente han ganado interés de manera creciente debido a su papel potencial en la patogénesis y como posibles blancos terapéuticos para el diseño de inhibidores sintéticos de aplicación en el manejo clínico de la infección [3]. Estas incluyen principalmente las proteinasas aspárticas, fosfolipasas y lipasas.

1.4.3.1 Proteinasas aspárticas. Las proteinasas aspárticas fueron descritas por primera vez en *C. albicans* en 1965 y permiten al patógeno utilizar proteína como única fuente de nitrógeno [29]. Suelen nombrarse bajo las abreviaciones: ‘*SAP*’, describiendo el gen y ‘*Sap*’, la proteína correspondiente. Estas enzimas son inhibidas por pepstatina A, un hexapéptido extracelular de *Streptomyces*, y suelen tener actividad óptima en el

rango ácido de pH, lo que pone al patógeno en desventaja en ciertos tejidos del hospedero con un pH cercano a la neutralidad [30]. Las proteinasas aspárticas facilitan la invasión y colonización de los tejidos del hospedero por disrupción de las membranas mucosas del mismo [31] y degradando importantes proteínas de defensa inmunológica y estructural, tales como las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas G, macroglobulina α_2 , proteína C3, β -lactoglobulina, lactoperoxidasa, colágeno y fibronectina [32]. La importancia de las Saps en el establecimiento de la candidiasis murina sistémica fue demostrado originalmente por el papel protector del inhibidor de proteinasa pepstatina A [33].

Se ha reportado particularmente en *C. parapsilosis* tres proteinasas aspárticas, dos de las cuales permanecen en gran parte sin caracterizar [34]. La isoenzima Sapp1p recientemente se caracterizó bioquímicamente [32, 35, 36]. Aunque inicialmente se le clasificó como un pseudogen, *sapp2p* produce una proteinasa funcional (Sapp2p), la cual constituye cerca del 20% de las Saps aisladas a partir del sobrenadante del organismo en cultivo [37]. Adicionalmente, la actividad proteolítica del producto del gen *sapp2p* posee diferentes mecanismos de activación que aquella del producto de *sapp1p* [34]. Actualmente permanece sin caracterizarse *sapp3* y su producto [3].

La producción de proteinasas aspárticas varía entre aislamientos de *C. parapsilosis* y su papel en la patogénesis aún permanece sin esclarecerse [3]. Sin embargo, hay cierta tendencia que relaciona la producción de estas enzimas y el sitio de aislamiento de *C. parapsilosis*, ya que las proteinasas aspárticas parecen ser menos importantes en la patogénesis de infecciones del torrente sanguíneo que en la

enfermedad invasiva localizada, particularmente en infecciones de la mucosa vaginal [38-42].

1.4.3.2 Fosfolipasas y esterasas. Las fosfolipasas son un grupo heterogéneo de enzimas capaces de hidrolizar uniones tipo éster en glicerofosfolípidos y se les denomina de manera genérica como: ‘PL’ [3]. Aunque todas las fosfolipasas actúan en fosfolípidos como sustratos, cada enzima tiene la habilidad de romper uniones tipo éster específicas. Así, letras calificativas como A, B, C y D son usadas para diferenciar entre fosfolipasas, así como para indicar el enlace blanco específico en la molécula fosfolipídica [43]. La función de las fosfolipasas durante el proceso infeccioso debido a *C. parapsilosis* aún no se comprende del todo, aunque se hipotetiza se encuentran involucradas en la disrupción de las membranas del hospedero [43, 44].

Mientras que las Saps y PLs de *C. parapsilosis* ya han sido estudiadas y caracterizadas en parte, las esterasas hidrolíticas secretadas han permanecido ampliamente abandonadas. Las esterasas se caracterizan por su habilidad para catalizar la hidrólisis de enlaces tipo éster de mono-, di- y triacilglicerolos o incluso fosfolípidos, actuando en sustratos solubles [30].

1.4.4 Formación de pseudohifas/“cambio fenotípico”

La baja virulencia de *C. parapsilosis* comparada con *C. albicans* puede ser atribuida a su incapacidad de formar hifas verdaderas [15]. Muchas especies de *Candida*, incluyendo *C. parapsilosis* existen como blastoconidias esféricas u ovoides [4] y son capaces, en diversos grados, de producir cadenas de blastoconidias elongadas, llamadas pseudohifas, tanto *in vivo*, como bajo ciertas condiciones, *in vitro* [15]. Por otra parte, las hifas verdaderas son más difíciles de ingerir y las paredes celulares pueden ser

más resistentes a la digestión. Adicionalmente, las hifas verdaderas se definen como más adhesivas a las células del hospedero que las pseudohifas [45].

El “cambio fenotípico” es un fenómeno de inestabilidad fenotípica específica, que permite a las cepas cambiar su fenotipo colonial sin afectar su genotipo identificable [46, 47] y aunque ha sido ampliamente estudiado en *C. albicans*, recientemente se ha determinado que este fenómeno también ocurre en *C. parapsilosis* [5, 48]. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan dicho fenómeno aún se desconocen. Diversos reportes indican que existe cierta correlación entre el “cambio fenotípico” y la formación de biopelícula [4]. En este sentido, los fenotipos concéntricos generan dos veces más biopelícula que aquellos con forma de “crepé” o cráter, así como los lisos producen la menor cantidad de biopelícula de los cuatro posibles fenotipos reportados para *C. parapsilosis* [4].

1.5 Ensayos *in vitro* de virulencia en el complejo *C. parapsilosis*

En 2007 Gácsér *et al.* [49] publicaron un estudio acerca de la virulencia de las tres especies del complejo *C. parapsilosis*, particularmente en tejido epitelial y epidérmico humano, encontrando que *C. orthopsilosis* causó un daño tisular similar al originado por *C. parapsilosis*, mientras que *C. metapsilosis* fue la especie menos virulenta. Si bien, se cuenta con información inicial pertinente a la virulencia de estas especies de *Candida* en tejidos humanos reconstituidos, en 2010 Orsi *et al.* [50] estudiaron la interacción de estos organismos con células del sistema inmune, empleando un modelo de infección *in vitro* en células de microglia y encontraron que los aislamientos de *C. metapsilosis* fueron más susceptibles a la actividad antifúngica

mediada por microglia que aquellos aislamientos de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*; por lo que, en conjunto, dichos trabajos señalan a *C. metapsilosis* como el miembro menos virulento del complejo *C. parapsilosis*.

1.6 Espectro clínico de la infección por *C. parapsilosis*

C. parapsilosis es un patógeno oportunista importante, con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, el cual abarca desde infecciones superficiales, las cuales afectan principalmente lecho ungueal de uñas, folículos e incluso oído medio, hasta infecciones sistémicas, que pueden llegar a comprometer de manera importante la vida del paciente. Eventualmente se han reportado casos esporádicos de peritonitis, endoftalmitis, trastornos articulares, pancreatitis y meningitis debidos a *C. parapsilosis*, sin embargo estos son poco frecuentes en la práctica clínica [15].

C. parapsilosis se encuentra entre las especies de *Candida* causales más comunes de enfermedad invasiva en todo el mundo, asociada a una tasa de mortalidad promedio cercana al 30% [3]. Las enfermedades subyacentes que predisponen a la infección son: cáncer, anormalidades hematológicas, trasplantes y trastornos crónico-degenerativos, particularmente la diabetes mellitus [51]. Comparada con *C. albicans*, *C. parapsilosis* es aislada con mayor frecuencia de neonatos, pacientes con catéteres intravasculares, individuos que estén recibiendo nutrición parenteral y trasplantados [3].

1.7 Epidemiología de la candidiasis

1.7.1 Prevalencia

Actualmente la candidiasis (también conocida como candidosis) se encuentra clasificada en cinco distintas presentaciones clínicas: mucocutánea, cutánea, sistémica, alérgica y miscelánea [52]. De las cuales, la modalidad sistémica, particularmente la fungemia, se encuentra ampliamente estudiada en muchos aspectos y a todos los niveles. Un estudio epidemiológico reciente de sepsis reveló que el número anual de casos de sepsis fúngica en los Estados Unidos incrementó en más del 200% entre 1979 y 2000 [53]. La morbilidad y mortalidad asociada con estas infecciones es sustancial, quedando claro que las enfermedades fúngicas han emergido como problemas importantes de salud pública [54]. En este sentido, las infecciones ocasionadas por *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Cryptococcus* spp. son las causas más importantes de morbi-mortalidad en los seres humanos y representan un 90% de todas las infecciones fúngicas [54, 55]. En el caso particular de *Candida* spp., desde la década de los ochenta las tasas de candidiasis se han incrementado en todo el mundo y representan la cuarta causa de infecciones nosocomiales en el torrente sanguíneo en los Estados Unidos y en otros países. La candidiasis se encuentra asociada con una alta tasa de mortalidad (del 46 al 75%) y una prolongada estancia hospitalaria [54, 56].

Durante la década de los noventa, en muchos países se reportó que *C. albicans* ocasionó entre el 50 y el 60% de todas las infecciones nosocomiales por hongos, razón por la cual se describió un notable cambio epidemiológico hacia otras especies que en conjunto se han denominado como *Candida* no-*albicans* (entre las que se encuentran: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, entre otras). Esta tendencia tiene

implicaciones clínicas obvias, debido a que muchas de estas especies son usualmente menos susceptibles a los antifúngicos triazólicos que *C. albicans*, lo cual puede requerir un manejo clínico diferente [54].

En 2008 Trofa *et al.* [3] reportaron que, a nivel mundial, *C. albicans* se posicionó como el principal agente etiológico de la mayor parte de las fungemias alrededor del mundo, por lo menos en los últimos 17 años, con un 49.8% de aislamientos, encontrándose precedido con tan sólo 19% por *C. parapsilosis*, una de las principales especies no-*albicans* responsable de fungemia (**Figura 3**). Adicionalmente, este estudio aporta evidencias clínico-epidemiológicas que demuestran el incremento en la tasa de incidencia de candidiasis invasivas debidas a especies no-*albicans* (particularmente *C. parapsilosis*) en ciertas regiones geográficas, principalmente en algunos países del continente asiático como Japón y Malasia (**Figura 4**).

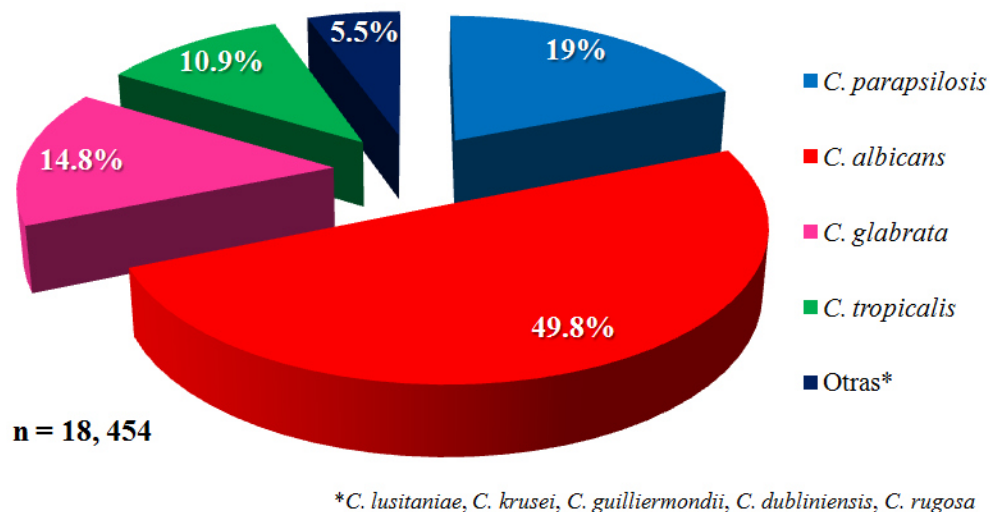


Figura 3. Porcentajes de aislamientos de *Candida* spp. en sangre a nivel mundial (1991-2008).

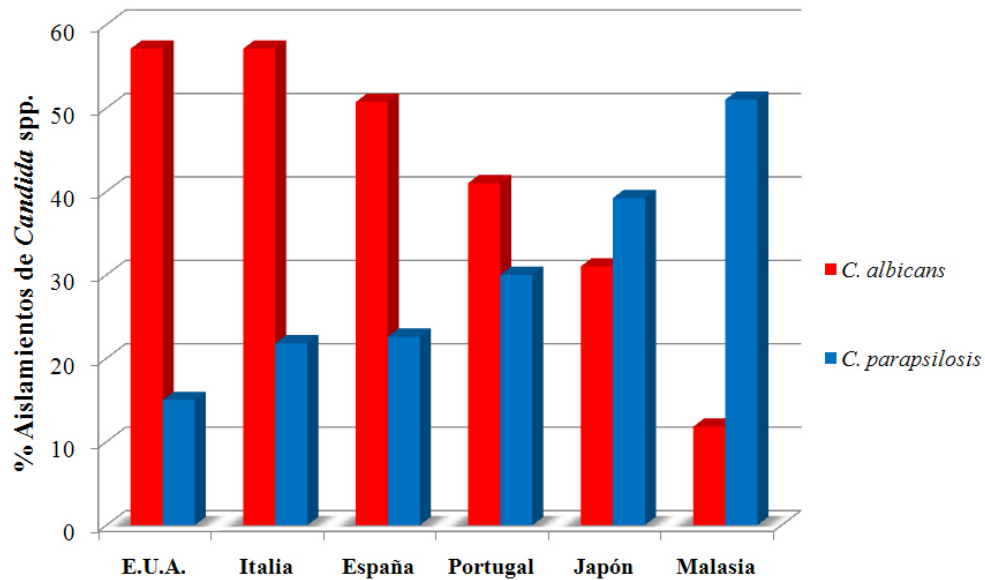


Figura 4. Reportes mundiales de candidiasis (1992-2006).

Los programas de vigilancia epidemiológica como el SENTRY han proporcionado sistemas de monitoreo de la emergencia de especies de *C. no-albicans* como una causa importante de infecciones nosocomiales y han seguido la tendencia en la resistencia de diversos antifúngicos en esos aislamientos [57]. En algunos hospitales del tercer nivel dentro del grupo de *C. no-albicans*, *C. glabrata* ha sido la especie más frecuentemente aislada de las candidiasis (3-35%), sobretodo en pacientes mayores de 60 años [54, 58]. Por otro lado, *C. parapsilosis* es la causa más importante de candidiasis en infantes y neonatos [54, 59].

La frecuencia de candidiasis invasiva debida a *C. parapsilosis* se incrementó en los últimos años, sobretodo en América Latina [60, 61], en donde actualmente se cuenta con dos importantes estudios de vigilancia epidemiológica de candidiasis (**Figura 5**).

Un estudio efectuado de Marzo de 2003 a Diciembre de 2004 por Colombo *et al.* [62] en Brasil, en el cual se analizaron 712 casos de candidiasis, encontrándose que, con un 40.9% de incidencia, *C. albicans* se posicionaba como el principal agente etiológico de candidiasis en dicha nación, siendo precedida por *C. tropicalis* y por *C. parapsilosis* con un 20.9 y 20.5% de incidencia, respectivamente. Por otra parte, en México (particularmente Monterrey, Nuevo León) González *et al.* [63] analizaron de Julio de 2004 a Julio de 2007 un total de 398 caso de candidiasis, y encontraron que, con un 37.9% de incidencia, *C. parapsilosis* era el principal agente etiológico de candidiasis en dicha región, encontrándose precedida con un 31.9 y 14.8% de incidencia por *C. albicans* y por *C. tropicalis*, respectivamente. Por otro lado, los investigadores encontraron que en pacientes \leq a 1 año de edad y hasta los 24 años el principal agente etiológico de candidiasis era *C. parapsilosis*, así como la tendencia de adquirir candidiasis debida a *C. glabrata* incrementaba notablemente con la edad de los pacientes afectados.

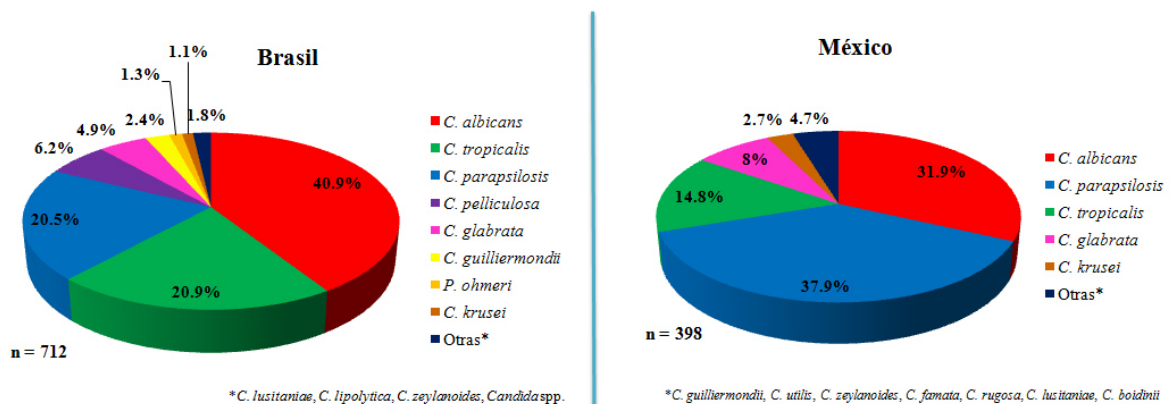


Figura 5. Comparación de la distribución de *Candida* spp. entre Brasil y México.

Afortunadamente, las infecciones del torrente sanguíneo debidas a *C. parapsilosis* se asocian con una tasa de mortalidad significativamente baja que aquellas infecciones debidas a otras especies de *Candida* [64-66]. Dado el origen exógeno de *C. parapsilosis*, las infecciones del torrente sanguíneo debidas a esta especie pueden prevenirse gracias a la implementación de buenas prácticas de control de infecciones, incluyendo la higiene de manos y la apropiada colocación y cuidado de catéteres intravasculares.

Ya reclasificado el complejo *C. parapsilosis*, en 2008 Lockhart *et al.* [67] efectuaron un estudio global de carácter internacional en el cual reportaron un 91.3% de aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto, 6.1% aislamientos de *C. orthopsilosis* y 1.8% aislamientos de *C. metapsilosis*. Actualmente se cuenta con un antecedente directo respecto a la epidemiología molecular del complejo *C. parapsilosis* en Monterrey, Nuevo León, México. En este estudio, después del análisis molecular de una extensa colección de 344 aislamientos clínicos pertenecientes al complejo *C. parapsilosis*, se encontró que el 90.4% correspondió a *C. parapsilosis* en sentido estricto, mientras que el 8.4% y 1.2% correspondieron a *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente. Por lo que *C. parapsilosis* sensu stricto resultó ser la especie más frecuente del complejo *C. parapsilosis* en dicha región, siendo habitualmente aislada de sangre; además de la única en mostrar resistencia *in vitro* frente a fluconazol, caspofungina, anidulafungina y micafungina [68].

1.7.2 Factores de riesgo

La enfermedad invasiva debida a *C. albicans* y *C. tropicalis* se encuentra normalmente precedida por previa colonización, siendo la transmisión vertical,

típicamente de madre a hijo durante el trabajo de parto, la más común para estos hongos [3]. En contraste, la enfermedad invasiva causada por *C. parapsilosis* puede ocurrir sin previa colonización y es frecuentemente transmitida horizontalmente a través de fuentes externas contaminadas, como dispositivos médicos o fluidos, las manos de los trabajadores del área de la salud, dispositivos prostéticos y catéteres [3].

El incremento en la frecuencia de infecciones por *C. parapsilosis* se ha atribuido a varios factores de riesgo, incluyendo las capacidades selectivas del organismo para proliferar en soluciones para hiperalimentación y su afinidad por dispositivos intravasculares y materiales prostéticos [3]. Los individuos inmunocomprometidos, como pacientes con VIH/SIDA y aquellos recientemente sometidos a procedimientos quirúrgicos, particularmente cirugía del tracto gastrointestinal, se encuentran en alto riesgo de infección con *C. parapsilosis*. Adicionalmente, pacientes que requieren el uso prolongado de catéteres venosos centrales o dispositivos médicos, como pacientes oncológicos, se encuentran en elevado riesgo de infección con dicho organismo [3].

La nutrición parenteral, en particular, facilita la infección con *C. parapsilosis* debido a que la levadura posee una ventaja de crecimiento selectivo en soluciones para hiperalimentación con elevadas concentraciones de glucosa [69, 70]. Además, algunos estudios de nutrición parenteral total muestran que puede incrementarse hasta en un 40% el peso seco de biopelículas, un factor de virulencia importante del patógeno [23].

La población que se encuentra en especial riesgo de infección nosocomial por *C. parapsilosis* son los neonatos prematuros de muy bajo peso [3]. La colonización de la piel o del tracto gastrointestinal es frecuentemente el primer paso en la patogénesis de la candidiasis invasiva y los neonatos se encuentran especialmente propensos a la

enfermedad dada la comprometida integridad de su piel, susceptibilidad frente a infecciones del tracto gastrointestinal, necesidad de catéteres venosos centrales por largo tiempo e intubación endotraqueal prolongada [71].

Las manos de los trabajadores del área de la salud son los principales vectores en la adquisición exógena de *C. parapsilosis*. Como un comensal normal de la piel humana, este organismo plantea una grave amenaza para aquellos pacientes que interactúan con trabajadores del área de la salud colonizados, particularmente cuando se violan los protocolos estándar para la higiene apropiada de las manos [3]. Aunque los porcentajes varían de un estudio a otro, múltiples trabajos reportan a *C. parapsilosis* como la levadura más comúnmente aislada a partir de las manos de trabajadores del área médica [72, 73].

1.8 Diagnóstico micológico

Para llevar a cabo la identificación de *C. parapsilosis* en el laboratorio de diagnóstico clínico se cuenta con diversos métodos microbiológicos convencionales, cuyos criterios de identificación requieren un enfoque similar a la identificación bacteriana debido a que las morfologías macroscópica y microscópica de las levaduras son muy homogéneas, por lo que un limitado número de pruebas morfológicas son importantes para la identificación de estos organismos.

1.8.1 Métodos microbiológicos convencionales

La caracterización rigurosa de levaduras se efectúa principalmente por sus características fisiológicas o bioquímicas, mediante la utilización de ciertos métodos, los cuales se pueden clasificar de manera general, por una parte en sistemas de

identificación manual, siendo el sistema API 20C AUX el más importante y por otro lado, en sistemas de identificación automatizada, de entre los que destacan: MicroScan y Vitek [74].

1.8.1.1 API 20C AUX. El sistema API 20C AUX de la compañía bioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia) es un micrométodo de asimilación de carbohidratos especialmente diseñado para la identificación de levaduras de relevancia clínica. Como se muestra en la **Figura 6**, el sistema consiste en una galería de 20 microcúpulas, 19 de las cuales poseen diferentes carbohidratos y un testigo, que carece de carbohidrato. El sistema se basa en la capacidad del organismo para asimilar diferencialmente los distintos carbohidratos, generándose así un perfil bioquímico característico, distintivo del organismo en estudio. Una suspensión de la levadura joven (24 h de incubación), preparada en solución salina y ajustada a una turbidez conocida es transferida a un medio especial de enriquecimiento, del cual se tomará para hidratar las microcúpulas de la galería, la cual se incuba posteriormente a 30°C por 24 a 72 h. Todas las reacciones son comparadas contra el testigo y los resultados son leídos y convertidos a un biotipo numérico de seis dígitos con el cual es posible llevar a cabo la identificación manual (tabla de códigos) o electrónicamente (base de datos).



Figura 6. Galería API 20C AUX (bioMérieux®) [74].

Este sistema para la identificación de levaduras se considera como uno de los más utilizados en los laboratorios de diagnóstico y es quizá el más ampliamente evaluado y publicado de todos los sistemas comerciales actualmente disponibles en el mercado, por lo que se le considera como el “estándar de oro” contra el cual se hacen comparaciones frente a la implementación de nuevos sistemas de identificación [74].

1.8.1.2 *MicroScan.* El sistema MicroScan de la compañía Dade Behring (West Sacramento, CA, E.U.A.) se encuentra compuesto de pruebas cromogénicas, así como de ensayos convencionales modificados para la identificación de hongos levaduriformes aislados a partir de muestras clínicas [74]. Se trata de una placa de 96 pocillos, los cuales contienen 27 distintos sustratos cromogénicos deshidratados. Una suspensión de la levadura, preparada en agua y ajustada a una turbidez conocida es posteriormente utilizada para hidratar los pocillos de las placas, y se incuba a 35 – 37°C por 4 h. Las lecturas cromogénicas pueden efectuarse de manera visual o automatizada (Autoscan). La interpretación de los perfiles bioquímicos tiene lugar transformando los resultados obtenidos en un biotipo numérico de 9 dígitos, el cual es comparado frente a una base de datos, o bien una tabla de códigos para llevar a cabo la identificación.

1.8.1.3 *Vitek.* El sistema Vitek de la compañía bioMérieux (Durham, NC, E.U.A.) utiliza una tarjeta compuesta de varias celdillas con sustratos deshidratados para una amplia gama de pruebas bioquímicas [74]. Se prepara una suspensión de la levadura en agua estéril, los tubos se colocan hasta la marca del sello de la tarjeta, para que posteriormente, por vacío, sea succionada la muestra dentro de la tarjeta a través de un conducto estéril. La unidad de lectura-incubación mantiene un ambiente controlado mientras las tarjetas se incuban, este sistema rota las tarjetas, permitiendo con ello que

las lecturas puedan ser efectuadas por una unidad láser y el fotodetector. Los resultados obtenidos son analizados en el equipo por comparación frente a su base de datos antes de arrojar la identificación del organismo en estudio.

1.8.2 Ensayos moleculares

Debido a la elevada variabilidad genética inherente en *C. parapsilosis*, los métodos microbiológicos convencionales no son de gran utilidad, motivo por el cual cada vez más se recurre a diversas herramientas moleculares, las cuales permiten identificar de manera precisa a nivel de especie este complejo de organismos, entre los principales ensayos moleculares destacan: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), la tecnología del ADN polimórfico aleatoriamente amplificado (RAPD), análisis de secuencias multilocus (MLST), así como la secuenciación de ciertos genes, como: el gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria (*SADH*) y los espaciadores transcripcionales internos ITS1-ITS2.

Desde que *C. parapsilosis* se reestructuró como un complejo de especies, se han implementado diversas metodologías de identificación molecular, basadas principalmente en RFLP [14, 75], secuenciación de la región no codificante ITS [76, 77], perfiles de ADN mitocondrial [78] y la utilización de marcadores microsatelitales [79]. Por otro lado, el método de AFLP también se ha utilizado no sólo para confirmar la identificación de especie, sino también para evaluar la relación genética de *C. parapsilosis* [80], *C. orthopsilosis* [81] y *C. metapsilosis* [82]. Sin embargo, pese a su elevada sensibilidad y robustez todas estas técnicas consumen mucho tiempo,

haciéndolas poco prácticas y difícilmente adaptables a la rutina actual de diagnóstico clínico, por lo que en 2008 se desarrolló una PCR en tiempo-real con análisis de temperatura *melting* con la finalidad de identificar 6 especies clínicamente relevantes de *Candida*, incluyendo *C. parapsilosis* [83]. Sin embargo, esta técnica no se optimizó para permitir la identificación precisa a nivel de especie del complejo *C. parapsilosis*, razón por el cual en 2010, Hays *et al.* [84] desarrollaron una prueba rápida utilizando la misma técnica molecular, capaz de discriminar mediante análisis de curvas *melting* las tres especies estrechamente relacionadas del complejo, por lo que este nuevo enfoque podría resultar muy útil para futuras investigaciones clínicas y epidemiológicas.

1.9 Modelos animales de candidiasis sistémica

Los modelos de infección sistémica por *Candida* resultan esenciales para nuestro entendimiento acerca del inicio y progresión de la enfermedad y también para permitir el desarrollo y evaluación de nuevas herramientas diagnósticas y terapias más efectivas. En años recientes, mini-hospederos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y la larva *Galleria mellonella* se han utilizado para estudiar aspectos de la infección diseminada por *Candida* [85, 86]. Sin embargo, es sólo en hospederos mamíferos que la enfermedad fúngica puede ser completamente estudiada. Aunque mamíferos superiores, como cerdos, conejos, cobayas y ratas, pueden utilizarse para investigar la candidiasis, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en ratones. Esto debido principalmente a factores económicos, fácil manejo, la disponibilidad de cepas murinas *knock-out* y otros reactivos para análisis de las respuestas del hospedero,

así como la disponibilidad de modelos de infección reproducibles y bien caracterizados [86].

Se utilizan dos tipos principales de modelos animales para estudiar la patogénesis de la candidiasis diseminada. El primero consiste en la inoculación directa en el torrente sanguíneo del patógeno a través de la vena caudal lateral de la cola de los ratones, extendiéndose rápidamente en todo el cuerpo. En este modelo, la infección es controlada en muchos órganos, pero progresa en los riñones y, a niveles elevados de inóculo, en el cerebro [87], con sepsis fúngica como la eventual causa de muerte en el animal [88]. El segundo modelo involucra varios métodos para colonizar persistentemente el tracto gastrointestinal de los ratones con *Candida*. En este modelo la colonización fúngica es más alta en el estómago, ciego e intestino delgado [89] y puede mantenerse con antibioticoterapia continua además de poder monitorearse de manera no invasiva mediante cuentas fúngicas fecales. El tratamiento subsecuente con agentes inmunosupresivos y/o translocación a la mucosa conducen a la diseminación del hongo en el hígado, riñones y bazo, principalmente [89, 90]. Estos modelos proveen información relevante que eventualmente es posible extrapolar a la infección en humanos. Específicamente, el modelo de infección directa en la vena de la cola (i) semeja a la infección en pacientes directamente a través de la utilización de catéteres, (ii) presenta un curso clínico similar a casos de candidiasis diseminada no tratada en humanos y (iii) ha sido predictivo de la eficacia de agentes antifúngicos contra infecciones sistémicas en humanos [86].

Los modelos murinos han sido de invaluable ayuda en incrementar nuestro entendimiento acerca del comportamiento de *Candida* spp., particularmente *C. albicans*, en el hospedero. El estudio de la virulencia de aislamientos clínicos en estos modelos ha demostrado considerable variación, tanto entre especies como dentro de las especies, sin asociación aparente con la fuente clínica del aislamiento [91, 92]. Las diferencias en virulencia han sido también evidentes cuando la misma cepa (o aislamiento) ha sido comparada en dos modelos animales de infección sistémica [93], sugiriendo que distintos factores de virulencia son necesarios en los diferentes modelos. Por otra parte, los modelos en ratón han sido también fundamentales en el entendimiento de las respuestas del hospedero durante el inicio y progresión de la infección sistémica por *Candida*, con la ventaja de permitir la manipulación del hospedero ya sea a través de anticuerpos neutralizantes, tratamiento inmunosupresivo o por creación de ratones *knock-out*. Estas manipulaciones del hospedero permiten emular hospederos susceptibles, por ejemplo pacientes con cuentas bajas de células B, células T, macrófagos o neutrófilos o con mutaciones génicas específicas, permitiendo analizar los efectos de estas manipulaciones en las respuestas del hospedero o susceptibilidad a la infección [86].

2.0 Respuesta inmune contra la candidiasis diseminada

2.0.1 Reconocimiento de *Candida* y respuesta inmune anti-*Candida*

La defensa del hospedero contra *Candida* spp. depende de la rápida activación de una respuesta inflamatoria por parte del sistema inmune innato, seguida de respuestas

inmunes específicas mediadas por linfocitos T (inmunidad celular) o linfocitos-B (inmunidad humoral). Es evidente la presencia de mecanismos que permiten a las células inmunes innatas reconocer rápidamente a un patógeno invasor. Los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) son las primeras moléculas del sistema inmune innato capaces de reconocer patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) de microorganismos. Los PRRs más estudiados en el reconocimiento de PAMPs de *Candida* spp. son los Receptores Tipo-Toll (TLRs, por sus siglas en Inglés) [94]. En la **Figura 7** se esquematizan los principales PRRs y sus respectivas vías de señalamiento intracelular. El TLR2 y TLR4 son los principales TLRs que reconocen a *C. albicans* y se han implicado como importantes para la iniciación de las respuestas protectoras del hospedero contra *Candida* [95]. TLR4 participa en la respuesta anti-*Candida* del hospedero por reconocimiento de estructuras tipo mananos e induce la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas [96, 97]. En particular, TLR4 ha probado ser crucial para el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección [98]. Por otra parte, el TLR2 se encuentra involucrado en el reconocimiento de fosfolipomananos de *C. albicans*, además de que también colabora con el receptor de β -glucanos (Dectina-1) para la inducción de citocinas pro-inflamatorias [99, 100]. Sin embargo, aún existe discrepancia respecto a sus efectos *in vivo* en la respuesta anti-

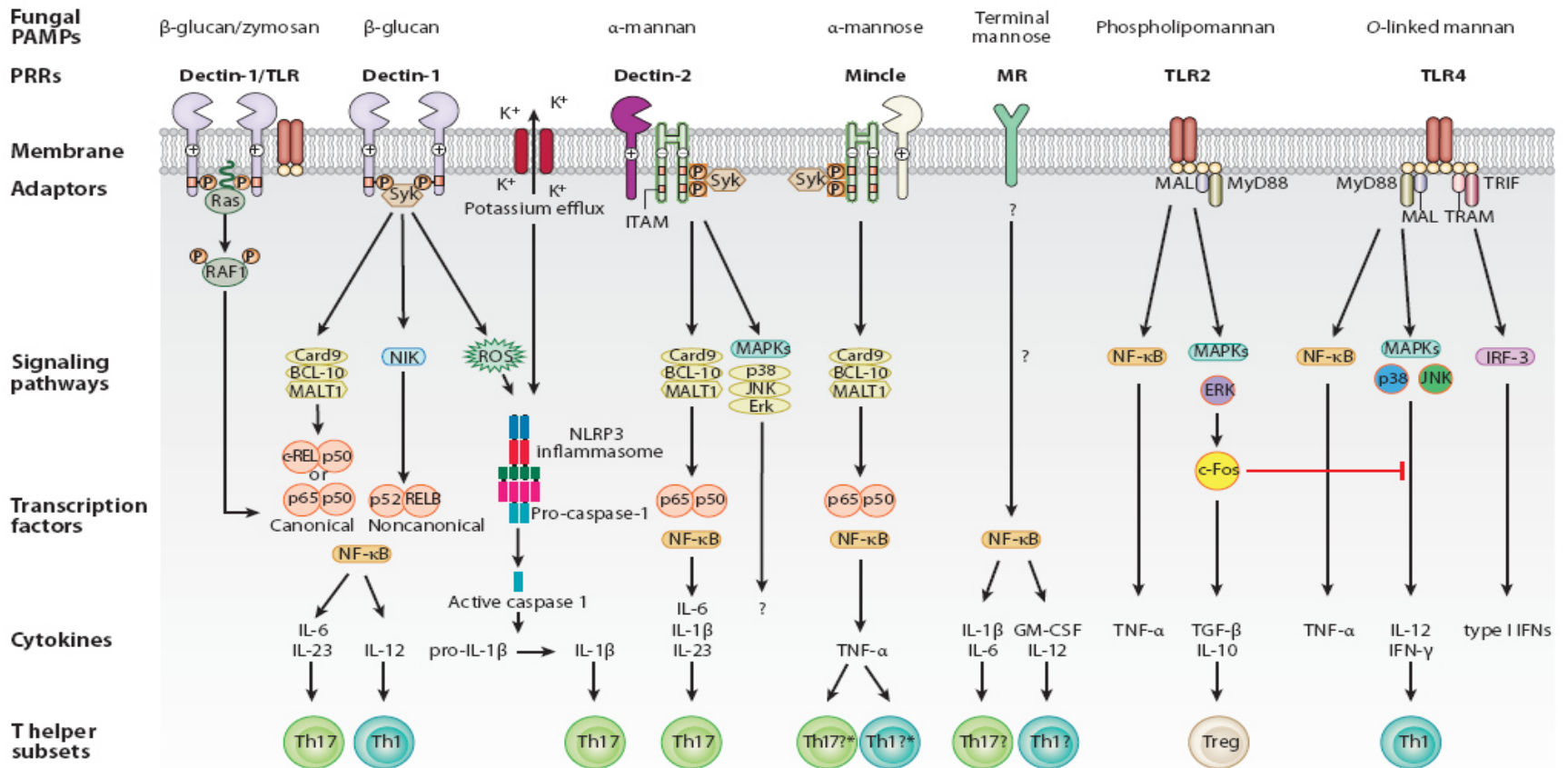


Figura 7. PRRs y vías de señalamiento intracelular que conducen a la diferenciación de células T cooperadoras (Th) antifúngicas. Tomada y modificada de Wüthrich *et al.* [101].

Candida del hospedero, ya que mientras algunos autores sugieren roles protectores [102], otros han demostrado la inducción de linfocitos T-reguladores y efectos inhibitorios de la defensa antifúngica del hospedero [103, 104]. Adicionalmente al TLR2 y TLR4, otros TLRs como TLR1, TLR6 y TLR9 se han implicado también en el reconocimiento de PAMPs de *Candida*, pero el papel que estos juegan en la infección *in vivo* es redundante en gran medida [105, 106].

Los receptores de lectina tipo-C (CLRs, por sus siglas en Inglés) son la segunda familia más importante de PRRs que reconocen componentes fúngicos de la pared celular de *C. albicans*. La Dectina-1 es un CLR que reconoce β -1,3-glucanos y se encuentra involucrado en la toma del ligando, fagocitosis y producción de citocinas pro-inflamatorias [107]. El receptor de manosa de los macrófagos, que fue uno de los primeros PRRs fúngicos identificados [108], puede reconocer oligosacáridos con terminaciones en *N*-acetilglucosamina, fucosa y manosa. En los monocitos y macrófagos humanos, el receptor de manosa (MR, por sus siglas en Inglés) está implicado en el reconocimiento de mananos con uniones-N de la pared celular externa de *Candida*, así como en el reclutamiento al fagosoma, de donde media la inducción de respuestas pro-inflamatorias [97, 109]. El CLR Dectina-2 fue el primer receptor descrito en producir citocinas pro-inflamatorias específicamente en respuesta a la forma hifal de *C. albicans* [110]. Recientemente se ha sugerido el papel de otros CLRs en la respuesta anti-*Candida* del hospedero, como Galectina-3, Mincle y CD36/Scarf [94, 111]. La pared celular de *Candida* es muy dinámica, además este organismo es capaz de realizar cambio morfológico, modificando así la composición de su pared celular. Por lo tanto,

diversas etapas que conducen a la candidiasis diseminada probablemente desencadenen diferentes respuestas del hospedero para desarrollar estrategias inmunes adaptables.

2.0.2 Respuestas críticas para controlar la candidiasis invasiva

Fagocitos, citocinas pro-inflamatorias derivadas de monocitos y respuestas tipo Th1 son los principales mecanismos efectores necesarios para eliminar a *Candida* del torrente sanguíneo y de los tejidos. En este estado de la infección, inicia una compleja interacción entre la inmunidad innata y la respuesta inmune adaptativa, la cual necesita ser estrictamente controlada para eliminar al hongo sin dañar al hospedero con inflamación excesiva.

2.0.2.1 Células. Los neutrófilos, macrófagos y monocitos desempeñan un papel importante en la muerte de *Candida* en el torrente sanguíneo y en los tejidos. La muerte mediada por fagocitos ocurre a través de mecanismos tanto oxidativos como no-oxidativos [112]. El receptor de reconocimiento de patrón Dectina-1 reconoce β -glucanos e induce el estallido respiratorio en respuesta al hongo [113]. Esta actividad se puede incrementar por señalamiento vía TLR [100]. El estallido respiratorio produce radicales libres de oxígeno tóxicos que dañan a *Candida* y son esenciales para una respuesta antifúngica óptima del hospedero [114, 115]. Se ha reportado que la Dectina-1 puede inducir directamente mecanismos fungicidas de neutrófilos [116]. Además, la activación de los neutrófilos conduce a la liberación de gránulos de proteasas que también son capaces de matar a *Candida* [117]. Por otra parte, la eliminación de este patógeno fúngico también puede ocurrir de forma extracelular, a través de respuestas indefinidas iniciadas por PRRs como la Galectina-3 [118]. Los monocitos en la sangre y

los macrófagos en los tejidos son las principales células responsables de la producción inicial de citocinas pro-inflamatorias que, como primer paso reclutarán y activarán neutrófilos y posteriormente mediarán las respuestas adaptativas anti-*Candida* en el hospedero.

2.0.2.2 Citocinas pro-inflamatorias derivadas de monocitos. Las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 (tanto α como β) e IL-6 son liberadas por los monocitos y/o macrófagos y juegan un papel fundamental en la defensa del hospedero contra la candidiasis diseminada. Ratones *knock-out* para TNF- α son altamente susceptibles a la candidiasis diseminada, mostrando un aumento en la tasa de mortalidad y las cargas fúngicas más altas en los riñones en comparación con los ratones control. TNF- α es responsable principalmente del reclutamiento óptimo de neutrófilos al sitio de infección y fagocitosis eficiente [119]. Además, los ratones que son deficientes de IL-1 α , IL-1 β o ambos también son susceptibles a la candidiasis invasiva experimental [120]. Interesantemente, los ratones deficientes en IL-1 α tuvieron una capacidad disminuida para dañar pseudohifas de *Candida*, mientras que los ratones deficientes en IL-1 β mostraron disminución en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección. Además, neutrófilos deficientes en IL-1 β tienen un estallido oxidativo defectuoso, el cual es una respuesta anti-*Candida* crucial y potente del hospedero tal como se describió con anterioridad [120]. Además de TNF e IL-1, la IL-6 también ha demostrado jugar un papel no redundante en la defensa antifúngica del hospedero; lo anterior fue comprobado con ratones deficientes de IL-6, los cuales resultaron ser altamente susceptibles al reto sistémico con *C. albicans* [121, 122]. Lo anterior sugiere la importancia de una

respuesta pro-inflamatoria inicial potente es esencial para la defensa óptima del hospedero contra la candidiasis diseminada.

2.0.2.3 Respuestas inmunes adaptativas. El IFN- γ es la citocina de la respuesta inmune tipo Th1 y es importante para la activación de macrófagos y producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en Inglés), así como la producción de inmunoglobulina específica anti-*Candida* [123]. IFN- γ también tiene actividad en otras células no inmunes importantes en la defensa del hospedero, tales como células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos [124]. Los ratones *knock-out* para IFN- γ son altamente susceptibles a la infección por *C. albicans*, evidenciando el papel central del IFN- γ endógeno en la resistencia contra la candidiasis sistémica [125, 126]. Además, los ratones deficientes en IL-18, citocina involucrada con la respuesta Th1, también son más susceptibles a la candidiasis diseminada [127]. En los últimos años se ha demostrado que la respuesta Th1 es la respuesta T cooperadora predominante, necesaria para coordinar de manera eficiente las respuestas antifúngicas durante la candidiasis diseminada [128].

Por su parte, la IL-22 es un miembro de la superfamilia de la citocina IL-10 que actúa vía el complejo heterodímero IL-10R2/IL-22R1 principalmente a través de las moléculas JAK y STAT. La regulación negativa del señalamiento de IL-22 conlleva a un incremento en la defensa antimicrobiana, activación de genes proliferativos, inhibición de la autofagia y la regulación positiva de proteínas anti-apoptóticas [129, 130], los cuales son importantes para la patogénesis de desórdenes cutáneos inflamatorios [131], enfermedad inflamatoria del intestino [132], inflamación pulmonar [133], pancreatitis

[134] y artritis [135]. En general, la IL-22 puede jugar ya sea un papel protector o patogénico en las enfermedades inflamatorias crónicas, dependiendo de la naturaleza y la localización de los tejidos afectados y del contexto local de la citocina [129, 136].

Aunque la respuesta tipo Th17 se encuentra principalmente involucrada en la defensa del hospedero a nivel de mucosas, se ha sugerido también un papel importante en la candidiasis diseminada. Ratones deficientes en el receptor de IL-17 (IL-17R) son más susceptibles a la candidiasis diseminada [137, 138]. Sin embargo, otras investigaciones han demostrado que ratones deficientes en IL-17A no son más susceptibles a la candidiasis diseminada [139]. Estas diferencias podrían explicarse por la producción de citocinas distintas a IL-17A, como la IL-17F, que actúa también a través del IL-17R y podría estar compensando la deficiencia de IL-17A. Ambas citocinas, IL-17A e IL-17F, son producidas por células Th17, por lo tanto la importancia de la respuesta inmune tipo Th17 durante la candidiasis diseminada queda por ser determinada.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se cuenta con escasa información referente a los factores de virulencia de las especies que conforman el complejo *Candida parapsilosis*. Ensayos previos *in vitro* ponen de manifiesto diferencias importantes en la virulencia de estas especies, por lo que analizar su comportamiento *in vivo* brindará nuevo conocimiento referente a la patogénesis de la infección diseminada por estos microorganismos.

El desarrollo de un modelo murino de candidiasis diseminada permitirá estudiar el daño tisular durante el proceso infeccioso, además de la producción de citocinas involucradas en la defensa del hospedero frente a la infección por las especies del complejo *C. parapsilosis*.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

La producción de factores de virulencia (enzimas líticas y biopelícula) de las especies del complejo *Candida parapsilosis* se encuentra correlacionada al daño tisular y producción de citocinas en un modelo murino de candidiasis diseminada.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la producción de factores de virulencia de las especies del complejo *Candida parapsilosis*, así como su participación en el daño tisular y producción de citocinas en un modelo murino de candidiasis diseminada.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la producción de enzimas líticas en aislamientos clínicos de las especies del complejo *Candida parapsilosis*.
2. Cuantificar la producción de biopelícula en aislamientos clínicos de las especies del complejo *C. parapsilosis*.
3. Evaluar la patogenicidad de las especies del complejo *C. parapsilosis* en un modelo murino de candidiasis diseminada.
4. Analizar el daño tisular ocasionado por las especies del complejo *C. parapsilosis* en un modelo murino de infección sistémica.
5. Cuantificar la producción de citocinas pro-inflamatorias en un modelo murino de infección sistémica por el complejo *C. parapsilosis*.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental

A partir de una colección de 65 aislamientos clínicos reactivados pertenecientes al complejo *C. parapsilosis* se realizó en una primera etapa el ajuste de inóculos a una misma concentración, con los cuales se llevó a cabo tanto la determinación *in vitro* de enzimas líticas extracelulares como la cuantificación de biopelículas. En base a los resultados obtenidos en esta primera etapa del estudio se seleccionaron dos cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto, dos de *C. orthopsilosis* y dos de *C. metapsilosis*, con las cuales se montó un modelo murino de candidiasis diseminada, con la finalidad de buscar una posible correlación entre los factores de virulencia de las especies del complejo *C. parapsilosis*, el daño tisular, así como la producción de citocinas *in vivo*.

5.2 Aislamientos del complejo *C. parapsilosis*

Se partió de una colección de 65 aislamientos clínicos de *C. parapsilosis* recolectados en un período aproximado de 10 años (1999-2010) en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (C.R.C.E.I.) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Estos aislamientos fueron recientemente incluidos en un estudio previo [68]. Las cepas se sembraron en placas de agar dextrosa de Sabouraud (ADS) (Difco, Detroit, MI, E.U.A.) y se incubaron (Incubadora American Gold Series, modelo IS-81) a 37°C por 24 h. Los aislamientos fueron inicialmente identificados como *C. parapsilosis* utilizando el auxonograma API 20C AUX de la compañía bioMérieux (bioMérieux, México), así como métodos morfológicos estándar (filamentación negativa en suero e incapacidad para generar clamidosporas en agar harina de maíz con Tween 80) y luego fueron identificados a nivel de especie mediante RFLP-BanI (New England *BioLabs* Inc., Ipswich, MA, E.U.A.) acorde a la metodología propuesta por Tavanti *et al.* [14]. Un total de 30 aislamientos fueron obtenidos de sangre. Sin embargo, también se contó con aislamientos procedentes de otros orígenes clínicos tales como: uña (9 aislamientos), piel (8 aislamientos), líquido peritoneal (7 aislamientos), orina (3 aislamientos), lavado bronquial (2 aislamientos) y un aislamiento procedente de fluido espinal, otro de bilis y uno más de secreción ótica. La colección de aislamientos estuvo conformada por 30 aislamientos tanto de *C. parapsilosis* sensu stricto como de *C. orthopsilosis* y cinco aislamientos de *C. metapsilosis*. Las cepas fueron almacenadas como suspensiones celulares en agua destilada estéril a temperatura ambiente y en viales con ADS inclinado a -20°C hasta su utilización.

5.3 Determinación de enzimas líticas

5.3.1 Oxidasa

La actividad de oxidasa se determinó mediante el método de Kovac. Se inoculó una asada de un cultivo joven del organismo en estudio en papel filtro Whatman

(Neumann-Neander-Str., Alemania) impregnado con el sustrato (tetrametil-p-fenilendiamina). La oxidación de este último a indofenol mediado por producción de citocromo-oxidasa se evidencia por la generación de un producto final de color violáceo oscuro en un lapso no mayor de 10 s posteriores a la inoculación. Un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* se utilizó como control positivo.

5.3.2 Catalasa

La actividad de catalasa se evidenció mediante la degradación enzimática del peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua tras inoculación con el organismo de prueba. La cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se utilizó como control positivo.

5.3.3 Ureasa

La actividad de ureasa se ensayó utilizando el medio de urea de Christensen. El medio se encuentra constituido por peptona al 0.1%, glucosa al 0.5%, NaCl al 0.5%, fosfato de potasio al 0.2%, rojo fenol al 0.0012% y agar bacteriológico al 1.4%. Los organismos capaces de hidrolizar la urea generarán amoníaco como subproducto, el cual elevará el pH del medio originando el viraje del indicador de amarillo a fucsia [140]. La cepa de referencia *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 se utilizó como control positivo.

5.3.4 Coagulasa

La actividad de coagulasa se investigó utilizando la prueba en tubo con plasma anticoagulado de conejo (BD BBL, Difco, Detroit, MI, E.U.A.). La presencia de la enzima inducirá la formación de coágulos en el plasma tras 4 h de incubación a 35°C en

condiciones de aerobiosis. La cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 se utilizó como control positivo.

5.3.5 Gelatinasa

La actividad de gelatinasa se evaluó utilizando medio gelatina nutritiva al 10% (Bioxon, Difco, Detroit, MI, E.U.A.). La licuefacción de la gelatina tras tres semanas de incubación a 30°C se considera un resultado positivo [140]. Un aislamiento ambiental de *Pseudallescheria boydii* se utilizó como control positivo.

5.3.6 DNasa

La actividad de DNasa se estudió con ayuda del medio comercial de prueba con verde de metileno (Difco, Detroit, MI, E.U.A.). La presencia de un halo incoloro alrededor del sitio de inoculación tras 24 h de incubación a 37°C es indicativo de actividad DNasa. La cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 se utilizó como control positivo.

5.3.7 Proteinasa aspártica

La actividad de proteinasa aspártica se ensayó utilizando el medio de prueba YCB-BSA. Para la elaboración de dicho medio, se preparó primero una solución acuosa de carbón base de levadura (Difco, Detroit, MI, E.U.A.) al 1.17%, extracto de levadura (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0.01% y albúmina sérica bovina (Bio Basic Inc., Markham, Ontario, Canadá) al 0.2%, se ajustó a un pH de 5.0, se esterilizó por filtración y finalmente se añadió a una solución estéril y atemperada de agar al 1.5%. La escisión de la albúmina sérica bovina mediada por la proteinasa aspártica resulta en un halo claro

que es detectado mediante tinción con amido black (Bio Basic Inc., Markham, Ontario, Canadá) al 1% [141].

5.3.8 Fosfolipasa

La actividad de fosfolipasa se evaluó utilizando como medio base ADS suplementado con glucosa al 3%, NaCl 1M y CaCl₂ 5 mM. Esta solución se esterilizó en autoclave y posteriormente se le añadió 8% de emulsión estéril de yema de huevo (Difco, D.F., México). La actividad de fosfolipasa produce una zona densa de precipitación alrededor de la colonia que expresa tal enzima [43].

5.3.9 Esterasa

La actividad esterasa se determinó utilizando el medio de prueba de opacidad Tween 80, preparado con 10 g de Bacto Peptona (Difco, Detroit, MI, E.U.A.), 5g de NaCl, 0.1 g de CaCl₂ y 15 g de agar en 1 L de agua destilada (pH ajustado a 6.8), la solución resultante se esterilizó en autoclave y finalmente se le adicionaron 5 ml de Tween 80 (Sigma-Aldrich, México) al medio atemperado. Las enzimas lipolíticas hidrolizan el medio de prueba, liberando ácidos grasos, los cuales se unen después al calcio, formando un halo de precipitación alrededor de las colonias que producen esta enzima [142, 143].

5.4.0 Hemolisina

La actividad hemolítica se examinó utilizando el método previamente descrito por Luo *et al.*, empleando ADS suplementado con glucosa al 3% y sangre humana al

7%. La presencia de un halo translúcido alrededor de la colonia que expresa esta enzima indica una actividad hemolítica positiva [144].

Las actividades enzimáticas de proteinasa aspártica, fosfolipasa, esterasa y hemolisina se determinaron mediante ensayos en placa con cada medio de prueba específico (10 ml de medio en placas Petri de 90-mm). Se inoculó una alícuota de 5 μ l de suspensión de levaduras (10^7 UFC/ml) en cada medio, excepto para los ensayos de hemolisina, en los cuales se inoculaban alícuotas de 10 μ l. Las placas fueron incubadas a 37°C por 2, 5, 7 y 10 días para los ensayos de hemolisina, fosfolipasa, proteinasa aspártica y esterasa, respectivamente. La actividad enzimática se expresó de acuerdo al índice Pz, el cual corresponde a la razón entre el diámetro colonial y el diámetro total de la colonia más el halo de lisis o precipitación. Se establecieron los siguientes rangos de actividad con base en el índice Pz: muy fuerte, $Pz < 0.69$; fuerte, $Pz = 0.70-0.79$; moderada, $Pz = 0.80-0.89$; débil, $Pz = 0.90-0.99$; y negativa, $Pz = 1$ [145]. La cepa de referencia *Candida albicans* ATCC 90028 se utilizó como control de calidad en todas las determinaciones enzimáticas. Los ensayos se efectuaron por duplicado.

5.4 Cuantificación de biopelícula

5.4.1 Inducción y cuantificación de biopelícula

Las condiciones de crecimiento y formación de biopelícula tanto para la técnica de tinción con cristal violeta como reducción de XTT fueron las establecidas en la metodología descrita por Melo *et al.* [146]. Las cepas se cultivaron en ADS a 37°C por 24 h y una colonia de cada cepa fue posteriormente sub-cultivada en caldo RPMI 1640

adicionado con L-glutamina (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, E.U.A.) a 37°C por 18 h a 120-200 rpm. Las células se cosecharon, se lavaron por duplicado en solución salina amortiguada de fosfatos (PBS) 10 mM y se ajustaron a una concentración de 1×10^7 células/ml en medio RPMI 1640. A continuación, una alícuota de 100 μ l de cada suspensión celular se transfirió a una placa estéril de poliestireno Corning Costar 9018 de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning Incorporated, NY, E.U.A.).

Las placas se incubaron a 37°C por 1.5 h a 75 rpm, los pocillos se lavaron con 150 μ L de PBS 1x y luego se adicionaron 100 μ l de medio RPMI 1640 fresco a cada pozo. Las placas finalmente se incubaron a 37°C por 72 h a 75 rpm para permitir el crecimiento de la biopelícula. El medio de prueba sin células se añadió en el último pozo de cada placa como control negativo.

Para determinar la masa celular participante en la formación de biopelículas se efectuó el ensayo de tinción con cristal violeta. Brevemente, después de la etapa de formación de biopelícula cada pocillo se lavó por duplicado con 200 μ l de PBS 1x y las placas se secaron a 37°C por 20 min en incubadora. Las biopelículas lavadas se tiñeron con 110 μ l de cristal violeta acuoso al 0.4% por 45 min. Posteriormente, los pocillos se lavaron por triplicado con 200 μ l de agua destilada estéril y luego se decoloraron con 200 μ l de etanol al 95%. Después de 45 min, se transfirieron 100 μ l de la solución de decoloración de cada pocillo a una nueva placa y se midió espectrofotométricamente en un lector de placas a 595 nm. Los valores de densidad óptica (DO) de los controles negativos se sustrajeron de los valores obtenidos de los pocillos con muestra con el objetivo de eliminar la interferencia de fondo. Por otra parte, la actividad metabólica de

las biopelículas se determinó con el ensayo de reducción de la sal de tetrazolium XTT (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino)-carbonil-2H-tetrazolium) (Sigma, St Louis, MO, E.U.A.). Después de la formación de biopelículas, los pocillos de las microplacas se lavaron por duplicado con 200 μ l de PBS 1x y enseguida se adicionó a cada pozo 200 μ l de PBS 1x y 12 μ l de una solución XTT-menadiona. La solución XTT-menadiona se preparó previo a la determinación añadiendo 1.5 ml de XTT 1 mg/ml de solución salina a 300 μ l de una solución acetónica de menadiona 0.4 mM (Sigma, St Louis, MO, E.U.A.). Las placas se incubaron a 37°C en total oscuridad por 5 h. Posteriormente, 100 μ l de cada solución de reacción se transfirieron a una nueva placa y la concentración del producto de formazán generado se determinó espectrofotométricamente a 490 nm. Los valores de DO de los controles negativos se sustrajeron de los valores obtenidos de las muestras. La cantidad de biopelícula formada por cada cepa se categorizó como elevada ($DO_{490} \geq 0.1$), baja ($0.025 \leq DO_{490} < 0.1$) o nula ($DO_{490} < 0.025$) acorde al criterio establecido por Pannanusorn *et al.* [147]. Las determinaciones de biopelícula se efectuaron por duplicado en dos ocasiones independientes, con dos replicados técnicos cada ocasión.

5.4.2 Amplificación y secuenciación del gen *BCR1*

La extracción de ADN genómico de cada aislamiento clínico se realizó mediante el método de lisis enzimática y CTAB con lisozima (Biotech, Bio Basic, Inc., Ontario, Toronto, Canadá) y proteinasa K (Bioline USA Inc., Taunton, MA, E.U.A.) [148]. Brevemente, cuatro colonias de un cultivo joven se resuspendieron en solución de “lisis enzimática” y se incubó a 37°C por 2 h. Se añadió TE 1x con SDS 1% y proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó por 1 h a 55°C. Posterior a esto se añadió fenol saturado,

SEVAG y TE 1x, se mezcló por inversión por 5 min y se centrifugó 8 min a 14,000 rpm. Este último paso se repitió dos veces. Se recuperó la fase acuosa, se añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitando al menos 20 min a -20°C. Luego se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm y el sedimento se lavó con etanol al 70% en dos ocasiones. Posteriormente se dejó secando toda la noche para finalmente resuspenderlo en agua libre de nucleasas. El ADN genómico total se trató con RNasa I (Invitrogen, E.U.A.) por 30 min a 37°C para remover trazas de ARN y la calidad e integridad se evaluaron por estándares fotométricos y métodos electroforéticos, respectivamente.

Con el objetivo de amplificar el gen *BCR1* de *C. parapsilosis* se diseñaron iniciadores consenso (*sentido* 5'-AAA ACA CAC YGG TGA ACG AC-3' y *anti-sentido* 5'-TCA CTC ATK GCT GAT CTT GG-3') (IDT, E.U.A.) con base en secuencias altamente conservadas previamente reportadas para *C. parapsilosis* sensu stricto (número de acceso: HE605206) y *C. orthopsilosis* (número de acceso: HE681722) en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y utilizando la herramienta en línea "primer-3" (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). El juego de iniciadores se utilizó a 5 µM y el kit comercial PCR master mix de Promega (Madison, WI, E.U.A.). La reacción de amplificación se diseñó para un volumen final de 25 µl y se llevó a cabo en el termociclador de punto final Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, E.U.A.). Los parámetros de ciclado estandarizados fueron los siguientes: 1 paso de desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, 42 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 57°C, 90 s a 72°C y finalmente un paso de elongación de 6 min a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV (UVP

BioImaging Systems. EpiChemi 3 Darkroom UVP Inc., Upland, CA, E.U.A.). Los amplicones fueron secuenciados utilizando el kit commercial Big Dye terminator cycle versión 3.1 usando los mismos iniciadores. Las reacciones fueron analizadas en el ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer utilizando el programa Sequencing Analysis Software versión 5.3 de Applied Biosystems. Las secuencias obtenidas de cada aislamiento fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL-W y GeneStudio Pro (GeneStudio, Inc., Suwanee, GA, E.U.A.), seguido por correcciones manuales en caso de ser necesarias. Las secuencias fueron luego anotadas utilizando el software Sequin del NCBI y las secuencias nucleotídicas se depositaron en la base de datos de GenBank bajo los siguientes números de acceso: KJ610843 a KJ610856.

5.5 Evaluación de patogenicidad *in vivo*

5.5.1 Declaración de Ética

El protocolo experimental se diseñó en conformidad con las regulaciones internacionales del Consejo de Revisión, siguiendo las recomendaciones de las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, así como de las Buenas Prácticas de Laboratorio. El cuidado, mantenimiento y manejo de los animales se encontró acorde con las regulaciones mexicanas para la experimentación animal (NOM-062-ZOO-1999).

5.5.2 Animales

Se emplearon ratones machos BALB/c de 5 semanas de edad (22-24 g de peso promedio), obtenidos de Harlan (Harlan, México). Se utilizó un total de 132 animales, los cuales se alojaron aleatorizadamente por grupos de 5 ratones en cajas ventiladas bajo

condiciones específicas libres de patógenos en el bioterio del Departamento de Microbiología (Microbiología Experimental). A todos los ratones se les ofreció agua y alimento balanceado para roedor Purina estériles *ad libitum*. El ciclo luz/oscuridad al cual fueron expuestos los animales fue de 12 h/12 h, respectivamente. Antes de utilizarse experimentalmente, se permitió que los roedores se aclimataran por 5 días posteriores a su llegada al bioterio.

5.5.3 Infección experimental

Para la preparación de los inóculos de infección, las seis cepas seleccionadas se pasaron al menos dos veces en ADS para verificar tanto su pureza como viabilidad. Después de 48 h de incubación a 37°C las levaduras se cosecharon, lavaron por duplicado en agua destilada estéril, se cuantificaron en hemacitómetro y finalmente se ajustaron a una concentración de 1.5×10^7 UFC/ratón. Las cuentas celulares se corroboraron efectuando diluciones seriadas de cada inóculo, las cuales posteriormente se sembraron en ADS a 37°C por 48 h. Una vez preparados y corroborados los inóculos de trabajo, se procedió a la inmovilización y vasodilatación térmica de cada animal (**Figura 8**). La candidiasis sistémica fue entonces inducida experimentalmente en los ratones por inyección de 200 µl de inóculo a través de la vena caudal lateral de la cola, en grupos de veinte animales por cepa ensayada. Tres ratones sin infección se utilizaron como controles por día experimental establecido, a los cuales se les administraron 200 µl de solución salina estéril. Los animales no fueron sometidos a ningún esquema inmunosupresor a lo largo del estudio y fueron monitoreados diariamente por 15 días en busca de signos clínicos sugerentes de estrés, tales como: disminución en el consumo de

agua y alimento, pérdida de peso, aislamiento auto-impuesto, hiperpnea, hiperventilación, movimiento incrementado/disminuido, posturas anormales, deshidratación, contracciones nerviosas (tics), temblor y temer. Aquellos ratones que exhibieran signos de estrés, acompañados de cualquiera de los siguientes: deterioro de la deambulación (incapacidad para alcanzar agua y alimento), evidencia de atrofia muscular y/o signos de demacración, letargia (somnia, aversión a la actividad, ausencia del estado de alerta física o mental), anorexia prolongada, disnea y trastornos neurológicos, se definieron como animales moribundos [149] y se procedió a su sacrificio.

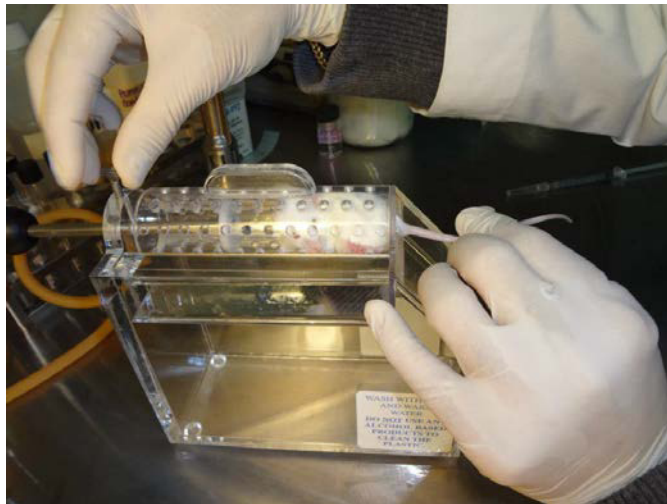


Figura 8. Inmovilización animal en dispositivo aireado especial que permite la libre manipulación de la cola del roedor.

5.5.4 Carga fúngica tisular

Cinco ratones por cepa se sacrificaron mediante dislocación cervical (minimizando al máximo el sufrimiento animal) los días 2, 5, 10 y 15 posteriores al reto intravenoso. Después del sacrificio, el bazo, los riñones, el hígado y los pulmones de cada ratón fueron inmediatamente removidos quirúrgicamente de manera aséptica, pesados y colocados en 2.5 ml de PBS 10 mM pH 7.2-7.4 estéril. Los órganos fueron homogenizados mecánicamente (Polytron-Aggregate, Kinematica) y diluidos de manera seriada 1:10 en solución salina estéril. Posteriormente alícuotas de 0.1 ml de los homogenizados tisulares concentrados y las respectivas diluciones se sembraron por duplicado en ADS y la cuenta colonial se efectuó pasadas 48 h de incubación a 37°C. La esplenomegalia fue monitoreada en cada punto de tiempo establecido durante el curso del estudio por medición del largo, ancho y alto de los bazos con la escala de un Vernier estéril y aplicando la fórmula matemática para el cálculo del volumen de una elipse (Volumen esplénico (cm³) = [π (largo x ancho x alto)]/6). El experimento *in vivo* completo se realizó por duplicado en diferentes tiempos.

5.6 Análisis histopatológico

Después del sacrificio de los ratones, los tejidos de interés (bazo, riñón, hígado y pulmón) fueron inmediatamente removidos y fijados por inmersión en formalina amortiguada al 10%. Las muestras se trataron acorde a la técnica histológica hasta la obtención de bloques de parafina, con los cuales se realizaron cortes seriados de 5 μ m de grosor, para realizar tinción de rutina con hematoxilina y eosina (H-E), histoquímica con

la técnica del reactivo de ácido periódico de Schiff (PAS) (Sigma, México) e impregnación auroargéntica con plata de metenamina de Grocott. El análisis de las preparaciones se llevó a cabo por microscopía de luz bajo un diseño de ciego simple con apoyo de un morfológico [150].

5.7 Determinación de citocinas

Se cuantificaron cuatro citocinas murinas en los sobrenadantes de los homogenizados tisulares de bazo, riñón y pulmón. Las citocinas ensayadas fueron: TNF- α , IFN- γ , IL-17A e IL-22. Las determinaciones se llevaron a cabo por inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para TNF- α (PeproTech, D.F., Mexico. Lot# 0712054), IFN- γ (PeproTech, D.F., Mexico. Lot# 0308098), IL-17A (eBioscience, San Diego, CA, E.U.A. Lot# E09521-1633) e IL-22 (eBioscience, San Diego, CA, E.U.A. Lot# E11283-1633). Una vez llevado el procesamiento de las muestras para cada citocina, las placas de ELISA fueron colocadas en el lector de microplacas iMark (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, E.U.A.) para determinar la absorbancia a 415 nm y a 655 nm. Cada muestra se analizó por duplicado.

5.8 Análisis estadístico

Con respecto a los resultados de los perfiles enzimáticos obtenidos, estos se compararon entre las especies del complejo *C. parapsilosis*, así como también con el origen clínico de los aislamientos utilizando la prueba de Chi-cuadrada. Por otra parte,

los promedios de los valores de DO obtenidos por ambos métodos de cuantificación de biopelícula fueron comparados mediante un prueba *T* de Student, mientras que la categorización como alta, baja o nula producción de biopelículas se comparó entre las especies del complejo *C. parapsilosis*, así como con la procedencia clínica de los aislamientos y las variantes genéticas de *BCR1* encontradas por medio de la prueba Chi-cuadrada.

La carga fúngica tisular de los órganos estudiados en los diferentes grupos experimentales, así como los resultados de las determinaciones de citocinas se analizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. En el caso de las determinaciones de citocinas se utilizó además la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's. Se efectuaron adicionalmente correlaciones de Pearson entre la esplenomegalia y la carga fúngica con los niveles locales de las citocinas determinadas. Tanto las gráficas presentadas en este trabajo como la totalidad de los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.03 para Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, E.U.A.). Solamente aquellos valores de $P \leq 0.05$ se consideraron significantes.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Determinación de enzimas líticas

La totalidad de las cepas analizadas en el presente estudio mostró una ligera actividad de catalasa y nula producción de oxidasa, coagulasa, ureasa, gelatinasa y DNasa indistintamente de la especie probada. Con respecto a la producción de las enzimas líticas extracelulares: proteinasa aspártica, fosfolipasa, esterasa y hemolisina, los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la **Tabla 1** y se muestran de manera representativa en la **Figura 9**. Aunque el 83% del total de los aislamientos probados no mostró actividad de proteinasa aspártica, un 17%, 7% y 60% de los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron productores importantes de proteinasa aspártica, respectivamente. Casi todos los aislamientos de *C. orthopsilosis* (97%) y *C. metapsilosis* (80%) exhibieron actividad fosfolipasa, mientras que sólo el 63% de los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto produjeron esta enzima. De manera similar, sólo el 13% de los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto mostraron actividad esterasa, comparada con el 67% de *C. orthopsilosis*. En contraste, todos los aislamientos de *C. metapsilosis* fueron negativos para la actividad lipolítica de esta enzima. Finalmente, el 67%, 87% y 80% de los aislamientos de *C.*

parapsilosis sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* produjeron hemolisina, respectivamente. En resumen, se encontraron diferencias significativas entre las especies que conforman el complejo *C. parapsilosis* en relación a la producción de productos extracelulares.

Tabla 1. Perfiles enzimáticos globales de los aislamientos clínicos incluidos en este trabajo.

Actividad enzimática	Índice Pz	No. de cepas de acuerdo al Índice Pz ^a		
		<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (n = 30)	<i>C. orthopsilosis</i> (n = 30)	<i>C. metapsilosis</i> (n = 5)
Aspartil proteinasa				
Muy fuerte	< 0.69	5	2	3
Fuerte	0.70-0.79	0	1	0
Moderada	0.80-0.89	0	0	0
Débil	0.90-0.99	0	0	0
Negativa	1.0	25	27	2
Fosfolipasa				
Muy fuerte	< 0.69	3	20	0
Fuerte	0.70-0.79	10	5	1
Moderada	0.80-0.89	6	4	3
Débil	0.90-0.99	0	0	0
Negativa	1.0	11	1	1
Esterasa				
Muy fuerte	< 0.69	4	20	0
Fuerte	0.70-0.79	0	0	0
Moderada	0.80-0.89	0	0	0
Débil	0.90-0.99	0	0	0
Negativa	1.0	26	10	5
Hemolisina				
Muy fuerte	< 0.69	0	0	0
Fuerte	0.70-0.79	9	15	3
Moderada	0.80-0.89	10	11	1
Débil	0.90-0.99	1	0	0
Negativa	1.0	10	4	1

^aÍndice Pz: diámetro colonial/diámetro total de la colonia más la zona de precipitación o halo.

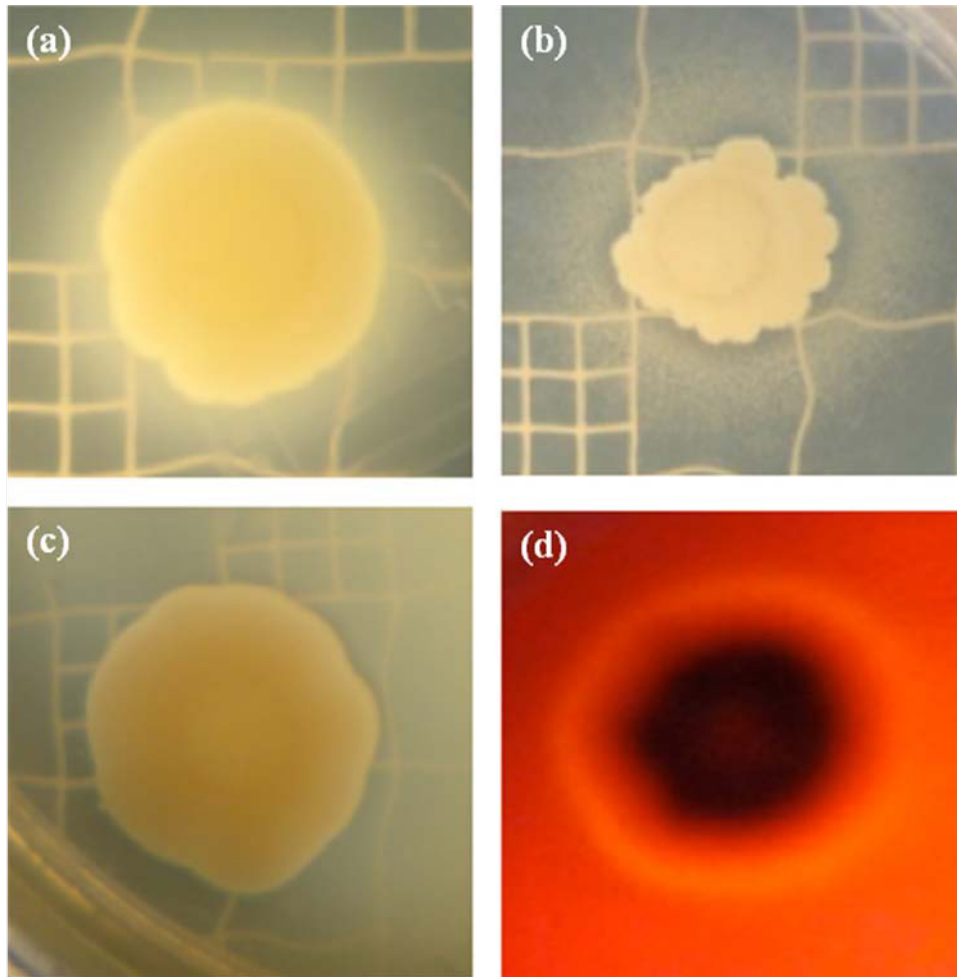


Figura 9. Evaluación *in vitro* de la actividad fosfolipasa (a), esterasa (b), aspartil proteínasa (c) y hemolítica (d) de los aislamientos incluidos en este trabajo.

Los aislamientos de *C. orthopsilosis* se asociaron estadísticamente con la producción de hemolisinas ($P = 0.048$) y fosfolipasas ($P < 0.0001$) en comparación con los aislamientos de *C. parapsilosis sensu stricto* y *C. metapsilosis*. Adicionalmente y de manera interesante, se encontró una asociación estadística entre el origen clínico de los aislamientos, particularmente aquellos provenientes de sangre y la producción de fosfolipasa ($P = 0.017$); es decir, 9/30 aislamientos (30%) de *C. parapsilosis sensu*

stricto, 20/30 aislamientos (67%) de *C. orthopsilosis* y 1/5 aislamientos (20%) de *C. metapsilosis*.

6.2 Cuantificación de biopelícula

La determinación de biopelícula se llevó a cabo por el método de tinción con cristal violeta, así como por la técnica de reducción de sales de XTT (actividad metabólica). Los valores de DO se expresaron como promedio \pm desviación estándar (DE) para cada grupo de datos determinado. La cuantificación de biopelícula por tinción con cristal violeta se muestra en la **Figura 10 (a)**. En este ensayo, el valor promedio de DO₅₉₅ y rango de cada especie fue el siguiente: *C. parapsilosis* sensu stricto, 0.121 (DE \pm 0.124) con un rango de 0.014-0.571; *C. orthopsilosis*, 0.082 (DE \pm 0.076) con un rango de 0.006-0.293; *C. metapsilosis*, 0.077 (DE \pm 0.068) con un rango de 0.013-0.175. *C. parapsilosis* sensu stricto mostró la producción más alta de biopelícula con base en la técnica de tinción con cristal violeta.

La **Figura 10 (b)** representa la actividad metabólica de biopelícula de los aislamientos analizados. En este ensayo el valor promedio de DO₄₉₀ y rango de cada especie fue el siguiente: *C. parapsilosis* sensu stricto, 0.075 (DE \pm 0.045) con un rango de 0.028-0.247; *C. orthopsilosis*, 0.092 (DE \pm 0.054) con un rango de 0.014-0.235; *C. metapsilosis*, 0.076 (DE \pm 0.035) con un rango de 0.049-0.135. *C. orthopsilosis* mostró la producción más alta de biopelícula con base en la técnica de reducción de XTT. Adicionalmente, conforme al criterio establecido por Pannanusorn *et al.* [147], 62 aislamientos (95.4%) produjeron biopelícula, 26.2% fueron altos productores, mientras

que el 69.2% se categorizaron como bajos productores. En general, *C. orthopsilosis* fue predominantemente un alto productor de biopelícula (40%), mientras que *C. parapsilosis* sensu stricto fue principalmente un bajo productor de biopelícula (86.7%). El fenotipo no-productor de biopelícula se detectó sólo en 3 aislamientos de *C. orthopsilosis* (4.6%) (**Tabla 2**). *C. parapsilosis* sensu stricto se asoció estadísticamente con la baja producción de biopelícula ($P= 0.0108$), mientras que *C. orthopsilosis* estadísticamente se asoció tanto con alta como con baja producción de la misma ($P= 0.0386$ y $P= 0.0045$, respectivamente).

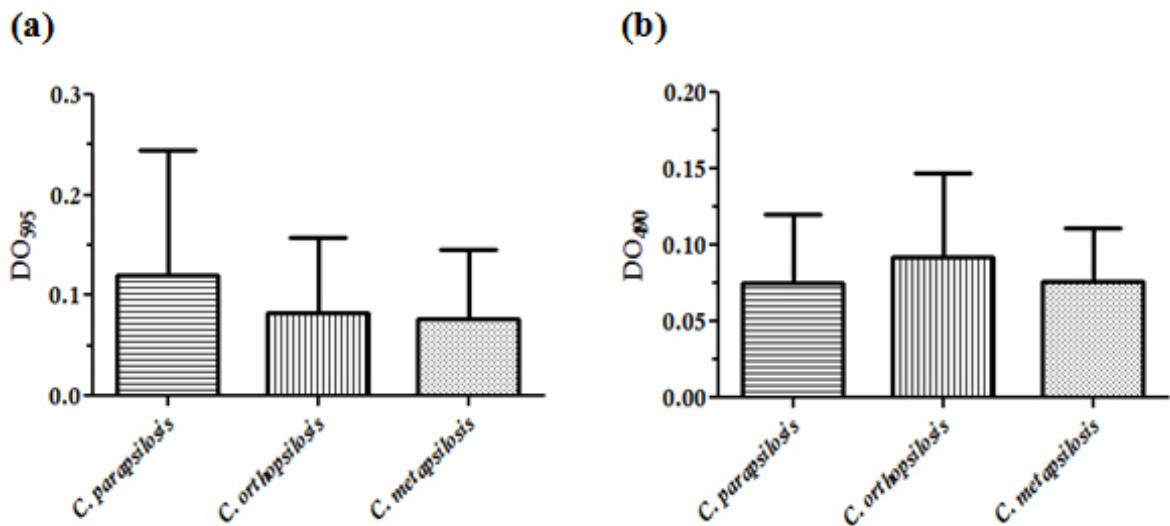


Figura 10. Cuantificación de biopelícula en aislamientos clínicos de *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* por tinción con cristal violeta (a) y actividad metabólica (b). Las barras representan el valor promedio de DO de cada grupo.

Tabla 2. Categorización de la producción de biopelícula de aislamientos del complejo *C. parapsilosis* evaluados en base a su actividad metabólica.

Especie (n)	No. de aislamientos por fenotipo (%):		
	Altos productores	Bajos productores	Productores nulos
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (30)	4 (13.3)	26 (86.7)*	0 (0)
<i>C. orthopsilosis</i> (30)	12 (40)*	15 (50)*	3 (10)
<i>C. metapsilosis</i> (5)	1 (20)	4 (80)	0 (0)
Total (65)	17 (26.2)	45 (69.2)	3 (4.6)

*Asociación estadística ($P \leq 0.05$)

Todos los ADNs extraídos se encontraron bajo los estándares de calidad y cantidad adecuados para su empleo en PCR. El juego de iniciadores consenso diseñados amplificó un segmento del gen *BCRI*, los amplicones incluyeron un segmento de exón e intrón. De todos los aislamientos analizados se generó un producto de PCR. El análisis de la secuencia nucleotídica de los amplicones correspondió al gen *BCRI* previamente reportado en el análisis de BLAST, estas secuencias mostraron variabilidad genética entre las especies analizadas. Se detectó un total de ocho variantes genéticas (designadas como: Co-1 a 8) en *C. orthopsilosis* con tamaños comprendidos entre 913 y 1,025 pb, mientras que *C. metapsilosis* presentó dos distintos genotipos, uno de 872 pb (Cm-1) y otro de 984 pb (Cm-2); además, no se detectó variabilidad genética en *C. parapsilosis* sensu stricto, quien amplificó un producto de aproximadamente 872 pb (Cp-1).

En las secuencias obtenidas se localizó la sección correspondiente al exón y se alineó, de aquí se dedujo el marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en Inglés) y se alineó también. Con base en el análisis del exón de *BCRI*, la secuencia de *C. parapsilosis* ATCC 22019 fue idéntica a todas las cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto

(Cp-1). Además, la secuencia de *C. metapsilosis* ATCC 96144 fue la misma para Cm-2 y 68.14% similar respecto a Cm-1, la cual es igual a las cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto. Por otra parte, el exón de *BCRI* de *C. orthopsilosis* ATCC 96139 fue idéntico al de las cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto y conservó una homología del 60.14% al 79.45% con respecto a las ocho variantes genéticas encontradas de *C. orthopsilosis* (Co-1 to 8). Finalmente, la variante más frecuentemente del exón *BCRI* analizado en el complejo *C. parapsilosis*, con 49.2% (32 aislamientos) fue la compartida por *C. parapsilosis* ATCC 22019, Cp-1, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y Cm-1, la cual a su vez es idéntica al depósito del GenBank HE605206 (*C. parapsilosis* strain CDC317). No se encontraron asociaciones estadísticas entre variantes del exón analizado del gen *BCRI* y fenotipos formadores de biopelícula de los aislamientos estudiados.

6.3 Evaluación de patogenicidad *in vivo*

Las cepas utilizadas en el estudio *in vivo* fueron elegidas en base a sus actividades *in vitro* de proteinasa aspártica, fosfolipasa, esterasa y hemolisina, y correspondieron a dos cepas de cada una de las siguientes especies: *C. parapsilosis* sensu stricto (c/c 105 y H-124), *C. orthopsilosis* (HP-179 y H-152) y *C. metapsilosis* (MEX-18 y ATCC (*American Type Culture Collection*)-96144). Detalles particulares de las cepas respecto a su caracterización fenotípica en base a sus respectivos perfiles enzimáticos se encuentran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Perfiles enzimáticos de las cepas utilizadas en los estudios *in vivo*.

Cepa	No. de GenBank	Origen clínico	Índice Pz ^a			
			Aspartil proteínasa	Fosfolipasa	Esterasa	Hemolisina
<i>C. parapsilosis</i> c/c 105	KC777378	Líquido peritoneal	1	0.77	0.53	0.73
H-124	KC777379	Sangre	1	1	1	1
<i>C. orthopsilosis</i> HP-179	KC777377	Sangre	1	0.68	0.56	0.75
H-152	KC777376	Sangre	0.70	1	1	1
<i>C. metapsilosis</i> M-18	KC777375	Piel	0.44	0.79	1	0.77
ATCC 96144	KC777380	Piel	1	0.80	1	1

^aÍndice Pz: muy fuerte, Pz < 0.69; fuerte, Pz = 0.70-0.79; moderada, Pz = 0.80-0.89; débil, Pz = 0.90-0.99; negativa, Pz = 1

Los resultados de carga fúngica tisular se resumen en la **Tabla 4**. Durante el transcurso de la infección los ratones no mostraron pérdida considerable de peso, ni manifestaron desórdenes oculares o de alteración motora. Sin embargo, esporádicamente se detectaron breves e intermitentes episodios de ligera pilo-erección en los animales, principalmente durante los primeros cinco días posteriores al reto intravenoso. Ningún ratón sucumbió producto de la infección. En general, la carga fúngica más alta de las seis cepas analizadas *in vivo* se encontró en riñón, seguida de bazo, pulmones y finalmente hígado en los cuatro días experimentales establecidos. La carga fúngica tendió a disminuir para el día 15 post-infección en todos los grupos de estudio. En el día 2, la carga fúngica de los riñones fue estadísticamente significativa en comparación con la del hígado y los pulmones, excepto para la cepa H-152. Por otra parte, la carga fúngica de los riñones fue significativa comparada con la del bazo, hígado y los pulmones para el día 5, excepto en las cepas H-152 y ATCC 96144.

Tabla 4. Carga fúngica tisular en ratones infectados sistémicamente con inóculos de 1.5×10^7 UFC/ratón.

Cepa (No. acceso GenBank)	Órgano	Log UFC/g tejido (mediana [rango])			
		Días post-infección			
		2	5	10	15
<i>C. parapsilosis</i>					
c/c 105 (KC777378)	Bazo	5.45 (5.28-5.57)	3.54 (3.45-3.91)	2.89 (0-3.08)	2.51 (0-2.83)
	Riñón	5.30 (5.23-5.54)	4.15 (3.89-4.28)	2.46 (0-5.04)	2.32 (2.18-3.20)
	Hígado	4.72 (4.53-4.86)	2.43 (2.06-2.68)	1.40 (0-1.63)	1.67 (0-1.90)
	Pulmón	4.23 (4.08-4.34)	3.11 (2.65-3.20)	2.15 (0-2.30)	2.20 (0-2.53)
H-124 (KC777379)	Bazo	5.23 (5.11-5.38)	3.93 (3.71-4.26)	3.08 (2.43-3.59)	3.04 (2.43-3.28)
	Riñón	5.20 (5.11-5.49)	4.28 (4.23-4.56)	4.63 (3.52-5.23)	4.83 (4.11-5.36)
	Hígado	3.97 (3.86-4.26)	2.79 (2.75-3.15)	1.77 (1.34-2.00)	1.93 (1.72-2.52)
	Pulmón	4.36 (4.11-4.40)	3.46 (3.28-3.66)	2.72 (2.32-3.53)	3.23 (2.53-3.91)
<i>C. orthopsilosis</i>					
HP-179 (KC777377)	Bazo	5.40 (5.30-5.54)	3.56 (3.18-3.72)	2.83 (2.72-3.28)	0 (0-2.36)
	Riñón	5.46 (5.40-5.54)	3.99 (3.72-4.08)	3.64 (3.08-4.08)	3.82 (2.67-4.54)
	Hígado	4.67 (4.40-4.78)	2.53 (2.52-2.78)	1.41 (0-1.89)	0 (0-1.78)
	Pulmón	4.73 (4.41-4.94)	3.26 (3.11-3.38)	2.53 (2.36-2.68)	2.15 (0-2.89)
H-152 (KC777376)	Bazo	5.43 (5.08-5.45)	3.81 (3.62-4.00)	2.57 (2.34-2.75)	2.57 (0-2.90)
	Riñón	5.15 (5.04-5.20)	4.52 (4.26-5.15)	4.48 (4.28-5.23)	4.38 (3.91-4.86)
	Hígado	5.15 (5.04-5.20)	3.34 (3.23-3.52)	1.89 (1.32-3.04)	1.41 (0-1.51)
	Pulmón	4.97 (4.80-5.23)	3.76 (3.51-4.04)	2.28 (0-2.81)	2.49 (0-3.11)
<i>C. metapsilosis</i>					
M-18 (KC777375)	Bazo	5.00 (4.83-5.15)	3.63 (3.34-3.72)	2.76 (2.66-3.08)	2.18 (0-2.26)
	Riñón	5.11 (5.04-5.18)	4.40 (4.26-4.56)	4.48 (4.34-5.11)	3.34 (0-4.71)
	Hígado	4.04 (3.79-4.11)	2.62 (2.48-3.04)	2.11 (1.86-2.81)	1.30 (0-1.61)
	Pulmón	4.58 (4.45-5.15)	3.28 (3.23-3.59)	3.00 (2.38-3.20)	2.26 (0-2.91)
ATCC 96144 (KC777380)	Bazo	5.11 (4.85-5.32)	3.68 (2.87-3.98)	2.58 (2.45-3.15)	2.65 (0-3.38)
	Riñón	5.00 (4.26-5.11)	4.11 (3.46-4.43)	4.11 (3.30-5.11)	4.36 (3.69-5.38)
	Hígado	4.41 (4.11-4.46)	2.81 (2.18-3.08)	1.88 (1.83-3.23)	2.11 (1.38-3.77)
	Pulmón	4.34 (3.46-4.40)	3.54 (2.86-3.79)	2.68 (2.40-2.73)	2.58 (2.18-2.85)

6.4 Análisis histopatológico

Durante el transcurso de las infecciones, no se detectaron alteraciones histológicas aparentes en bazo y pulmón comparado con los ratones control. Sin embargo, en el bazo, la presencia de levaduras aisladas cerca de las células de los cordones de Billroth y en los sinusoides de la pulpa roja fue evidente, especialmente en el día 2 posterior al reto intravenoso (**Figura 11**). No se encontró evidencia de estructuras fúngicas en los pulmones de los ratones infectados, así como tampoco en los tabiques inter-alveolares y la lámina propia de los bronquiolos (**Figura 12**). En el hígado se encontraron focos aislados de infiltrado de neutrófilos en el tejido conectivo de los espacios porta y entre los sinusoides desde el día 2 y con leve incremento hacia el día 15, con presencia de células PAS positivas sugerentes de levaduras en la pared de sinusoides y algunas otras en la periferia de los hepatocitos (**Figura 13**). Por otra parte, se detectaron abundantes células de levadura en los riñones desde el día 2 posterior a la infección sistémica, principalmente en el intersticio renal, y estas tendieron a decrecer gradualmente para el día 15 (**Figura 14**). Adicionalmente, la presencia de focos de infiltrado inflamatorio agudo rodeando a las levaduras en el riñón fue evidente los días 5 y 10 posteriores al reto (**Tabla 5**). A diferencia del bazo, pulmón e hígado, los riñones de los ratones infectados mostraron ciertas alteraciones histopatológicas particulares, siendo la retracción glomerular y la destrucción evidente de túbulos renales los principales hallazgos encontrados comparando con los controles sin infección, detectándose desde el día 2 posterior al reto (**Figuras 14, 15 y Tabla 5**).

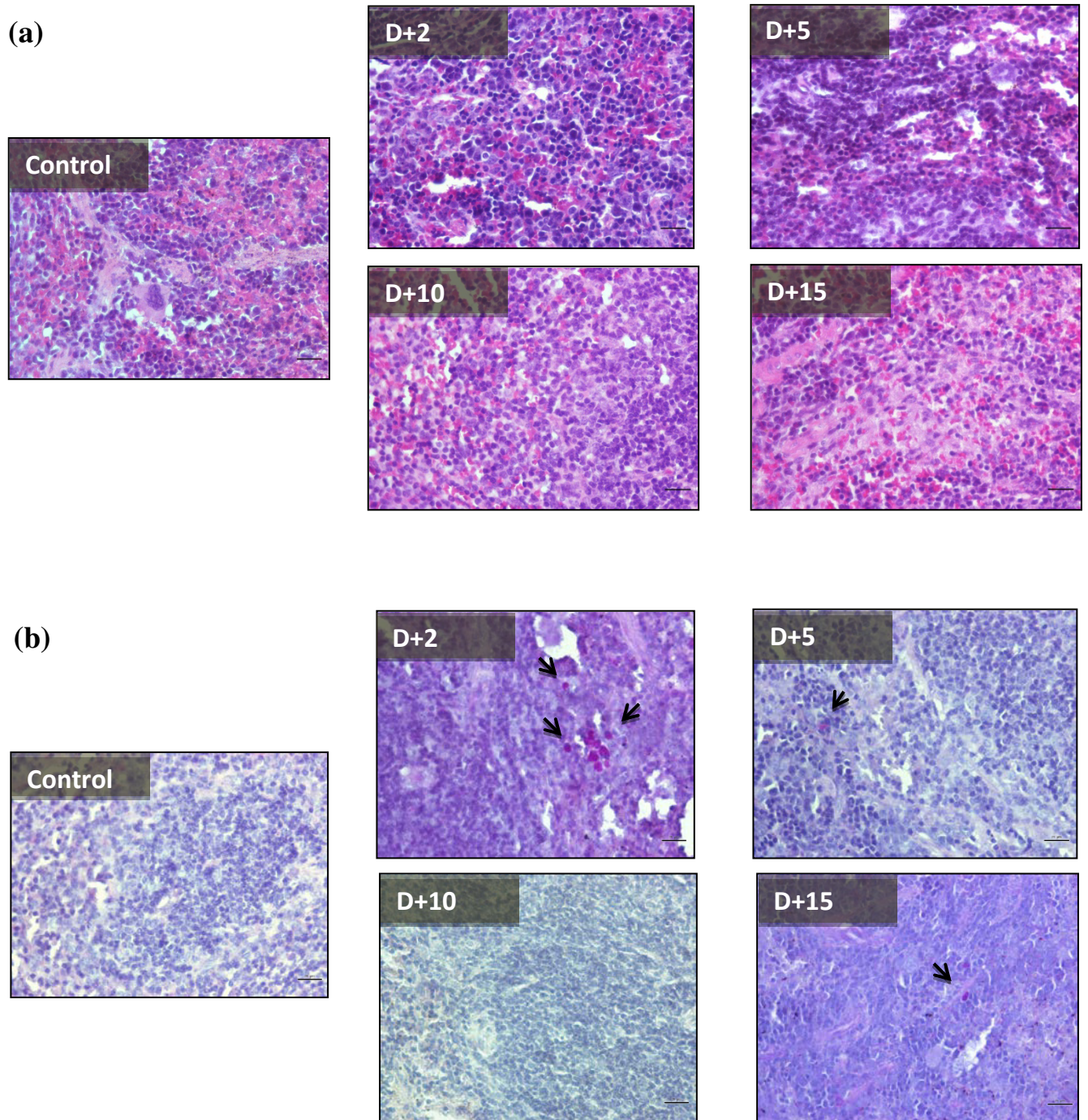


Figura 11. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de pulpa roja de bazo teñidos con H-E (a) y PAS (b) obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. Las flechas indican células sugerentes de levadura. D+2, D+5, D+10 y D+15 corresponden a los días post-infección 2, 5, 10 y 15, respectivamente. Magnificación original x400, barra métrica: 20 μ m.

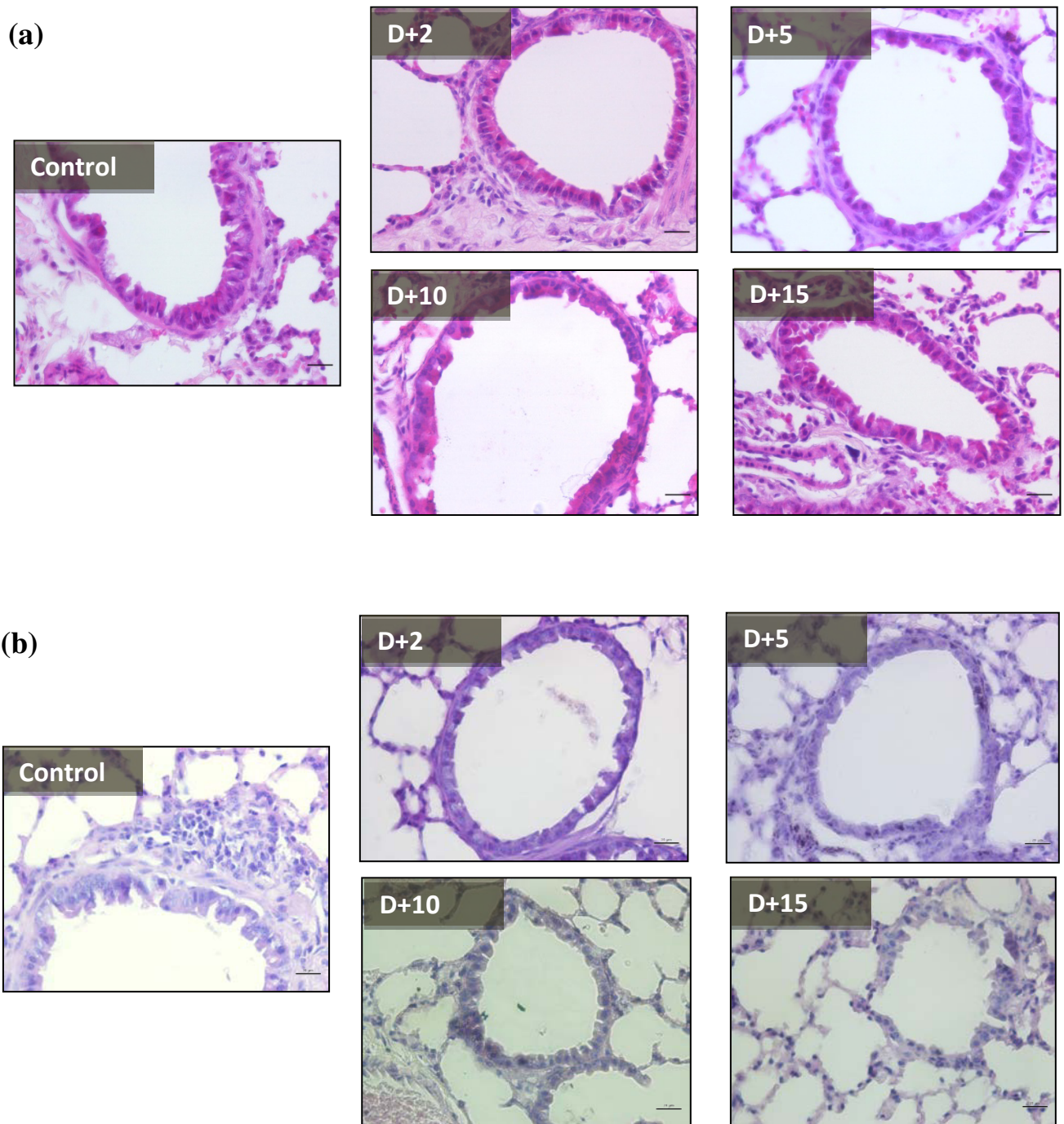


Figura 12. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de bronquiolos pulmonares teñidos con H-E (a) y PAS (b) obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. D+2, D+5, D+10 y D+15 corresponden a los días post-infección 2, 5, 10 y 15, respectivamente. Magnificación original x400, barra métrica: 20 μ m.

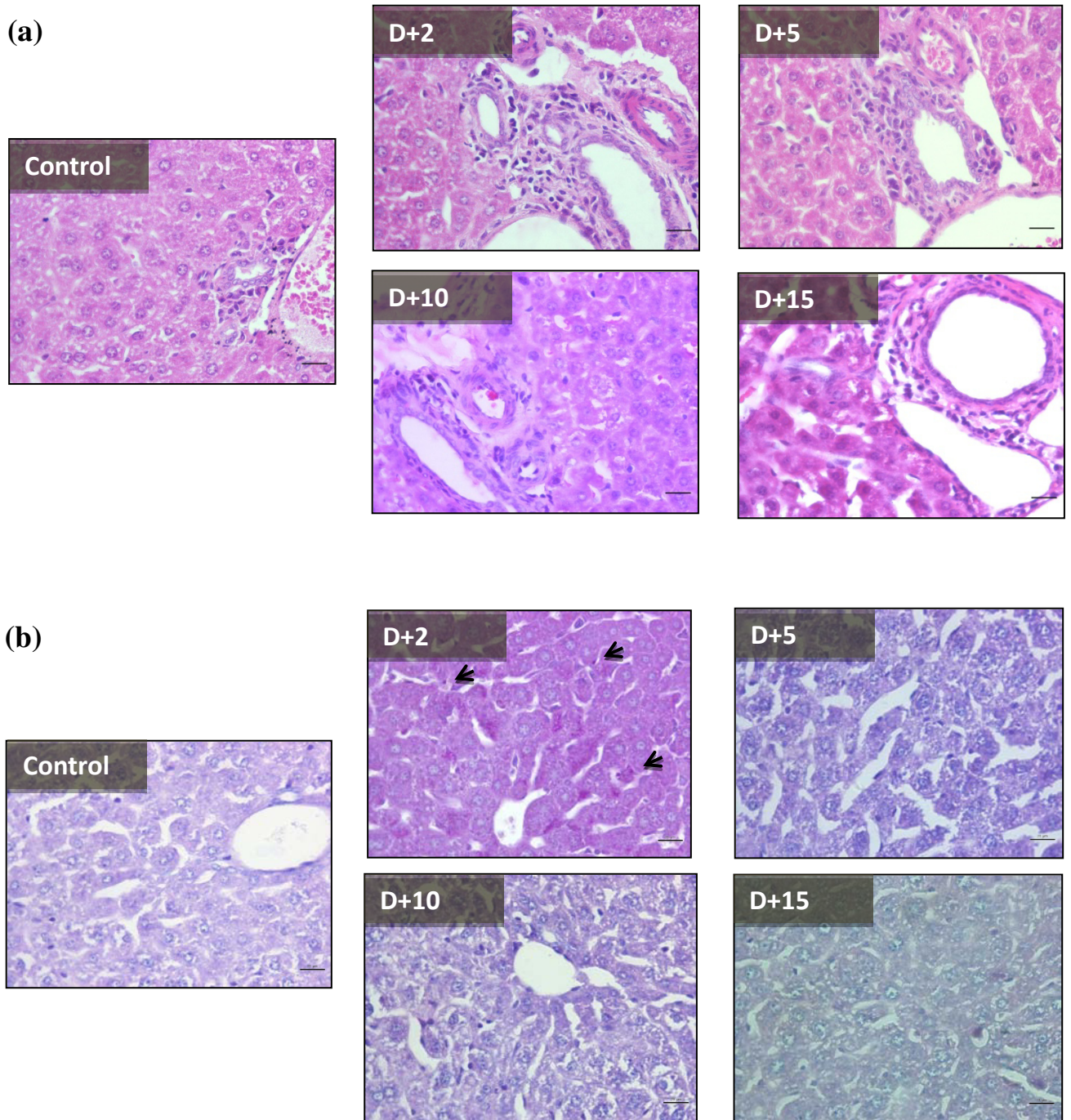


Figura 13. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de la triada porta hepática teñidos con H-E (a) y PAS (b) obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. Las flechas indican células sugerentes de levadura. D+2, D+5, D+10 y D+15 corresponden a los días post-infección 2, 5, 10 y 15, respectivamente. Magnificación original x400, barra métrica: 20 μ m.

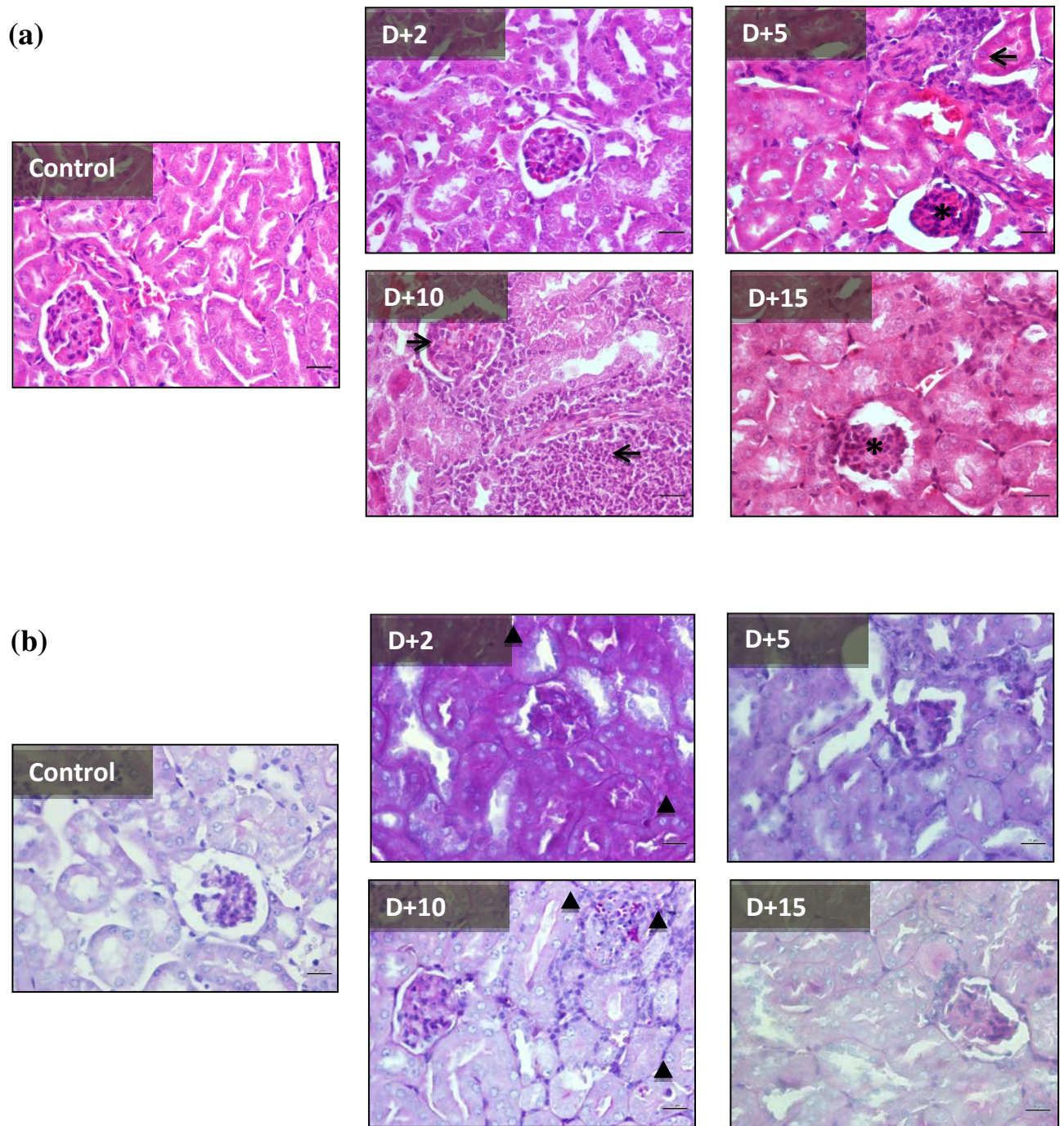


Figura 14. Composición comparativa de cortes histológicos representativos de corteza renal teñidos con H-E (a) y PAS (b) obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. Las flechas indican focos inflamatorios, los asteriscos señalan núcleos de células picnóticas y los triángulos apuntan células sugerentes de levadura. D+2, D+5, D+10 y D+15 corresponden a los días post-infección 2, 5, 10 y 15, respectivamente. Magnificación original x400, barra métrica: 20 μ m.

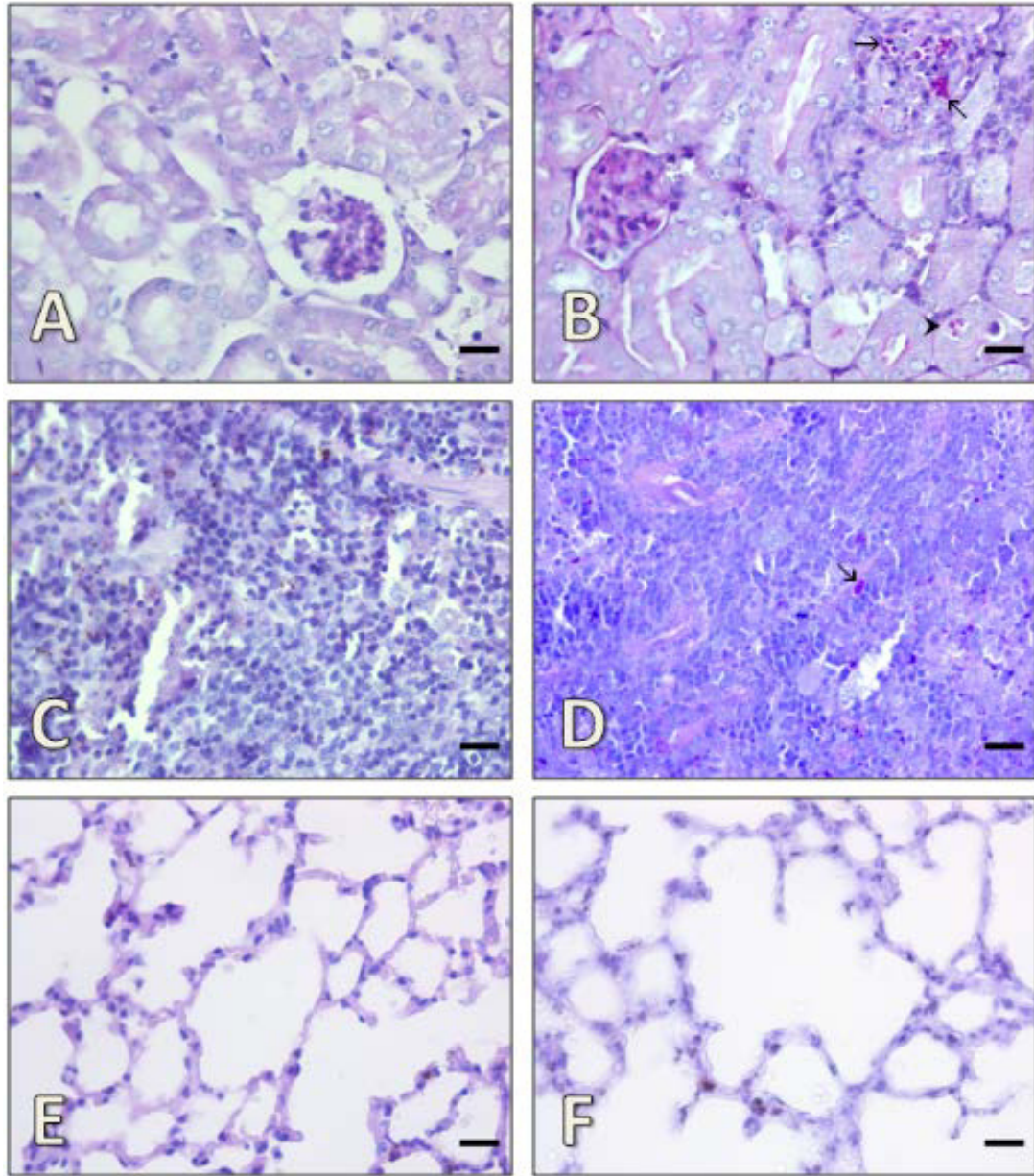


Figura 15. Composición comparativa entre órganos de cortes histológicos teñidos con PAS obtenidos de animales experimentalmente infectados vía sistémica con cepas del complejo *C. parapsilosis*. A, C y E representan controles sin infección de riñón, bazo y pulmón, respectivamente. B, D y F corresponden a cortes histológicos aleatorizadamente seleccionados de riñón, bazo y pulmón infectados, respectivamente del día 5 posterior al reto. Las flechas señalan células sugerentes de levaduras. Magnificación original x400, barra métrica: 20 μ m.

Tabla 5. Hallazgos histopatológicos encontrados en cortes seriados de riñón obtenidos durante el transcurso de la infección murina diseminada con cepas del complejo *C. parapsilosis*.

Hallazgo histológico	Control	Días post-infección			
		2	5	10	15
Retracción glomerular	-	-+	+	++	++
Infiltración de neutrófilos	-	-+	++	+++	+
Destrucción de túbulos renales	-	-+	+	++	+

Estimación: - ausente, -+ variable, + presente, ++ moderado, +++ abundante.

No se encontró un patrón histopatológico particular asociado a una especie o perfil enzimático específico entre las cepas ensayadas. De manera general, el riñón fue el órgano más afectado durante la infección diseminada con las especies del complejo *C. parapsilosis*.

6.5 Cuantificación de citocinas

6.5.1 Detección de citocinas inflamatorias desde etapas tempranas de la infección

Nosotros estudiamos si las cepas del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos inducían un perfil de citocinas específico en riñón, bazo y pulmón. Todas las cepas del complejo *C. parapsilosis* indujeron la producción de TNF- α e IL-22

en los ratones infectados ($P < 0.0001$). La concentración de TNF- α fue mayor comparada con otras citocinas analizadas en los ratones infectados con el complejo *C. parapsilosis*. Se encontraron niveles mayores (> 5-10 veces) de TNF- α en riñón comparado con pulmón o bazo (**Figura 16**). En riñón, la cepa *C. metapsilosis* ATCC-96144 fue altamente inductora de TNF- α , mientras que *C. metapsilosis* M-18 indujo bajos niveles de TNF- α los días 2-10 posteriores a la infección (**Figura 16A**). En pulmón, *C. parapsilosis* sensu stricto c/c 105, *C. orthopsilosis* HP-179 y *C. metapsilosis* M-18 fueron los inductores más potentes de TNF- α los días 10 y 15 posteriores al reto (**Figura 16B**). Por otra parte, se encontraron patrones no específicos en bazo entre los niveles de citocinas y las cepas del complejo *C. parapsilosis* (**Figura 16C**). Similar a lo encontrado con TNF- α , los niveles de IL-22 se encontraron elevados en riñón (> 10 veces) comparados con los obtenidos en pulmón y bazo (**Figura 17**). En riñón, *C. parapsilosis* sensu stricto H-124, *C. orthopsilosis* H-152 y *C. metapsilosis* ATCC-96144 indujeron altos niveles de IL-22 en la infección temprana (**Figura 17A**). En pulmón, *C. parapsilosis* sensu stricto c/c 105 y *C. metapsilosis* M-18 indujeron niveles elevados de IL-22 los días 2 y 5 post-infección. Sin embargo, en los siguientes períodos post-infección, esta citocina se elevó en todos los ratones infectados independientemente de la especie y su perfil enzimático (**Figura 17B**). En bazo, las cepas de *C. metapsilosis* fueron los inductores más potentes de IL-22 los días 5 y 10 posteriores al reto (**Figura 17C**). Las cepas del complejo *C. parapsilosis* regularon negativamente (a la baja) los niveles de IFN- γ en riñón los días 2, 5 y 10 post-infección. En pulmón, las cepas *C. parapsilosis* sensu stricto c/c 105 y H-124 fueron los inductores más potentes de IFN- γ los días 2 y 5 posteriores al reto, respectivamente; sin embargo, los niveles disminuían

en días posteriores (**Figura 18B**). La producción de IL-17A fue regulada negativamente en riñón y pulmón de los ratones infectados con las cepas del complejo *C. parapsilosis* los días 2, 5 y 10, respectivamente (**Figura 19A-B**). En bazo, la cepa *C. parapsilosis* sensu stricto H-124 indujo los niveles más altos de IL-17A los días experimentales 5 y 10 (**Figura 19C**).

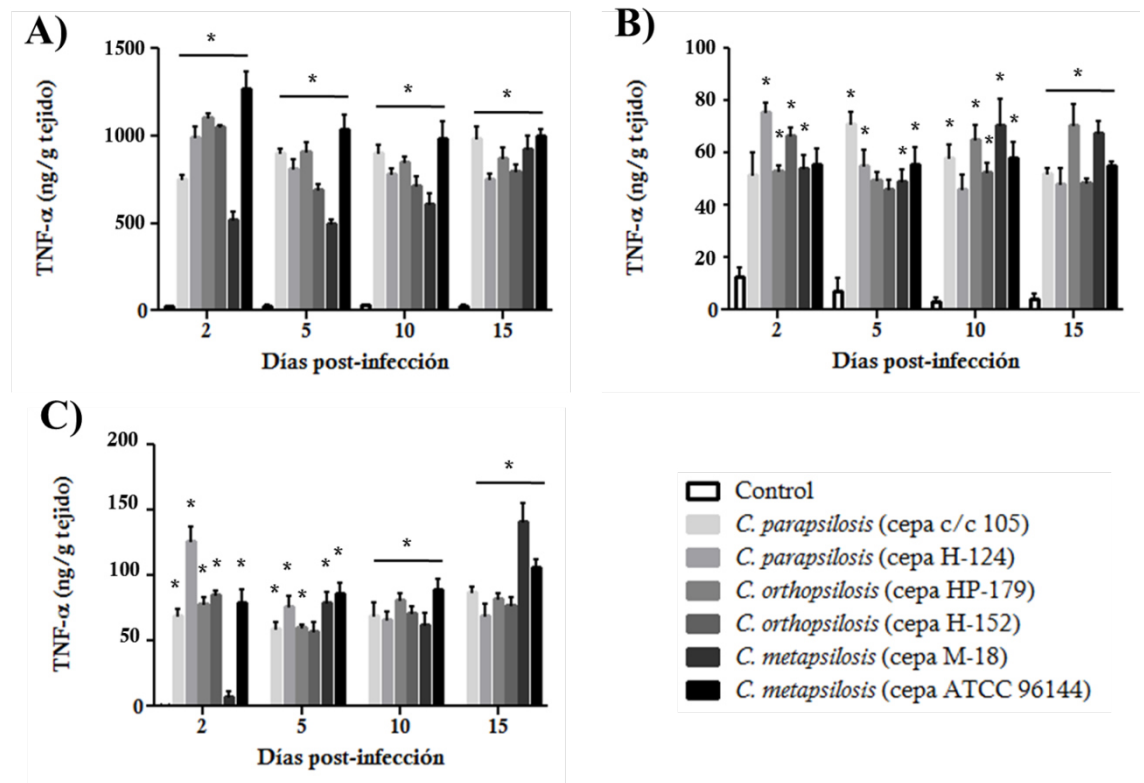


Figura 16. TNF- α expresado localmente en riñón (A), pulmón (B) y bazo (C) en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. Las barras corresponden a los promedios de cinco ratones por grupo \pm DE. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con controles sin infección.

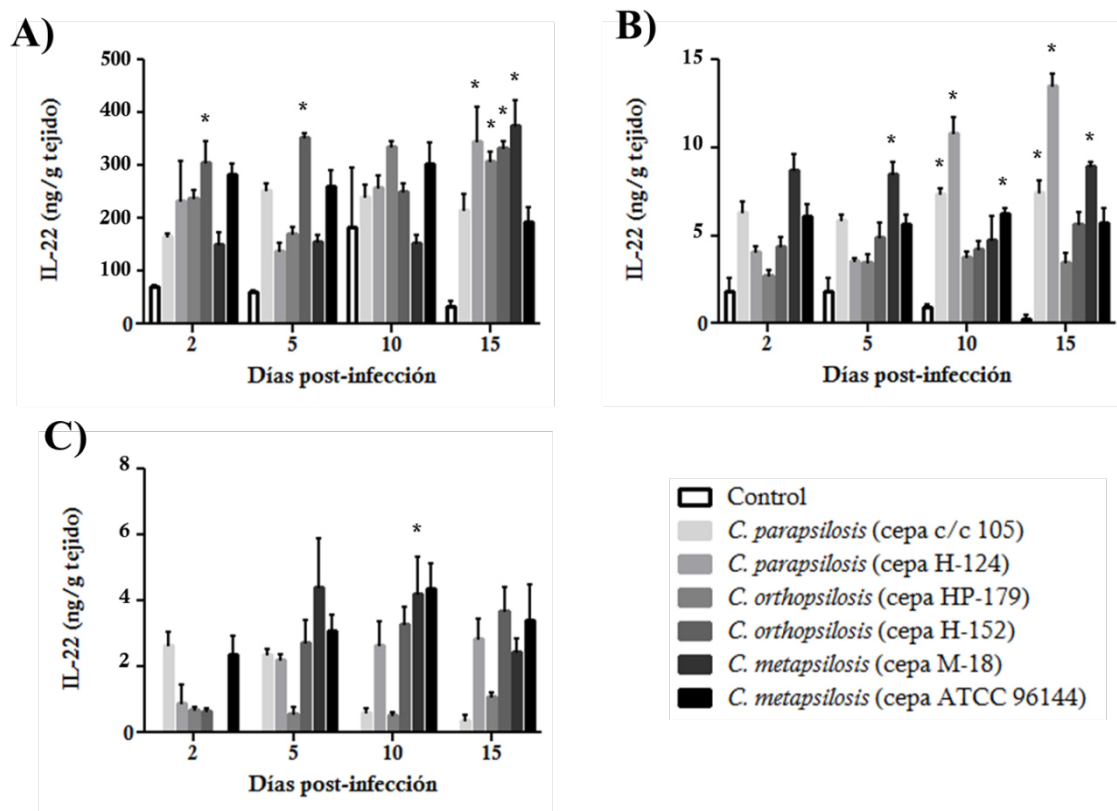


Figura 17. IL-22 expresada localmente en riñón (A), pulmón (B) y bazo (C) en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. Las barras corresponden a los promedios de cinco ratones por grupo \pm DE. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con controles sin infección.

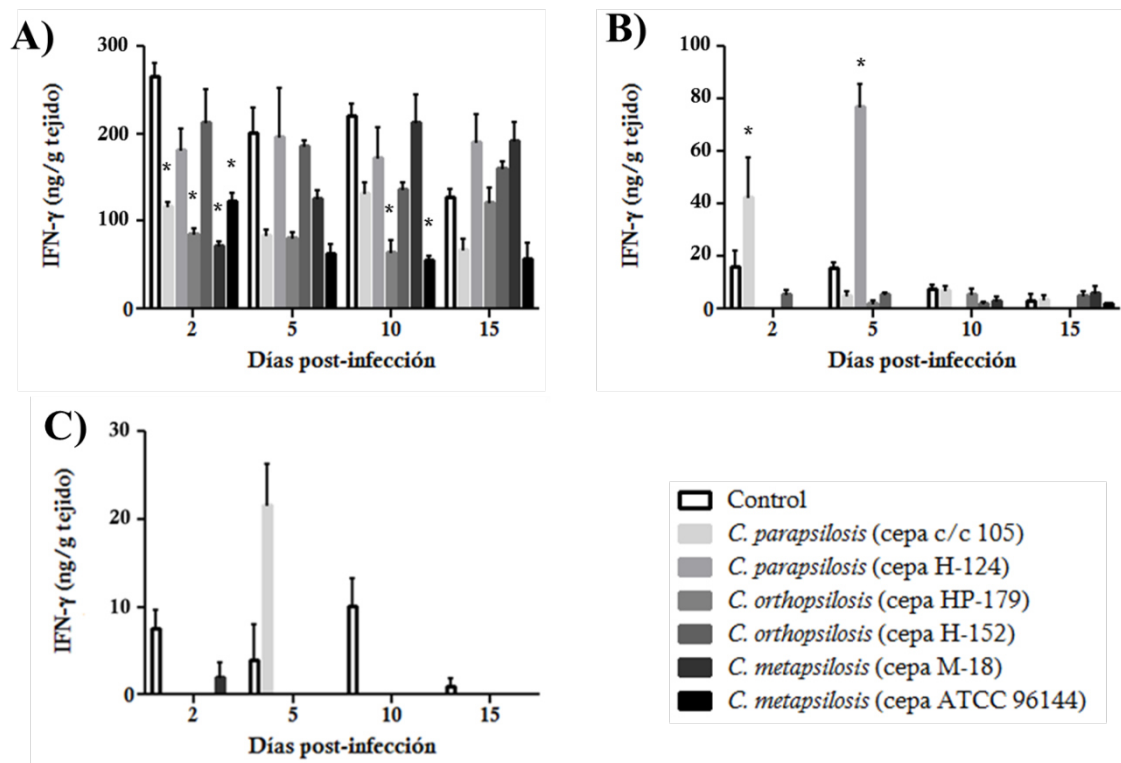


Figura 18. IFN- γ expresado localmente en riñón (A), pulmón (B) y bazo (C) en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. Las barras corresponden a los promedios de cinco ratones por grupo \pm DE. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con controles sin infección.

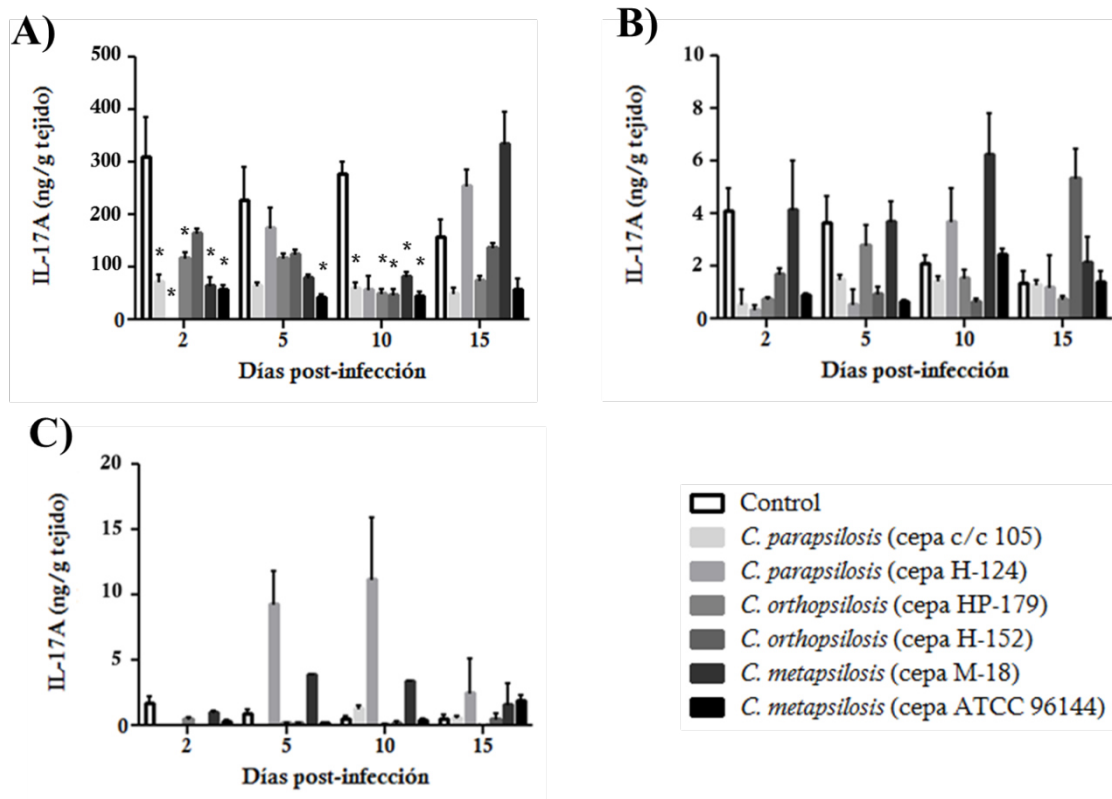


Figura 19. IL-17A expresada localmente en riñón (A), pulmón (B) y bazo (C) en ratones experimentalmente infectados con especies del complejo *C. parapsilosis* con diferentes perfiles enzimáticos. Las barras corresponden a los promedios de cinco ratones por grupo \pm DE. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con controles sin infección.

6.5.2 La esplenomegalia es paralela a los niveles de TNF- α e IL-22

El aumento en el volumen del bazo fue monitoreado a lo largo del curso de la infección experimental. Los ratones infectados con las cepas del complejo *C. parapsilosis* exhibieron esplenomegalia y esto fue acorde con los niveles de TNF- α e IL-22, específicamente con las cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. metapsilosis*.

6.5.3 TNF- α e IL-22 podrían controlar la carga fúngica

El TNF- α , así como la IL-22 son citocinas esenciales en el control de las infecciones fúngicas. El TNF- α induce estrés oxidativo y nitrosativo en el microambiente fagolisosomal, contribuyendo además al proceso inflamatorio [151]. Por su parte, la IL-22 limita el crecimiento fúngico debido a la inducción de péptidos antimicrobianos [112]. Así, nosotros nos cuestionamos si los niveles de TNF- α e IL-22 se encontraban relacionados con el decremento en la carga fúngica tisular. Estos análisis demostraron que ambas citocinas se incrementan en los riñones de los ratones infectados con muchas de las cepas de *C. parapsilosis*, mostrando una reducción > 1 log en la carga fúngica. *C. orthopsilosis* H-152 (una cepa productora de biopelícula) fue la menor afectada de las cepas analizadas en riñón, mostrando una reducción < 0.5 log. En bazo y pulmón, la carga fúngica se redujo a > 2 log en la mayoría de las cepas del complejo *C. parapsilosis*, donde se presentaron altos niveles de TNF- α e IL-22 (datos no mostrados); sin embargo, cuando se analizó una posible correlación esta no fue significativa.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

Diversos trabajos y estudios epidemiológicos se han generado en todo el mundo desde el reporte de que *C. parapsilosis* se trataba en realidad de un complejo conformado por tres especies. Sin embargo, poco es lo que se sabe hasta el momento acerca de la distribución comparativa de factores de virulencia entre los miembros que integran este complejo de microorganismos y cómo estos participan en el proceso patogénico. Se sabe que *Candida* spp. tiene la habilidad de producir diversos factores de virulencia que mejoran su capacidad de colonizar mucosas, superficies sintéticas y subsecuentemente invadir los tejidos del hospedero [3].

Dentro de los criterios básicos de identificación y clasificación propios del género *Candida* se encuentra la ausencia de actividad oxidasa y ureasa, hecho por el cual la totalidad de los aislamientos analizados fueron negativos en ambas pruebas. Por otra parte, con respecto a la actividad coagulasa, pese a que Rodrigues *et al.* [152] y Yigit *et al.* [153] reportaron porcentajes superiores al 30% de aislamientos de *C. parapsilosis* (no caracterizados genéticamente) que exhibían dicha actividad, nosotros no detectamos fenotipos productores de coagulasa. Referente a la actividad catalasa, recientemente Abi-chacra *et al.* [154] analizaron 14 cepas del complejo *C. parapsilosis* adoptando una

metodología diferente a la establecida en este trabajo, bajo la cual lisaban enzimáticamente las células levaduriformes en una primera etapa, seguido de monitoreo espectrofotométrico del sustrato (H₂O₂) removido. Ellos reportaron actividad en todas las cepas analizadas, la cual iba de 0.031 a 0.593 ($\Delta A_{240}/\text{min mg}^{-1}$ de proteína).

El papel de las proteinasas aspárticas como factor de virulencia de *C. albicans* ha sido intensamente investigado durante las últimas décadas, aunque su contribución a la virulencia de *C. parapsilosis* no se encuentra claramente comprendida aún [31]. La actividad de esta enzima en *C. parapsilosis* fue examinada por primera vez por Dagdeviren *et al.* [39], quienes reportaron un 42% de aislamientos clínicos con actividad de proteinasa aspártica, mientras que França *et al.* [155] reportaron un porcentaje por encima del 90%. Después de la reclasificación del complejo *C. parapsilosis* en 2005 por Tavanti *et al.* [14], Ge *et al.* [156] investigaron la actividad proteolítica extracelular en una colección de 31 aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis* caracterizados a nivel molecular, y reportaron que un 81% y 83.3% de los aislamientos identificados como *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. metapsilosis* respectivamente eran positivos, habiendo detectado una elevada actividad proteinasa en *C. parapsilosis* sensu stricto. Por su parte, Tosun *et al.* [157] reportaron tan sólo un 31% de incidencia de aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto productores de proteinasa aspártica y ninguno aislamiento de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* con dicha actividad a pesar de que todas las cepas analizadas poseían los genes codificantes para la enzima (*SAPP1-3*). Posteriormente Németh *et al.* [158] encontraron actividad proteinasa tanto en *C. parapsilosis* sensu stricto (63/63 aislamientos), como en *C. orthopsilosis* (12/12 aislamientos) y *C. metapsilosis* (16/18 aislamientos), hallazgos confirmados más adelante por otros grupos

[154, 159]. En el presente estudio se encontró que la producción de proteinasa aspártica no fue común, al menos en los aislamientos clínicos analizados en este estudio. Aunque se detectaron algunos aislamientos fuertemente productores de proteinasa aspártica en cada una de las especies del complejo. Interesantemente, una gran proporción de los aislamientos de *C. metapsilosis* (60%) fueron positivos. Los resultados encontrados concuerdan con lo reportado por Ge *et al.* [156], Németh *et al.* [158], Chaves *et al.* [159] y Abi-chacra *et al.* [154], ya que las tres especies que conforman el complejo *C. parapsilosis* son capaces de producir proteinasa aspártica. Sin embargo, Chaves *et al.* [159] reportaron que *C. orthopsilosis* era más proteolítica que *C. metapsilosis*, difiriendo con nuestros hallazgos. Además, Abi-chacra *et al.* [154] reportaron valores bajos de Pz (0.352-0.228) al estudiar la actividad proteolítica en una colección de 14 aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis*, dejando de manifiesto la elevada capacidad proteolítica de las tres especies del complejo *C. parapsilosis*, lo cual contrasta con nuestros resultados, ya que sólo un 17% de los aislamientos analizados mostró actividad proteolítica.

Enzimas lipolíticas, tales como las fosfolipasas y estererasas se han asociado en infecciones por *C. albicans* con penetración en las células del hospedero [160], adhesión a células epiteliales [161], invasión de epitelio oral humano reconstituido [162] e incluso transducción de vías de señalamiento en el hospedero [163]. Aunque Ghannoum *et al.* [43] detectaron actividad de fosfolipasa en otras especies distintas a *C. albicans*, incluyendo un 51% de aislamientos de *C. parapsilosis* en sus estudios, Shimizu *et al.* [164] y Kantarcioglu y Yucel [44] no detectaron actividad fosfolipasa en sus aislamientos de levaduras. En resumen, la actividad estererasa en estos estudios ha sido

ignorada en gran medida. Yücesoy y Marol [165] y Kumar *et al.* [142] describieron producción de esterasa en un 57% y 25%, respectivamente en aislamientos de *C. parapsilosis*. Un estudio posterior con cepas del complejo *C. parapsilosis* caracterizadas a nivel molecular reportó un 90.5% (19/20 aislamientos) y 91.7% (10/11 aislamientos) de aislamientos productores de fosfolipasa identificados como *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. metapsilosis*, respectivamente. Reportando además que ambas especies mostraban de manera similar una escasa actividad esterasa [156]. En el presente trabajo un total de 63% de los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto exhibieron actividad fosfolipasa y 53% fueron productores fuertes. Casi todos los aislamientos de *C. orthopsilosis* produjeron fosfolipasa y 69% fueron productores muy fuertes. Por otra parte, la actividad esterasa se detectó sólo en un 13% de los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto *versus* un 67% de los aislamientos de *C. orthopsilosis*. Interesantemente, ningún aislamiento de *C. metapsilosis* produjo esterasa, un hallazgo que contrasta con lo reportado por Ge *et al.* [156]. Por otra parte, Abi-chacra *et al.* [154] encontraron un 92.9% (13/14 aislamientos) de aislamientos del complejo *C. parapsilosis* productores de esterasa y no detectaron ningún aislamiento con actividad fosfolipasa, difiriendo de los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, estas diferencias deben tomarse con cautela ya que pueden deberse al reducido número de aislamientos de *C. metapsilosis* analizados.

Se sabe que la actividad de hemolisina es un factor de virulencia putativo que contribuye a la diseminación de *Candida* spp. facilitando la adquisición de hierro procedente de los eritrocitos del torrente sanguíneo del hospedero [166]. La capacidad de diversas especies de *Candida* no-*albicans*, particularmente *C. parapsilosis* para

producir factores hemolíticos ha sido reportada previamente por França *et al.* [155], quienes detectaron actividad hemolítica en todos los aislamientos analizados. En el presente estudio se encontró que *C. orthopsilosis* fue la especie hemolíticamente más activa del complejo *C. parapsilosis*, con un 87% de aislamientos (62% procedentes de sangre) productores de hemolisina. En contraste, 67% de los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto produjeron factores hemolíticos (20% de los aislamientos provenientes de sangre). Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los reportados por Abi-chacra *et al.* [154], quienes indistintamente encontraron una débil actividad hemolítica en 14 aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis* identificados mediante técnicas moleculares. En conjunto, los resultados obtenidos proveen mayor información acerca de la frecuencia de producción de las principales enzimas consideradas como factores de virulencia de *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

La capacidad de *Candida* spp. de formar biopelículas puede conferir una ventaja ecológica a las levaduras, ayudando a su supervivencia como comensales humanos y patógenos. Esto también podría ser responsable particularmente de su buena adaptación a la colonización de los tejidos del hospedero así como a dispositivos de uso médico [167]. A la fecha se han reportado varios métodos para evaluar la producción de biopelícula en el género anamórfico *Candida* [168]. En este trabajo se evaluó la capacidad de producción de biopelícula por medio de dos técnicas diferentes, tinción con cristal violeta y determinación de viabilidad celular por reducción de XTT. La tinción con cristal violeta es probablemente el ensayo más fiable para determinar la producción total de biopelícula porque considera tanto las células metabólicamente activas como

inactivas participantes en la biopelícula [169]. Otro método que ha sido ampliamente utilizado para cuantificar *in vitro* biopelículas de *Candida* spp. es el ensayo de reducción de XTT [170], el cual considera específicamente las células metabólicamente activas de la biopelícula a través de la reducción del XTT mediante deshidrogenasas mitocondriales.

El estudio de la capacidad de producción de biopelícula entre las especies que conforman el complejo *C. parapsilosis* aún no ha sido claramente entendido debido a reportes aparentemente contradictorios en la literatura. En una primera instancia, Song *et al.* [171] estudiaron la capacidad de 159 aislamientos del complejo *C. parapsilosis* para producir biopelícula a través de un enfoque espectrofotométrico en el cual las biopelículas cultivadas se incubaban sin agitación y los valores de transmitancia se medían sin tinción previa a 405 nm. Ellos reportaron que *C. parapsilosis* sensu stricto (anteriormente *C. parapsilosis* grupo I) era la única especie del complejo capaz de formar biopelículas. Luego, Tavanti *et al.* [81] utilizando la misma metodología previamente mencionada con ligeras modificaciones reportaron que ninguno de los 33 aislamientos clínicos de *C. orthopsilosis* que ellos estudiaron fue capaz de formar biopelículas *in vitro*, soportando lo encontrado más adelante por de Toro *et al.* [172], quienes analizaron 10 aislamientos clínicos de *C. orthopsilosis* por reducción de XTT, encontrando ausencia de actividad metabólica. En contraste, Lattif *et al.* [173] basados en ensayos de reducción de XTT, medición de peso seco, además de microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal láser de 10 aislamientos clínicos de *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, establecieron que las tres especies eran capaces de formar biopelículas, las cuales eran, de hecho, similares tanto

en topografía de superficie como arquitectura tridimensional. Finalmente, Melo *et al.* [146] confirmaron la capacidad de formación de biopelícula de las especies del complejo *C. parapsilosis* al analizar 20 aislamientos (7 *C. parapsilosis* sensu stricto, 8 *C. orthopsilosis* and 5 *C. metapsilosis*) por tinción con cristal violeta, reducción de XTT y microscopía electrónica de barrido. Recientemente Tosun *et al.* [157] reportaron un 29% (11/38 aislamientos) de aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto productores de biopelícula, señalando además que aquellos aislamientos procedentes de orina tendían a formar mayor cantidad de biopelícula que aquellos procedentes de otros orígenes clínicos. Después Abi-chacra *et al.* [154] establecieron que las tres especies del complejo *C. parapsilosis* presentaban una elevada hidrofobicidad de superficie, así como un habilidad similar para formar biopelícula. Más recientemente Ruiz *et al.* [174] señalaron producción de biopelícula por parte de los tres microorganismos, siendo *C. parapsilosis* sensu stricto la especie con la producción más alta de biopelícula, seguida de *C. orthopsilosis* y después por *C. metapsilosis*.

Los resultados de cuantificación de biopelículas bajo las condiciones experimentales adoptadas en este trabajo contrastan con los hallazgos reportados previamente por Song *et al.* [171], Tavanti *et al.*[81], de Toro *et al.* [172] y Tosun *et al.* [157], y concuerdan con los resultados establecidos por Lattif *et al.* [173], Melo *et al.* [146] y Ruiz *et al.* [174]. Aunque los valores de *P* no fueron significativos, con base en la tinción con cristal violeta, la escala de producción de biopelícula fue: *C. parapsilosis* sensu stricto > *C. orthopsilosis* > *C. metapsilosis*; mientras que de acuerdo al ensayo de reducción de XTT la escala fue la siguiente: *C. orthopsilosis* > *C. metapsilosis* ≥ *C. parapsilosis* sensu stricto. Por otra parte, el origen y la selección de aislamientos pueden

ser un factor que influya la formación de biopelículas en *Candida* spp. [175, 176]. Reportes recientes han puesto de manifiesto que aislamientos procedentes de sangre producen mayores cantidades de biopelícula comparados con aislamientos provenientes de otros orígenes clínicos [177]. Sin embargo, nosotros no encontramos diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad de formación de biopelícula y el origen clínico de los aislamientos estudiados, concordando con Silva *et al.* [167] y de Toro *et al.* [172].

La formación de biopelículas microbianas es un proceso biológico complejo finamente regulado por mecanismos genéticos de los organismos participantes. Uno de los reguladores maestros de este fenómeno es el factor transcripcional Bcr1 [178], el cual es un dedo de zinc identificado en ensayos con cepas mutantes incapaces de formar biopelícula en superficies abióticas [26, 179] y de adherirse a sustratos de silicona [180]. Además, Bcr1 se requiere para la expresión de varios genes codificantes de proteínas de superficie celular, tales como *ALS1*, *ALS3* y *HWPI*, los cuales son los principales blancos funcionales de Bcr1 [26, 179]. Recientemente, Srikantha *et al.* [181] demostraron que el gen *BCR1* confería impermeabilidad, impenetrabilidad y resistencia a fármacos en biopelículas *a/a* de *C. albicans*. Particularmente en *C. parapsilosis*, la formación de biopelículas es tanto dependiente como independiente de *BCR1*, pero incluso en cepas que mostraron un fenotipo de biopelícula independiente de *BCR1*, éste posee funciones fisiológicas alternativas [28]. En conjunto, este trabajo provee evidencia de variabilidad genética en el exón analizado de *BCR1* entre los miembros del complejo *C. parapsilosis*, y este hallazgo aparentemente no se encuentra asociado con un fenotipo particular de formación de biopelícula. La elucidación de la anatomía completa del gen

BCRI en cada especie, así como la determinación de perfiles de expresión génica por qPCR resulta crítica para revelar la participación de este gen en la formación de biopelículas en *Candida*, o si el fenotipo de formación de biopelícula es parte de un proceso mucho más intrincado orquestado por una amplia gama de diferentes genes involucrados.

Diversos animales de experimentación se han desarrollado para investigar las diferentes presentaciones clínicas de la candidiasis, siendo los modelos murinos el estándar de oro para estudiar patogénesis y eficacia terapéutica de antifúngicos [182]. El modelo murino de desafío intravenoso (IV) emula la candidiasis sistémica humana, y debido a su elevada reproducibilidad se ha establecido como el modelo más común a utilizar para investigar la virulencia de *C. albicans*, así como para determinar aspectos relacionados con interacciones hongo-hospedero [86-88]. Un estudio de patogenicidad de *Candida* spp. en un modelo murino de infección sistémica fue previamente publicado por Arendrup *et al.* [183]. Ellos reportaron que ratones hembras infectados con 10^7 UFC de *C. parapsilosis* no morían y que las levaduras no se detectaban en los riñones en el día 7 posterior al reto [183]. A pesar del hecho de que este reporte representó nuestro único antecedente directo, sus resultados fueron diferentes de los nuestros probablemente porque utilizaron ratonas de otra cepa murina (CF1) y los aislamientos utilizados de *C. parapsilosis* no se confirmaron mediante métodos moleculares, además de que el diseño experimental de su estudio fue diferente al nuestro. Más adelante, Gácsér *et al.* demostraron el papel importante que juega la fosfolipasa en la virulencia de *C. parapsilosis* utilizando un eficiente sistema de delección génica basado en el marcador de resistencia de nourseotricina (*caSAT1*) y su subsecuente delección por medio de FLP

[184]. Ellos encontraron que los mutantes homocigotos lipasa-negativos de *C. parapsilosis* fueron significativamente menos virulentos comparados con las cepas *wild-type* cuando se inocularon intraperitonealmente en ratonas BALB/c. Sin embargo, ellos reportaron no haber encontrado diferencias significativas en la carga fúngica o sobrevida animal en el modelo murino de infección intravenosa adoptado utilizando un inóculo de 10^7 levaduras [184]. Recientemente, Bertini *et al.* investigaron el potencial patogénico del complejo *C. parapsilosis* en ratonas BALB/c tratadas con estrógeno durante una infección vulvo-vaginal con inóculos de 10^6 levaduras y reportaron diferencias significativas en cuanto a la cinética de infección entre las especies del grupo ‘psilosis’ [185]. Las ratonas infectadas con *C. metapsilosis* mostraron una carga fúngica vaginal reducida, así como resolución espontánea de la infección para el día 28 posterior al reto para todas las cepas probadas. Sin embargo, dado que la base fisio-patológica de la candidiasis vaginal es diferente del cuadro clínico diseminado, junto con el hecho de que las cepas utilizadas por Bertini *et al.* no fueron caracterizadas en base a sus perfiles enzimáticos, no resulta posible contrastar nuestros resultados con los suyos.

Aunque el perfil enzimático *in vitro* de las cepas mostró diferencias importantes respecto a sus actividades de proteinasa aspártica, fosfolipasa, esterasa y hemolisina, no se detectaron diferencias significativas entre las especies del grupo ‘psilosis’ (en términos de carga fúngica tisular) cuando se ensayaron *in vivo*, sugiriendo que posiblemente las tres especies del complejo *C. parapsilosis* poseen un potencial patogénico similar en la infección diseminada en hospederos inmunocompetentes. Estudios posteriores con cepas más ampliamente caracterizadas resultan necesarios para probar dicha hipótesis.

Durante la candidiasis murina sistémica, el torrente sanguíneo y la mayoría de los órganos (bazo, pulmones e hígado) depuran gradualmente el patógeno, pero este escenario es algo diferente en los riñones, el principal órgano blanco para el reto IV en el ratón, en el cual la carga fúngica incrementa acompañada de una alza en los niveles de citocinas renales y quimiocinas [186, 187], existiendo una correlación entre los elevados niveles de citocinas renales y la severidad de la lesión con el consecuente pronóstico de la infección [88, 187]. Los factores celulares y moleculares que determinan el control diferencial órgano-específico de *Candida* permanecen aún sin esclarecerse.

En la infección patogénica por *C. albicans*, los mediadores inflamatorios de la respuesta inmune son conducidos por las células Th1 y recientemente también han sido implicadas las células Th17. Los linfocitos Th1 estimulados producen IFN- γ , el cual contribuye a la defensa anti-*Candida* del hospedero mediante inducción de la producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en Inglés) por macrófagos [123]. Por otra parte, las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 [188]. La IL-17A interconecta la defensa linfoide y mieloide del hospedero [189] a través de la inducción de infiltrados de granulocitos neutrofílicos al sitio de infección y activación de macrófagos [188]. Mientras tanto, la IL-22 es un miembro de la familia de citocinas de la IL-10, a la cual se le han atribuido funciones tanto pro- como anti-inflamatorias. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que esta citocina participa en la resistencia innata a la candidiasis en las etapas tempranas de la infección a nivel renal e intestinal mediante control crítico del crecimiento fúngico inicial y la homeostasis epitelial en la ausencia relativa de inmunidad Th1 [190]. Interesantemente, nuevos hallazgos sugieren que altos niveles de la IL-22 y el TNF- α son una potente combinación sinérgica de citocinas para

la inmunidad cutánea, conservando eficientemente la integridad de la barrera epidérmica en un modelo de infección cutánea comparada con IFN- γ , IL-17, IL-22 o TNF- α solas [191]. Recientemente, la IL-22 ha cobrado relevancia clínica en otras entidades patológicas como la psoriasis, colitis ulcerativa, ciertos tumores y daño hepático y pancreático [130]. En la infección diseminada por *C. albicans*, las células Th1 se encuentran asociadas con la protección de la enfermedad, mientras que una predominancia de células Th2 promueven susceptibilidad [192]. Finalmente, el balance en la respuesta innata entre la inmunidad fungicida (benéfica) y los mecanismos inmunocompensatorios (perjudicial) determinan el alcance del daño tisular en las infecciones fúngicas [112].

La producción local de citocinas en un modelo murino experimental de infección hematogena por *C. albicans* fue demostrada previamente por Spellberg *et al.* [193], ellos examinaron la relación entre la supervivencia del hospedero y la respuesta inmune local en riñón y bazo durante la candidiasis probando diferentes inóculos, llegando a la conclusión de que este patógeno inducía respuesta esplénicas tipo 2 con ambos inóculos (no-fatal y fatal). La sobrevivencia de los animales se correlacionó con una respuesta tipo 1 (IFN- γ) donde se encontró una nula o baja mortalidad, mientras una respuesta tipo 2 (IL-10) se relacionó con el 100% de las infecciones fatales. Subsecuentemente, MacCallum *et al.* [187] analizaron los niveles de citocinas y quimiocinas en órganos infectados, elucidando respuestas órgano-específicas, con altos niveles de citocinas y quimiocinas en los riñones infectados, pero respuestas reducidas en el bazo. Ellos concluyeron que la quimiocina derivada de keratinocitos (KC) es un mediador temprano importante en la infección y se correlaciona junto con la IL-6 y el

MIP-1 β con la severidad de la lesión renal, mientras que el GM-CSF y la IL-10 han mostrado correlaciones inversas con respecto al daño histológico generado. Estas diferencias se reflejan también a nivel transcripcional con la expresión diferencial de genes de citocinas en ambos órganos [194]. Nuestro estudio se enfocó en la respuesta local a la infección, el diseño experimental que adoptamos no incluyó la determinación sérica de citocinas. De los órganos ensayados en este estudio, el riñón mostró la carga fúngica más alta, así como elevados niveles de citocinas pro-inflamatorias y fue el único tejido que mostró alteraciones histológicas debidas a la infección sistémica. Recientemente, Lionakis *et al.* [195] caracterizaron las poblaciones celulares inmunes en los órganos infectados durante la progresión de la candidiasis diseminada en un modelo murino. Ellos encontraron neutrófilos acumulados en todos los órganos infectados, pero una demora en su aparición en los riñones, dejando estos órganos desprotegidos durante las primeras 24 h posteriores al reto intravenoso. El incremento de los neutrófilos ocurrió de forma gradual en estos órganos conforme la enfermedad progresaba. La inflamación renal podría explicarse en parte por los neutrófilos CCR1 positivos, los cuales juegan un papel patogénico clave en la candidiasis invasiva mediando la inmunopatología renal a través del reclutamiento excesivo de neutrófilos de la sangre hacia el riñón [196]. El papel de la IL-22 en el reclutamiento de neutrófilos en tejido periférico ya ha sido reportado en otros patógenos, como el citomegalovirus [197]. Nosotros encontramos una regulación negativa en la producción de IFN- γ durante la infección por el complejo *C. parapsilosis*, concordando con Carvalho *et al.*, quienes también reportaron este hallazgo en algunos pacientes con candidiasis vaginal recurrente (CVR) [198]; esto podría deberse a la ausencia de IL-6 en respuesta al hongo en

superficies epiteliales y a la pobre activación de linfocitos Th1 [199]. Los altos niveles de IL-22 encontrados en riñón podrían encontrarse involucrados en el reclutamiento neutrofílico en este tejido. En pulmón y bazo no se encontraron neutrófilos, de hecho se detectó un incremento de IL-22 durante la infección con el complejo *C. parapsilosis*, pudiendo deberse al número relativamente bajo o ausente de levaduras en estos tejidos. Finalmente, no se encontró una correlación significativa entre la inflamación esplénica y la carga fúngica con los niveles locales de citocinas encontrados en los animales infectados.

En conjunto, este estudio demostró que ratones machos inmunocompetentes BALB/c experimentalmente infectados con cepas del grupo ‘psilosis’ exhibiendo diferentes perfiles enzimáticos *in vitro* inducen indistintamente una pronunciada respuesta inflamatoria que resulta esencial para la inmunidad antifúngica protectora, la cual conduce la patología durante la infección diseminada, principalmente en el riñón. Aunque no se encontró una correlación entre niveles locales de citocinas y actividad enzimática de las cepas ensayadas *in vivo*, los papeles de estas enzimas en la enfermedad sistémica por el grupo *C. parapsilosis* sensu lato no deben ser subestimados. En este sentido, estudios posteriores con más cepas caracterizadas, así como mutantes homocigotos para los genes involucrados en cada enzima resultan esenciales para elucidar sus contribuciones particulares en la patogénesis por estos patógenos oportunistas. En general, este conocimiento posee implicaciones obvias en el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas novedosas, las cuales tengan por objeto mejorar la defensa del hospedero contra el complejo *C. parapsilosis*, proporcionando una solución para prevenir y reducir la alta tasa de mortalidad de la candidiasis invasiva.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

Aunque los perfiles enzimáticos de las cepas analizadas en este estudio exhibieron diferencias importantes respecto a sus actividades *in vitro* de proteinasa aspártica, fosfolipasa, esterasa y hemolisina, no se detectaron diferencias significativas en términos de carga fúngica tisular, histopatología y producción de citocinas cuando se probaron *in vivo*, al menos con los aislamientos ensayados en este estudio y bajo el diseño experimental adoptado. Por otra parte, y como otros autores previamente ya lo han establecido, el riñón fue el principal órgano dañado durante el reto sistémico, siendo el blanco de la infección indistintamente de la cepa ensayada.

Las tres especies del grupo “psilosis” poseen posiblemente un potencial patogénico similar en la infección diseminada en hospederos inmunocompetentes, induciendo por igual una respuesta inmunológica pro-inflamatoria como principal mecanismo antifúngico mediador frente al reto sistémico.

La hipótesis planteada inicialmente se rechazó. La producción de factores de virulencia (enzimas líticas y biopelículas) de las especies del complejo *C. parapsilosis* no se correlacionó con el daño tisular y producción de citocinas en un modelo murino de candidiasis diseminada.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

De este trabajo se desprenden las siguientes perspectivas:

- Ampliar la batería de pruebas para el estudio de factores de virulencia de las especies del complejo *C. parapsilosis*.
- Evaluar los genes asociados a virulencia en los patógenos en estudio.
- Generar cepas mutantes deletadas para cada gen (es) asociado a virulencia, para evaluar el impacto del producto en su patogenicidad *in vivo*.
- Llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica y citometría de flujo (FACS) para corroborar los resultados obtenidos en las ELISAs, y de esta manera establecer el tipo de respuesta inmune local montada durante la infección murina.
- Evaluar más citocinas, así como estudiar individualmente su papel en la respuesta inmune murina mediante bloqueo con anticuerpos/ARNi y, de ser posible, en modelos *knock-out*.
- Estudiar eficacia terapéutica de esquemas antifúngicos combinados en el tratamiento de la candidiasis murina sistémica.

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

1. Ashford, B., Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1928. **8**: p. 507-538.
2. Weems, J.J., Jr., *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*, 1992. **14**(3): p. 756-66.
3. Trofa, D., A. Gacser, and J.D. Nosanchuk, *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008. **21**(4): p. 606-25.
4. Laffey, S.F. and G. Butler, Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 2005. **151**(Pt 4): p. 1073-81.
5. Enger, L., *et al.*, Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(2): p. 658-69.
6. Kim, S.K., K. El Bissati, and C. Ben Mamoun, Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 2006. **152**(Pt 10): p. 2885-94.
7. Nosek, J., *et al.*, Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*, 2009. **55**(5): p. 497-509.
8. Fell, J.W. and S.A. Meyer, Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl*, 1967. **32**(3): p. 177-93.

9. Scherer, S. and D.A. Stevens, Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 1987. **25**(4): p. 675-9.
10. Lehmann, P.F., D. Lin, and B.A. Lasker, Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol*, 1992. **30**(12): p. 3249-54.
11. Lin, D., *et al.*, Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(7): p. 1815-21.
12. Roy, B. and S.A. Meyer, Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(1): p. 216-8.
13. Rycovska, A., *et al.*, Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 2004. **150**(Pt 5): p. 1571-80.
14. Tavanti, A., *et al.*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(1): p. 284-92.
15. van Asbeck, E.C., K.V. Clemons, and D.A. Stevens, *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol*, 2009. **35**(4): p. 283-309.
16. Panagoda, G.J., A.N. Ellepola, and L.P. Samaranayake, Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, 2001. **44**(1-2): p. 29-35.
17. Branchini, M.L., *et al.*, Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 1994. **32**(2): p. 452-6.
18. Kuhn, D.M., *et al.*, Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(6): p. 1773-80.
19. Baillie, G.S. and L.J. Douglas, Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*, 1999. **48**(7): p. 671-9.

20. Hawser, S.P. and L.J. Douglas, Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*, 1994. **62**(3): p. 915-21.
21. Kuhn, D.M., *et al.*, Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*, 2002. **70**(2): p. 878-88.
22. Ramage, G., J.P. Martinez, and J.L. Lopez-Ribot, *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*, 2006. **6**(7): p. 979-86.
23. Kuhn, D.M., *et al.*, *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis*, 2004. **10**(6): p. 1074-81.
24. Ding, C. and G. Butler, Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for *BCR1* in biofilm formation. *Eukaryot Cell*, 2007. **6**(8): p. 1310-9.
25. Nobile, C.J. and A.P. Mitchell, Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol*, 2005. **15**(12): p. 1150-5.
26. Nobile, C.J., *et al.*, Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog*, 2006. **2**(7): p. e63.
27. Ding, C., *et al.*, Conserved and divergent roles of Bcr1 and CFEM proteins in *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28151.
28. Pannanusorn, S., *et al.*, Characterization of biofilm formation and the role of *BCR1* in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*, 2013.
29. Staib, F., Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia*, 1965. **4**(3): p. 187-93.
30. Schaller, M., *et al.*, Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2005. **48**(6): p. 365-77.
31. Ruchel, R., *et al.*, *Candida* acid proteinases. *J Med Vet Mycol*, 1992. **30 Suppl 1**: p. 123-32.

32. Pichova, I., *et al.*, Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(9): p. 2669-77.
33. Fallon, K., *et al.*, Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun*, 1997. **65**(2): p. 551-6.
34. Merkerova, M., *et al.*, Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res*, 2006. **6**(7): p. 1018-26.
35. Dostal, J., *et al.*, The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol Chem*, 2005. **386**(8): p. 791-9.
36. Fusek, M., *et al.*, Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. *Biochemistry*, 1994. **33**(32): p. 9791-9.
37. Fusek, M., *et al.*, *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *FEBS Lett*, 1993. **327**(1): p. 108-12.
38. Cassone, A., *et al.*, Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis*, 1995. **171**(4): p. 967-75.
39. Dagdeviren, M., N. Cerikcioglu, and M. Karavus, Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses*, 2005. **48**(5): p. 321-6.
40. De Bernardis, F., *et al.*, Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis*, 1999. **179**(1): p. 201-8.
41. De Bernardis, F., *et al.*, Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(11): p. 3481-6.
42. Yamamoto, T., *et al.*, Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*, 1992. **36**(6): p. 637-41.

43. Ghannoum, M.A., Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 2000. **13**(1): p. 122-43, table of contents.
44. Kantarcioglu, A.S. and A. Yucel, Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 2002. **45**(5-6): p. 160-5.
45. Hostetter, M.K., Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*, 1994. **7**(1): p. 29-42.
46. Fidel, P.L., Jr., J.A. Vazquez, and J.D. Sobel, *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(1): p. 80-96.
47. Soll, D.R., High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 1992. **5**(2): p. 183-203.
48. Lott, T.J., *et al.*, Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*, 1993. **23**(5-6): p. 463-7.
49. Gacser, A., *et al.*, Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*, 2007. **44**(12): p. 1336-41.
50. Orsi, C.F., B. Colombari, and E. Blasi, *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex. *Med Mycol*, 2010. **48**(8): p. 1024-33.
51. Safdar, A., D.S. Perlin, and D. Armstrong, Hematogenous infections due to *Candida parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002. **44**(1): p. 11-6.
52. Bonifaz, A., Candidosis, in *Micología Médica Básica*, Mc Graw Hill, Editor. 2010: México. p. 279-300.
53. Martin, G.S., *et al.*, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003. **348**(16): p. 1546-54.

54. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 2007. **20**(1): p. 133-63.
55. Warnock, D.W., Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. *J Antimicrob Chemother*, 1998. **41 Suppl D**: p. 95-105.
56. Wey, S.B., *et al.*, Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*, 1988. **148**(12): p. 2642-5.
57. Pfaller, M.A., *et al.*, International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(7): p. 1886-9.
58. Bodey, G.P., *et al.*, The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med*, 2002. **112**(5): p. 380-5.
59. Rowen, J.L., *et al.*, *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced fluconazole susceptibility. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(11): p. 3735-7.
60. Colombo, A.L., *et al.*, High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999. **34**(4): p. 281-6.
61. Levin, A.S., *et al.*, *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998. **30**(4): p. 243-9.
62. Colombo, A.L., *et al.*, Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(8): p. 2816-23.
63. Gonzalez, G.M., M. Elizondo, and J. Ayala, Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(9): p. 2902-5.
64. Almirante, B., *et al.*, Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(5): p. 1681-5.

65. Hajjeh, R.A., *et al.*, Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(4): p. 1519-27.
66. Pappas, P.G., *et al.*, A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(5): p. 634-43.
67. Lockhart, S.R., *et al.*, Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(8): p. 2659-64.
68. Trevino-Rangel, R.D., *et al.*, Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol*, 2012.
69. Solomon, S.L., *et al.*, An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition. *J Infect Dis*, 1984. **149**(1): p. 98-102.
70. Weems, J.J., Jr., *et al.*, *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *J Clin Microbiol*, 1987. **25**(6): p. 1029-32.
71. Benjamin, D.K., Jr., *et al.*, When to suspect fungal infection in neonates: A clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics*, 2000. **106**(4): p. 712-8.
72. Saiman, L., *et al.*, Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J*, 2001. **20**(12): p. 1119-24.
73. Bonassoli, L.A., M. Bertoli, and T.I. Svidzinski, High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect*, 2005. **59**(2): p. 159-62.
74. Truant, A.L., Commercial Methods for Identification and Susceptibility Testing of Fungi, in Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology, ASM, Editor. 2002: Washington, DC. p. 225-248.

75. Asadzadeh, M., *et al.*, Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol*, 2009. **58**(Pt 6): p. 745-52.
76. Gomez-Lopez, A., *et al.*, Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(4): p. 1506-9.
77. Borman, A.M., *et al.*, Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(7): p. 2307-10.
78. Nosek, J., *et al.*, Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(4): p. 1283-9.
79. Sabino, R., *et al.*, New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(5): p. 1677-82.
80. Tavanti, A., *et al.*, Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol*, 2010. **10**: p. 203.
81. Tavanti, A., *et al.*, Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(5): p. 1455-62.
82. Hensgens, L.A., *et al.*, AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: evidence for recombination. *Fungal Genet Biol*, 2009. **46**(10): p. 750-8.
83. Khan, Z., A.S. Mustafa, and F.F. Alam, Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. *J Microbiol Immunol Infect*, 2009. **42**(4): p. 290-5.
84. Hays, C., *et al.*, Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol*, 2010.

85. Chamilos, G., *et al.*, Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*, 2007. **7**(1): p. 42-55.
86. Szabo, E.K. and D.M. MacCallum, The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol Lett*, 2011. **320**(1): p. 1-8.
87. MacCallum, D.M. and F.C. Odds, Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. *Mycoses*, 2005. **48**(3): p. 151-61.
88. Spellberg, B., *et al.*, Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *J Infect Dis*, 2005. **192**(2): p. 336-43.
89. Clemons, K.V., *et al.*, Development of an orogastrintestinal mucosal model of candidiasis with dissemination to visceral organs. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(8): p. 2650-7.
90. Koh, A.Y., *et al.*, Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(2): p. e35.
91. Asmundsdottir, L.R., *et al.*, The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Infect*, 2009. **15**(6): p. 576-85.
92. MacCallum, D.M., *et al.*, Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. *Eukaryot Cell*, 2009. **8**(3): p. 373-87.
93. Bendel, C.M., *et al.*, Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Crit Care Med*, 2003. **31**(2): p. 501-7.
94. van de Veerdonk, F.L., B.J. Kullberg, and M.G. Netea, Pathogenesis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*, 2010. **16**(5): p. 453-9.
95. Netea, M.G., *et al.*, An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(1): p. 67-78.
96. Tada, H., *et al.*, *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol*, 2002. **46**(7): p. 503-12.

97. Netea, M.G., *et al.*, Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1642-50.
98. Netea, M.G., *et al.*, The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*, 2002. **185**(10): p. 1483-9.
99. Jouault, T., *et al.*, *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis*, 2003. **188**(1): p. 165-72.
100. Gantner, B.N., *et al.*, Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, 2003. **197**(9): p. 1107-17.
101. Wuthrich, M., G.S. Deepe, Jr., and B. Klein, Adaptive immunity to fungi. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 115-48.
102. Villamon, E., *et al.*, Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect*, 2004. **6**(1): p. 1-7.
103. Netea, M.G., *et al.*, Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*, 2004. **172**(6): p. 3712-8.
104. Bellocchio, S., *et al.*, The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 3059-69.
105. van de Veerdonk, F.L., *et al.*, Redundant role of TLR9 for anti-*Candida* host defense. *Immunobiology*, 2008. **213**(8): p. 613-20.
106. Netea, M.G., *et al.*, Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008. **52**(1): p. 118-23.
107. Brown, G.D., Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 33-43.
108. Stahl, P.D. and R.A. Ezekowitz, The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(1): p. 50-5.

109. Heinsbroek, S.E., *et al.*, Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(11): p. e1000218.
110. Sato, K., *et al.*, Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem*, 2006. **281**(50): p. 38854-66.
111. Means, T.K., *et al.*, Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med*, 2009. **206**(3): p. 637-53.
112. Romani, L., Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(4): p. 275-88.
113. Yang, Z. and J.S. Marshall, Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation. *Immunobiology*, 2009. **214**(4): p. 321-30.
114. Aratani, Y., *et al.*, Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun*, 1999. **67**(4): p. 1828-36.
115. Mansour, M.K. and S.M. Levitz, Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol*, 2002. **5**(4): p. 359-65.
116. Kennedy, A.D., *et al.*, Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(2): p. 467-78.
117. Reeves, E.P., *et al.*, Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, 2002. **416**(6878): p. 291-7.
118. Kohatsu, L., *et al.*, Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol*, 2006. **177**(7): p. 4718-26.
119. Netea, M.G., *et al.*, Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1498-505.
120. Vonk, A.G., *et al.*, Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*, 2006. **193**(10): p. 1419-26.

121. van Enckevort, F.H., *et al.*, Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice. *Med Mycol*, 1999. **37**(6): p. 419-26.
122. Romani, L., *et al.*, Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med*, 1996. **183**(4): p. 1345-55.
123. Kaposzta, R., *et al.*, Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1998. **66**(4): p. 1708-17.
124. Gallin, J.I., *et al.*, Interferon-gamma in the management of infectious diseases. *Ann Intern Med*, 1995. **123**(3): p. 216-24.
125. Balish, E., *et al.*, Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma^{-/-}) mice. *J Infect Dis*, 1998. **178**(2): p. 478-87.
126. Lavigne, L.M., *et al.*, The role of recombinant murine IL-12 and IFN-gamma in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection. *J Immunol*, 1998. **160**(1): p. 284-92.
127. Netea, M.G., *et al.*, Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(12): p. 3409-17.
128. Gozalbo, D. and M.L. Gil, IFN-gamma in *Candida albicans* infections. *Front Biosci* (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 1970-8.
129. Cobleigh, M.A. and M.D. Robek, Protective and pathological properties of IL-22 in liver disease: implications for viral hepatitis. *Am J Pathol*, 2013. **182**(1): p. 21-8.
130. Sabat, R., W. Ouyang, and K. Wolk, Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(1): p. 21-38.
131. Wolk, K., *et al.*, IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 241-54.

132. Andoh, A., *et al.*, Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology*, 2005. **129**(3): p. 969-84.
133. Besnard, A.G., *et al.*, Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **183**(9): p. 1153-63.
134. Feng, D., *et al.*, Interleukin-22 ameliorates cerulein-induced pancreatitis in mice by inhibiting the autophagic pathway. *Int J Biol Sci*, 2012. **8**(2): p. 249-57.
135. Shen, H., J.C. Goodall, and J.S. Hill Gaston, Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(6): p. 1647-56.
136. Witte, E., *et al.*, Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(5): p. 365-79.
137. van de Veerdonk, F.L., *et al.*, Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. *Shock*, 2010. **34**(4): p. 407-11.
138. Huang, W., *et al.*, Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis*, 2004. **190**(3): p. 624-31.
139. Lin, L., *et al.*, Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(12): p. e1000703.
140. Kurtzman C.P., F.J.W., *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4th ed. 1998, The Netherlands: Elsevier.
141. Chakrabarti, A., N. Nayak, and P. Talwar, *In vitro* proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia*, 1991. **114**(3): p. 163-8.
142. Kumar, C.P., *et al.*, Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. *Rev Iberoam Micol*, 2006. **23**(2): p. 101-3.
143. Slifkin, M., Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(12): p. 4626-8.

144. Luo, G., L.P. Samaranayake, and J.Y. Yau, *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(8): p. 2971-4.
145. Koga-Ito, C.Y., *et al.*, Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*, 2006. **161**(4): p. 219-23.
146. Melo, A.S., *et al.*, Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol*, 2011. **49**(3): p. 253-62.
147. Pannanusorn, S., V. Fernandez, and U. Romling, Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*, 2013. **56**(3): p. 264-72.
148. Sambrook J, F.F., Maniatis T, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2001, New York.
149. Clancy, C.J., S. Cheng, and M.H. Nguyen, Animal models of candidiasis. *Methods Mol Biol*, 2009. **499**: p. 65-76.
150. Scudamore, C.L., *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. First Edition ed. 2014: Wiley Blackwell. 248.
151. Brown, G.D., Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 1-21.
152. Rodrigues, A.G., *et al.*, Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(12): p. 5792-3.
153. Yigit, N., A.E. Aktas, and A. Ayyildiz, Detection of coagulase activity in pathogenic *Candida* species. *J Int Med Res*, 2008. **36**(6): p. 1378-82.
154. Abi-Chacra, E.A., *et al.*, Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res*, 2013. **13**(8): p. 831-48.
155. França, E.J., *et al.*, Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses*, 2011. **54**(4): p. e44-51.

156. Ge, Y.P., *et al.*, *In Vitro* Evaluation of Phospholipase, Proteinase, and Esterase Activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Mycopathologia*, 2011. **172**(6): p. 429-38.
157. Tosun, I., *et al.*, Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol*, 2013. **51**(5): p. 483-92.
158. Nemeth, T., *et al.*, Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e68704.
159. Chaves, G.M., *et al.*, Species distribution and virulence factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients in Brazil. *Mycopathologia*, 2013. **175**(3-4): p. 255-63.
160. Pugh, D. and R.A. Cawson, The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia*, 1977. **15**(1): p. 29-35.
161. Barrett-Bee, K., *et al.*, A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol*, 1985. **131**(5): p. 1217-21.
162. Jayatilake, J.A., Y.H. Samaranayake, and L.P. Samaranayake, An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*, 2005. **34**(4): p. 240-6.
163. Filler, S.G., *et al.*, *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production. *J Infect Dis*, 1991. **164**(5): p. 928-35.
164. Shimizu, M.T., *et al.*, Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses*, 1996. **39**(5-6): p. 161-7.
165. Yucesoy, M. and S. Marol, [Determination of esterase activity of *Candida* varieties]. *Mikrobiyol Bul*, 2003. **37**(1): p. 59-63.
166. Manns, J.M., D.M. Mosser, and H.R. Buckley, Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1994. **62**(11): p. 5154-6.

167. Silva, S., *et al.*, Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*, 2009. **47**(7): p. 681-9.
168. Chandra, J., P.K. Mukherjee, and M.A. Ghannoum, *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*, 2008. **3**(12): p. 1909-24.
169. Ramage, G., *et al.*, Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(9): p. 2475-9.
170. Kuhn, D.M., *et al.*, Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(1): p. 506-8.
171. Song, J.W., *et al.*, Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol*, 2005. **43**(7): p. 657-61.
172. de Toro, M., *et al.*, Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*, 2011. **17**(3): p. 418-24.
173. Lattif, A.A., *et al.*, Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol*, 2010. **300**(4): p. 265-70.
174. Ruiz, L.S., *et al.*, Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*, 2013. **175**(3-4): p. 231-9.
175. Hasan, F., *et al.*, Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*, 2009. **11**(8-9): p. 753-61.
176. Jain, N., *et al.*, Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(6): p. 1697-703.
177. Kumar, C.P. and T. Menon, Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Med Mycol*, 2006. **44**(1): p. 99-101.
178. Fanning, S., *et al.*, Divergent targets of *Candida albicans* biofilm regulator Bcr1 *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot Cell*, 2012. **11**(7): p. 896-904.

179. Nobile, C.J., *et al.*, A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, 2012. **148**(1-2): p. 126-38.
180. Finkel, J.S., *et al.*, Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(2): p. e1002525.
181. Srikantha, T., *et al.*, Identification of genes upregulated by the transcription factor Bcr1 that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* α /alpha biofilms. *Eukaryot Cell*, 2013. **12**(6): p. 875-88.
182. Jacobsen, I.D., *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*, 2014. **5**(2): p. 237-9.
183. Arendrup, M., T. Horn, and N. Frimodt-Moller, *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection*, 2002. **30**(5): p. 286-91.
184. Gacser, A., *et al.*, Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest*, 2007. **117**(10): p. 3049-58.
185. Bertini, A., *et al.*, Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol*, 2013. **303**(2): p. 98-103.
186. MacCallum, D.M., Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS Yeast Res*, 2009. **9**(7): p. 1111-22.
187. MacCallum, D.M., *et al.*, Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6420.
188. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 454-67.
189. Ye, P., *et al.*, Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*, 2001. **194**(4): p. 519-27.

190. De Luca, A., *et al.*, IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol*, 2010. **3**(4): p. 361-73.
191. Eyerich, S., *et al.*, IL-22 and TNF-alpha represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(7): p. 1894-901.
192. Romani, L., *et al.*, Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med*, 1992. **176**(1): p. 19-25.
193. Spellberg, B., *et al.*, Parenchymal organ, and not splenic, immunity correlates with host survival during disseminated candidiasis. *Infect Immun*, 2003. **71**(10): p. 5756-64.
194. Brieland, J., *et al.*, Comparison of pathogenesis and host immune responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in systemically infected immunocompetent mice. *Infect Immun*, 2001. **69**(8): p. 5046-55.
195. Lionakis, M.S., *et al.*, Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J Innate Immun*, 2011. **3**(2): p. 180-99.
196. Lionakis, M.S., *et al.*, Chemokine receptor CCR1 drives neutrophil-mediated kidney immunopathology and mortality in invasive candidiasis. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(8): p. e1002865.
197. Stacey, M.A., *et al.*, Neutrophils recruited by IL-22 in peripheral tissues function as TRAIL-dependent antiviral effectors against MCMV. *Cell Host Microbe*, 2014. **15**(4): p. 471-83.
198. Carvalho, L.P., *et al.*, Downregulation of IFN-gamma production in patients with recurrent vaginal candidiasis. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **109**(1): p. 102-5.
199. Fidel, P.L., Jr., The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal models. *Int Rev Immunol*, 2002. **21**(6): p. 515-48.

APÉNDICES

Apéndice A. Preparación de reactivos y soluciones

Acetato de sodio 3M pH 5.3 ± 1

Pesar 20.415 g de $C_2H_3NaO_2$ y aforar a 50 mL con $H_2O/DEPC$.

Ácido clorhídrico 1N

Diluir 8.35 mL de HCl en 91.65 mL de H_2O destilada.

Ácido crómico al 5%

Diluir 5 g de H_2CrO_4 en 100 mL de H_2O destilada.

Ácido periódico al 0.5%

Pesar 0.5 g de cristales de H_5IO_6 y diluir con 100 mL de H_2O .

Agua amoniacal al 1%

Diluir 1 ml de NH_4OH en 99 ml de H_2O destilada.

Agua/DEPC ($H_2O/DEPC$)

Agregar 1 mL de DEPC. Aforar a 1L con H_2O destilada estéril a 37°C por 12 h.

Alcohol ácido

Diluir 1 ml de HCl concentrado en 99 ml de etanol al 70%.

Bisulfito de sodio al 1%

Disolver 1 g de NaHSO_3 en 100 mL de H_2O destilada.

Borato de sodio (bórax) al 5%

Diluir 5 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de H_2O destilada.

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (Stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de H_2O ultrapura y aforar a 50 mL. Almacenar a 4°C protegido de la luz en recipiente de vidrio ámbar. Para preparar la solución de trabajo ($2 \mu\text{g/mL}$) se efectúa una dilución 1:250 de la solución stock (1 mL del stock + 249 mL de H_2O ultrapura).

Buffer de bloqueo (ELISA)

Disolver 1 g de ASB en 100 mL de PBS. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C . Vida útil: 1 semana.

Buffer de lavado (ELISA)

Diluir 0.05 mL de Tween 20 en 100 mL de PBS.

Cloruro de oro al 0.1%

Abrir cuidadosamente una ampolla de 0.1 g de AuCl_3 y permitir disolución completa en 100 mL de H_2O destilada. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

Cristal violeta al 0.4%

Pesar 0.4 g de cristales de cristal violeta y disolver en 100 mL de H_2O destilada. Esterilizar en autoclave.

CTAB/NaCl (CTAB 10%/NaCl 0.7 M)

Disolver 4.1g de NaCl en 80 mL de H₂O destilada, agregar lentamente 10 g de CTAB y calentar a 65°C mientras se mezclan. Ajustar a un volumen de 100 mL.

Diluyente de prueba (ELISA)

Pesar 0.1 g de ASB y agregar 0.05 mL de Tween 20, aforar a 100 mL con PBS. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. Vida útil: 1 semana.

EDTA 500 mM pH 8.0

Disolver 9.306 g de Na₂EDTA·2H₂O en 40 mL de H₂O ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL. Esterilizar en autoclave.

Etanol al 70%

Mezclar 70 mL de etanol absoluto con 30 mL de H₂O destilada estéril.

Etanol al 95%

Diluir 95 mL de etanol absoluto con 5 mL de H₂O destilada estéril.

Fenol saturado

- 1.- Pesar 500g de fenol y fundir en baño maría a 65°C.
- 2.- Agregar 8-hidroxiquinoleína (antioxidante) a una concentración final de 0.1%.
- 3.- Añadir un volumen de Tris-HCl 0.5M pH 8.0, mezclar con agitador magnético y ajustar con lentejas de NaOH el pH hasta que este sea mayor de 7.8 en la fase fenólica (medir con papel indicador).
- 4.- Agitar durante 24 h en cuarto frío, posteriormente dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando pipeta.
- 5.- Repetir la misma operación pero utilizando Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.
- 6.- Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 pH 8.0 conteniendo β-mercaptoetanol a una concentración de 0.2%.

7.- La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20°C y las alícuotas en uso se deberán almacenar a 4°C .

Formalina amortiguada (fijador tisular)

Disolver 8.1 g de NaCl en 900 mL de H_2O destilada y adicionar 100 mL de formaldehído (37% grado reactivo). Esterilizar en autoclave.

Gel de agarosa al 1.5%

Disolver 1.5 g de agarosa grado biología molecular en 100 mL de TBE 0.5x, calentar hasta disolución total. Una vez que hayan cesado los vapores añadir 10 μL de bromuro de etidio 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mezclar y vaciar en la cámara de electroforesis.

Hematoxilina de Gill

Pesar 2.36 g de cristales de hematoxilina anhidra, 0.2 g de NaIO_3 y 17.6 g de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, diluir en 730 mL de H_2O destilada. Añadir 2 mL de CH_3COOH y 250 mL de etilenglicol.

Jugo azul 6x (Buffer de carga para electroforesis)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 mL de glicerol en TE 1x pH 8.0 y aforar a 10 mL. No esterilizar.

Menadiona 0.4 mM

Pesar 0.07 g de menadiona y disolver en 1L de acetona absoluta. Almacenar en recipiente de vidrio ámbar a 4°C .

Metabisulfito de sodio al 10%

Disolver 10 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en 100 mL de H_2O destilada.

Metenamina al 3%

Diluir 3 g de metenamina en 100 mL de H_2O destilada

Nitrato de plata al 5%

Diluir 5 g de AgNO_3 en 100 mL de H_2O destilada.

PBS (solución amortiguadora de fosfatos) 10x (Stock)

Pesar 80.6 g de NaCl , 2.2 g de KCl , 11.5 g de Na_2HPO_4 y 2 g de KH_2PO_4 , y aforar con H_2O destilada a 1L. Esterilizar en autoclave.

Proteinasa K 10 mg/mL

Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 estéril y hacer alícuotas de 100 μL , las cuales deberá almacenarse a -20°C .

Reactivo de Kovac (sustrato)

Disolver 25 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído en 375 mL de alcohol amílico y adicionar 125 mL de HCl concentrado. Almacenar en frasco gotero ámbar a -20°C .

SDS (dodecilsulfato sódico) al 1%

Disolver 1 g de SDS en 100 mL de H_2O destilada. Esterilizar en autoclave.

SDS al 10%

Disolver 10 g de SDS en 100 mL de H_2O destilada. Esterilizar en autoclave.

SEVAG

Diluir 1 mL de alcohol isoamilico en 24 mL de CHCl_3 .

Solución de descontaminación de áreas contaminadas con bromuro de etidio

Diluir 10 mL de H_3PO_2 en 10 mL de H_2O destilada y con el volumen resultante disolver 4.2 g de NaNO_2 .

Solución de incubación/trabajo (Grocott-Gomori)

Añadir 3 mL de AgNO_3 5% en 40 mL de metenamina 3%, se forma un precipitado blanco que desaparece con agitación, enseguida se agregan 3 mL de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 5% y finalmente se adicionan 35 mL de H_2O destilada.

Solución de “lisis enzimática”

Mezclar 20 mL de Tris-HCl 100 mM, 0.4 mL de EDTA 500 mM y 60 mL de Tritón X-100 2%, llevar a 100 mL con H_2O destilada estéril y almacenar a 4°C. Al momento de su utilización, se deberá agregar lisozima (grado biología molecular) 2 mg/mL, para evitar degradación enzimática.

Solución enjuagadura sulfurosa (PAS)

Diluir 15 mL de HCl 1N en 300 mL de H_2O destilada, con el volumen resultante diluir 18 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 10%.

Solución salina al 0.85%

Disolver 0.85 g de NaCl en 100 mL de H_2O destilada. Esterilizar en autoclave.

Solución salina 5M

Disolver 292.2 g de NaCl en H_2O destilada y aforar a 1L. Esterilizar en autoclave.

TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 10x (Stock)

Disolver 54 g de Tris-base y 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 500 mM y en H_2O ultrapura, aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave. Para preparar la solución de trabajo (0.5x) se mezclan 50 mL del stock en H_2O destilada estéril y se afora a 1L.

TE (Tris-EDTA) 1x pH 8.0

Mezclar 500 μL de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 y 50 μL de EDTA 500 mM en H_2O destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 mL. Esterilizar en autoclave.

Tiosulfato de sodio al 3%

Pesar 3 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y disolver en 100 ml de H_2O destilada. Almacenaje a temperatura ambiente.

Tris-HCl 10 mM pH 7.5

Disolver 1.58 g de Tris-HCl en H_2O destilada, ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado y finalmente aforar a 1 L.

Tris-HCl 100 mM pH 8.0

Disolver 15.76 g de Tris-HCl en H_2O destilada, ajustar pH a 8.0 y aforar a 1 L.

Tris-HCl 500 mM pH 8.0

Disolver 30.3 g de Tris-base en 300 mL de H_2O ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

Tritón X-100 2%

Pesar 2 g de Tritón y disolver en 100 mL de H_2O destilada estéril.

XTT 1 mg/mL

Pesar 1 mg de XTT y disolver en 1 mL de solución salina estéril 0.85%.

Apéndice B. Técnicas histológicas

Técnica histológica de inclusión en parafina

Material y equipo necesario:

- Viales con las muestras a procesar fijadas en formalina amortiguada, paraformaldehído al 4 % o glutaraldehído al 2.5 %.
- Histoquinete.
- Estufa a 60 °C.
- Centro de inclusión.
- Moldes de acero.
- Agujas histológicas.
- Pinzas de disección.

Procedimiento:

1. Obtener y fijar los fragmentos de los tejidos u órganos durante un período mínimo de 2 horas.
2. Lavar en agua corriente.
3. Deshidratar gradualmente con etanol (en histoquinete):
 - a) Pasar por etanol al 60 % durante 60 min.

- b) Pasar por etanol al 70 % durante 60 min.
 - c) Pasar por etanol al 80 % durante 60 min.
 - d) Pasar por etanol al 96 % durante 60 min.
 - e) Pasar por etanol al 96 % durante 60 min.
 - f) Pasar por etanol absoluto durante 60 min.
 - g) Pasar por etanol absoluto durante 60 min.
4. Pasar por etanol-xilol 1:1 durante 60 min.
 5. Aclarar en xilol durante 60 min dos veces.
 6. Pre-incluir los fragmentos en parafina líquida a 60 °C durante 60 min dos veces.
 7. Incluir los fragmentos en parafina y dejar solidificar en los moldes de acero.

Tinción de rutina con hematoxilina y eosina (H-E)

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 micras de grosor.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas.
2. Colocar las laminillas en la hematoxilina de Gill por 2 min.
3. Enjuagar lentamente con agua corriente 2 veces.
4. Una inmersión rápida en alcohol ácido.
5. Enjuagar lentamente con agua corriente 2 veces.
6. Dos inmersiones rápidas en agua amoniacal al 1 %.
7. Enjuagar lentamente con agua corriente 2 veces.
8. Enjuagar lentamente con agua destilada.
9. Colocar las laminillas en eosina (6 inmersiones).
10. Enjuagar brevemente con alcohol al 96 %.
11. Deshidratar y montar las laminillas.

Resultados esperados:

Núcleos en color morado oscuro. Citoplasma y fibras de la matriz extracelular en color rosa.

Técnica histoquímica con ácido peryódico de Schiff (PAS)

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 micras de grosor.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas.
2. Colocar las laminillas en solución acuosa de ácido peryódico por aprox. 7.5 min.
3. Enjuagar con agua destilada unas 2 o 3 veces.
4. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff por 13 a 15 min.
5. Diferenciar en la solución sulfurosa para enjuagar unos dos cambios de 2 min. cada uno.
6. Lavar con agua corriente por 3-5 min.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Contrastar con hematoxilina de Gill por 1-2 min.
9. Lavar con agua corriente.
10. Decolorar ligeramente en alcohol ácido y posteriormente lavar con agua destilada.
11. Virar en agua amoniacal, lavar con agua corriente y enjuagar con agua destilada.
12. Deshidratar y montar las laminillas.

Resultados esperados:

Levaduras en color magenta.

Técnica histoquímica con plata metenamina de Grocott

Secciones:

Tejido fijado en formol y seccionado a 5 micras de grosor.

Procedimiento:

Debe evitarse durante todo el proceso el uso de instrumentos metálicos, ya que la plata precipitaría sobre ellos.

1. Desparafinar e hidratar.
2. Oxidación en ácido crómico al 5% por 15 min.
3. Lavar con agua corriente.
4. Enjuagar en bisulfito sódico al 1%.
5. Lavar con agua corriente por 3 min. y enjuagar bien en 2-3 cambios de agua destilada.
6. Pasar los cortes en solución de incubación a 60°C en oscuridad por 1 h.
7. Lavar bien en dos cambios con agua destilada y uno más con agua bidestilada.
8. Dar tono en 0.1% de cloruro de oro por 4 min.
9. Pasar las secciones en tiosulfato de sodio al 3% por 5 min.
10. Lavar bien en agua corriente.
11. Contrastar claramente en la solución de verde brillante por 10 s.
12. Lavar en agua corriente.
13. Deshidratar, aclarar, montar.

Resultados esperados:

Hifas de hongos y cuerpos levaduriformes en color negro. Fondo: verde pálido.

Apéndice C. Producción científica



ARTÍCULO DE REVISIÓN

***Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante**

Rogelio de J. Treviño-Rangel,¹ José Gerardo González-González,² Elvira Garza-González,³ Gloria M. González.¹

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México.

² Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México.

³ Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México

Recibido: Febrero 2012. Aceptado: Junio 2012

PALABRAS CLAVE

Candidosis, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, México.

Resumen

Candida parapsilosis ha emergido como agente importante de fungemia en varias regiones geográficas, incluido México. En el entorno clínico esta levadura oportunista se ha asociado con las manos de trabajadores del área de salud, y es particularmente frecuente en infecciones sistémicas en neonatos prematuros de bajo peso, pacientes cateterizados, además de sujetos bajo esquemas de hiperalimentación intravenosa. *C. parapsilosis* es un complejo de tres especies: *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*, con diferencias importantes en cuanto a virulencia y susceptibilidad antifúngica.

KEYWORDS

Candidosis, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, Mexico.

***Candida parapsilosis*, a challenging threat**

Abstract

Candida parapsilosis has emerged as an important agent of fungemia in various geographic regions, even in Mexico. In the clinical setting, this opportunistic yeast has been associated with the hands of healthcare workers, and is particularly related to bloodstream infections in low weight birth neonates, catheterized patients and subjects under intravenous hyperalimentation schemes. *C. parapsilosis* is a complex of three species named: *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, with important differences in virulence and antifungal susceptibility.

Correspondencia: M.C. Rogelio de J. Treviño-Rangel, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Madero y Dr. Eduardo A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro. C.P. 64460. Monterrey, N.L., México. Teléfono: (5281) 8329 4177. Fax: (5281) 8676 8605. Correo electrónico: roghe24@gmail.com

Short Communication

Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico

ROGELIO DE J. TREVIÑO-RANGEL*, ELVIRA GARZA-GONZÁLEZ*, J. GERARDO GONZÁLEZ†, VIRGILIO BOCANEGRA-GARCÍA‡, JORGE M. LLACA† & GLORIA M. GONZÁLEZ*

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, †Hospital Universitario, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, and ‡Laboratorio de Medicina de Conservación, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México

Recently, it was proposed that the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis* was a complex composed of the following three species: *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*. A set of 344 clinical isolates of *Candida parapsilosis* from Monterrey, Mexico was re-identified by RFLP. Their antifungal susceptibility to fluconazole, caspofungin, anidulafungin and micafungin was determined using the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3 protocol. *Candida parapsilosis* sensu stricto was the most frequent species, and was the only one which showed resistance to antifungals.

Keywords Candidosis, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, antifungal susceptibility

Introduction

Candida parapsilosis has been reported as an important agent of fungemia in various geographic regions including Mexico [1–3]. In the clinical setting, this opportunistic yeast has been recovered from the hands of health-care workers [1], and is primarily associated with bloodstream infections in low-birth weight neonates, catheter-associated candidiasis and intravenous hyperalimentation [4,5]. *C. parapsilosis* is a complex of three species, i.e., *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* [6]. Recent studies reported a decreased susceptibility of *C. parapsilosis* to azoles and echinocandins which might become a cause of clinical concern [7,8].

The purpose of this study was to re-identify by RFLP a total of 344 clinical isolates of *C. parapsilosis* collected over a 10-year period (1999–2010) from Monterrey, Mexico, and to determine their antifungal susceptibility profiles to fluconazole (FLC), caspofungin (CAS), anidulafungin (ANI) and micafungin (MCF), using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) method.

Materials and methods

Isolates were grown at 37°C for 24 h on potato dextrose agar (PDA) slants (Difco, Detroit, MI), and initially identified as *C. parapsilosis* through the use of API 20C AUX strips (bioMérieux, Mexico) and standard morphological methods. Details regarding the isolates are presented in Table 1.

In order to re-identify the isolates, they were subcultured on PDA slants and incubated at 37°C for 24 h. A 15-1 equivalent of each isolate was scraped from the plate and resuspended in 100 µl of sterile distilled water. The yeasts were then lysed by heating to 95°C for 10 min for DNA extraction.

Received 14 December 2011; Received in final revised form 24 January 2012; Accepted 10 March 2012

Correspondence: Gloria M. González, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. Eduardo A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N.L. México, 64460. Tel: (5281) 8329 4177; fax: (5281) 8676 8605; E-mail: gmglez@yahoo.com.mx

Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex

ROGELIO DE J. TREVIÑO-RANGEL*, J. GERARDO GONZÁLEZ† & GLORIA M. GONZÁLEZ*

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, and

†Hospital Universitario, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Candida parapsilosis is considered as an important emerging fungal pathogen and was recently found to be a complex that include three species, i.e., *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. The aim of this study was to determine the *in vitro* aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of 65 clinical isolates of the *C. parapsilosis* complex, which had been previously identified by RFLP-*BanI* analysis. Of the enzymes evaluated, aspartyl proteinase was the least produced by the *C. parapsilosis* species complex. Phospholipase and esterase were strongly expressed by *C. orthopsilosis* (67% of isolates), while 10% and 13% of *C. parapsilosis* sensu stricto isolates were strong producers, respectively, of these two enzymes. In contrast, high production of both enzymes was not detected in *C. metapsilosis*. Hemolysin activity was significantly more abundant in *C. orthopsilosis* (87%) than *C. parapsilosis* sensu stricto (67%). Overall, *C. orthopsilosis* isolates were statistically associated with the production of hemolysins ($P = 0.048$) and phospholipases ($P < 0.0001$) compared to isolates of *C. parapsilosis* sensu stricto or *C. metapsilosis*. Furthermore, a statistical association was found between isolates recovered from blood and phospholipase production ($P = 0.017$). The distribution of isolates obtained from blood was 30% of *C. parapsilosis* sensu stricto, 67% of *C. orthopsilosis* and 20% of *C. metapsilosis*.

Keywords *Candida parapsilosis*, aspartyl proteinase, phospholipase, esterase, hemolysin

Introduction

The opportunistic yeast *Candida parapsilosis* has increased in significance and prevalence over the past 20 years [1] and has been ranked as the second most common agent of fungemia in Europe, Asia and Latin America [2–5]. The transmission of *C. parapsilosis* has been correlated with the inadequate sanitary practices of healthcare workers (i.e., hand contact) [3] and has been specifically associated with bloodstream infections in low birth-weight

neonates, catheter-associated candidiasis and intravenous hyperalimentation [6,7].

In 2005, based on DNA sequences, the genetically heterogeneous taxon *C. parapsilosis* was recognized to have three morphologically and physiologically indistinguishable species, i.e., *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* [8].

In Monterrey, Mexico, in particular, *C. parapsilosis* has clearly emerged as the main cause of disseminated candidiasis, predominantly affecting ≤ 1 -year-old infants [9]. Recently, Treviño-Rangel *et al.* established that *C. parapsilosis* sensu stricto was the most prevalent species of the *C. parapsilosis* complex in Monterrey, and the only one of the three species that showed resistance to conventional antifungal compounds [10].

Extracellular hydrolytic enzymes, such as aspartyl proteinases, phospholipases and esterases, have been considered

Received 29 March 2012; Received in final form 22 June 2012; Accepted 12 July 2012

Correspondence: Gloria M. González, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. Eduardo A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N.L., México, 64460. Tel.: (5281) 8329 4177; Fax: (5281) 8676 8605; E-mail: gmglez@yahoo.com.mx



Original Article

Evaluation of *in vivo* pathogenicity of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* with different enzymatic profiles in a murine model of disseminated candidiasis

Rogelio de J. Treviño-Rangel¹, Irám P. Rodríguez-Sánchez²,
M. Elizondo-Zertuche¹, Margarita L. Martínez-Fierro³, Idalia Garza-Veloz³,
Víktor J. Romero-Díaz⁴, José G. González⁵ and Gloria M. González^{1,*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, ²Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico, ³Laboratorio de Medicina Molecular, Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Zacatecas, Mexico, ⁴Departamento de Histología, Facultad de Medicina and ⁵Hospital Universitario, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

*To whom correspondence should be addressed. Gloria M. González, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. Eduardo A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N.L., México, 64460. Tel: +5281 8329 4177; Fax: +5281 8348 5477; E-mail: gmglez@yahoo.com.mx

Received 18 June 2013; Revised 31 August 2013; Accepted 9 November 2013

Abstract

Six isolates of the *Candida parapsilosis* complex with different enzymatic profiles were used to induce systemic infection in immunocompetent BALB/c mice. Fungal tissue burden was determined on days 2, 5, 10, and 15 post challenge. The highest fungal load irrespective of post-infection day was detected in the kidney, followed by the spleen, lung, and liver, with a tendency for the fungal burden to decrease by day 15 in all groups. Significant differences among the strains were not detected, suggesting that the three species of the “psilosis” group possess a similar pathogenic potential in disseminated candidiasis regardless of their enzymatic profiles.

Key words: murine model, disseminated candidiasis, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, fungal tissue burden.

Introduction

Candida parapsilosis, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis*, which comprise the “psilosis” group, are a cryptic species that frequently cause opportunistic infections. These infections are associated with high morbidity and mortality rates in hospitalized immune-compromised patients [1], principally among the pediatric population [2]. These yeasts have

been the subject of an increasing number of epidemiological surveys [3,4], as well as *in vitro* studies of extracellular hydrolytic enzymes [5,6] and biofilm production capability [7,8].

To date there are limited reports that focus on the pathogenic potential of psilosis group members. Gácsér et al. studied the *in vitro* behavior of the three species in oral



Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



Original article

Biofilm formation and genetic variability of *BCR1* gene in the *Candida parapsilosis* complex

Rogelio de J. Treviño-Rangel^a, Irám P. Rodríguez-Sánchez^b, Adrián G. Rosas-Taraco^c,
Romel Hernández-Bello^a, José G. González^d, Gloria M. González^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

^b Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

^c Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

^d Hospital Universitario, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2014

Accepted 11 November 2014

Available online xxx

Keywords:

Candida parapsilosis complex

Biofilm

Crystal violet staining

XTT

BCR1

ABSTRACT

Background: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* are cryptic species that belong to the *C. parapsilosis* complex, which has been increasingly associated to fungemia in various geographic regions, principally due to the capability of these yeasts to form biofilms on indwelling medical devices. *BCR1* is one of the most studied genes related to *Candida* spp. biofilms.

Aims: To evaluate the biofilm forming capability of a subset of 65 clinical isolates of the *C. parapsilosis* complex using two conventional approaches, and to look for an association between the biofilm forming phenotype and genetic variants of a fragment of *BCR1*.

Methods: The biofilm determination was carried out by crystal violet staining and tetrazolium reduction assay. On the other hand, a segment of *BCR1* gene was sequenced by Sanger methodology.

Results: *C. parapsilosis sensu stricto* was statistically associated with a low biofilm production phenotype, while *C. orthopsilosis* was significantly associated with both phenotypes (high and low biofilm producers). According to the *BCR1* sequence analysis, genetic variability was detected in *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* without a particular biofilm formation phenotype association.

Conclusions: Under the adopted experimental design, *C. parapsilosis sensu stricto* was associated with the low biofilm phenotype and *C. orthopsilosis* with both phenotypes (high and low biofilm producers). On the other hand, an association between a biofilm forming phenotype and a particular genetic variant of the analyzed *BCR1* fragment was not found.

© 2014 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Formación de biopelícula y variabilidad genética del gen *BCR1* en el complejo *Candida parapsilosis*

RESUMEN

Antecedentes: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* son especies crípticas que integran el complejo *C. parapsilosis*, asociado de forma creciente a fungemia en diversas regiones geográficas. Dicho crecimiento se debe principalmente a la capacidad de estas levaduras de crear biopelículas en los dispositivos médicos. El gen *BCR1* es uno de los más estudiados en las biopelículas de *Candida* spp.

Palabras clave:

Complejo *Candida parapsilosis*

Biopelícula

Tinción con cristal violeta

XTT

BCR1

* Corresponding author.

E-mail address: gmglez@yahoo.com.mx (G.M. González).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2014.11.001>

1130-1406/© 2014 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.



Original Article

***Candida parapsilosis* complex induces local inflammatory cytokines in immunocompetent mice**

Rogelio de J. Treviño-Rangel¹, Gloria M. González¹, Azalia M. Martínez-Castilla², Jaime García-Juárez³, Efrén R. Robledo-Leal⁴, José G. González⁵ and Adrian G. Rosas-Taraco^{2,*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, Mexico, ²Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, Mexico, ³Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, Mexico, ⁴Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México and ⁵Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, Mexico

*To whom correspondence should be addressed. Adrian G. Rosas-Taraco, Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Gonzalitos 235 Nte., Mitras Centro, 64460, Monterrey, Nuevo León, Mexico. Tel: +52 (81) 83294211, Fax: +52 (81) 83331058; E-mail: adrian.rosastr@uanl.edu.mx

Received 6 November 2014; Revised 12 January 2015; Accepted 22 February 2015

Abstract

Despite the increasing incidence of the *Candida parapsilosis* complex in the clinical setting and high mortality rates associated with disseminated infection, the host-fungus interactions regarding *Candida parapsilosis* sensu stricto and the closely related species *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* remains blurred. In this study, we analyzed inflammatory cytokines levels and histopathology as well as fungal burden in spleen, kidney and lung of mice infected with six strains of the “psilosis” group with different enzymatic profiles. Strong interleukin 22 (IL-22) and tumor necrosis factor α (TNF- α) responses were observed in analyzed organs from infected mice ($P < .0001$) regardless of the species and enzymatic profile. TNF- α and IL-22 levels were related with spleen inflammation and fungal load. Fungal cells were detected only in spleen and kidney of infected mice, especially by day 2 post-challenge. The kidney showed glomerular retraction and partial destruction of renal tubules. Our data suggest that a strong inflammatory response, mainly of IL-22 and TNF- α , could be involved in *Candida parapsilosis* complex infection control.

Key words: *Candida parapsilosis* complex, cytokines response, IL-22, TNF- α , IFN- γ , IL-17A.

Introduction

Candida parapsilosis sensu stricto has been recognized as one of the most common *Candida* species that originate candidemia [1,2]. Along with *Candida orthopsilosis* and

Candida metapsilosis, these three phenotypically indistinguishable cryptic yeasts belong to the so-called psilosis group [3]. The administration of parenteral hyperalimentation solutions, as well as the use of intravascular devices and

Síntesis curricular

Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

Tesis: “Determinación de factores de virulencia de las especies del complejo *Candida parapsilosis* y su participación en el daño tisular y producción de citocinas en un modelo murino de candidiasis diseminada.”

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Biografía: Nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León el 24 de Diciembre de 1986. Primogénito de Rogelio Benito Treviño Garza e Idalia Isabel Rangel de Treviño.

Trayectoria académica: Químico Farmacéutico Biólogo con acentuación en Farmacia egresado en 2008 de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L., primer lugar de generación. En 2011 obtiene el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica, título obtenido con mención honorífica en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Ha realizado dos estancias académicas de investigación, una en el ‘*Laboratory of Mycology Research*’ de la División de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Medicina Interna de la Escuela de Medicina de la Universidad de Texas en Houston, E.U.A., y una más en el ‘*Fungus Testing Lab*’ del Departamento de Patología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Texas en San Antonio, E.U.A. Doblemente reconocido como “Estudiante Distinguido de Posgrado” por la Sub-dirección de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Cuenta además con tres diplomados con valor curricular, uno en “Enseñanza de las Ciencias Básicas con un Enfoque Clínico” (Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.), otro en

Histotecnología (Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.) y uno más en Bioética Básica (Instituto de Investigaciones en Bioética, A.C.). Su principal línea de investigación se centra en la epidemiología molecular, patogénesis y virulencia de agentes fúngicos de interés clínico, de donde a la fecha se desprende un artículo de revisión y más de diez artículos originales publicados en revistas indexadas de carácter internacional. Es co-autor de un capítulo de libro y ha presentado ponencias y trabajos de investigación en más de 10 eventos académicos nacionales e internacionales. Se le han otorgado tres galardones en investigación y actualmente es miembro de la Sociedad Americana de Microbiología, así como de la Asociación Mexicana de Micología Médica y la Asociación Mexicana de Bioseguridad.

Experiencia profesional: Servicio social como farmacéutico hospitalario en Hospital San José TEC de Monterrey y Christus Muguerza Alta Especialidad, y como farmacéutico comunitario en el Recetario Magistral de Farmacia Universitaria, U.A.N.L. Científico certificado desde 2014 para el transporte y biocustodia de sustancias biológico-infecciosas por la Asociación Mexicana de Bioseguridad, A.C.