

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



IMPORTANCIA DE LAS RUTAS MEDIADAS POR MAPK EN  
*Candida albicans* EN EL RECONOCIMIENTO INMUNITARIO Y EN  
LA COLONIZACIÓN GASTROINTESTINAL EN UN MODELO MURINO

TESIS DOCTORAL DE:

**ANTONIO DANIEL PRIETO PRIETO**

DIRIGIDA POR:

**JESÚS PLA ALONSO**

Madrid, 2013



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**

**IMPORTANCIA DE LAS RUTAS MEDIADAS POR MAPK  
EN *Candida albicans* EN EL RECONOCIMIENTO  
INMUNITARIO Y EN LA COLONIZACIÓN  
GASTROINTESTINAL EN UN MODELO MURINO**

**TESIS DOCTORAL**  
**ANTONIO DANIEL PRIETO PRIETO**  
**MADRID, 2012**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**IMPORTANCIA DE LAS RUTAS MEDIADAS POR MAPK EN  
*Candida albicans* EN EL RECONOCIMIENTO INMUNITARIO Y EN  
LA COLONIZACIÓN GASTROINTESTINAL EN UN MODELO MURINO.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por

D. ANTONIO DANIEL PRIETO PRIETO

DIRECTOR:

DR. JESÚS PLA ALONSO



**D<sup>a</sup>. CONCEPCIÓN GIL GARCÍA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICA:** Que D. ANTONIO DANIEL PRIETO PRIETO ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección del Dr. Jesús Pla Alonso, el trabajo que presenta para optar al Grado de Doctor en Farmacia con el título:

**“Importancia de las rutas mediadas por MAPK en *Candida albicans* en el reconocimiento inmunitario y en la colonización gastrointestinal en un modelo murino.”**

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid a 15 de Noviembre de 2012.

Fdo. Prof. Dra. Concepción Gil García



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- **BIO2006-03637:** Rutas de transducción de señal implicadas en la resistencia a estrés oxidativo y nitrosativo en el hongo patógeno *Candida albicans*: aplicaciones en el desarrollo de una vacuna frente a las candidiasis.  
**Entidad financiadora:** Ministerio de Educación y Ciencia. Programa Nacional de Biotecnología 2007-2010.
- **HA2006-002:** Mecanismos de Interacción Huésped-Patógeno.  
**Entidad financiadora:** Ministerio de Educación y Ciencia, acciones integradas 2007-2008.
- **BIO2009-07788:** Implicación de rutas de transducción de señal mediadas por MAP quinasa en la construcción de la pared celular de *Candida albicans*: relevancia en modelos de comensalismo en ratón.  
**Entidad financiadora:** Ministerio de Educación y Ciencia. Programa Nacional de Biotecnología 2010-2013.

así como a la concesión de las siguientes ayudas:

- **Beca Predoctoral del programa de Formación del Personal Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.** Julio 2008 - Julio 2012
- **Ayudas para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPU,** concedidas para las estancias temporales en los laboratorios del Dr. Ulrich von Andrian (Harvard Medical School, Boston, EEUU) en 2010 y de la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Gil (Facultad de Biología, Universidad de Valencia) en 2011.



*A Cris  
a Carlos  
y a mis Padres*



Ocurre que tras pasar 10 años felices en una Facultad ya la consideras tu hábitat. Un lugar donde te desenvuelves con soltura y naturalidad, y que siempre te recibe con un soplo familiar. El Departamento podría incluso definirlo como un hogar, en el que he convivido con un gran número de personas, especialmente estos años de Tesis.

De esta manera no se puede menos que aprovechar esta oportunidad para agradecer a todos los miembros que forman o han formado parte del Departamento de Microbiología II durante estos últimos años por su gran dedicación a la Ciencia y a las personas. Todos han sido importantes sólo por estar ahí, aunque algunos por mayor cercanía y complicidad ocuparán un lugar especial en los recuerdos.

A Jesús le debo mucho, por darme su confianza y seguridad, que me acompañaran siempre y mostrarme que las cosas en Ciencia son lo que son, no lo que queremos o creemos que deberían ser. Discutir con él (de Ciencia) ha sido siempre divertido y enriquecedor. Divertido sobre todo cuando te das cuenta de que lo mejor que puedes hacer es llevarle la contraria, de forma razonada, eso sí; y enriquecedor sobre todo cuando le tratas de tú a tú. Me ha transmitido su punto especial de perseverancia e inconformismo tan necesarios en este campo y en la vida.

Rebeca, más pausada, pero siempre perseverante. De ella he aprendido que puedes conseguir todos lo que te propones, si das lo mejor de ti y sin necesidad de montar tanto alboroto. Siempre es agradable que esté cerca porque da una sensación de seguridad en que todo va a salir bien.

Elvira me enseñó en los primeros momentos y hemos aprendido juntos en los últimos. Es un impulso fuerte y constante, que te empuja cuando más lo necesitas y te induce a nunca dejar para mañana lo que, de hecho, podrías haber hecho ayer. En definitiva tiene la *voluntad del guerrero*.

La falta que más he sentido es la de David. Le valoro sus ganas de mostrarme toda su experiencia y conocimiento con ilusión y disponibilidad total. Le tengo que agradecer también su confianza en mí cuando aún no había hecho nada para ganármela.

Luego ya llegaron Carmen e Inês. No sé muy bien en qué orden porque seguimos sin ponernos de acuerdo en eso, pero para el caso es como si hubiéramos entrado los tres a la par. De hecho parecemos siameses, siempre juntos haciendo experimentos hasta las tantas o en festivos, lidiando con impresos varios, con los cursos de Doctorado, el DEA... Compartir agobios une ¡y mucho! Aunque no sólo de penas vive el doctorando, hemos pasado muchos muchísimos ratos buenos dentro y fuera del laboratorio. También con Blanca, que fue como un soplo de aire fresco y loco, cuando ya empezábamos a marchitarnos. Con ella he aprendido de la forma más gratificante posible, enseñando.

Con mis niñas el tiempo parece no pasar, entre risas y *consejos de sabios*. Sin ellas todo esto habría sido sólo un trabajo y no un lugar que añoras durante las vacaciones.

Pero no todo ha ocurrido en el *depar*, también me ha tocado desplazarme a otros lugares donde me han tratado de la mejor manera imaginable. En Stuttgart, agradezco a Martin y Rupp que me acogieran y enseñaran de tan buen grado, a pesar de lo novato que era. Más adelante en Boston ya fue como estar en otro mundo, sin que faltaran grandes colegas que me ayudaron y apoyaron en todo, especialmente Elena, Matteo y Angelo. La última, pero no menos especial fue la estancia en Valencia. Es de la que volví con más pena porque lo que dejaba allí eran amigos de verdad. Me siento realmente afortunado de haber conocido y trabajado codo con codo con Viqui, Nuria y Javi; y muy especialmente con Marisa y Dani.

Por último, decirles a Cris, a mi hermano y a mis padres, que todo esto no habría siquiera comenzado de no ser por ellos. Gracias a ellos me siento orgulloso de quien y como soy. Han sido el gran apoyo totalmente incondicional, que no precisan saber porque les necesitas y siempre están ahí.

Veremos que viene ahora...

# Índice

---



<b>Abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
1. La infección fúngica en la actualidad: <i>Candida albicans</i> como modelo de investigación .....	11
A. Relevancia y generalidades.....	11
B. La pared celular de <i>C. albicans</i> .....	13
C. Patogenicidad y <i>C. albicans</i> .....	14
D. Adaptación del microorganismo en el hospedador a través de rutas de transducción de señales .....	18
E. Herramientas genéticas para el estudio de <i>C. albicans</i> .....	24
2. Respuesta inmunitaria del hospedador frente a <i>C. albicans</i> .....	29
A. Reconocimiento de <i>C. albicans</i> mediado por células del hospedador.....	29
B. Activación de las defensas del hospedador.....	41
3. Estudios <i>in vivo</i> de la relación <i>C. albicans</i> -Hospedador .....	44
A. Modelos de estudio en invertebrados .....	45
B. Modelos de estudio en mamíferos.....	45
<b>Planteamientos y objetivos</b> .....	<b>49</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>53</b>
1. Desarrollo de herramientas para el estudio de la infección por <i>C. albicans</i> .....	55
A. Marcaje genético de <i>C. albicans</i> dependiente de sustrato .....	55
B. Desarrollo de un sistema de visualización fluorescente en <i>C. albicans</i> .....	58
2. Estudio de la interacción de mutantes de <i>C. albicans</i> alterados en pared celular con el hospedador .....	85
A. Análisis del contenido en $\beta$ -(1,3)-glucano .....	85
B. Interacción de mutantes en MAPK con distintos tipos celulares del hospedador .	89
3. Colonización de <i>C. albicans</i> en un modelo murino <i>in vivo</i> .....	98
A. Análisis y optimización del protocolo de colonización.....	98
B. Relevancia de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs en la colonización intestinal por <i>C. albicans</i> .....	123
C. Colonización de ratones <i>Tlr2<sup>-/-</sup></i> , <i>Tlr4<sup>-/-</sup></i> y <i>Myd88<sup>-/-</sup></i> .....	134
D. Infección de órganos diana por <i>C. albicans</i> .....	135
<b>Discusión</b> .....	<b>143</b>

1. Reconocimiento inmunitario de mutantes de <i>C. albicans</i> alterados en pared .....	146
2. Colonización y diseminación de <i>C. albicans</i> en un modelo murino <i>in vivo</i> .....	153
<b>Conclusiones</b> .....	<b>169</b>
<b>Planteamientos futuros</b> .....	<b>173</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>177</b>
1. Tipos celulares empleados .....	179
A. Microorganismos .....	179
B. Líneas celulares de mamífero .....	181
2. Animales de experimentación .....	181
A. Estabulados en la Universidad Complutense de Madrid .....	182
B. Estabulados en la Universidad de Valencia .....	182
C. Estabulados en Harvard Medical School .....	182
3. Manipulación y análisis de estirpes celulares .....	183
A. Microorganismos .....	183
B. Líneas celulares .....	185
4. Técnicas de biología molecular .....	187
A. Manipulación de DNA .....	187
B. Manipulación de proteínas .....	192
5. Técnicas de luminiscencia, microscopía y citómetro de flujo .....	193
A. Medida de luminiscencia .....	193
B. Microscopía .....	193
C. Citometría de flujo .....	194
6. Determinación de citoquinas .....	196
7. Ensayos en animales de experimentación .....	196
A. Ensayo de colonización .....	196
B. Ensayos de diseminación .....	197
8. Estadística y soporte bioinformático .....	200
<b>Listado de figuras y tablas</b> .....	<b>201</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>209</b>

# Abreviaturas

---



$\mu$ L	Microlitro	PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
AMPc	Adenosin-monofosfato cíclico	PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BSA	Albumina de suero bovino	Pir	Proteína con dominios con repeticiones internas
Ca	<i>Candida albicans</i>	PLM	Fosfolipomanano
CCD	<i>Charge-coupled device</i>	PMN	Polimorfonucleares
cel/mL	Células/mililitro	PP	Placa de Peyer
CFUs	Unidades formadoras de colonias	PPM	Fosfopeptidomanano
CMC	Candidiasis mucosa crónica	PRR	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos.
CWP	Proteína de pared celular.	r.p.m.	Revoluciones por minuto
Cy	Ciclofosfamida	RNA	Ácido ribonucleico
D.O.	Densidad óptica	ROS	Especies reactivas de oxígeno.
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol	SAP	Aspartil proteasa secretada
DCs	Células dendríticas	SCF	<i>Stem cell factor</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico	SCS	Seno subcapsular
Dox	Doxiciclina	SD	Medio sintético dextrosa
DTT	Dithiothreitol	SDS	Dodecil sulfato sódico
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>	SEM	Error estándar de la media.
FACS	Fluorescence activated cell sorting	SFB	Bacterias filamentosas segmentadas
FBS	Suero fetal bovino	t	Tiempo
FP	Proteína fluorescente	TCR	Receptores de células T
g	Gramo	TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
GP	Ganglio poplíteo	T <sub>reg</sub>	Linfocitos T reguladores
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol	UV	Ultravioleta
h	Horas	wt	Cepa silvestre
HK	<i>Heat killed</i>	YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
HPSC	Células madre y progenitoras hematopoyéticas	$\Delta$	Delección
ID	Intestino delgado		
IFI	Inmunofluorescencia indirecta		
IG	Intestino grueso		
IFN- $\gamma$	Interferón gamma		
IP	Ioduro de propidio		
IVM	Microscopía <i>intra vital</i>		
Kb	Kilopares de bases		
KO	<i>Knockout</i>		
LPS	Lipopolisacárido		
M	Molar		
MAC	Complejo de ataque a la membrana.		
MAP	Proteína activada por mitógeno		
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno		
MAPKK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno		
MAPKKK	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno		
mg/mL	Miligramo/mililitro		
min	Minutos		
mL	Mililitro		
MLN	Ganglio linfático mesentérico		
mM	Milimolar		
moDCs	Células dendríticas derivadas de monocito		
MPM	Microscopía multifotón		
OPC	Candidiasis oro-faríngea		
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida		
PAK	Quinasa asociada a p21		



# Introducción

---



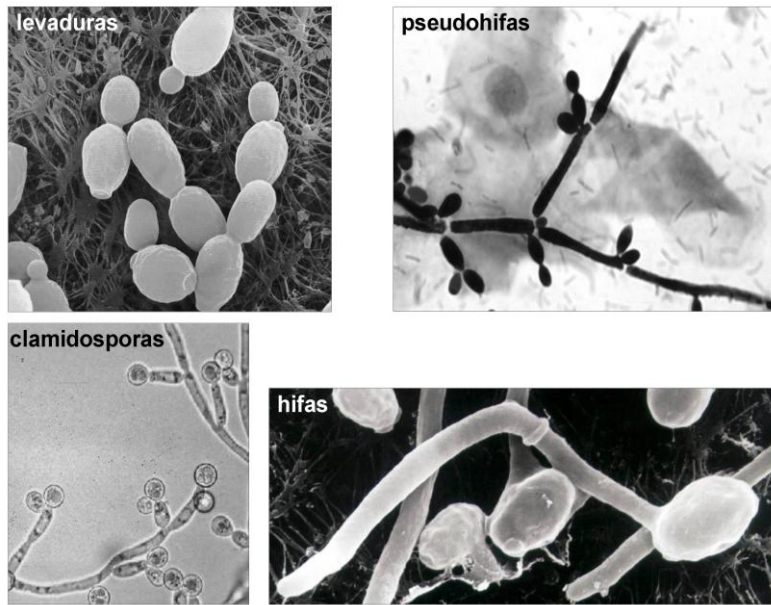
# 1. La infección fúngica en la actualidad: *Candida albicans* como modelo de investigación

## A. Relevancia y generalidades

Las infecciones producidas por hongos representan actualmente un problema sanitario importante de difícil control (Pfaller and Diekema, 2007). Su tratamiento es difícil debido, en parte, al limitado arsenal terapéutico disponible para su eliminación (especialmente en las de tipo sistémico) debido a la estrecha similitud funcional de las células fúngicas con las células del hospedador. Los tratamientos antifúngicos actuales (polienos, azoles y equinocandinas) tienen una utilidad que está limitada por factores como el coste, la toxicidad, la farmacocinética (Rentz *et al.*, 1998) o incluso por la creciente aparición de resistencias a algunos de ellos (Sanglard *et al.*, 1995; van den Bossche *et al.*, 1998; Perfect, 2004; Akins, 2005).

Las infecciones fúngicas representan un 19% del total de las existentes en las Unidades de Cuidados Intensivos a nivel mundial, de las cuales el 88% son causadas por el género *Candida* (Vincent *et al.*, 2009). En Estados Unidos, *Candida spp* ha sido descrita como la cuarta causa de sepsis nosocomial entre 1998 y 2003, experimentando un aumento de su frecuencia de aislamiento de un 8 % a un 12 % en ese periodo, con una tasa bruta de mortalidad del 47% (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Las causas principales de esta incidencia se deben a los estados de inmunosupresión derivados de la alta prevalencia de la infección por VIH (menos graves que hace un tiempo debido a los eficaces y nuevos tratamientos antirretrovirales), así como a tratamientos con fármacos inmunosupresores (en pacientes sometidos a trasplantes de órganos) o tratamientos antineoplásicos. Por estas razones, las infecciones fúngicas constituyen un problema sanitario aún no resuelto y un desafío para la investigación básica y aplicada.

La levadura *Candida albicans* es la especie patógena de *Candida* más prevalente, a pesar de que el aumento de pacientes inmunocomprometidos ha venido acompañado de un aumento en la diversidad de estirpes patógenas encontradas como agentes etiológicos de infecciones fúngicas (Vincent, 2003; Alangaden, 2011). *C. albicans* es un hongo unicelular diploide que normalmente crece como levadura (blastospora) pero que bajo determinadas condiciones ambientales puede filantar formando tubos germinativos o hifas (fase de micelio). Además, es capaz también de generar otras morfologías minoritarias como las pseudohifas (Gow, 1997) y, en determinadas condiciones experimentales, clamidosporas. Esta última morfología es, en ocasiones, empleada en clínica para diferenciar *C. albicans* de otras especies del género *Candida* (Staib and Morschhauser, 2007). Por todo ello, este hongo debe considerarse realmente como un organismo polimórfico (Figura 1).



**Figura 1: Morfologías celulares de *C. albicans*.**

La blastospora es la forma levaduriforme unicelular del hongo. Las hifas, alargadas, están formadas por unidades celulares separadas por septos de quitina que se forman por extensión apical de la blastospora dando lugar a un tubo germinativo. Las pseudohifas, formadas por gemación de la blastospora, están constituidas por unidades celulares entre las que no existen verdaderos septos. Las clamidosporas son células grandes, refringentes y de pared gruesa que se localizan en los extremos de las hifas cuya formación, principalmente *in vitro*, requiere de determinadas condiciones como ausencia de luz y baja temperatura (Figura modificada de Román E, Tesis doctoral).

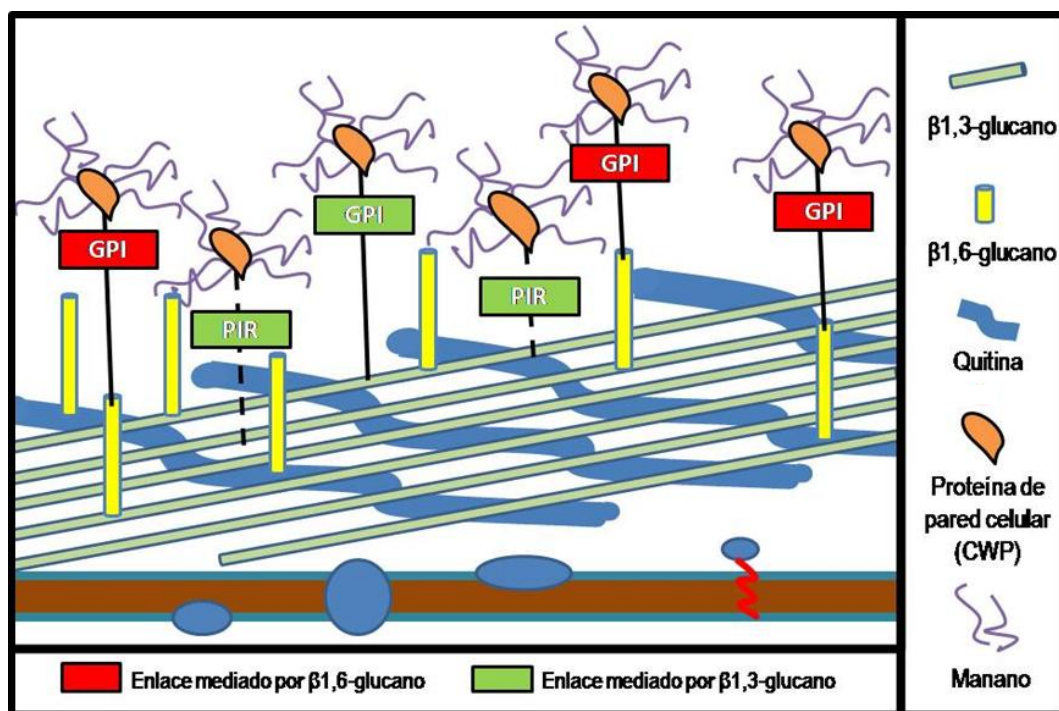
Se considera que la presencia de este hongo es endémica y no manifiesta predilección en función de la edad, el sexo o la raza del individuo, pudiendo transmitirse, en circunstancias apropiadas, de persona a persona (Fanello *et al.*, 2001;Gerhardts *et al.*, 2012). En condiciones normales, *C. albicans* se encuentra formando parte de la microbiota comensal, principalmente en el tracto digestivo y urogenital de individuos sanos, sin producir enfermedad. En estas condiciones, su proliferación es controlada por el sistema inmune innato, no teniendo lugar ningún proceso patológico. En condiciones de alteración de estas defensas del hospedador (inmunodepresión, tratamientos antibióticos, cirugía, neutropenia o uso de catéteres entre otros), el microorganismo es capaz de diseminarse a órganos internos produciendo infecciones sistémicas, que se denominan **candidiasis**, comportándose, por tanto, como un **patógeno oportunista** (Dixon *et al.*, 1996;Garber, 2001).

En la mayoría de los casos, la infección sistémica o invasiva tiene, por ello, un origen **endógeno**. El principal reservorio de levadura es el tracto gastrointestinal, por lo que la colonización de éste permite el posterior desarrollo de la candidiasis (Nucci and Anaissie, 2001).

## B. La pared celular de *C. albicans*

La pared fúngica de *C. albicans* es una estructura dinámica y compleja que protege a la célula de diversas agresiones externas como la deformación mecánica, la presencia de compuestos tóxicos o la presión osmótica entre otros. Por ser la estructura celular más externa, la pared celular cumple una función esencial en la interacción con el hospedador. Así, al mediar la adhesión a células de los tejidos del hospedador tiene un papel crucial en el inicio de la colonización (Chaffin *et al.*, 1998; Calderone and Fonzi, 2001; Sundstrom, 2002). Además, es reconocida por las células inmunitarias del hospedador modulando, por ello, el tipo de respuesta inmunitaria (Arana *et al.*, 2009).

El conocimiento de la pared celular fúngica y de las funciones que realiza así como el mecanismo de su síntesis puede proporcionar claves para desarrollar nuevas terapias antifúngicas, ya que se trata de una estructura sólo presente en la célula microbiana (Cassone *et al.*, 1987; Cutler, 2001; Ernst and Prill, 2001).



**Figura 2: Organización esquemática de la pared celular fúngica.**

En la figura se muestran los componentes mayoritarios de la pared celular fúngica. El β-1,3 glucano y la quitina se localizan en la capa interna, mientras que la externa está compuesta por manoproteínas de la pared celular (CWPs). Éstas están ancladas a la capa interna por enlaces glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) o por dominios con repeticiones internas (Pir).

La pared celular representa el 15-30 % del peso seco de la célula, siendo su composición principalmente de carácter polisacárido (90 %) y proteico (10 %). Presenta una

disposición en multicapa, en la que los carbohidratos se componen de tres formas mayoritarias:  $\beta$ -glucano (polímeros de D-glucosa con enlaces tanto  $\beta$ -1,3 como  $\beta$ -1,6); manano, tanto en su forma mayoritaria de fosfopeptidomanano (PPM, proteínas O- o N-glicosiladas) como minoritaria de fosfolipomanano (PLM), y quitina (polímero de N-acetilglucosamina unido por enlaces  $\beta$ -1,4) (Arana *et al.*, 2009).

La quitina (1-2 % del peso seco de la pared) y el  $\beta$ -(1,3)-glucano (50-60 %) son los polisacáridos estructurales, localizados en capas internas de la pared, que confieren forma y rigidez a la pared. Ancladas a estas moléculas, las manoproteínas (35-40 %) establecen hacia el exterior una capa menos estructurada que determina, en buena medida, la porosidad de la pared celular (Figura 2).

En general, los polímeros de manosa están unidos a las proteínas mediante enlace N-glicosídico (N-manano) u O-glicosídicos (O-manano). El primero consiste en la unión a asparragina de una cadena central lineal de manosa unida por enlaces  $\alpha$ -1,6, con ramificaciones por enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3. El O-manano se forma por unión de pequeñas cadenas de  $\alpha$ -1,2 o  $\alpha$ -1,3-manosa a residuos de serina o de treonina (Poulain and Jouault, 2004). Este PPM contiene un 3-5 % de proteína y 1-2% de grupos fosfato. El PLM se compone de glicoesfingolípidos altamente glicosilados derivados de inositol-fosfoceramida (Trinel *et al.*, 2002b).

En *C. albicans* se da la peculiaridad de la presencia de un tipo de componente específico formado por manosa unida a través de un enlace  $\beta$ -1,2 que confiere una estéreo-especificidad única al compuesto. Se ha detectado tanto en la fracción de PPM como de PLM (Nitz *et al.*, 2002).

Las proteínas de pared celular (denominadas CWP) se encuentran en número muy elevado y su naturaleza es muy diversa. La mayoría están fuertemente unidas al resto de la pared, empleando un dominio que contiene un derivado de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para anclarse mayoritariamente al  $\beta$ -1,3-glucano por mediación de  $\beta$ -1,6-glucano (proteínas GPI) o, minoritariamente, a la membrana plasmática e incluso directamente al  $\beta$ -1,3-glucano. Se han descrito también las denominadas proteínas Pir (*Proteins with Internal Repeats*) que se unen directamente al  $\beta$ -1,3-glucano (Figura 2).

## C. Patogenicidad y *C. albicans*

Aunque el estado **comensal** es frecuentemente considerado como inocuo para el hospedador, el hongo está continuamente interactuando con el sistema inmunitario, y éste es el principal responsable de controlar dicho estado (Mochon *et al.*, 2010).

En el curso de la patogénesis existen tres fases dinámicas diferentes: adhesión, invasión y daño. La adhesión al hospedador es una fase necesaria tanto para el comensalismo como para el inicio de la patogénesis. El proceso invasivo parece iniciarse a través de las microvellosidades epiteliales de la mucosa intestinal y puede ocurrir por dos vías: endocitosis inducida o entrada activa. La primera es una acción impulsada por el

hospedador, en la que invasinas son unidas por receptores epiteliales o endoteliales (E-cadherina, N-cadherina). La entrada activa, por su parte, ya sea a través o entre células, parece requerir una correcta turgencia e integridad de la pared, así como formación de vacuolas y elongación hifal (Dalle *et al.*, 2010;Wachtler *et al.*, 2011). A pesar de que este proceso parece ser una fase claramente patogénica, podría existir una invasión moderada en estado comensal para mantener un anclaje al epitelio y evitar su desprendimiento.

Por otro lado, la inducción de daño, característico de la patogénesis, ocurre cuando existe un crecimiento invasivo profundo interepitelial potenciado por la filamentación y la secreción de factores de virulencia como hidrolasas (Dalle *et al.*, 2010;Wachtler *et al.*, 2011). Sin embargo, el daño y afección tisular puede ocurrir, adicionalmente, como consecuencia de una sobreactivación del sistema inmunitario. Una vez en sangre el hongo tiende a localizarse y proliferar en distintos órganos diana, como el riñón o el hígado, pudiendo llegar a casi cualquier órgano según el grado de inmunosupresión del hospedador.

El estudio de la manera concreta en que se desarrolla cada una de las fases de este proceso y la determinación de cómo participan los factores de virulencia específicos implicados en ellas son aéreas de investigación de gran importancia y utilidad. De esta manera, se podrían definir nuevas dianas para antifúngicos en los elementos que demuestren ser relevantes para que el hongo realice de forma efectiva cualquiera de las etapas esenciales de la infección.

Hasta ahora se han determinado un gran número de factores implicados en la virulencia de este organismo (Calderone and Fonzi, 2001;Gow and Hube, 2012), gracias a los avances realizados en herramientas de estudio para este hongo (De Backer *et al.*, 2000;Berman and Sudbery, 2002;Sudbery *et al.*, 2004). En función de la etapa o proceso en que participan, podemos agrupar dichos factores de virulencia en los siguientes grupos:

- Factores nutricionales y metabólicos. Se han descrito numerosos mutantes en procesos biosintéticos como síntesis de bases (Kirsch and Whitney, 1991), ciclo de glioxalato (Lorenz and Fink, 2001;2002) o adquisición de hierro (Almeida *et al.*, 2008) que muestran una menor virulencia en modelos de infección animal o sistemas *in vitro*.
- Factores implicados en adhesión. En este proceso se han implicado adhesinas fúngicas que pueden mediar la interacción covalente o no covalente con receptores celulares. Juegan un papel importante en esta etapa proteínas como Hwp1 (Staab *et al.*, 1999), las proteínas de la familia Als (Kapteyn *et al.*, 2000;Hoyer, 2001;Filler and Sheppard, 2006;Phan *et al.*, 2007), Int1 (Gale *et al.*, 1998;Kinneberg *et al.*, 1999) y Eap1 (Li and Palecek, 2003). La mayoría de éstas son proteínas de pared celular y algunas de ellas se han relacionado con el crecimiento filamentoso (principalmente Als3 y Hwp1) aunque también participan en otros procesos.
- Las invasinas o factores extracelulares. Son elementos que facilitan al patógeno atravesar barreras físicas que el hospedador utiliza para evitar la infección. En este

grupo se incluyen proteasas (especialmente las aspartil proteasas o SAPs) y lipasas esenciales para la invasión del microorganismo en tejidos superficiales y mucosas por entrada activa (Leidich *et al.*, 1998; De Bernardis *et al.*, 1999; Hube, 1999; Felk *et al.*, 2002; Fradin *et al.*, 2003). También se han descrito mediadores de endocitosis inducida, que son reconocidos por E-cadherina y N-cadherina como es Als3 (Liu and Filler, 2011).

- Los procesos de cambio de morfología colonial o *switching*. Esta modificación implica una diferente exposición de proteínas superficiales y, con ello, un diferente reconocimiento y respuesta por parte del sistema inmunitario. *C. albicans* es capaz de llevar a cabo cambios fenotípicos como la transición *white-opaque* (Magee and Magee, 2004) y la transición tipo 3153A (Morrow *et al.*, 1994). Aunque la transición *white-opaque* tiene cierta relevancia desde el punto de vista de la patogenicidad (Kvaal *et al.*, 1997; 1999), su papel principal parece ser el mediar el apareamiento de células diploides (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000) al ser la forma *opaque* la competente en dicho proceso (Soll *et al.*, 1993; Miller and Johnson, 2002).
- El polimorfismo: Un aspecto de gran importancia en este microorganismo es su capacidad de cambiar su morfología celular de levadura a hifa (conocido como transición dimórfica, Figura 1) en respuesta a factores nutricionales y ambientales como la presencia de suero (Gow and Gooday, 1982), prolina (Dabrowa and Howard, 1981) o N-acetilglucosamina (Simonetti *et al.*, 1974), la temperatura (Lee *et al.*, 1975) o el pH del medio (Soll *et al.*, 1978; Odds, 1994). Muchos hongos patógenos desarrollan, al menos, dos morfologías: una micelial y otra unicelular (forma levaduriforme, conidios o esporas). La fase de micelio ha sido considerada durante mucho tiempo un factor de virulencia esencial, ya que mutantes incapaces de filamentos mostraban una menor virulencia en modelos animales (Ryley and Ryley, 1990; Leberer *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997). Sin embargo, mutantes hiperfilamentosos muestran también una reducida virulencia (Braun and Johnson, 1997; Alonso-Monge *et al.*, 1999), por lo que actualmente no puede considerarse una morfología concreta como la exclusivamente patógena (Braun and Johnson, 1997; Kobayashi and Cutler, 1998). Por este motivo, parece que realmente es la capacidad de alternar entre distintas formas lo que contribuye a la patogenicidad. Este dato se correlaciona bien con los datos clínicos, donde no existe una única morfología en el reino de los hongos que se asocie con virulencia (Romani *et al.*, 2003). La forma levaduriforme de *C. albicans* se adapta mejor a un crecimiento rápido y presenta ventajas que permiten su diseminación por el torrente sanguíneo (Saville *et al.*, 2003), mientras que las hifas parecen ser más resistentes a la fagocitosis (debido a su morfología y tamaño) y pueden provocar la muerte del macrófago. Esta estructura también facilita la invasión de tejidos a través de las capas epiteliales y endoteliales (Saville *et al.*, 2003). Estudios recientes indican que ratones con defectos inmunitarios específicos (deficiencia en linfocitos B, en linfocitos T o ratones con ambos tipos de linfocitos no funcionales) son capaces de sobrevivir a una infección mediada por células levaduriformes y no con formas filamentosas durante una infección sistémica. Sin embargo, las formas levaduriformes se comportan como patógenas en ratones

inmunosuprimidos mediante tratamiento con ciclofosfamida-cortisona (Saville *et al.*, 2008).

- Biopelículas: Las biopelículas o *biofilms* están implicadas en una proporción significativa de infecciones nosocomiales humanas de distinta etiología. *C. albicans* es el hongo más frecuentemente asociado a la formación de estas estructuras. La capacidad de este hongo de crecer formando biopelículas tiene importantes repercusiones clínicas debido a la mayor resistencia a antifúngicos y a las defensas inmunitarias del hospedador, así como su mayor capacidad para asociarse a implantes médicos como catéteres o prótesis (Lopez-Ribot, 2005). Estudios *in vitro* de formación de biopelículas de *C. albicans* indican que requiere un anclaje y colonización inicial, proliferación y una posterior maduración de la biopelícula (Lopez-Ribot, 2005; Ramage *et al.*, 2005). Existen también evidencias de que la filamentación de *C. albicans* es un paso importante en el desarrollo de biopelículas maduras y bien estructuradas (Baillie and Douglas, 1999). Se ha descrito que el mutante *efg1*, alterado en filamentación, no desarrolla biopelículas (Ramage *et al.*, 2002b). También se han relacionado moléculas de *quorum sensing* en este proceso, como el farnesol, molécula que bloquea la filamentación y también inhibe la formación de biopelículas (Ramage *et al.*, 2002a).
- Las rutas de transducción de señales. Existen diversos mecanismos que, por integración de señales, regulan una comunicación entre células fúngicas y/o una respuesta adaptativa del patógeno a cambios extracelulares o intracelulares, controlando coordinadamente la expresión de otros factores de virulencia en respuesta a estímulos adecuados (Román *et al.*, 2007). Al igual que las señales ambientales, la comunicación entre células fúngicas a través de mecanismos de detección de quórum (*quorum sensing*) pueden regular la morfogénesis e incluso controlar la invasión a través de tejidos, ya que cortes histológicos suelen mostrar una invasión sincronizada y paralela de hifas. Su importancia en la infección es capital pues prácticamente todas las rutas de transducción de señales de *C. albicans*, en particular las mediadas por quinasas de tipo MAP, han sido relacionadas con patogenicidad, debido a los defectos en virulencia de los mutantes correspondientes (Román *et al.*, 2007).

Se debe tener en cuenta que estos factores funcionan de manera compleja y coordinada, por lo que, en ocasiones, varias características confluyen en un mismo elemento. Por ejemplo, Als3 es una glicoproteína de pared cuya expresión está regulada ambientalmente y aumentada en filamentación, que media la adhesión a tejidos del hospedador pudiendo verse implicadas también en invasión y en la adquisición de hierro (Liu and Filler, 2011). Otro ejemplo característico serían las rutas de transducción de señales, en las que profundizaremos a continuación.

## D. Adaptación del microorganismo en el hospedador a través de rutas de transducción de señales

*C. albicans* ha desarrollado diferentes estrategias de adaptación al medio con el fin de sobrevivir a los cambios externos. Este proceso requiere la detección de un estímulo del exterior (o interno) y la transmisión de la señal recibida al interior celular, permitiendo generar una respuesta específica y apropiada de adaptación a las nuevas condiciones del ambiente. Situaciones adversas que requieren una adaptación como son la limitación de nutrientes, cambios en el pH, el estrés oxidativo y osmótico, entre otros, se producen habitualmente en el interior del hospedador pudiendo determinar el curso de la infección.

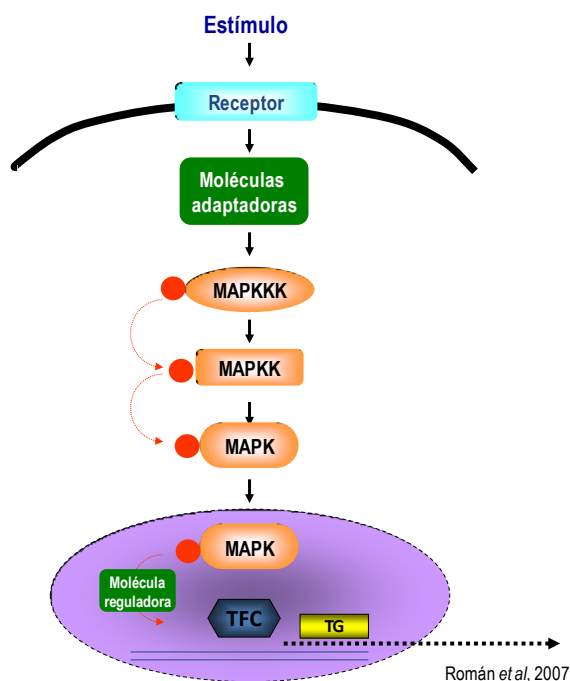
Uno de los sistemas de señalización mejor caracterizados y más conservados son las rutas mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógeno o proteínas quinasas de tipo MAP (MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinases*, Figura 3) (Pearson *et al.*, 2001; Cowan and Storey, 2003). En los últimos años se ha revelado que estas rutas son importantes determinantes de virulencia en *C. albicans* (Chauhan *et al.*, 2003; 2006; Román *et al.*, 2007) ya que regulan procesos esenciales como la morfogénesis (levadura-hifa), la biogénesis de la pared celular y la adaptación a distintos tipos de estrés (estrés oxidativo, entre otros) (Alonso-Monge *et al.*, 2006; Román *et al.*, 2007).

### a) Estructura funcional de las rutas de MAP quinasas

El principal componente de estas rutas lo constituye el módulo de quinasas MAP formado por tres proteínas: la quinasa de tipo MAP (MAPK o ERK), la quinasa de tipo MAPK (MAPKK o MEK) y la quinasa de tipo MAPKK (MAPKKK o MEKK). La activación secuencial por fosforilación de estos elementos permite la transmisión de la señal desde el exterior al interior celular (Figura 3). El estímulo desencadenante de la activación de la cascada de quinasas MAP es percibido por un receptor que puede ser de varios tipos: receptores acoplados a proteínas G, sensores de fosforilación histidina-aspártico -también denominados sistemas de dos componentes-, proteínas integrales de membrana y receptores de tipo tirosina quinasa (Herskowitz, 1995), habiéndose identificado tan sólo los dos primeros en levaduras. La señal es transmitida a continuación al módulo central a través de proteínas intermediarias o moléculas adaptadoras, generalmente de tipo GTPasa (también denominadas proteínas G) o proteína quinasas (Widmann *et al.*, 1999). Las MAPKKK poseen un dominio catalítico en la región C-terminal y un dominio regulador en su extremo N-terminal. Si bien el mecanismo por el cual las MAPKKK son activadas aún no se conoce totalmente, cambios conformacionales de la proteína o el desplazamiento de proteínas que inhibieran la activación del dominio catalítico podrían ser algunos de los procesos implicados en su activación (Banuett, 1998). Las MAPKK, por su parte, se activan por fosforilación en residuos de serina o treonina localizados en el subdominio catalítico VIII de estas proteínas. Cada MAPKK puede ser activada por más de una MAPKKK, lo cual nos permite intuir la interconexión existente entre diferentes rutas. Por último, la MAPKK fosforila a la MAPK – también denominada ERK (del inglés, *Extracellular signal Regulated Kinase*) – en dos residuos específicos de treonina y tirosina, localizados en el motivo de activación TXY (donde X representa ácido glutámico, prolina o

glicocola, dependiendo del tipo de MAPK) que se encuentra en el subdominio VIII. Ya que es necesaria la fosforilación de ambos residuos para la activación de la MAPK, la desfosforilación de uno de ellos basta para inactivarla. Tras su fosforilación, la MAPK se transloca al núcleo celular activando sus correspondientes dianas entre las que se encuentran los factores de transcripción u otras moléculas que determinan un patrón de transcripción génica adecuado y específico para que se origine la respuesta necesaria y se posibilite la adaptación a las nuevas condiciones externas.

Tras el desencadenamiento de la respuesta, la presencia de mecanismos de retroalimentación, entre los que se encuentran fosfatasas específicas, permite recuperar los niveles basales de activación de la ruta.



**Figura 3: Esquema general de rutas de MAPKs.**

Un estímulo es percibido en la membrana plasmática a través de receptores específicos. La señal se transfiere mediante fosforilación a través de sistemas de dos componentes o moléculas adaptadoras (PAKs y GTPasas) al módulo de MAPKs que está compuesto por tres proteínas: MAPKKK, MAPKK y MAPK. Cuando la MAPK se fosforila se transloca al núcleo donde fosforila un factor de transcripción (que puede formar parte de un complejo de transcripción, TFC) o una molécula represora (molécula reguladora). Como consecuencia, la expresión de genes diana (TG, del inglés *target genes*) se activa posibilitando la adaptación a las nuevas condiciones. Esta activación es transitoria debido a la existencia de mecanismos de retroalimentación que desactivan la ruta recuperando así la situación basal inicial (Figura tomada de Román *et al.*, 2007).

## b) Rutas de MAP quinasas en *C. albicans*

En *C. albicans*, se han descrito hasta el momento tres rutas mediadas por quinasas de tipo MAP que se detallan a continuación:

### b.1. Ruta de integridad celular

La MAP quinasa Mkc1 (homólogo de Slf2 de *Saccharomyces cerevisiae*) pertenece a la denominada ruta de integridad celular o ruta PKC. Se ha comprobado su papel en la construcción de la pared celular (Navarro-García *et al.*, 1995;1998), así como en la respuesta a estrés (Navarro-García *et al.*, 2005), en la transición morfológica (Navarro-

García *et al.*, 1998), en la formación de biopelículas (Kumamoto, 2005) y en virulencia (Diez-Orejas *et al.*, 1997).

La activación de Mkc1 es dependiente de Pkc1 (proteína quinasa C), excepto en respuesta a diamida, indicando que ambas quinasas están situadas en la misma ruta (Navarro-García *et al.*, 2005). La pared celular sufre constantemente modificaciones al objeto de adaptarse adecuadamente al ambiente y defectos en este proceso pueden provocar defectos en la integridad celular (Bates *et al.*, 2005) con la correspondiente activación de esta y otras rutas de señalización (Alonso-Monge *et al.*, 2006).

## b.2. La ruta HOG

La ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*) está implicada en la adaptación a estrés osmótico y oxidativo *in vitro*, en morfogénesis y en virulencia (Alonso-Monge *et al.*, 1999;2003;Arana *et al.*, 2005). La MAPK Hog1 es fosforilada por su MAPKK Pbs2 en condiciones de estrés osmótico y oxidativo (menadiona y peróxido de hidrógeno) (Arana *et al.*, 2005) a través de la señalización mediada por Ssk2 (MAPKKK de la ruta HOG) (Cheetham *et al.*, 2007). En estrés oxidativo interviene además la proteína reguladora Ssk1 (Chauhan *et al.*, 2003). La translocación de Hog1 al núcleo debida a este estrés genera una respuesta transcripcional adaptativa que es parcialmente solapante, aunque distinguible, de la que genera el factor transcripcional Cap1, homólogo de Yap1 en *C. albicans*. (Alonso-Monge *et al.*, 2003;Enjalbert *et al.*, 2006).

Se ha descrito que la ruta HOG está implicada además en morfogénesis, ya que los mutantes *hog1* y *pbs2* son hiperfilamentosos en condiciones no inductoras de temperatura, de pH, en ciertos medios o a concentraciones limitantes de suero (Alonso-Monge *et al.*, 1999;Arana *et al.*, 2005). En cambio, los mutantes *ssk1* muestran una habilidad reducida en la formación de filamentos en suero, fenotipo que no se suprime cuando *HOG1* se sobreexpresa en el mutante (Alex *et al.*, 1998;Calera *et al.*, 2000). La ruta HOG parece ser relevante también en otro programa morfogenético como es la producción de clamidosporas, ya que los mutantes *hog1* son incapaces de formar estas estructuras (Alonso-Monge *et al.*, 2003;Eisman *et al.*, 2006). La aparición de estas estructuras es también dependiente del regulador morfogenético Efg1 (Sonneborn *et al.*, 1999) y de la MAPK Hog1.

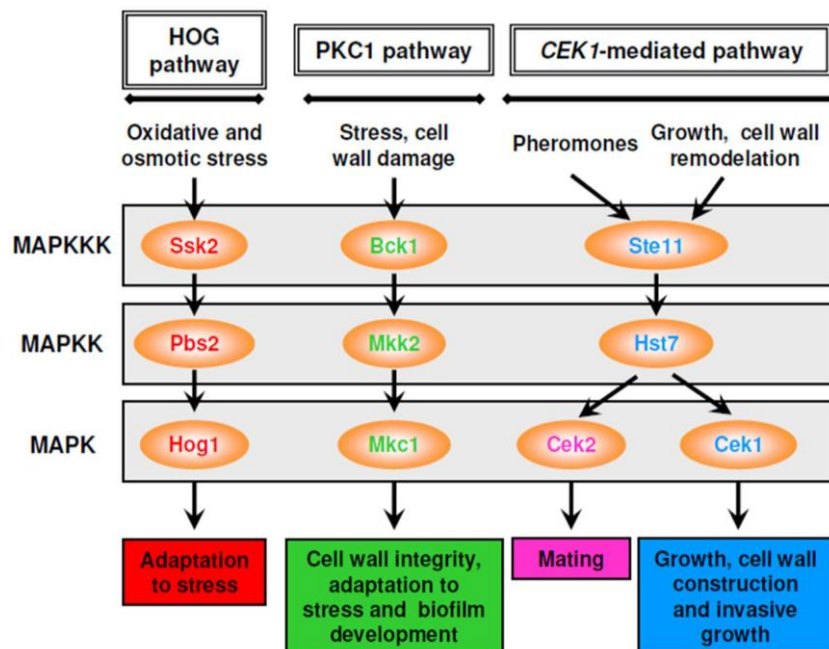
## b.3. Ruta de crecimiento vegetativo

La ruta de crecimiento vegetativo o SVG (*Sterile Vegetative Growth*) está mediada por la MAP quinasa Cek1, homólogo a Kss1 de *S. cerevisiae*. Esta ruta está implicada en morfogénesis, formación hifal y en el proceso de apareamiento (Whiteway *et al.*, 1992;Csank *et al.*, 1998). Comprende la MAPKK Hst7 (homólogo de Ste7 de *S. cerevisiae*) (Leberer *et al.*, 1996) así como otros elementos de interés como Cst20 (PAK homóloga de Ste20), Ste11 (MAPKKK de la ruta), Cph1 (factor de transcripción homólogo de Ste12 de *S. cerevisiae*), Cpp1 (fosfatasa que podría estar implicada en la defosforilación de Cek1), Sho1, Msb2 y Opy2 (sensores) (Csank *et al.*, 1997;Schroppel *et al.*, 2000;Ushinsky *et al.*,

2002; Román *et al.*, 2005; Cheetham *et al.*, 2007; Román *et al.*, 2009b; C. Herrero, Tesis Doctoral).

La ausencia de Cek1 confiere al hongo defectos en el crecimiento invasivo en ciertos medios y una virulencia reducida en el modelo experimental de infección sistémica en ratón (Csank *et al.*, 1998). Además, la delección de *CEK1* presenta un fenotipo que se traduce en un defecto parcial de la eficiencia en el proceso de apareamiento de la levadura, debido a la existencia de otra MAPK, Cek2 (homólogo a Fus3 de *S. cerevisiae*), siendo el doble mutante *cek1 cek2* completamente incapaz de aparear (Chen *et al.*, 2002).

Cek1 se fosforila por diferentes señales ambientales entre las cuales cabe destacar la dilución de las levaduras procedentes de fase estacionaria de crecimiento en medio rico fresco y la presencia en el medio de compuestos que inducen un daño en pared (rojo de Congo, caspofungina, zimoliasa,...). La activación de la ruta en estas condiciones es dependiente de los sensores Sho1 y Msb2 (Román *et al.*, 2005; 2009b). No se conoce el estímulo preciso desencadenante de la activación de esta ruta *in vivo* pero la limitación de nitrógeno (Biswas and Morschhauser, 2005), la remodelación de la pared celular (Román *et al.*, 2005), fenómenos de *quorum sensing* (Sato *et al.*, 2004; Román *et al.*, 2009a) y la respuesta a alteraciones en la glicosilación, como ocurre con tunicamicina (Cantero *et al.*, 2007; Román *et al.*, 2009b), han sido propuestos como estímulos desencadenantes de la señalización.



**Figura 4: Rutas de transducción de señales mediadas por quinasas tipo MAP en *C. albicans*.**

Esquema de los principales elementos y funciones fisiológicas de las rutas de MAPK descritas en *C. albicans* (Figura modificada de Galán-Díez *et al.*, 2010).

## c) Implicación de las rutas mediadas por MAPK en la virulencia fúngica

### c.1. Reconocimiento fúngico

Las tres rutas de MAP quinasas están relacionadas de manera esencial con la biogénesis de la pared celular en *C. albicans*. La implicación de la ruta de integridad celular parece evidente por cuanto los mutantes *mkc1* son más sensibles a la acción de enzimas degradantes de la pared celular (como zimoliasa) y antifúngicos, desarrollando además alteraciones superficiales en condiciones restrictivas de crecimiento (alta temperatura) (Navarro-García *et al.*, 1995).

La ruta HOG participa también en la biogénesis de la pared celular. La delección de *HOG1* confiere fenotipos de sensibilidad a ciertos compuestos como nikomicina Z (inhibidor de la síntesis de quitina) y fenotipos de resistencia frente a compuestos que alteran el correcto ensamblaje de la pared como el rojo de Congo o el blanco de calcofluor (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Román *et al.*, 2005).

La ruta mediada por la MAPK Cek1 se ha relacionado con el enmascaramiento de  $\beta$ -(1,3)-glucano, ya que el mutante *cek1* exhibe una mayor exposición de este componente localizado homogéneamente en la superficie del hongo (Galán-Díez *et al.*, 2010). Esta disposición del glucano en la pared de *C. albicans* parece ser relevante en su reconocimiento por células del sistema inmunitario ya que dicho mutante provoca una mayor unión a células dendríticas, un aumento de la fagocitosis y una mayor activación de macrófagos vía Dectina-1 (Galán-Díez *et al.*, 2010).

### c.2. Morfogénesis

Tal y como se ha mencionado, la morfología fúngica es importante durante la invasión y evasión de la célula hospedadora. Así pues, no es de extrañar que mutantes incapaces en formar filamentos suelen ser menos virulentos en algunos modelos experimentales (Leberer *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997). Sin embargo, también se han descrito mutantes hiperfilamentosos con una reducida virulencia (Braun and Johnson, 1997; Alonso-Monge *et al.*, 1999).

Aunque existen reguladores negativos del desarrollo hifal, en *C. albicans* la regulación positiva se lleva a cabo mediante la señalización a través de la ruta PKA (proteína quinasa A) dependiente de AMP cíclico (AMPc). PKA es una holoenzima que comprende subunidades reguladoras y catalíticas altamente conservadas. Niveles bajos de AMPc mantienen las subunidades inactivas, mientras que concentraciones superiores de este segundo mensajero permiten su unión a las subunidades reguladoras disociando el complejo y liberando las subunidades catalíticas activas las cuales desencadenan la respuesta. En *C. albicans* la activación de PKA por disociación de las subunidades catalíticas Tpk3 resulta en una fosforilación del principal regulador transcripcional

implicado, Efg1 (Stoldt *et al.*, 1997;Bockmuhl and Ernst, 2001). La ruta PKA media muchos efectos fisiológicos del segundo mensajero en hongos y otros organismos eucariotas.

Una segunda ruta implica a la MAPK Cek1 (Leberer *et al.*, 1996;Csank *et al.*, 1998), de la cual algunos elementos participan en el proceso de apareamiento como se ha mencionado anteriormente (Whiteway *et al.*, 1992;Chen *et al.*, 2002). Esta ruta juega un papel importante en la filamentación en medio sólido en condiciones de limitación de nitrógeno o ciertas fuentes de carbono a través de la activación del factor de transcripción Cph1 (Köhler and Fink, 1996). Sin embargo, la interrupción de la señal a través de esta ruta no impide la formación de filamentos en respuesta a suero, inductor fisiológico. Las rutas PKA y mediada por Cek1 funcionan en paralelo contribuyendo a la formación de filamentos, ya que mutantes *efg1 cph1* son incapaces de formar filamentos *in vitro* y son avirulentos en el modelo de infección sistémica (Lo *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios recientes indican que estos mutantes son capaces de generar zonas localizadas de infección y proliferar en riñones en vez de ser eliminados por el sistema inmunitario (Chen *et al.*, 2006). Además, el doble mutante es capaz de formar filamentos en ciertos modelos animales *in vivo*, indicando la existencia de rutas adicionales para filamentar durante la infección *in vivo* (Riggle *et al.*, 1999).

La ruta HOG es relevante en la transición dimórfica, ya que ciertos mutantes de la ruta son hiperfilamentosos (*hog1*, *pbs2* y *ssk2*) (Alonso-Monge *et al.*, 1999;Arana *et al.*, 2005;Cheetham *et al.*, 2007), mientras que otros son deficientes en la formación de filamentos en suero (*ssk1*) (Alex *et al.*, 1998;Calera *et al.*, 2000).

### c.3. Infección sistémica

La habilidad para crecer y proliferar en los tejidos del hospedador es esencial para causar enfermedad.

La ruta de integridad celular tiene un papel importante en el crecimiento en el interior del huésped. Así, la MAPK Mkc1 es importante para la proliferación a alta temperatura y su activación se desencadena por distintos tipos de estrés (oxidativo, daño de la pared celular y temperatura) (Navarro-Garcia *et al.*, 2005), sugiriendo que la ausencia de esta MAPK provocaría una respuesta deficiente cuando se encuentra con las defensas del hospedador. Además, los mutantes son menos virulentos en el modelo de infección sistémica de ratón, ya que no se diseminan eficientemente a órganos diana y desencadenan una respuesta inflamatoria alterada en animales infectados (Diez-Orejas *et al.*, 1997).

La relevancia en diseminación de la ruta HOG viene dada por el hecho de que el mutante *hog1*, a pesar de ser hiperfilamentoso, muestra una virulencia mucho más baja en comparación con una cepa silvestre en el modelo de infección sistémica de ratón, existiendo una mayor capacidad de aclaramiento del hongo y produciendo un menor daño en los tejidos (Alonso-Monge *et al.*, 1999).

Por otro lado, también se ha demostrado que la ruta SVG tiene un papel notable en la patogénesis de las candidiasis porque cepas carentes de la MAPK Cek1 muestran una virulencia reducida en el modelo sistémico en ratón y de mastitis murina (Csank *et al.*, 1998).

#### **c.4. Colonización**

Hasta la fecha no se ha descrito la influencia de las rutas mediadas por quinasa tipo MAP en el proceso de colonización, ya sea durante un equilibrio comensal o como parte inicial de un proceso infeccioso. La importancia en adaptación, formación de la pared y morfogénesis de estos elementos hace pensar que podrían jugar un papel importante a la hora de reconocer el nuevo ambiente y acomodarse a él, en el reconocimiento por el sistema inmunitario y en el proceso de invasión.

### **E. Herramientas genéticas para el estudio de *C. albicans***

#### **a) Interés del marcaje de microorganismos**

A la hora de abordar el estudio de los mecanismos de infección *in vivo* de un patógeno, es interesante disponer de un sistema de marcaje del microorganismo sencillo, estable y versátil con el objeto de poder identificar fácilmente la cepa de estudio durante o tras la interacción con el hospedador. Entre los tipos de marcas que se podrían aplicar se encuentran la tinción fluorescente directa (mediante compuestos con afinidad a ciertas estructuras como DAPI, yoduro de propidio, blanco de calcofluor o verde de Oregón); el tratamiento con anticuerpos conjugados y/o la expresión de genes reporteros (como aquellos que codifican enzimas, proteínas fluorescentes,...). Sin embargo, un gen reportero óptimo para este objetivo debería cumplir ciertas características esenciales: 1) estar ausente en las células diana, 2) ser fácilmente detectable *in situ* y 3) no ser transmisible horizontalmente.

El uso de genes reporteros incluidos en microorganismos ha sido utilizado con este objetivo ya que permite establecer una marca genética de transmisión vertical y una identificación rápida y clara por los métodos adecuados. En particular, las características de ciertos reporteros como proteínas fluorescentes y enzimas luciferasas han llegado a permitir estudiar procesos biológicos *in vivo* en un contexto de órganos intactos y en tiempo real en algunos casos (Benninger *et al.*, 2008). La aplicación de esta tecnología al estudio de modelos animales de infección permitiría establecer la función de determinados componentes del patógeno y del hospedador en el curso de la infección dentro de una anatomía inmunológica natural e intacta (Doyle *et al.*, 2004; Garside and Brewer, 2008). Ello proporcionaría ideas no sólo sobre el establecimiento del proceso infeccioso *in vivo*, sino también sobre el desarrollo de la respuesta inmunitaria así como sobre nuevos mecanismos evasivos con los que los patógenos podrían eludir las defensas del hospedador durante la infección.

## b) Genes reporteros empleados en *C. albicans*

Los genes reporteros constituyen herramientas fundamentales en biología molecular empleados, frecuentemente, para hacer estudios de transcripción mediante el análisis del patrón de expresión génica, para visualizar células vivas, seleccionar mutantes o llevar a cabo estudios de interacción proteína-proteína y DNA-proteína. Generalmente, el uso de un gen reportero obliga a expresar en el microorganismo de estudio una proteína heteróloga, es decir, originaria de otro organismo. Esto conlleva una serie de problemas asociados a las distintas maneras que tienen los organismos de procesar el DNA, el RNA y las proteínas. La recombinación génica, las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales, y la distinta disponibilidad de determinados componentes (por ejemplo ciertos RNA de transferencia) puede afectar a la expresión, estructura y función de proteínas no propias.

Gen reportero	Aplicación	Referencia
<i>lacZ</i>	Cuantificación de la expresión génica <i>in vitro</i> .	(Uhl and Johnson, 2001)
<i>LAC4</i>		(Leuker <i>et al.</i> , 1992)
FLuc ( <i>Photinus pyralis</i> )	Cuantificación de la expresión génica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Srikantha <i>et al.</i> , 1995) (Doyle <i>et al.</i> , 2006b)
RLuc ( <i>Renilla reniformis</i> )		(Srikantha <i>et al.</i> , 1996)
GFP	Cuantificación de la expresión génica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Localización de proteínas. Marcaje celular.	(Cormack <i>et al.</i> , 1997) (Morschhäuser <i>et al.</i> , 1998)
yEmRFP	Marcaje celular.	(Keppler-Ross <i>et al.</i> , 2008)
<i>XOG1</i>	Cuantificación de expresión <i>in vitro</i>	(González <i>et al.</i> , 1997)
<i>URA3</i>	Cuantificación de la expresión génica <i>in vitro</i> .	(Myers <i>et al.</i> , 1995)

**Tabla 1. Principales genes reporteros descritos en *C. albicans***

En *C. albicans*, además, se da la particularidad de la existencia de un código genético diferente del estándar. En ésta, y otras especies del género *Candida*, el codón CTG codifica serina en vez de leucina (Yokogawa *et al.*, 1992; Ohama *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993). Este hecho ha complicado históricamente el desarrollo de genes reporteros funcionales en este hongo y, de hecho, numerosos genes reporteros utilizados en otros sistemas biológicos no tenían utilidad en éste. A pesar de ello, en los últimos años múltiples genes han podido ser usados, modificados o no, para el estudio de promotores de *Candida* (Eckert and Muhlschlegel, 2009). Según la finalidad del estudio, se pueden usar genes reporteros como *lacZ*, *LAC4* o *RLUC* para cuantificar la expresión diferencial dependiente de promotores bajo distintas condiciones. La expresión de proteínas fluorescentes ha permitido, además, la observación *in vivo* del hongo y la localización de

proteínas de fusión a este reportero. En la Tabla 1 se muestra los principales genes reporteros utilizados en *C. albicans* y sus utilidades.

### b.1. Galactosidasas

El gen *lacZ* de *Escherichia coli* ha sido utilizado tradicionalmente como reportero en biología experimental. Este gen codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, una glucósido-hidrolasa. Su uso como gen reportero se fundamenta en la medida de la actividad hidrolasa por la liberación de compuestos cromogénicos al utilizar sustratos como el ONPG (orto-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido, coloración amarilla) o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido, azul) tras expresarse dependiente de un promotor determinado (Hermann *et al.*, 1992).

El gen *LAC4* de *Kluyveromyces lactis*, que fue el primer reportero heterólogo utilizado con éxito en *C. albicans* (Leuker *et al.*, 1992). Más recientemente se ha desarrollado un sistema más eficaz que utiliza una versión del gen *lacZ* de *Streptococcus thermophilus* con codones adaptados para *C. albicans* (Uhl and Johnson, 2001). Estos autores describieron su utilidad para medir la expresión de promotores inducibles (como *MAL2*), constitutivos (como *ACT1*) o dependientes de morfología (como *HWP1*) en este organismo. Este sistema ha sido utilizado posteriormente por otros grupos (Li *et al.*, 2004; Gaur *et al.*, 2005; Karababa *et al.*, 2006).

### b.2. Luciferasas

Otra familia de genes ampliamente utilizados son los que codifican luciferasas. En este caso la actividad enzimática se detecta por cuantificación de la señal de luz emitida en presencia del sustrato correspondiente (coelenterina o luciferina) y ATP (Arana and Pla, 2012). Existen varios tipos de luciferasa que han sido utilizados como genes reporteros. Entre ellos destacan la obtenida de la luciérnaga común americana (*Photinus pyralis*, FLuc) y la del escarabajo elatérico del Caribe (*Caribbean Click beetle*, *Pyrophorus plagiophthalmus*, CbLuc) dependientes de luciferina, así como la del octocoral marino (*Renilla reniformis*, RLuc) dependiente de coelenterina.

El primer intento de aplicación de una luciferasa en *C. albicans* como reportero no tuvo éxito debido a que la forma nativa del gen FLuc de *P. pyralis* contiene nueve codones CTG (Srikantha *et al.*, 1995). El uso eficiente de este gen requirió la sustitución de los codones CTG por TTG (Doyle *et al.*, 2006b). En el caso del gen RLuc de *R. reniformis* se pudo usar la versión nativa al no contener ningún CTG (Srikantha *et al.*, 1996). Éste fue muy eficaz y sensible en la monitorización de promotores inducibles (como *GAL1*), constitutivos (como *EF1  $\alpha$ 2*) o específicos de fase (como son *WH11* y *OP4*), así como para probar promotores truncados (Nicholls *et al.*, 2004; Pendrak *et al.*, 2004; Harry *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Rognon *et al.*, 2006; Arana *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2007; Argimon *et al.*, 2007).

Los fotones emitidos por la reacción de luminiscencia pueden atravesar los tejidos del hospedador y son detectables en la superficie usando un detector sensible a fotones como

las cámaras de tipo CCD (*Charge-Coupled Device*). La luciferasa de *P. pyralis* ha permitido así la visualización de infecciones *in vivo* externamente proporcionando una aproximación del sitio de la infección dentro del ratón (Doyle *et al.*, 2006a).

### **b.3. Proteína fluorescente verde: GFP**

Las proteínas fluorescentes tienen la propiedad de emitir luz a una longitud de onda concreta y detectable al ser excitadas con otra específica de mayor energía. La primera proteína fluorescente que se descubrió y la más extendida es la GFP (*Green Fluorescent Protein*, de la medusa *Aequorea victoria*) (Chalfie *et al.*, 1994). La GFP posee numerosas propiedades que la hacen útil en este tipo de estudios, como son su alta estabilidad, su mínima toxicidad, su detección no invasiva y su capacidad de generar luz verde sin la adición de sustratos ni cofactores externos. Ésto ha permitido su uso en distintas aplicaciones como monitorizar la expresión génica, la observación *in vivo* y el marcaje de células, así como la fusión a proteínas (marcaje y localización).

Para su uso en *C. albicans* ha sido necesario la optimización de codones del gen que codifica la GFP (Cormack *et al.*, 1997; Morschhäuser *et al.*, 1998). De este modo, se ha podido utilizar bajo el control de promotores constitutivos como *ADH1* (Cormack *et al.*, 1997) y *ACT1* (Barelle *et al.*, 2004), además de promotores regulables como *SAP2* (Morschhäuser *et al.*, 1998), *MET3* (Care *et al.*, 1999) o el sistema TetR/tetO (Park and Morschhäuser, 2005). De hecho, la GFP ha sido utilizada ampliamente en estudios de localización subcelular de proteínas como Cdc3 (Gerami-Nejad *et al.*, 2001), Hog1 (Arana *et al.*, 2005) o Crz1p (Karababa *et al.*, 2006), entre otras muchas.

### **b.4. Otras proteínas fluorescentes**

#### **i Variantes de GFP**

Con el objetivo de visualizar distintos eventos celulares simultáneamente, la interacción entre diferentes proteínas y la relación función-estructural de una proteína concreta, se han desarrollado nuevas proteínas fluorescentes distinguibles de la GFP. Así, por distintas mutaciones del gen GFP se obtuvieron varias versiones modificadas con distintos espectros de emisión y absorción, entre las que destacan la denominadas CFP (en azul, del inglés *cyan*) y YFP (en amarillo, del inglés *yellow*) (Heim *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1995; Heim and Tsien, 1996; Ormo *et al.*, 1996). Al igual que ocurrió con la GFP, los codones de estas variantes fueron optimizados para su uso en *C. albicans* (Gerami-Nejad *et al.*, 2001). Sin embargo, su utilidad en la utilización conjunta con la GFP está limitada debido a la superposición parcial de los espectros de absorción y emisión con la GFP.

#### **ii DsRed**

DsRed es una proteína roja fluorescente descubierta en *Discosoma striata* (Matz *et al.*, 1999). Esta proteína posee una gran estabilidad frente a cambios de pH, desnaturalización y fotoinactivación (*photobleaching*) (Miyawaki, 2002), además de un alto brillo (coeficiente de extinción molar de 75.000 vs 56.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> en GFP) y rendimiento cuántico (0.79 vs

0.60 en GFP) (Shaner *et al.*, 2004). Su uso en biotecnología está siendo de gran interés debido a la posibilidad de utilizarla junto a la GFP en estudios celulares y moleculares (Jakobs *et al.*, 2000). Además, al emitir en una longitud de onda mayor, disminuye los problemas asociados a la difracción de luz y a la autofluorescencia (Tsien, 1999). Sin embargo, la DsRed también tiene propiedades poco deseables como son la lenta maduración de su fluoróforo (10 horas), la formación obligada de tetrámeros, la tendencia a agregarse y el mantenimiento de fluorescencia verde residual (Miyawaki, 2002).

Por ello se han desarrollado versiones mejoradas de la nativa DsRed que minimizan estos inconvenientes. Así, apareció una primera versión monomérica (mRFP1) y una mejorada versión dimérica (dimer2) (Campbell *et al.*, 2002). La proteína mRFP1 posee una maduración más rápida (1 hora) y un espectro más diferenciable de la GFP, pero también menor brillo (21 % de DsRed) y menor fotoestabilidad. Así mismo, dimer2 mejora el tiempo de maduración de DsRed (2 h.) manteniendo un 80 % del brillo. Más tarde, a partir de éstas, se obtuvieron versiones mejoradas (en brillo, estabilidad y maduración) y nuevos espectros de excitación-emisión (Shaner *et al.*, 2004). Entre estas últimas versiones destacan la dTomato (dímero derivado de dimer2) y la mCherry (derivada de mRFP1), además de la versión duplicada en tándem de la dTomato (tdTomato). La proteína dTomato madura en 1 hora manteniendo el brillo de la dimer2 (tdTomato duplica el valor) y una ligera mejora del espectro de excitación-emisión. En el caso de la mCherry, las mejoras se traducen principalmente en un moderado aumento del brillo (27% de DsRed) y una notable fotoestabilidad (10 veces mayor a la de mRFP1 y similar a la de dTomato).

La modificación del gen de la RFP mCherry ha llevado a la reciente obtención de una variante aplicable a levaduras denominada yEMRFP (Kepler-Ross *et al.*, 2008). Aunque su diseño se encaminó a su aplicación en *S. cerevisiae*, también ha demostrado ser funcional en *C. albicans* como marcador celular. Sin embargo, desde su aparición su utilización en nuevos estudios ha sido escasa.

### **b.5. Otros genes reporteros**

El gen *XOG1* expresa una exoglucanasa. Su uso como gen reportero permitiría una visualización macroscópica por excitación con luz ultravioleta del sustrato fluorogénico (González *et al.*, 1997).

El gen *URA3* codifica para una orotidina monofosfato (OMP) carboxilasa cuya actividad puede aplicarse a su utilización como reportero (Myers *et al.*, 1995). Sin embargo, a diferencia de *XOG1*, la implicación de *URA3* en patogenicidad limitaría el uso de este sistema (Lay *et al.*, 1998).

## 2. Respuesta inmunitaria del hospedador frente a *C. albicans*

Cualquier respuesta inmunitaria implica, en primer lugar, el reconocimiento del agente patógeno o agentes extraños y, en segundo lugar, la elaboración de una respuesta frente a dicho agente con la finalidad de eliminarlo o controlarlo.

En sentido amplio, los distintos tipos de respuestas inmunitarias se agrupan en dos categorías: respuesta innata y respuesta adaptativa. Las principales diferencias entre ambas residen en el momento en que actúan durante la infección, en el carácter específico frente a un determinado agente patógeno por parte de la adaptativa y en su capacidad de madurar la especificidad, puesto que ésta mejora con los sucesivos contactos con el mismo agente. Las dos características clave de este tipo de respuesta son, pues, especificidad y memoria.

El sistema inmune innato está conservado filogenéticamente y aparece en casi todos los organismos multicelulares (Hoffmann *et al.*, 1999). Aunque carece de la especificidad del adaptativo, puede también distinguir lo propio de lo extraño. Sus receptores no están distribuidos clonalmente, sino que todas las células de un mismo tipo expresan un determinado repertorio de receptores y no genera memoria. Esto da lugar a respuestas muy rápidas, sin el retraso que se produce en la respuesta adaptativa debido necesidad de la expansión clonal de los linfocitos. El sistema inmune innato es, por ello, la primera barrera de defensa frente a organismos a los que no hemos estado previamente expuestos. La respuesta innata juega un papel fundamental en la iniciación y determinación del tipo de respuesta inmune adaptativa que se generará frente al microorganismo invasor.

La respuesta innata está compuesta por barreras físicas, por una serie de factores solubles como las proteínas del complemento, y por varias poblaciones celulares como los neutrófilos circulantes, monocitos, macrófagos y células *natural killer* (Romani and Kaufmann, 1998).

### **A. Reconocimiento de *C. albicans* mediado por células del hospedador**

El reconocimiento de patógenos por parte de los componentes de la inmunidad innata implica la identificación en los mismos de los patrones moleculares asociados a patógeno (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) o PAMPs (Janeway, Jr., 1992; Underhill and Ozinsky, 2002a). Estas estructuras, altamente conservadas en microorganismos, representan determinantes superficiales que no están presentes en células de mamífero y que son reconocidos por sus receptores correspondientes, PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), presentes en la superficie de las células inmunitarias. Diferentes PRRs reconocen diferentes PAMPs y contribuyen, de esta manera, a la generación de diferentes respuestas frente al microorganismo (Aderem and Underhill, 1999). La distribución de

estos PRRs y su abundancia varía entre las distintas poblaciones de células inmunitarias y contribuye a modular la propia respuesta.

Los polisacáridos de la pared fúngica son el principal elemento considerado en la definición de PAMP, aunque proteínas como Als3 pueden comportarse como antígenos y algunas aspartil proteasas (SAPs), secretadas o asociadas a pared, son reconocidas por células inmunitarias (Pietrella *et al.*, 2010).

Los principales receptores descritos en la inmunidad innata que juegan un papel en la interacción de las células del sistema inmunitario frente a *C. albicans*, se describen a continuación:

### a) Receptores opsonizantes

Durante la fase efectora de la inmunidad humoral existen componentes del hospedador que son capaces de opsonizar a los agentes infecciosos facilitando así su reconocimiento por receptores fagocíticos. Entre las proteínas solubles que reconocen elementos de la pared de *C. albicans* destacan las colectinas, los anticuerpos y las proteínas que forman parte del complemento.

#### a.1. Colectinas

El manano de la pared de *C. albicans* es reconocido por un grupo de proteínas solubles denominadas colectinas, que son secretadas como grandes complejos multiméricos (Epstein *et al.*, 1996). Al menos tres de ellas han sido implicadas en la inmunidad antifúngica: la lectina de unión a manosa (MBL), la proteína surfactante A (SP-A) y la proteína surfactante D (SP-D).

La lectina o proteína de unión a manosa (MBL o MBP) se une a manosa, fucosa y a grupos N-acetil-glucosamina presentes en glicolípidos y glicoproteínas de la superficie celular de microorganismos (Turner and Hamvas, 2000). Aunque podría interferir en la adherencia de *C. albicans* a los tejidos del hospedador, debido a que este proceso parece depender parcialmente de la interacción con manano (Vazquez-Torres and Balish, 1997), parece que su principal función es la activación del complemento por la vía de las lectinas.

Las proteínas surfactantes SP-A y SP-D reconocen un amplio rango de patógenos fúngicos como son *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Kishore *et al.*, 2006). La unión de SP-D a *C. albicans* inhibe el crecimiento hifal y pseudohifal, acompañado de una menor fagocitosis por macrófagos, por lo que se asocia más con aglutinación del patógeno que con facilitador de fagocitosis (van Rozendaal *et al.*, 2000). Por otro lado, la SP-A suprime la producción de citoquinas y quimioquinas (Rosseau *et al.*, 1999) por macrófagos alveolares en contacto con *C. albicans*.

## a.2. Anticuerpos

Entre las múltiples funciones asociadas a los anticuerpos está su capacidad opsonizante. Las inmunoglobulinas pueden unir componentes de pared para, posteriormente, ser reconocidas a través de sus dominios genéricos Fc por la familia de receptores de fragmentos Fc (FcR) (Unkeless *et al.*, 1995; Ravetch, 1997; Ravetch and Clynes, 1998). Se ha comprobado cómo la IgG anti-manano favorece la opsonización, la fagocitosis y la muerte de *C. albicans* mediada por neutrófilos humanos (Kozel *et al.*, 2004).

## a.3. El complemento

El sistema del complemento está formado por un gran número de proteínas plasmáticas que, en presencia de una superficie microbiana, desencadenan una cascada de reacciones que dan lugar a la liberación de opsoninas, factores inflamatorios y quimiotácticos, y la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El sistema se caracteriza por producir una respuesta rápida y amplificada frente a un estímulo.

Existen tres vías de activación del complemento: la vía clásica (mediada por anticuerpos), la vía alternativa (activada por ausencia de ácido siálico) y la vía de las lectinas (mediada por la proteína de unión a manosa o MBL). Las tres vías se inician por factores diferentes, pero convergen a partir de la proteólisis de C3, componente principal y más abundante.

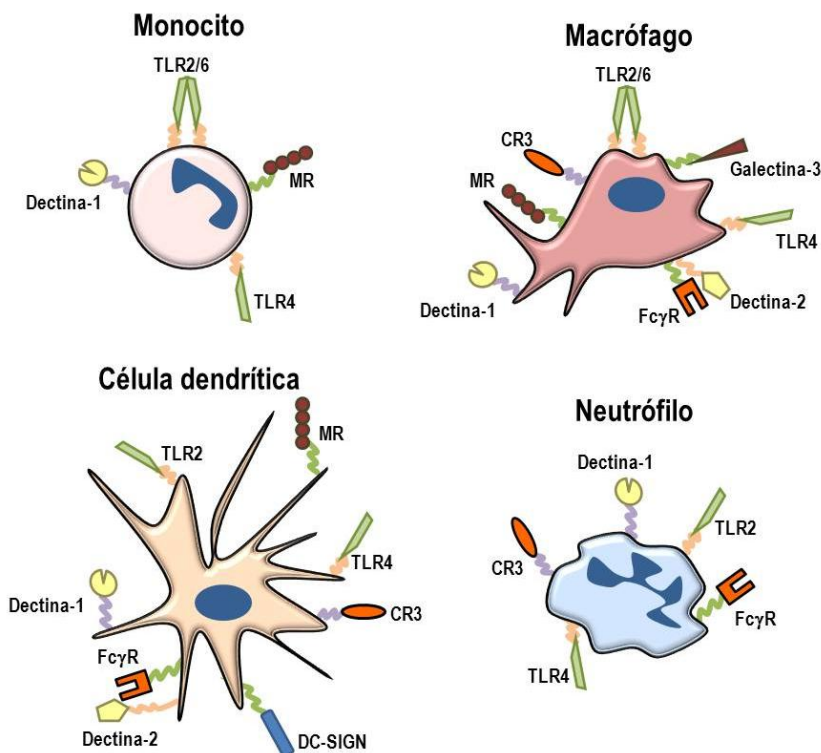
MBL juega un papel importante en la primera línea de defensa contra *C. albicans* por provocar aglutinación e iniciar la cascada del complemento (Ip and Lau, 2004). Esta proteína se encuentra asociada a dos serin-proteasas, MASP-1 y MASP-2, las cuales se activan tras la unión de MBL al microorganismo. MASP-2 rompe y activa a los componentes del complemento C4 y C2 (que compondrán posteriormente la C3-convertasa), mientras que MASP-1 puede romper a C3 directamente (Matsushita *et al.*, 2000). La proteólisis de C3 en C3a y C3b conlleva la opsonización de la superficie fúngica (por C3b y por su forma inactiva iC3b), así como la continuación y amplificación de la cascada, que permite la rotura de C5 en C5a (principal factor quimiotáctico) y C5b. Este último permite la interacción de C6, C7 y C8 con múltiples unidades de C9 para formar el complejo de ataque a la membrana.

Distintos receptores de complemento (CR), presentes principalmente en células inmunitarias, reconocen elementos generados en la activación de la cascada. Se cree que CR1 participa principalmente en la eliminación de inmunocomplejos. CR3 (CD11b/CD18 o Mac-1), presente en macrófagos y neutrófilos, y CR4 (CD11c/CD18), presente en células dendríticas, son responsables de la fagocitosis de partículas (Aderem and Underhill, 1999). Por su parte, C5aR media inflamación y quimiotaxis.

Se ha descrito que C3a tienen efectos antimicrobianos contra *C. albicans* (Sonesson *et al.*, 2007). Estudios recientes ponen de manifiesto una nueva función del factor C5a en respuesta a *C. albicans*, pues el bloqueo de la unión C5a a su receptor (C5aR) reduce la liberación de citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-6 inducida por el hongo, siendo este efecto independiente de C6 (Cheng *et al.*, 2012).

## b) Receptores no opsonizantes

Los receptores no opsonizantes están distribuidos por toda la superficie de, principalmente, las células inmunitarias, reconociendo y uniéndose a los PAMPs del microorganismo. Entre ellos se encuentran el receptor de manosa, DEC205, DC-SIGN, L-SIGN, Endo-180, Langerina, DCAL-1, BDCA-2, Dectina-2 y Dectina-1; que pertenecen a la familia de las lectinas tipo C (Stahl and Ezekowitz, 1998; Rosenberger and Finlay, 2003; Stuart and Ezekowitz, 2005) y los receptores de tipo *Toll* (TLRs) que median, por reconocimiento de diferentes estructuras microbianas, la liberación de citoquinas proinflamatorias (Rosenberger and Finlay, 2003).



**Figura 5: Principales células del sistema inmunitario y PRRs implicados en el reconocimiento fúngico.**

Se muestran las células de la inmunidad innata más relevantes en la respuesta frente a hongos con los receptores que expresa cada tipo celular: monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos.

### b.1. Lectinas que reconocen manosa

Estos receptores reconocen específicamente polímeros de manosa presente en el manano de la superficie celular, estructura que, como hemos indicado anteriormente, tiene gran importancia en la especificidad y magnitud de la respuesta inmunológica del hospedador.

Aunque la mayor parte del manano de la pared corresponde a proteínas de pared altamente glicosiladas (fosfopéptidomanano) también existe un componente lipídico, caracterizado en *C. albicans*, que corresponde al fosfolipomanano (Trinel *et al.*, 2002a). El PLM contribuye por un lado a la expresión de epítomos  $\beta$ -1,2-oligomanosídicos en la superficie de la pared celular de levaduras (Poulain *et al.*, 2002) y, por otro, a la supervivencia de levaduras fagocitadas por inducción de apoptosis en la célula hospedadora (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003).

### i Receptor de manosa

El receptor de manosa (MR) es considerado el primer PRR descrito para hongos (Stahl and Ezekowitz, 1998). Además de hongos, incluyendo *C. neoformans*, *C. albicans* y *P. carinii*, el MR es capaz de reconocer algunas bacterias y virus (Fraser *et al.*, 2000; Mansour and Levitz, 2002; Taylor *et al.*, 2004). Este receptor presenta dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que actúan de forma coordinada en el reconocimiento, la unión de alta afinidad y posterior endocitosis de glicoconjugados (Taylor *et al.*, 1992). Su actividad está mediada por el dominio lectina de tipo C que une manosas terminales, fucosa o N-acetilglucosamina y que es responsable del reconocimiento microbiano (Taylor *et al.*, 2005a).

El reconocimiento *in vitro* de la levadura mediado por macrófagos derivados de monocitos humanos se inhibe por ligandos del receptor MR, como el manano. El MR está también (Marodi *et al.*, 1991; Martínez-Pomares *et al.*, 2001) implicado en la producción de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, y factor estimulante de proliferación de granulocitos/monocitos o GM-CSF) (Yamamoto *et al.*, 1997) como consecuencia de un contacto con la levadura. Sin embargo, al estudiar la función del receptor *in vivo* no se encontraron diferencias significativas entre ratones silvestres y ratones *knockout* en MR, ya que los ratones deficientes en dicho receptor fueron capaces de producir una respuesta inflamatoria eficaz en presencia de la levadura (Lee *et al.*, 2003).

### ii Galectina-3

Galectina-3 es una lectina que se ha implicado con el reconocimiento de  $\beta$ -(1,2)-oligomanósidos en la superficie de *C. albicans* (Fradin *et al.*, 2000). Este receptor está relacionado con la fagocitosis mediada por macrófagos (Sano *et al.*, 2003) y se expresa en un gran número de células, aunque su asociación con la membrana, requerimiento aparente para llevar a cabo su papel en la ingestión de las células, no es muy clara en todas ellas. El papel de los  $\beta$ -(1,2)-manósidos en la prevención de infecciones fúngicas es de gran interés (Dromer *et al.*, 2002; Trinel *et al.*, 2002a), ya que anticuerpos frente a  $\beta$ -(1,2)-manano son protectores, mientras que aquellos dirigidos contra  $\alpha$ -manano no lo son (Cutler, 2001). De hecho, se ha demostrado que el receptor Galectina-3 de macrófagos murinos puede discriminar entre levaduras patógenas (*C. albicans*) y no patógenas (*S. cerevisiae*) en asociación con TLR2, debido a que estas últimas no presentan el enlace  $\beta$ -1,2 (Jouault *et al.*, 2006). Esta colaboración se ha postulado también para el reconocimiento de fosfolipomanano (PLM) de la pared por

Galectina-3, la cual podría ser de especial importancia para reconocer *C. albicans* en la mucosa intestinal.

### iii Dectina-2

Dectina-2 (*DC-associated C-type lectin-2*) pertenece a la familia de lectinas DCIR (Inmuno-receptores de células dendríticas) (Kanazawa *et al.*, 2004;2007). Dectina-2 tiene también descrita una función como receptor de manosas presentes en la pared celular de *C. albicans* (Ariizumi *et al.*, 2000a;McGreal *et al.*, 2006). Se expresa principalmente en células mieloides y en monocitos inflamatorios maduros (Taylor *et al.*, 2005b). Debido a su corto tallo citoplasmático, se postula que Dectina-2 debe interactuar con el receptor FcR $\gamma$  para inducir señales intracelulares y, curiosamente, parece diferenciar el manano de levaduras frente al de hifas, que lo activa más eficientemente (Sato *et al.*, 2006).

### iv DC-SIGN

DC-SIGN (CD209, *Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*) presenta gran afinidad por manosas ramificadas presentes en moléculas complejas (Cambi *et al.*, 2003), reconociéndolas de una manera dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Koppel *et al.*, 2005). Como molécula de adhesión, DC-SIGN está implicada en el contacto entre células dendríticas y linfocitos T mediante la unión del ligando ICAM-3 (Geijtenbeek *et al.*, 2000b) y media también el rodamiento de las células dendríticas en el endotelio a través de su interacción con ICAM-2 (Geijtenbeek *et al.*, 2000a). Sin embargo, la expresión de esta lectina de tipo C II de membrana está restringida principalmente a células dendríticas y a otras células presentadoras de antígeno, como células de Hofbauer en la placenta (Mummidi *et al.*, 2001;Soilleux *et al.*, 2001), macrófagos alveolares en el pulmón (Soilleux *et al.*, 2002) y macrófagos sinoviales (van Lent *et al.*, 2003).

En ratón se han identificado 8 ortólogos, aunque estas moléculas parecen tener perfiles de expresión diferentes y algunas diferencias estructurales (Koppel *et al.*, 2005;Powlesland *et al.*, 2006). De los homólogos murinos, únicamente SIGNR1 (también denominado DC-SIGN murino) y SIGNR3 reconocen partículas fúngicas (Taylor *et al.*, 2004;Takahara *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista estructural, DC-SIGN contiene un dominio lectina de unión a manano, siete repeticiones internas, una región transmembrana y una cola citoplasmática que media la internalización del receptor cuando interacciona con ligandos externos. Se ha mostrado que DC-SIGN es capaz de reconocer *C. albicans* en líneas celulares transfectadas con el receptor y en células dendríticas derivadas de monocitos humanos; dicha interacción resulta en una internalización del microorganismo en vesículas específicas enriquecidas en DC-SIGN (Cambi *et al.*, 2003). Hay también evidencias del papel que DC-SIGN tiene en el reconocimiento de otros hongos como los conidios de *Aspergillus fumigatus* (Serrano-Gómez *et al.*, 2004;2005). Las células dendríticas que expresan DC-SIGN se localizan principalmente en la submucosa de los tejidos, donde entran en contacto con diferentes patógenos. DC-SIGN puede inducir señalización intracelular a través de la ruta de la Raf-quinasa, modulando las respuestas mediadas por

TLRs e induciendo niveles altos de la citoquina inmunosupresora IL-10 (Gringhuis *et al.*, 2007; Hodges *et al.*, 2007). De hecho, se ha propuesto que la actividad de DC-SIGN podría ser el objetivo de patógenos con la finalidad de interactuar con el receptor y generar respuestas inmunitarias supresoras (van Kooyk Y. and Geijtenbeek, 2003).

## **b.2. Receptores de $\beta$ -glucano**

El glucano se halla distribuido de forma uniforme a lo largo de la superficie de la célula fúngica formando la matriz esencial de la pared celular. El  $\beta$ -1,3-glucano es mayoritario y está formado por moléculas de D-glucosa enlazadas linealmente, mientras que el enlace  $\beta$ -1,6 participa en las ramificaciones. Las células viables de la levadura no exponen grandes cantidades de glucano en superficie pero éstos son accesibles cuando la levadura ha sido inactivada por calor o cuando la capa superficial, formada por manosa principalmente, ha sido eliminada (Poulain and Jouault, 2004). Sin embargo, la presencia de  $\beta$ -glucano especialmente al nivel de las cicatrices de gemación (Gantner *et al.*, 2005), tienen influencia en el reconocimiento mediado por fagocitos.

### **i CR3 (CD11b/CD18)**

CR3 es una integrina de tipo  $\beta_2$  que reconoce ligandos, tanto exógenos como endógenos, de patógenos que han sido opsonizados por iC3b y carbohidratos, incluyendo  $\beta$ -glucano. El reconocimiento de carbohidratos está mediado por un dominio lectina, distinto al dominio de unión normal de ligandos de CR3 (Diamond *et al.*, 1993; Thornton *et al.*, 1996). El dominio lectina media el reconocimiento de ambas morfologías de la levadura (levaduriforme e hifal) (Forsyth *et al.*, 1998; Forsyth and Mathews, 2002), así como de otros hongos. Es un receptor fundamental en el proceso de fagocitosis, pero no desencadena respuestas protectoras, como la explosión oxidativa (Wright and Silverstein, 1983), y puede reprimir señales proinflamatorias (Wright and Silverstein, 1982; Brandhorst *et al.*, 2004).

Se ha descrito que la fagocitosis de *C. albicans* mediada por neutrófilos puede ser, en parte, debida a un reconocimiento del componente minoritario  $\beta$ -1,6-glucano (Rubin-Bejerano *et al.*, 2007) ya que partículas recubiertas con  $\beta$ -1,6-glucano son ingeridas por neutrófilos y la fagocitosis de blastosporas tratadas con  $\beta$ -1,6-glucanasa se ve reducida. Este reconocimiento parece estar mediado por CR3 tras la opsonización por fragmentos C3d (subproducto de C3) que unen  $\beta$ -1,6-glucano.

### **ii Dectina-1**

Dectina-1 (*DC-associated C-type lectin-1*) es considerado el principal receptor de  $\beta$ -glucano (Brown and Gordon, 2001). Reconoce glucanos altamente conservados unidos por enlace  $\beta$ -1,3 de una manera  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente (Herre *et al.*, 2004a; Brown, 2006). Se expresa principalmente en células mieloides (monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) (Taylor *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2002). Dectina-1 es un receptor de membrana tipo II con un tallo citoplásmico con un motivo de activación basado en tirosina

denominado hemi-ITAM (*Intracellular immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) (Rogers *et al.*, 2005), un dominio transmembrana y un dominio extracelular de tipo C no clásico (C-type lectin domain) con 2 sitios probables de N-glicosilación (Ariizumi *et al.*, 2000b; Brown and Gordon, 2001).

La fosforilación de la tirosina del ITAM permite el reclutamiento de Syk (*SH2-domain-containing protein spleen tyrosine kinase*) de forma dependiente de la quinasa Src, CARD9 y Bcl-10-Malt1, permitiendo la activación de la MAPK y de NF- $\kappa$ B, que da lugar a la producción de citoquinas, como la IL-2 y IL-10 (Rogers *et al.*, 2005), IL-6 (Gow *et al.*, 2007) e IL-17 (LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007), y a la maduración de células dendríticas. Por otro lado, la señalización que implica la fagocitosis por interacción  $\beta$ -glucano/Dectina-1 en macrófagos es dependiente de la tirosina proximal del motivo tipo ITAM y de la activación de la quinasa Src, pero es independiente de Syk (Goodridge *et al.*, 2009). Esta señalización desencadena estallido respiratorio, activación y regulación de ciclooxigenasa 2 (COX2), fagocitosis del ligando y la producción de diversas citoquinas y quimioquinas, incluyendo TNF- $\alpha$ , MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein-2*), IL-2, IL-10, IL-12p70, IL-6 e IL-23 (Willment and Brown, 2008; Goodridge *et al.*, 2009). También se ha relacionado la activación de este receptor con la activación de complejos inflamasoma, lo que confirma el carácter proinflamatorio de la respuesta a  $\beta$ -(1,3)-glucano (Cheng *et al.*, 2011).

Se ha visto que Dectina-1 se une específicamente a zonas donde la levadura está gemando y en cicatrices de gemación, donde el  $\beta$ -(1,3)-glucano queda más expuesto (Gantner *et al.*, 2005). De hecho, reconoce más específicamente cuando las levaduras exponen más glucano por una desorganización en la pared celular (Wheeler *et al.*, 2008; Galán-Díez *et al.*, 2010) y no reconoce formas filamentosas, ya que en esta forma de crecimiento el  $\beta$ -glucano no queda expuesto (Gantner *et al.*, 2005). Este resultado sugiere la posibilidad de que el hongo se haya adaptado para escapar al reconocimiento del sistema inmunitario a través del enmascaramiento de componentes específicos de la superficie celular que pudieran desencadenar una respuesta antifúngica (Heinsbroek *et al.*, 2005), aunque se ha visto que durante la infección, el  $\beta$ -glucano de *C. albicans* queda enmascarado en las primeras etapas y expuesto más tarde en varios órganos (Wheeler *et al.*, 2008).

Otro hecho relevante respecto al reconocimiento de  $\beta$ -glucano es que difiere dependiendo de si se encuentra soluble o formando partículas. Así, se induce mayor producción de citoquinas cuando se estimula con partículas de gran tamaño, como el curdlan (partículas de  $\beta$ -(1,3)-glucano producidas por *Alcaligenes faecalis*), que con partículas más pequeñas, como el zimosán (derivado de *S. cerevisiae*) o el curdlan sonicado. La laminarina ( $\beta$ -glucano soluble obtenido de *Laminaria digitata*) no señala, sino que bloquea la unión de las partículas al receptor (Rosas *et al.*, 2008).

Existe controversia respecto a la susceptibilidad de ratones defectivos en Dectina-1 a la candidiasis sistémica. Se ha detectado una menor supervivencia en ratones *knockout* con fondo genético 129/C57BL/6 y BL/6 (Taylor *et al.*, 2007; Vautier *et al.*, 2012), mientras que

no se ha visto tal efecto en fondo genético BALB/c (Saijo *et al.*, 2007). El hecho de que ratones defectivos en CARD9 sean también más susceptibles a la infección sistémica (Gross *et al.*, 2006) apoya la primera posibilidad.

Varios datos sugieren una función crucial de este receptor en la inmunidad de la mucosa frente a *C. albicans*. Dectina-1 se expresa altamente en células inmunitarias de la lámina propia del tracto gastrointestinal (Reid *et al.*, 2009), donde se induce una respuesta Th17 frente al hongo (Zelante *et al.*, 2007). Pacientes con defectos en Dectina-1 muestran alteraciones en la producción de IL-17 y sufren frecuentemente infecciones crónicas por *C. albicans* de tipo mucocutáneas (Ferwerda *et al.*, 2009; Netea and Marodi, 2010). Así mismo, se ha confirmado una mayor susceptibilidad del tejido gastrointestinal durante la infección sistémica en ratones Dectina-1 *knockout*, a pesar de que la colonización tras inoculación intragástrica, con o sin tratamiento antibiótico oral, no difiere en estos ratones de los controles C57BL/6 (Vautier *et al.*, 2012).

Parte de la respuesta mediada por Dectina-1 parece ser en colaboración con TLR2, induciendo señales dependientes de MyD88 que activan la producción de TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$  y la maduración de DCs (Dennehy *et al.*, 2008; Goodridge *et al.*, 2009) aunque, tras la fagocitosis de zimosán, Dectina-1 activa al factor de transcripción NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) permitiendo la producción de citoquinas de forma independiente del TLR2 (Goodridge *et al.*, 2007).

### iii Otros receptores de glucano

Los receptores “basurero” CD36 y SCARF1 han sido relacionados con el reconocimiento de *C. albicans* y *C. neoformans* a través de  $\beta$ -glucano. Se han descrito como importantes mediadores en la defensa contra estos patógenos en *Caenorhabditis elegans*, ya que inducen la producción de péptidos y de citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40, MIP1- $\alpha$  y MIP1- $\beta$ , MIP2,...), este último proceso en colaboración con TLR2 (Means *et al.*, 2009).

### **b.3. Receptores tipo Toll (TLRs)**

Los receptores de tipo *Toll* (TLRs) como elementos inmunitarios fueron descritos en *Drosophila* como consecuencia de la observación de la elevada resistencia innata que mostraba la mosca frente a infecciones fúngicas (Lemaitre *et al.*, 1996; Rock *et al.*, 1998). Los TLRs presentan un dominio extracelular rico en leucina (LRR), responsable del reconocimiento de los ligandos (Bell *et al.*, 2003) y una región intracitoplasmática denominada TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) con una homología significativa al dominio intracelular del receptor de tipo I de la IL-1, capaz de transmitir señales de activación (Akira and Takeda, 2004).

La transducción de la señal tras el reconocimiento del ligando comienza a través del dominio TIR. Este dominio interacciona con dominios TIR de moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) (Kawai and Akira, 2010). La primera molécula adaptadora que se describió fue MyD88 (*Myeloid Differentiation Factor 88*), que establece una vía de señalización común a todos los TLRs, salvo TLR3, esencial para la inducción de

citoquinas inflamatorias. De hecho, se ha descrito que MyD88 es necesario para la fagocitosis y muerte de *C. albicans* (Marr *et al.*, 2003). Existe otra vía independiente de MyD88, específica para TLR3 y TLR4, que implica a la molécula adaptadora TRIF (Akira and Takeda, 2004).

La ruta medida por MyD88 resulta en una cascada de reacciones que finalmente provocan la activación del complejo I $\kappa$ B (*I*KappaB Kinases) y de la familia de MAPK, que conlleva la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear  $\kappa$ B) y AP-1 (*Activator Protein 1*) respectivamente. Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes de citoquinas inflamatorias y otros genes implicados en el control de la proliferación celular y de la inmunidad (Akira and Takeda, 2004).

Se sabe que diferentes miembros de esta familia pueden cooperar entre ellos y así expandir el repertorio de ligandos que reconocen, al igual que pueden cooperar con otros receptores fagocíticos (Underhill and Ozinsky, 2002b; Akira and Takeda, 2004). Por otro lado, se ha implicado a los TLRs en aspectos no relacionados directamente con microorganismos, como son el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2006) o su participación en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como son el lupus eritematoso sistémico, la aterosclerosis o la artritis reumatoide (Takeda and Akira, 2005).

Entre los receptores tipo *Toll*, son TLR2 y TLR4 los principales implicados en el reconocimiento de *C. albicans*.

### i TLR2

TLR2 es capaz de reconocer una gran variedad de ligandos microbianos debido a su capacidad de colaborar con otros receptores formando heterodímeros. Inicialmente, se describió TLR2 como un elemento capaz de reconocer zimosán (Underhill *et al.*, 1999). Desde entonces, un gran número de publicaciones han indicado que este receptor influye en las patogénesis fúngicas.

El primer ligando de TLR2 descrito asociado a la pared celular de *C. albicans* fue el fosfolipomanano (PLM). El PLM induce la producción de mediadores inflamatorios en células mieloides de forma dependiente de TLR2 (Jouault *et al.*, 2003; Roeder *et al.*, 2004). El zimosán induce la señalización a través del heterodímero TLR2/TLR6, pero parece que dicha interacción no está mediada por glucano (Underhill, 2003).

Dectina-1 y TLR2 parecen colaborar en el reconocimiento de  $\beta$ -(1,3)-glucano, ya que la activación a través de Dectina-1 es capaz de producir un aumento en la respuesta inflamatoria mediada por TLR2, probablemente por solapamiento de las vías de transducción de señal (Gantner *et al.*, 2003; Underhill, 2003). También se ha descrito que la pre-exposición a agonistas de TLR2 aumenta en los macrófagos el estallido respiratorio inducido por Dectina-1 (Underhill, 2007).

Como ya se ha comentado, la asociación de TLR2 y Galectina-3 permite a los macrófagos discriminar entre *C. albicans* y *S. cerevisiae*, por reconocimiento de manano con enlace  $\beta$ -1,2 (Jouault *et al.*, 2006).

La susceptibilidad de ratones defectivos en TLR2 frente a *C. albicans* ha sido una cuestión controvertida en los últimos años, aunque ratones KO para MyD88 son claramente susceptibles en modelos de virulencia sistémica (Villamon *et al.*, 2004a). Se ha descrito que ratones TLR2 KO infectados con una cepa virulenta son más sensibles, en términos de supervivencia cuando se comparan con los ratones control (Villamon *et al.*, 2004b). Otros estudios indican que son más resistentes (Netea *et al.*, 2004), mientras que otros muestran que son igualmente susceptibles frente a una cepa de *C. albicans* de baja virulencia o a una dosis alta de una cepa virulenta, que causa una rápida mortalidad (Bellocchio *et al.*, 2004).

También se ha demostrado que la señalización mediada por TLR2 y TLR4, dependiente de MyD88 participa en la secreción de IL-23 y, por tanto, en el desarrollo de una respuesta Th17, que promueve la inflamación y favorece la eliminación del hongo (Zelante *et al.*, 2007). TLR2 parece estar implicado, además, en la producción de prostaglandina E2 en respuesta a *C. albicans* (Villamon *et al.*, 2005) y en el reclutamiento de neutrófilos al foco de infección.

## ii TLR4

TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) soluble y en la superficie celular de bacterias Gram-negativas (Poltorak *et al.*, 1998; Doyle and O'Neill, 2006), induciendo la producción de numerosos mediadores proinflamatorios como las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6. Sin embargo, el reconocimiento del LPS requiere de otras proteínas que forman junto a TLR4 el receptor funcional, como son la proteína de unión a LPS CD14 y MD-2 (Takeda *et al.*, 2003; Miyake, 2004). Respecto a ligandos fúngicos, se cree que el O-manano es reconocido por TLR4, ya que existe un reconocimiento diferencial de mutantes de *C. albicans* afectados en diferentes fases de la biogénesis de manano (Netea *et al.*, 2006).

La alteración de TLR4 en ratones C3H/HeJ les hace más susceptibles a una infección por *C. albicans* y estos ratones tienen alterado el patrón de expresión de citoquinas y el reclutamiento de neutrófilos (Netea *et al.*, 2002). Sin embargo, ratones KO de fondo genético C57BL/6 muestran una supervivencia similar a los controles cuando son infectados con una cepa de *C. albicans* de virulencia atenuada o incluso mayor durante la infección con una cepa virulenta (Bellocchio *et al.*, 2004). Posteriormente, empleando ambos tipos de ratones simultáneamente se ha descartado una susceptibilidad diferencial frente a las candidiasis sistémicas en los ratones deficientes en TLR4 comparados con ratones control (Murciano *et al.*, 2006).

## iii Otros TLRs

TLR9, así como otros miembros de la familia (TLR3, TLR7 y TLR8), se localiza en compartimentos intracelulares. Reconoce ácidos nucleicos, con motivos CpG no

metilados, tras la destrucción del patógeno en el fagolisosoma. Desencadena una señalización a través de MyD88, que resulta en la expresión de citoquinas inflamatorias (Wagner, 2001; Miyake, 2007; Kawai and Akira, 2010). La susceptibilidad a candidiasis diseminada no aumenta en ratones defectivos en TLR9 en comparación a ratones control. Los ratones TLR9 *knockout* son incapaces de desencadenar una respuesta específica Th1 tras una infección gástrica con *C. albicans* y muestran un aumento en linfocitos Th2 productores de IL-4. Por otro lado, células dendríticas sin TLR9 estimuladas con levaduras de *C. albicans* producen mayores niveles de IL-10 y menores de IL-12 (Bellocchio *et al.*, 2004).

La participación de TLR1 y de TLR6 en el reconocimiento *C. albicans* y en la consiguiente inducción de producción de citocinas por macrófagos se ha visto en colaboración con TLR2. La eliminación de estos receptores en ratones no supone un aumento de la susceptibilidad a la infección (Netea *et al.*, 2008b).

#### **b.4. Receptores tipo Nod (NLRs)**

Los NLRs (*Nod-like Receptors*) son una familia de receptores inmunitarios intracelulares caracterizados por tener repeticiones ricas en leucinas y un dominio de unión de nucleótidos (Weindl *et al.*, 2010). Así, estos receptores parecen conformar una línea de reconocimiento de *C. albicans* a nivel citoplasmático (Netea and Marodi, 2010). El complejo inflammasoma NLRP3 (*NLR pyrin-domain 3*) ha sido estudiado recientemente por su relevancia en la defensa del hospedador frente a *C. albicans* (Hise *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2009). El reconocimiento de PAMPs por este complejo activa la Caspasa-1 que conlleva el procesamiento y secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Bryant and Fitzgerald, 2009). Se ha relacionado la producción de IL-1 $\beta$  inducida por el hongo, proceso en el cual TLR2, Dectina-1 y NLRP3 parecen ser esenciales en un modelo de mucosa oral (Hise *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2009).

#### **b.5. Reconocimiento de quitina**

La quitina es, quizá, el componente polisacárido de la pared celular menos estudiado. La quitina parece inducir el reclutamiento de células inmunitarias que principalmente liberan IL-4 e IL-13 (Reese *et al.*, 2007). La quitina (y su forma desacetilada, quitosán) también participa en el reconocimiento, activación y atenuación inmune (Reese *et al.*, 2007; Mora-Montes *et al.*, 2011).

Tanto la lectina tipo C RegIIIy (HIP/PAD) en las células de Paneth del intestino delgado, como FIBCD1 (proteína tetramérica que une grupos acetilo dependiente de calcio) se han visto implicadas en la unión de quitina (Schlosser *et al.*, 2009). Sin embargo, el receptor que une quitina en células mieloides no ha sido aún identificado.

Existe controversia sobre la implicación de la quitina en el reconocimiento inmune, ya que se ha visto que se inducen ambas señales pro y antiinflamatorias, siendo muy relevante el tamaño de partícula de quitina (Lenardon *et al.*, 2010). Es probable que el quitosán tenga mecanismos de reconocimiento distintos a la quitina, ya que es capaz de activar el

inflammasoma NLRP3 y células dendríticas a través de TLR4, acciones que la quitina no produce (Villiers *et al.*, 2009; Bueter *et al.*, 2011).

## B. Activación de las defensas del hospedador

El reconocimiento de PAMPs de *C. albicans* mediado por receptores del sistema inmunitario produce la activación de rutas de señalización que estimulan la producción de citoquinas, la fagocitosis y la acción fungicida.

### a) Fagocitosis de *C. albicans*

La fagocitosis del microorganismo está mediada por la acción concertada de receptores opsonizantes y no opsonizantes. La unión y activación del complemento, mediada principalmente por MBL y por anticuerpos, implica una opsonización de la levadura, pero no su lisis, que está impedida por la existencia de la pared celular (Kozel, 1996). Algunos receptores de membrana como Dectina-1 (Herre *et al.*, 2004b), MR (Romani *et al.*, 2004) y DC-SIGN (Cambi *et al.*, 2003) median la fagocitosis de partículas fúngicas. Además, se ha descrito que las células dendríticas son capaces de fagocitar blastosporas de *C. albicans* a través del receptor de manosa (MR) y, parcialmente, por receptores CR3 y FcγR (Ip and Lau, 2004).

Los TLRs no median fagocitosis fúngica, pero podrían estar implicados en dirigir la maduración del fagosoma y en la presentación de antígenos (Blander and Medzhitov, 2006).

### b) Acción fungicida frente a *C. albicans*

Tras el proceso de fagocitosis, la acción fungicida contra *C. albicans* ocurre a través de mecanismos tanto oxidativos como no oxidativos (Romani, 2004). Aunque los receptores implicados en el desencadenamiento de estos eventos son poco conocidos, se ha descrito que Dectina-1 induce la explosión oxidativa en respuesta a *C. albicans* activando la NADPH oxidasa (Donini *et al.*, 2007). Esta actividad puede ser incrementada mediante señalización a través de TLR2 (Gantner *et al.*, 2003). La explosión oxidativa es un mecanismo efector antifúngico esencial en la producción de oxidantes tóxicos y en la activación de proteasas que pueden matar a la levadura (Aratani *et al.*, 1999; Mansour and Levitz, 2002; Reeves *et al.*, 2002). La acción fungicida frente a *C. albicans* también podría ocurrir extracelularmente a través de las acciones, todavía no definidas, de PRRs como la Galectina-3 (Kohatsu *et al.*, 2006).

### c) Liberación de mediadores solubles

#### c.1. Citoquinas

Uno de los procesos más importantes llevados a cabo por las células inmunitarias tras el reconocimiento de patógenos es, junto con la fagocitosis, la liberación de citoquinas. Entre

ellas, destacan las de acción proinflamatoria como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6, producidas rápidamente por fagocitos tras su interacción con *C. albicans* (Presterl *et al.*, 1999). El TNF- $\alpha$  es esencial en el control de las candidiasis, ya que su neutralización favorece el avance de la enfermedad (Steinshamn and Waage, 1992; Netea *et al.*, 1995). Esta citoquina participa en la quimiotaxis de células fagocíticas, a las que activa desencadenando el estallido respiratorio e induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras (Parameswaran and Patial, 2010).

Como ya se ha comentado, los receptores tipo *Toll* activan tanto la ruta NF- $\kappa$ B como rutas mediadas por MAPKs, las cuales conducen a la estimulación de producción de citoquinas proinflamatorias (Akira and Hemmi, 2003). El balance entre las señales que son inducidas por TLR2 y TLR4 parece tener un papel crucial en la regulación de la respuesta inmunitaria. Se ha descrito que TLR4 puede estimular la producción de citoquinas proinflamatorias a través de dos rutas. Una de ellas implica la inducción de citoquinas dependiente de NF- $\kappa$ B mediada por MyD88; mientras que la otra implica la liberación de interferones de tipo I dependiente de IRF3 (factor de regulación de interferón 3) (Toshchakov *et al.*, 2002), induciendo la producción secundaria de citoquinas de respuesta Th1 como el IFN- $\gamma$  (Netea *et al.*, 2002). Sin embargo, macrófagos peritoneales de ratones *Tlr2*<sup>-/-</sup> muestran una menor liberación de TNF- $\alpha$  al ser estimulados *ex vivo* con células de *C. albicans* viables o inactivadas por distintos procedimientos, mientras que no se ha observado ese efecto en ausencia de TLR4. En el mismo trabajo se describen resultados similares respecto a la liberación de IFN- $\gamma$  por esplenocitos de estos ratones (Murciano *et al.*, 2007).

Entre las lectinas tipo C, Dectina-1, Dectina-2 y MR están implicados en la iniciación de respuestas frente a *C. albicans*. Dectina-2 parece unir preferentemente hifas de *C. albicans* induciendo la producción de TNF- $\alpha$  y el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) (Sato *et al.*, 2006). Dectina-1 induce la producción de numerosas citoquinas y quimioquinas en respuesta a hongos, incluyendo TNF- $\alpha$  (Gantner *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2003; 2005; Rogers *et al.*, 2005). Mientras que la inducción de la producción de IL-10, IL-6 e IL-2 puede ser mediada directamente por Dectina-1 (Slack *et al.*, 2007), la inducción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas requiere la colaboración en la señalización con TLR2 (Gantner *et al.*, 2003), aunque ciertas evidencias sugieren que Dectina-1 es suficiente para el desencadenamiento de estas respuestas en ciertos tipos celulares, como los macrófagos alveolares (Steele *et al.*, 2003). Las rutas intracelulares que son activadas por Dectina-1 para la inducción de citoquinas implican el reclutamiento de Syk (Rogers *et al.*, 2005) y la señalización vía CARD9 (Gross *et al.*, 2006). Además de esta mediación de la ruta Dectin-1-Syk, CARD9 es una molécula adaptadora que media señales proinflamatorias que son inducidas por otra clase de receptores, como los receptores Ndo (Hsu *et al.*, 2007), receptores asociados a ITAM y TLRs (Hara *et al.*, 2007). También se ha sugerido que existen rutas dependientes de TRIF que modulan el balance entre respuestas Th17 y T<sub>reg</sub> en ratones con candidiasis gástrica (De Luca *et al.*, 2007).

En modelos epiteliales, se ha visto que el reconocimiento inicial del hongo es a través de la pared pero independiente de la morfología, produciéndose una activación de la cascada NF- $\kappa$ B y del factor de transcripción dependiente de MAPK c-Jun, siendo esta respuesta transitoria sin implicar una producción de citoquinas. Para la liberación de estos mediadores sería necesario un aumento de la forma filamentosa que implicaría una activación epitelial completa y discriminativa. Esta activación, estudiada en epitelio oral y vaginal, resulta de la señalización por dos vías: la mediada por el factor de transcripción c-Fos, que es activado por la ruta p38 y la de la fosfatasa de MAPK denominada MKP1, que es activada por la ruta MEK1/2–ERK1/2 y que regula la producción de citoquinas mediada por MAPK. Las estructuras asociadas a filamentación que inducen la activación de c-Fos y MKP1 son desconocidas, aunque se duda que sean polisacáridos de pared, ya que éstos sólo activan NF- $\kappa$ B y c-Jun (Moyes *et al.*, 2010;2011).

Se ha descrito que levaduras e hifas son reconocidas de forma diferente por células inmunitarias (Wozniok *et al.*, 2008); así, el patrón de citoquinas inducido por levaduras e hifas difiere significativamente. Parece que las hifas inducen menor producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  por células dendríticas y mayores niveles de IL-4, no siendo reconocidas por TLR4 (d'Ostiani *et al.*, 2000) además de no inducir la fuerte respuesta proinflamatoria mediada por Dectina-1, tal y como se observa frente a levaduras (Gantner *et al.*, 2005).

## c.2. Péptidos antimicrobianos

La liberación de compuestos péptidicos de carácter antimicrobiano es un importante mecanismo de control de patógenos, especialmente a nivel de mucosas. Concretamente, en la mucosa bucal se han descrito numerosos compuestos péptidicos que intervienen en el control bacteriano como  $\alpha$ - y  $\beta$ -Defensinas, Adrenomedulina, Histatinas y Catelicidinas (Dale and Fredericks, 2005). Estos dos últimos grupos de péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) han sido estudiados en los últimos años por su relevancia en el control de *C. albicans*. La histatina 5 (Hst 5) y la catelicidina LL-37 presentan una importante actividad anti-*Candida* por distintos mecanismos (Den Hertog *et al.*, 2005; Dale and Fredericks, 2005).

La Hst 5 es producida por glándulas salivares e implica una toxicidad en mitocondrias metabólicamente activas y una leve alteración a nivel de pared celular para favorecer su entrada (Helmerhorst *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Den Hertog *et al.*, 2005; Mochon and Liu, 2008). Se han observado, además, efectos antifúngicos sinérgicos con anfotericina B contra *Candida*, *C. neoformans* y *A. fumigatus* (van't Hof W. *et al.*, 2000).

El péptido LL-37 se encuentra en mucosa bucal y saliva, principalmente en condiciones inflamatorias (Frohm *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 2002). De hecho, las células responsables de su producción parecen ser los neutrófilos infiltrados y no las células epiteliales (Dale *et al.*, 2001). Su mecanismo de acción se limita a la superficie celular, acumulándose en la membrana plasmática donde genera una desorganización de la bicapa lipídica con la consecuente alteración de la permeabilidad (Den Hertog *et al.*, 2005; Den Hertog *et al.*, 2006).

En ratón se ha descrito un péptido antimicrobiano, llamado CRAMP. Este péptido es producido en saliva y en mucosas y parece cumplir un papel similar al que tiene LL-37 en humanos (Murakami *et al.*, 2002).

#### d) Inducción de respuesta adaptativa

En los últimos años se ha relacionado la activación de la respuesta Th17 en la protección frente a infecciones fúngicas, especialmente a nivel de mucosas (Curtis and Way, 2009). La diferenciación de linfocitos T CD4 vírgenes a Th17 es inducida por las citoquinas producidas por células presentadoras de antígeno IL-1 $\beta$ , IL-6 y TGF- $\beta$ , y mantenido por IL-23.

En macrófagos, tanto las levaduras como las hifas inducen la producción de IL-23 e IL-6, mientras que sólo las hifas inducen la liberación de IL-1 $\beta$  madura, siendo este proceso mediado por el inflammasoma NLRP3 (que no es activado por mutantes anclados en su forma de levadura). En células mieloides, la activación de IL-1 $\beta$  requiere un procesamiento de la proIL-1 $\beta$  por parte de la caspasa-1 la cual es activada via Dectina-1. Ambas morfologías inducen la transcripción y traducción de proIL-1 $\beta$ , pero sólo la hifa induce caspasa-1 con la consecuente liberación de IL-1 $\beta$  activa, que permite el establecimiento de Th17, con la consecuente liberación de IL-17 y reclutamiento de neutrófilos (Cheng *et al.*, 2011). En la inmunidad de mucosas, la fracción Th17, con sus citoquinas IL-17A, IL-17F e IL-22, cumple el papel de discriminar colonización y enfermedad invasiva (van de Veerdonk *et al.*, 2009;2011). Estos datos sugieren que la transición de levadura colonizante a hifa invasora de tejidos activa la respuesta Th17 protectora de mucosa. Aunque el papel de IL-17 en la respuesta inmunitaria frente a candidiasis es protector, mediante la inducción del reclutamiento de neutrófilos (Huang *et al.*, 2004), puede llegar a ejercer un efecto patológico inflamatorio en infecciones gástricas producidas por la levadura (Zelante *et al.*, 2007).

### 3. Estudios *in vivo* de la relación *C. albicans*-Hospedador

En los últimos años, se han establecido diversos modelos animales clínicamente relevantes de candidiasis que imitan tanto las alteraciones inmunitarias como las características específicas de tejidos de seres humanos. El estudio de las interacciones *Candida*-hospedador utilizando estos modelos animales ha experimentado un gran desarrollo gracias a los avances en genómica como son la disponibilidad de mutantes de *C. albicans* en genes de interés, la aplicación *in vivo* de *microarrays*, y otras tecnologías emergentes, así como la construcción de ratones transgénicos y *knockout*. La combinación de todas estas herramientas ha permitido el desarrollo de numerosos trabajos científicos que han aportado una importante información sobre la patogénesis molecular y celular de la candidiasis (de Repentigny L., 2004;Brown *et al.*, 2007).

El estudio en animales de experimentación en vez de en humanos presenta una serie de ventajas, como son el control eficiente de los individuos y de su ambiente, la posibilidad de realizar análisis longitudinales de tipo causa-efecto, la mayor capacidad de toma de muestras y la posibilidad de ensayar antifúngicos o vacunas. Un modelo adecuado de patogénesis debería por tanto reproducir fielmente el proceso virulento completo, incluyendo colonización e invasión por el lugar anatómico preciso, además de mimetizar en lo posible los defectos inmunológicos o las situaciones fisiológicas asociadas a la infección. Además, el tiempo de interacción debe poder prolongarse el tiempo necesario para detectar la importancia de los factores implicados, tanto los relativos al hongo como al hospedador (de Repentigny L., 2004).

## A. Modelos de estudio en invertebrados

El uso de animales invertebrados se ha aplicado principalmente al estudio de la infección epitelial y celular además de la respuesta humoral, siendo las especies más utilizadas *Drosophila melanogaster*, *Acanthamoeba sp.*, *C. elegans*, *Dictyostelium discoideum* y *Galleria mellonella* (Chamilos *et al.*, 2007; Mylonakis *et al.*, 2007). Este tipo de modelo presenta importantes ventajas sobre el uso de mamíferos, principalmente desde el punto de vista ético y económico. Sin embargo, sus múltiples diferencias con humanos hacen que difícilmente puedan aportar datos tan extrapolables sobre la interacción patógeno-hospedador como los modelos desarrollados en mamíferos.

## B. Modelos de estudio en mamíferos

Dentro de los distintos mamíferos empleados en investigación, los ratones y las ratas son los más utilizados en estudios de candidiasis, aunque también se han utilizado otros como el cerdo (Andrutis *et al.*, 2000; Samaranyake and Samaranyake, 2001). Entre las ventajas de usar pequeños roedores están su relativa similitud anatómica e inmunológica, el mayor número de herramientas y métodos disponibles para su estudio y que suponen menos implicaciones éticas que otros mamíferos más evolucionados (Samaranyake and Samaranyake, 2001; Chamilos *et al.*, 2007).

A pesar de todo, el modelo murino presenta algunos impedimentos como el hecho de que, al contrario que en humanos, el trato gastrointestinal de los ratones no es colonizado naturalmente por *C. albicans*, aunque algunos autores lo consideran una ventaja ya que de esta manera el comportamiento inmunológico del hospedador no estará afectado por una respuesta adaptativa preexistente hacia el hongo (Samaranyake and Samaranyake, 2001; de Repentigny L., 2004).

### a) Infección sistémica

Tradicionalmente el estudio de la infección por *C. albicans* en ratón se ha llevado a cabo forzando la entrada a nivel sistémico, evitándose así el problema de la ausencia de colonización.

La inyección intravenosa ha servido durante años para comprobar la importancia de numerosos factores de virulencia del hongo (Csank *et al.*, 1997; Diez-Orejas *et al.*, 1997; Alonso-Monge *et al.*, 1999). A pesar de que ésta es una vía poco común de infección en humanos, su utilización se ha generalizado por la dificultad en establecer un modelo universal y reproducible en mucosa.

## b) Modelos en mucosa

De la variedad de genes delecionados en *C. albicans*, sólo unos pocos se ha ensayado en modelos de infección de mucosas, por lo que está por demostrar su implicación en este proceso. Así pues, no se conocen bien los mecanismos relativos al establecimiento en ese ambiente. Las mucosas en las que se establece *C. albicans* son principalmente la vaginal, la oral y la gastrointestinal. Se han desarrollado distintos modelos en estas localizaciones, aplicándose las metodologías necesarias para facilitar la interacción, ya que hasta ahora no se ha descrito ningún modelo de invasión de mucosas por *Candida* que no precise un tratamiento previo al animal.

### b.1. Principales modelos utilizados

#### i Vaginal

En general, la viabilidad del modelo vaginal depende del mantenimiento de los individuos en un estado prolongado de pseudo-estro, que precisa de la administración semanal de 17- $\beta$ -estradiol (Clemons *et al.*, 2004). En ausencia de pseudo-estro la infección vaginal es eliminada en 2 semanas (Fidel, Jr. *et al.*, 2000). El tratamiento hormonal afecta a las células epiteliales, al ambiente en la mucosa y al sistema inmunitario (Fidel, Jr. *et al.*, 2000; Relloso *et al.*, 2012). La susceptibilidad en este modelo es similar en distintas cepas de ratón (excepto en la cepa CD-1), por lo que parece ser independiente del haplotipo MHC H-2 (Calderon *et al.*, 2003).

#### ii Oro-faríngeo

En el caso de los modelos oro-faríngeos de candidiasis (OPC), la rata ha sido tradicionalmente el organismo más empleado (Samaranayake and Samaranayake, 2001; Naglik *et al.*, 2008), aunque en los últimos años se están desarrollando métodos de gran interés en ratón (Conti and Gaffen, 2010). Uno de los primeros modelos consistía en la colocación de un implante acrílico en la boca del animal que provoca la obstrucción necesaria para producirse la infección. Posteriormente se desarrollaron métodos basados en tratamientos con antibióticos o que inducen inmunodepresión, ya que de otra manera *Candida* es rápidamente eliminada (Deslauriers *et al.*, 1995; Kamai *et al.*, 2001).

#### iii Gastrointestinal

El establecimiento en intestino tras una inoculación intragástrica simularía más fielmente la entrada natural de *C. albicans* y su progreso hasta la diseminación sistémica existente en humanos. Se han ensayado numerosos modelos, principalmente murinos, de infección

gastrointestinal, algunos de ellos con la finalidad de comprobar la eficacia de fármacos antifúngicos en un entorno *in vivo* (Capilla *et al.*, 2007).

La mayoría de los estudios que pretenden un establecimiento de *C. albicans* emplean un tratamiento antibiótico que, supuestamente por reducción de la microbiota, permite la colonización (Helstrom and Balish, 1979; Kinneberg *et al.*, 1999; Tansho *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2008). Se han descrito algunos basados en colitis inducida químicamente (Jawhara and Poulain, 2007). Aunque se puede evitar dicho tratamiento si se modifica la microbiota con alteraciones fisiológicas como la utilización de ratones gnotobioticos (Balish *et al.*, 1984; 1990; Rahman and Challacombe, 1995) o mediante alteración de la alimentación (Yamaguchi *et al.*, 2005). Modelos de candidiasis diseminada de origen gastrointestinal han sido descritos en crías de ratón (4-6 días de edad) (Pope *et al.*, 1979) y tras fuertes tratamientos inmunosupresores y modificadores de mucosa (Koh *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha empleado un método de candidiasis mucosa crónica a nivel gástrico (CMC) en el que no se busca una colonización estable, sino una permanencia en el tracto gastrointestinal suficiente para detectar diferencias de susceptibilidad (concentración de *C. albicans* en estómago) y cambios a nivel inmunitarios, por lo que se prescinde del uso de antibióticos (Cenci *et al.*, 1995; Montagnoli *et al.*, 2002; entre otros).

## **b.2. Elementos estudiados en modelos de ratón**

Todos estos modelos han aportado interesantes datos sobre la susceptibilidad del hospedador y sobre factores de virulencia en *C. albicans*.

### **i Factores del hospedador**

Uno de los objetivos más directos para ensayar modelos animales es el estudio inmunológico frente a la infección. Así, cabe destacar cómo con un modelo de OPC se ha observado una discrepancia entre la susceptibilidad de ratones KO en IFN- $\gamma$  y ratones defectivos en IL-12p40 (Farah *et al.*, 2006), que posteriormente se relacionó con la existencia de la respuesta Th17 y se estudió más a fondo con otro modelo de infección orofaríngeo (Conti *et al.*, 2009). Otro nuevo elemento relacionado con el reconocimiento de *C. albicans* que ha sido estudiado recientemente en OPC es el complejo inflamasoma NLRP3, y se ha visto que colabora con TLR2 y Dectina-1 en el desarrollo de una respuesta antifúngica eficaz (Hise *et al.*, 2009). Por otro lado, en un modelo de OPC se ha confirmado la diferente susceptibilidad de los ratones DBA/2 frente a BALB/c (Elahi *et al.*, 2000), ya vista en modelos sistémicos.

Respecto a los modelos gastrointestinales, uno de los primeros establecidos y más utilizado para *C. albicans* ha sido el de candidiasis mucosa crónica (CMC). Este modelo permite detectar una permanencia poco mantenida en el tracto gastrointestinal (Cenci *et al.*, 1995), pero ha sido empleado para estudiar la relación entre las respuestas Th1 y Th2 frente al hongo hasta el descubrimiento del papel de la respuesta Th17. Modificaciones de éste se han usado más recientemente para estudiar la relevancia de la interacción de distintos elementos inmunitarios. Así, se ha sugerido una relación entre los receptores tipo

*Toll* y la susceptibilidad a nivel de mucosa gástrica, debido a un aumento en la carga fúngica, al cabo de una semana, en estómago en ratones KO en TLR2, TLR4 o MyD88, mientras que se observa una disminución en los KO para TLR9 (Bellocchio *et al.*, 2004). Este dato se confirmó posteriormente usando el mismo modelo (CMC), pero se le da una relevancia mayor a TLR4 en base a que el aumento se mantiene tras 2 semanas. En el mismo trabajo se estudia profundamente la importancia de la vía MyD88 comparada con la mediada por TRIF, concluyendo que cada ruta participa en la maduración secuencial de dos tipos distintos de linfocitos T<sub>reg</sub>, que participan en la protección inmunitaria en respuesta a *C. albicans* (De Luca *et al.*, 2007). También se han estudiado en este modelo aspectos de gran importancia como la relevancia del balance Th1/Th17 (Zelante *et al.*, 2007), así como la de IL-22, citoquina recientemente asociada a la protección frente a *C. albicans* (De Luca *et al.*, 2010).

Otros experimentos que favorecen el establecimiento de una colonización mantenida han permitido determinar factores que permiten una diseminación desde el intestino, como es la administración de corticoides (Bendel *et al.*, 2002; Tansho *et al.*, 2004), la inmunodepresión generalizada (ciclofosfamida) o una combinación de neutropenia y daño en mucosa (Koh *et al.*, 2008). Algunos de ellos muestran un patrón de producción de anticuerpos dependiente de esta diseminación (Tansho *et al.*, 2004; Cutler *et al.*, 2011).

## ii Factores de *C. albicans*.

Entre los elementos específicos del hongo ensayados en modelos gastrointestinales se limitan a una serie de mutantes isogénicos de *C. albicans* ensayados en distintas condiciones.

Se ha visto que la delección del gene *INT1* (relacionado con filamentación) implica una disminución (comparado con la cepa silvestre CAF2) en los niveles de *C. albicans* en ciego, a los 3 y 7 días en ratones tratados con antibióticos (Kinneberg *et al.*, 1999). De forma similar, la falta de *Efg1* (uno de los elementos claves en filamentación) implica una menor capacidad de colonización gastrointestinal a largo plazo en ratones inmunocompetentes, aunque no en ratones atímicos (Pierce and Kumamoto, 2012). Por otro lado, la falta de *Gpi7* resultó en una menor recuperación de células de *Candida* viable en heces siguiendo el protocolo de Pope (Richard *et al.*, 2002). También se ha visto que *Als1* es importante en las fases iniciales de candidiasis orofaríngea, probablemente por su implicación en el proceso de adhesión (Kamai *et al.*, 2002). De forma similar se describe una menor presencia del mutante *cka2* en un modelo de OPC (Chiang *et al.*, 2007).

En el caso del gen *EFH1* el efecto es contrario, pues se ha visto que el mutante *efh1* presenta mayores niveles de colonización que la cepa parental en ratones tratados con antibióticos (White *et al.*, 2007). Más recientemente se ha confirmado un comportamiento similar entre la cepa silvestre SC5314 y la frecuentemente usada como parental CAF2 (*URA3/ura3*). Se ha descartado una implicación directa de la filamentación al detectarse una colonización normal del mutante *efg1 cph1* (defectivo en filamentación) y un nivel menor, pero comparable, del mutante hiperfilamentoso *tup1* (Koh *et al.*, 2008).

# Planteamientos y objetivos

---



Este trabajo surgió de la observación de que numerosos mutantes de *Candida albicans* defectuosos en la señalización mediada por quinasas de tipo MAP, tema en el que nos hemos centrado en los últimos años, muestran una menor virulencia en un modelo murino de infección sistémica. Los estudios de nuestro grupo y de otros, indicaban que en este modelo en que se inicia la infección por inyección en la vena lateral de la cola de ratón, la virulencia y el alojamiento en órganos, era menor en los mutantes *mkc1*, *cek1* y *hog1*. Sin embargo, este modelo, ampliamente utilizado en la literatura científica hasta el momento, presenta ciertos inconvenientes desde el punto de vista experimental, siendo el mayor de ellos el hecho de que no mimetice la forma en la que transcurre normalmente una infección en un paciente, que suele implicar una deficiencia inmunológica, fungemias iniciales reducidas y paso a través de mucosas. Además, la información que con frecuencia se obtiene de este modelo se ha limitado a la tasa media de supervivencia de los animales, desconociendo en qué estadio o estadios del proceso infeccioso es defectuoso el mutante analizado.

Por este motivo, en nuestro grupo hemos iniciado el estudio y caracterización de un modelo de colonización gastrointestinal en ratón, por entender que es complementario (y quizá más realista) para describir el curso de la infección natural por *Candida albicans*. Ello ha llevado al desarrollo de herramientas genéticas que posibiliten la visualización del hongo en los tejidos del hospedador, tanto *in vitro* como *in vivo*, y a la puesta a punto de sistemas para el estudio de poblaciones *ex vivo* del hongo en muestras intestinales. Ello ha posibilitado también el estudio de qué factores condicionan el establecimiento, proliferación y diseminación del microorganismo en el organismo huésped y la realización de estudios competitivos entre una cepa silvestre y mutante para conocer su evolución en el curso de la colonización en el modelo de ratón.



# Resultados

---



## 1. Desarrollo de herramientas para el estudio de la infección por *C. albicans*

En el diseño de numerosos experimentos que implican una interacción directa *in vivo* de un patógeno con el hospedador es necesaria la identificación del microorganismo inoculado tras ser recuperado de las correspondientes muestras biológicas y la diferenciación, si procede, de otros especímenes que pudieran colonizar dichos hábitats. La identificación de la cepa objeto de estudio es posible mediante diferentes estrategias, entre ellas, el marcaje genético con elementos que codifican una actividad enzimática específica o que permiten una fácil visualización.

Como primer objetivo de este trabajo nos planteamos desarrollar cepas de *C. albicans* marcadas establemente mediante genes reporteros adecuados. En una primera fase de este apartado de Resultados, describimos el marcaje del hongo con sistemas enzimáticos mientras que, en una segunda, se describe la puesta a punto de un sistema de expresión *in vivo*, detección y visualización de proteínas fluorescentes en este organismo.

### A. Marcaje genético de *C. albicans* dependiente de sustrato

#### a) Expresión del gen *lacZ* de *Streptococcus thermophilus* en *C. albicans*

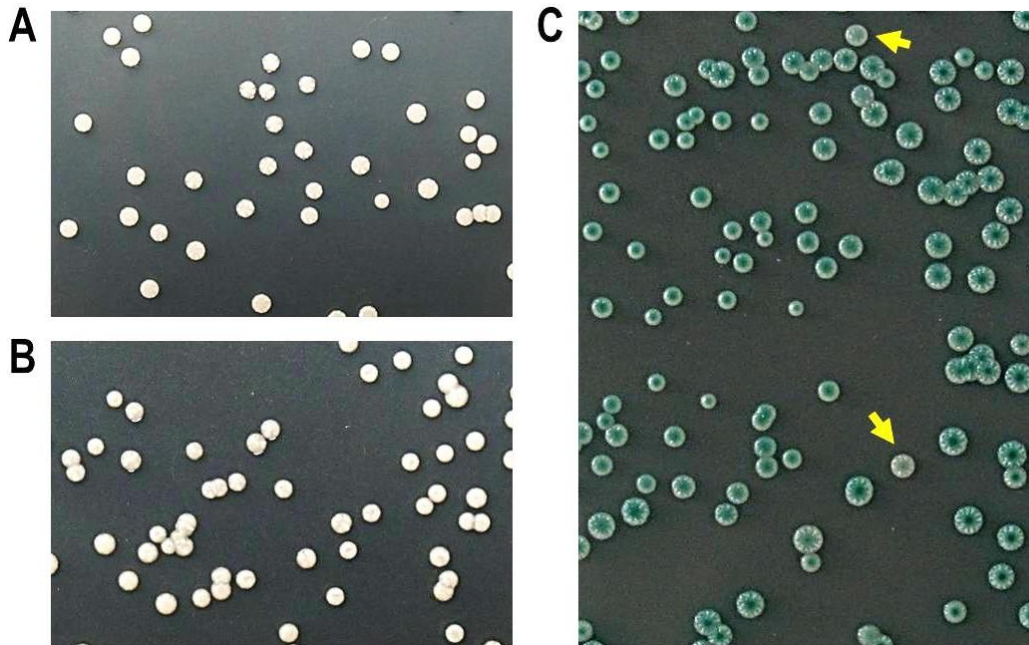
El gen *lacZ* de *Streptococcus thermophilus* ha sido anteriormente utilizado con éxito como gen informador en *C. albicans* (Uhl and Johnson, 2001). Nosotros requeríamos una expresión suficientemente alta que permitiera su detección en colonias y, en la medida de lo posible, que no estuviera regulada nutricionalmente.

Tras ser amplificado (ver Materiales y Métodos 4.A.c.3), se introdujo dicho gen en plásmidos de expresión génica regulados por doxiciclina. Se utilizó tanto una versión inducible (Dox<sup>IND</sup>, plásmido pNIM1) (Park and Morschhauser, 2005), como reprimible (Dox<sup>REP</sup>, pNIM1R) (L.E. Cowen, no publicado) por el antibiótico (ver Materiales y Métodos 4.A.b).

Ambos plásmidos se integraron en la región génica *ADH1* y se seleccionaron por resistencia a nirsotricina (marcador de selección del vector). La transformación de la cepa parental CAF2 (Fonzi and Irwin, 1993) con dichas construcciones dio lugar a las cepas CAF2-*lacZ*<sup>IND</sup> y CAF2-*lacZ*<sup>REP</sup> (ver Materiales y Métodos 1.A), que regulan positiva y negativamente, respectivamente, la expresión del gen reportero dependiente de la presencia en el medio de doxiciclina.

La siembra de estas cepas en medio SD con 40 µg/mL de X-Gal (SD-XGal) mostró en las colonias aisladas obtenidas una tinción azul intensa característica tras la hidrólisis del sustrato cromogénico X-Gal por la enzima β-galactosidasa (Figura 6). Como se puede observar, se detectó claramente la actividad enzimática así como la regulación

dependiente de doxiciclina. También se evidenció una cierta heterogeneidad en la coloración colonial (Figura 6, flechas amarillas).



**Figura 6. Cultivo sólido de *C. albicans* expresando el gen *StlacZ*.**

Morfología colonial y detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa CAF2 (panel A) y CAF2-*lacZ*<sup>REP</sup> (paneles B y C). Se sembraron un número reducido (30-300) de células de las cepas en SD-XGal (pH=7) adicionando 20  $\mu$ g/mL doxiciclina en los paneles A y B como control de represión. Las fotografías se tomaron tras 48 horas creciendo a 37°C. Las flechas indican colonias con una expresión no homogénea de *lacZ* respecto del resto.

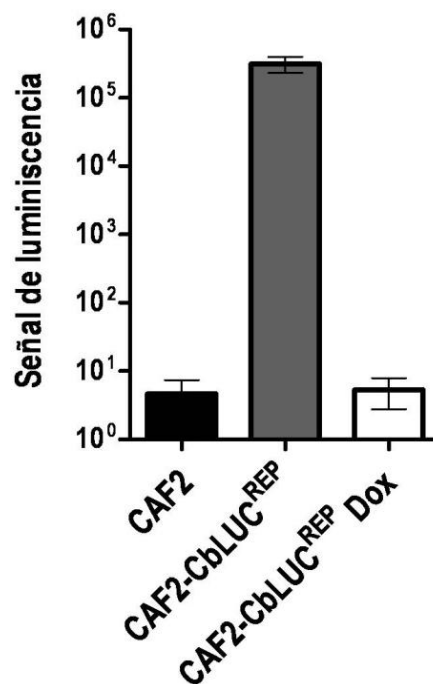
### b) Expresión del gen CbLuc en *C. albicans*

El uso de luciferasas como genes reporteros en *C. albicans* ha sido utilizado anteriormente para desarrollar estudios de expresión de distintos genes (Arana and Pla, 2012). Dadas las peculiaridades de este sistema reportero (alta sensibilidad y fondo nulo), su acoplamiento bajo el control de promotores constitutivos permitiría *a priori* y mediante el uso de los controles adecuados, estimar el número de células en una muestra biológica compleja. Los genes de luciferasa utilizados hasta el momento en *C. albicans* proceden del coral *Renilla reniformis* (RLuc) y de la luciérnaga común americana *Photinus pyralis* (FLuc). En este trabajo nos planteamos la introducción en este hongo de una versión modificada de una nueva luciferasa (CbLuc) procedente del escarabajo elatérico del Caribe (Caribbean Click beetle, *Pyrophorus plagiophthalmus*) (Hida *et al.*, 2009).

Para ello, se rediseñó la secuencia de nucleótidos del gen CbLuc para adaptarla al uso de codones de *C. albicans*, poniendo especial atención en la eliminación de todos los

codones CTG, cuya traducción en esta especie difiere del universal y del utilizado por otras especies de *Candida* (Yokogawa *et al.*, 1992; Ohama *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993) (ver Materiales y Métodos 4.A.c.4). Se obtuvo así el alelo  $^{Ca}CbLuc$ , que se subclonó en uno de los plásmidos indicados anteriormente y regulado negativamente por doxiciclina (pNIM1R), integrándose en la cepa CAF2. Se obtuvo así el transformante CAF2- $^{Ca}CbLuc^{REP}$  (ver Materiales y Métodos 1.A).

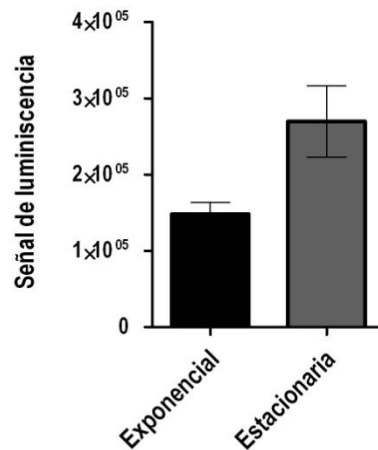
Como se muestra en la Figura 7, la luciferasa de escarabajo diseñada es funcional en *C. albicans*. La señal de luminiscencia emitida por la cepa expresando el gen  $^{Ca}CbLuc$  es del orden de  $3 \times 10^5$  unidades/ $10^6$  células según nuestras condiciones de ensayo. Por el contrario, los controles negativos (CAF2 y CAF2- $^{Ca}CbLuc^{REP}$  en presencia de doxiciclina) dieron valores inferiores a 5 unidades/ $10^6$  células. Estos datos indican que el sistema tiene una alta sensibilidad (0,3 unidades de señal por célula) además de una gran especificidad, presentando un fondo de señal mínimo (aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$  unidades de señal/célula de media).



**Figura 7. Funcionalidad de la enzima CbLuc en *C. albicans*.**

Se representa, en escala logarítmica, la señal de luminiscencia (en unidades arbitrarias) detectada por millón de células fúngicas, emitidos por las cepas CAF2 y CAF2- $^{Ca}CbLuc^{REP}$  tras 18 horas de crecimiento a 37 °C en medio SD o medio SD con doxiciclina (10  $\mu$ g/mL) como se indica. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM).

El análisis de la expresión en función de la fase de crecimiento (Figura 8) mostró una disminución de la señal de luminiscencia en fase exponencial en comparación con la fase estacionaria de crecimiento ( $1,5 \times 10^5$  frente a  $2,7 \times 10^5$  unidades por millón de células). Ello se debe, probablemente, a una menor acumulación de la enzima CbLuc por célula en condiciones de tasa máxima de crecimiento, puesto que tras la obtención de extractos proteicos, la relación entre las señales emitidas por proteína total fue similar (datos no mostrados).



**Figura 8. Expresión de  $CaCbLuc$  en función de la fase de crecimiento.**

Se representa, en escala logarítmica, la señal de luminiscencia detectada por millón de células fúngicas emitidas por la cepa CAF2- $CaCbLuc^{REP}$  creciendo en fase estacionaria (D.O.=10) o fase exponencial (D.O.=1), en medio SD a 37 °C.

## B. Desarrollo de un sistema de visualización fluorescente en *C. albicans*

Un objetivo para el estudio *in vivo* de la infección es poder visualizar directamente las células fúngicas en contacto con el hospedador. La fluorescencia permite prescindir de un sustrato para su detección y permite el estudio de células individuales mediante microscopía o citometría de flujo, lo cual la hacen especialmente útil en este tipo de estudios.

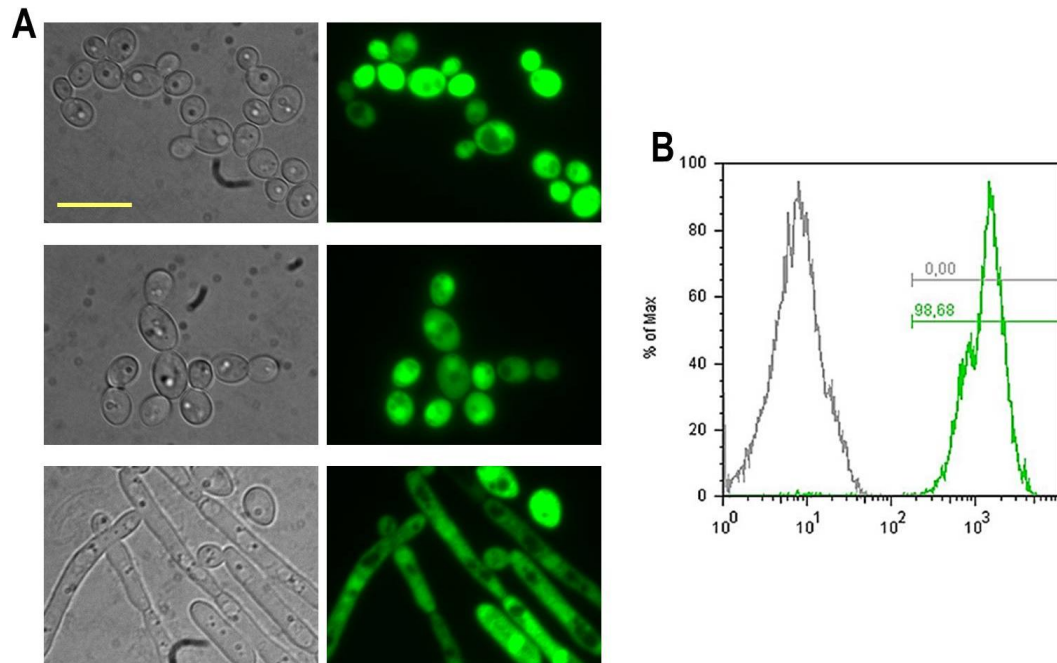
### a) Expresión de *GFP* en *C. albicans*

El uso de la proteína verde fluorescente (GFP) en *C. albicans* se ha generalizado desde que se desarrollaran versiones eficaces para este microorganismo (Cormack *et al.*, 1997; Morschhäuser *et al.*, 1998). La integración de las construcciones tanto en el sistema inducible ( $Dox^{IND}$ ) como en el reprimible ( $Dox^{REP}$ ) descrito anteriormente permitiría expresar la fluorescencia en el animal de forma controlada mediante la adición del antibiótico.

Se realizaron las construcciones correspondientes para introducir el alelo  $MoGFP$  (Morschhäuser *et al.*, 1998) en los plásmidos de expresión regulada ya vistos anteriormente (ver Materiales y Métodos 4.A.c.1). La integración, en la región génica *ADH1*, de dichas construcciones en la cepa parental CAF2 dio lugar a la obtención de las cepas correspondientes, CAF2- $MoGFP^{IND}$  y CAF2- $MoGFP^{REP}$  (ver Materiales y Métodos 1.A).

La expresión de  $MoGFP$  se analizó tanto en cultivos en medio líquido estándar (creciendo tanto en fase exponencial como en estacionaria) como en condiciones favorecedoras de la filamentación, puesto que este cambio morfológico se induce en el curso de una infección experimental. El análisis por microscopía (Figura 9A) reveló una visualización muy eficaz de la GFP en ambas morfologías. La detección por citometría de flujo mostró una clara

separación entre las poblaciones (99% población positiva al expresar GFP frente al 0% de población positiva en el control), con una media de intensidad de fluorescencia en la población positiva de 1430 frente a una media de 9 en la negativa (Figura 9B).



**Figura 9. Detección de GFP expresada en *C. albicans*.**

En la figura A se muestra la detección de GFP correspondiente a la cepa CAF2- $M_{\text{O}}$ GFP<sup>REP</sup> creciendo a 37 °C en medio líquido SD analizadas en fase estacionaria (imagen superior), exponencial (imagen intermedia) y en condiciones inductoras de filamentación (imagen inferior), mediante la adición de suero (20% v/v) al medio SD, tomándose las fotografías tras 18 horas. Las imágenes corresponden a microscopía óptica por contraste de fases (izquierda) y microscopía de epifluorescencia, en el canal verde (derecha). La barra en amarillo corresponde a un tamaño de 10  $\mu\text{m}$  en todas las figuras. En el panel B se muestran los histogramas obtenidos a partir de dos cultivos, tras 18 horas de crecimiento en medio SD a 37 °C, de la cepa CAF2- $M_{\text{O}}$ GFP<sup>REP</sup> en presencia (perfil gris) o ausencia (perfil verde) de doxiciclina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

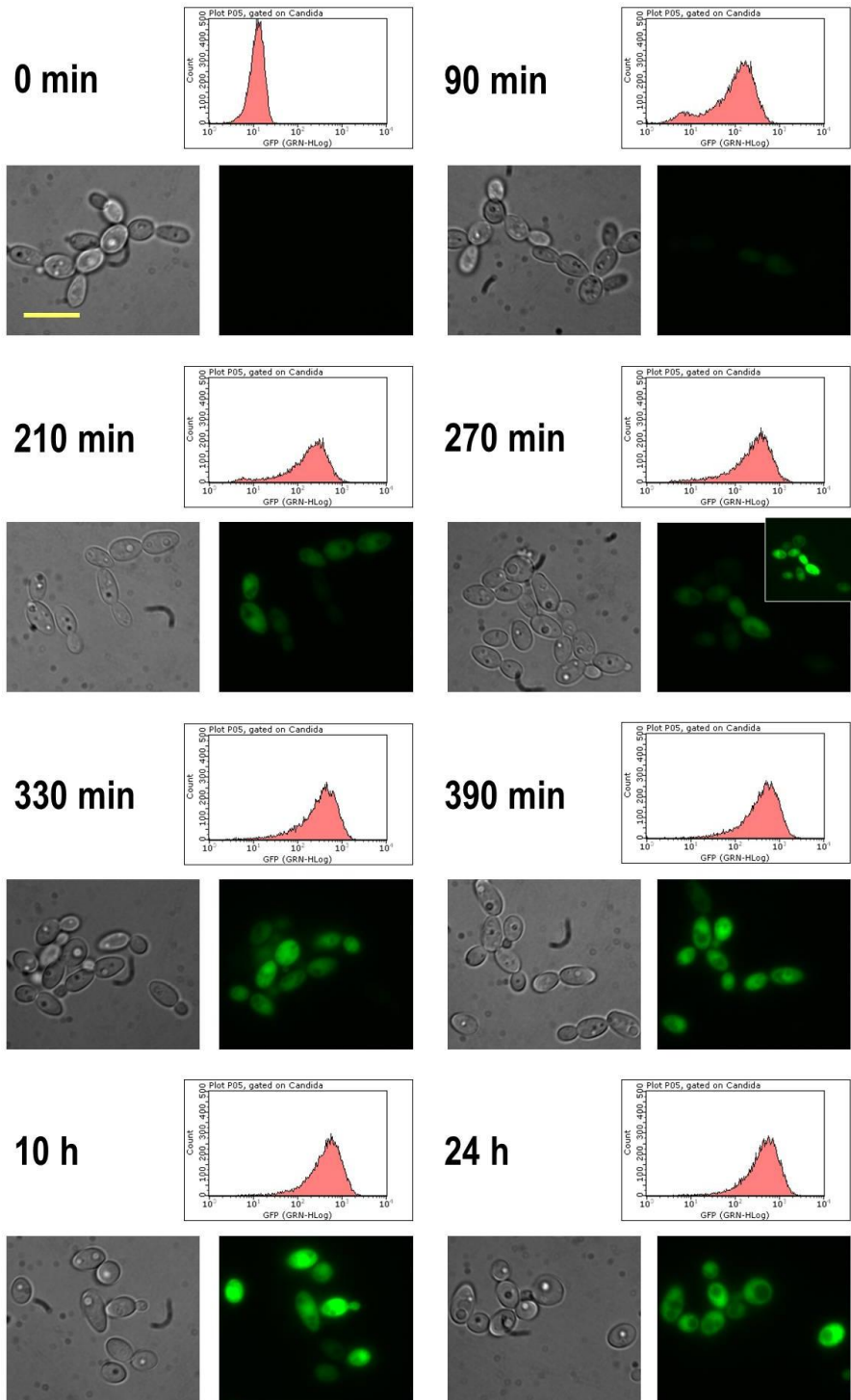
### a.1. Dependencia de promotores regulados por doxiciclina

Con el objetivo de caracterizar más a fondo el sistema regulado por doxiciclina nos planteamos estudiar la dependencia con el tiempo y la concentración de doxiciclina, dada su relevancia para el diseño de futuros experimentos *in vivo*.

#### i Cinética de inducción y represión de la expresión de GFP

Se realizó, en primer lugar, una cinética de inducción empleando la cepa CAF2- $M_{\text{O}}$ GFP<sup>IND</sup>. Como se muestra la Figura 10, la expresión de proteína fluorescente verde fue claramente detectable a partir de los 210 minutos tras la adición de la doxiciclina al medio de cultivo

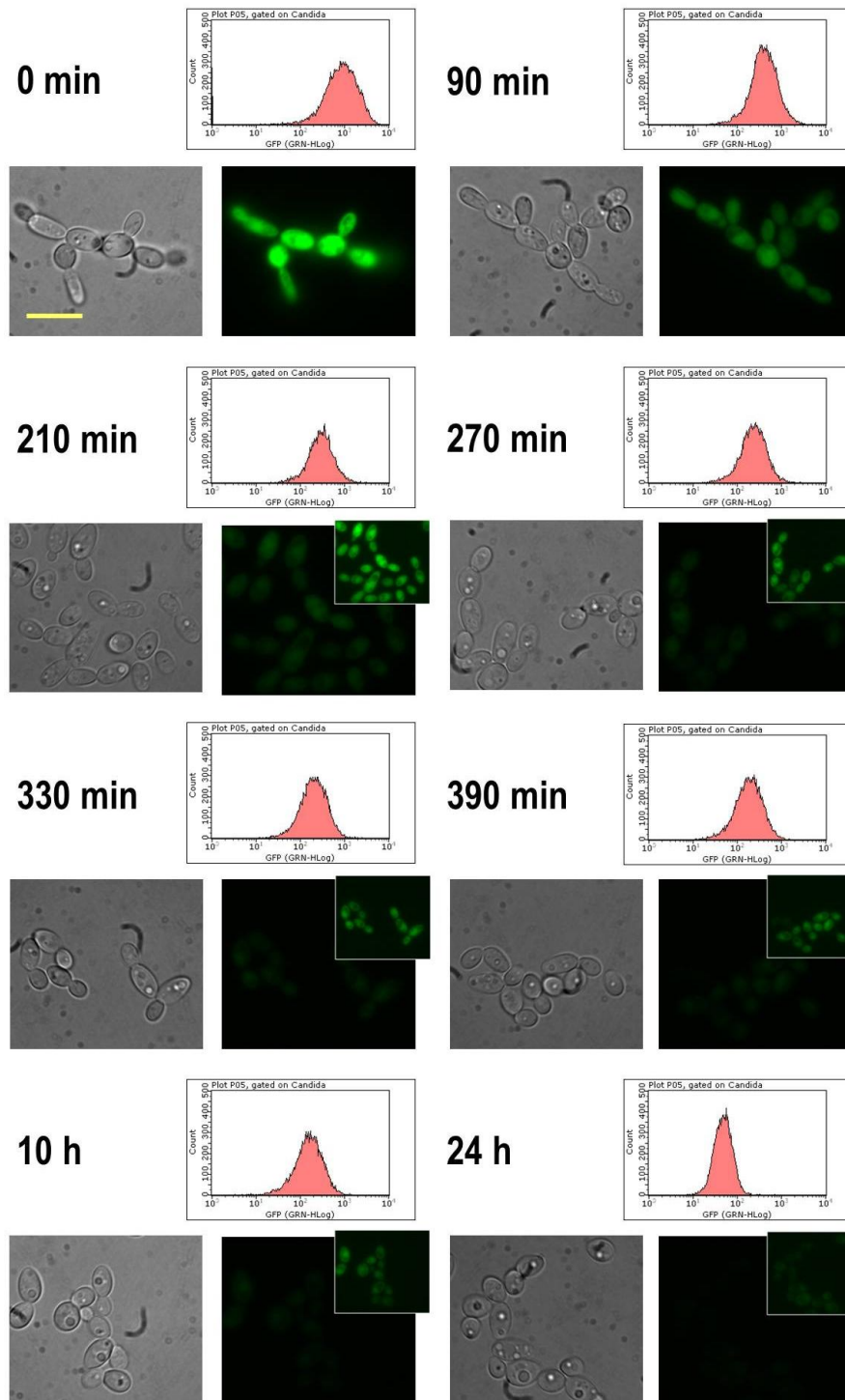
por microscopía, mientras que tras 90 minutos ya se aprecia la aparición de una población expresando GFP en el análisis por FACS.



**Figura 10. Cinética de inducción de  $M^o$ GFP en medio SD.**

Detección de GFP correspondiente a la cepa CAF2- $M^o$ GFP<sup>IND</sup> creciendo en fase exponencial en medio líquido SD a 37 °C. Las imágenes y los perfiles de citometría se obtuvieron a los tiempos indicados tras la adición de doxiciclina (10 µg/mL). El cuadro izquierdo de cada tiempo corresponde a microscopía óptica y el derecho a microscopía de fluorescencia verde. El cuadro pequeño a 270 minutos implica un mayor nivel de luminosidad de la misma imagen a la que acompaña al objeto de apreciar el comienzo de aparición de señal fluorescente. Todas las fotos fueron tomadas utilizando el mismo nivel de exposición al objeto de hacer comparable la señal detectada. La barra amarilla corresponde a 10 µm.

En un experimento conceptualmente similar, estudiamos la detección de GFP en el sistema reprimible (CAF2- $M^o$ GFP<sup>REP</sup>) con la finalidad de determinar los tiempos en los que se mantiene detectable la proteína. Dicha detección es posible hasta 10 horas tras la adición de doxiciclina en medio líquido, especialmente mediante citometría de flujo, dejando de ser óptima la detección microscópica a partir de 210 minutos en presencia del represor (Figura 11).

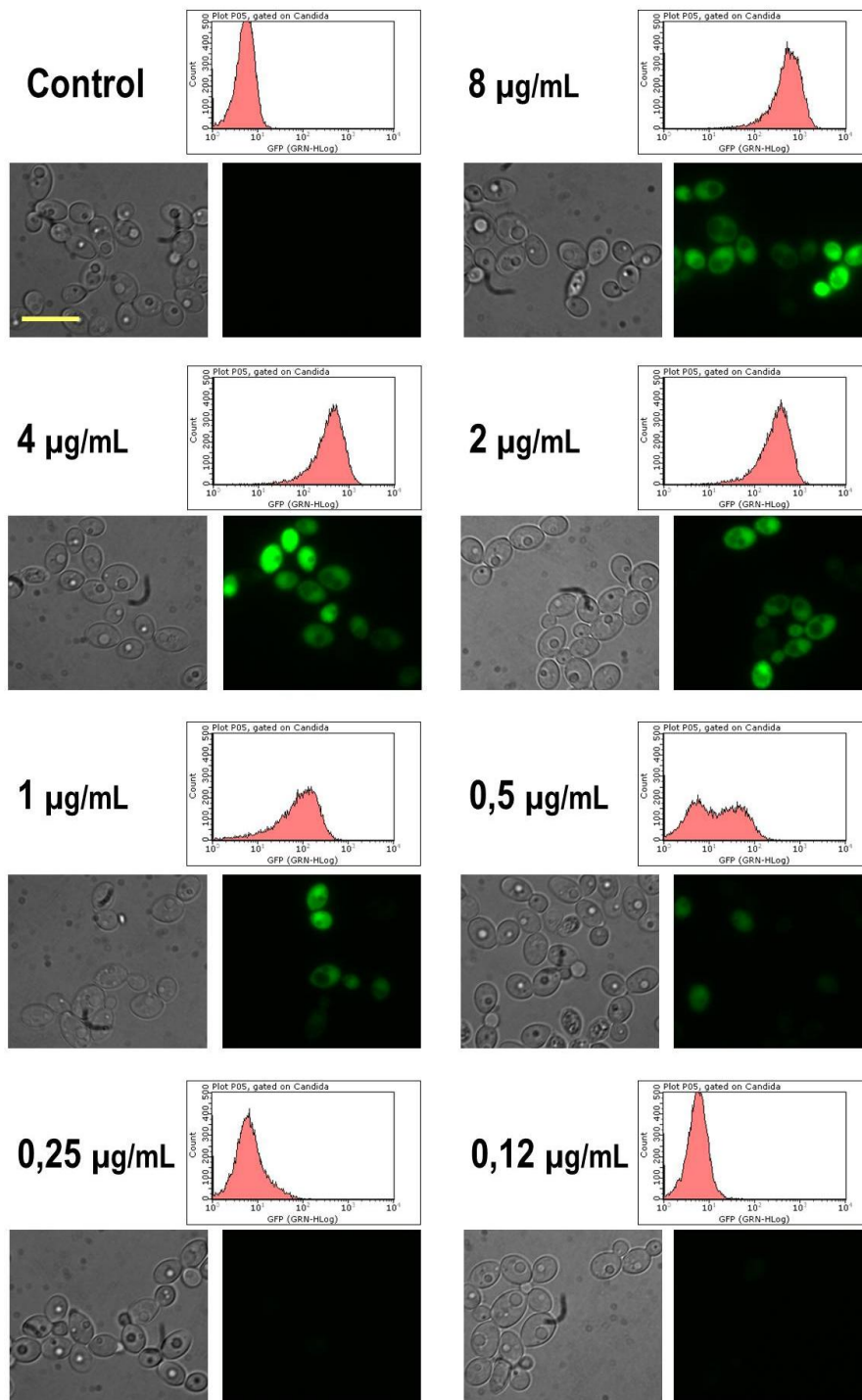


**Figura 11. Cinética de represión de la expresión de  $M^o$ GFP.**

Detección de GFP correspondiente a la cepa CAF2- $M^o$ GFP<sup>REP</sup> creciendo en fase exponencial en medio líquido SD a 37 °C. Las imágenes y los perfiles de citometría se obtuvieron a los tiempos indicados tras la adición de doxiciclina (10 µg/mL). El cuadro izquierdo de cada tiempo corresponde a microscopía óptica y el derecho a microscopía de fluorescencia verde. Los cuadros pequeños corresponden a un mayor nivel de luminosidad de la misma imagen a la que acompaña al objeto de apreciar el comienzo de aparición de señal fluorescente. Todas las fotos fueron tomadas utilizando el mismo nivel de exposición al objeto de hacer comparable la señal detectada. La línea amarilla corresponde a 10 µm.

## ii Expresión de $M^o$ GFP a concentraciones limitantes de doxiciclina

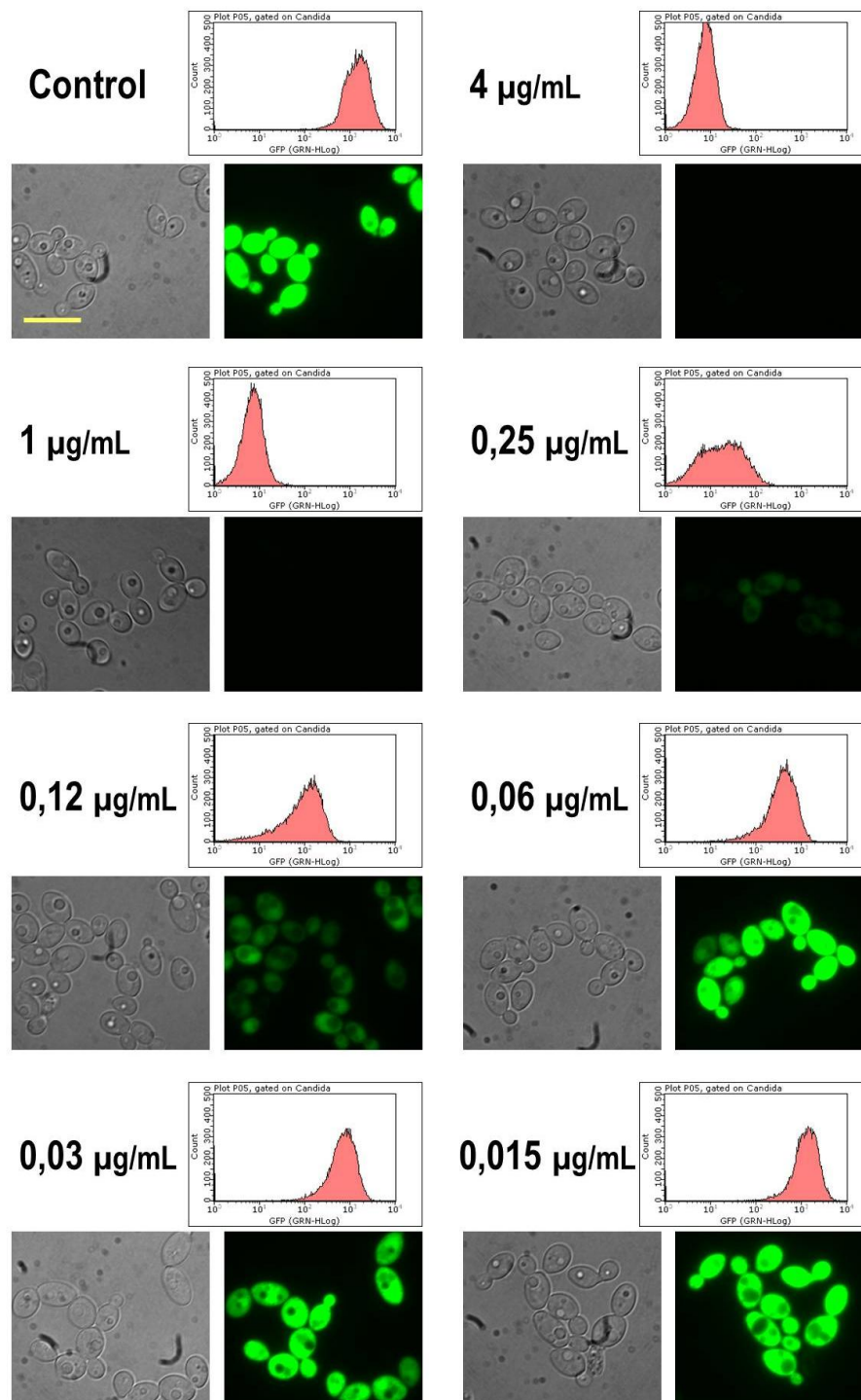
Con el propósito de determinar el rango de concentraciones de doxiciclina que inducen una expresión detectable de GFP, se realizó la inducción en la cepaCAF2- $M^o$ GFP<sup>IND</sup> utilizando diferentes concentraciones del antibiótico y recuperando las células a un tiempo fijo establecido. Como muestra la Figura 12, la expresión comienza a ser eficiente a partir de concentraciones de doxiciclina de 2  $\mu$ g/mL. Tanto por microscopía como por citometría se aprecia que, por debajo de este valor, la señal disminuye notablemente y la expresión no es homogénea en la población.



**Figura 12. Inducción de la expresión de  $M^oGFP$  a concentraciones limitantes de doxiciclina.**

Detección de GFP correspondiente a la cepa CAF2- $M^oGFP^{IND}$  creciendo durante 24 horas en medio líquido SD a 37 °C, en presencia de distintas concentraciones de doxiciclina (indicadas sobre las imágenes) o en ausencia del compuesto (control). Se realizaron diluciones seriadas en medio de cultivo del antibiótico, inoculándose todas ellas a densidad óptica de 0,01 de un cultivo crecido durante 24 horas previas sin presencia de doxiciclina. Las imágenes se obtuvieron por microscopía óptica y de fluorescencia (canal verde) y los histogramas mediante citometría de flujo (canal verde). La barra amarilla corresponde a 10  $\mu$ m.

De forma similar, se efectuó el tratamiento de la cepa CAF2-MoGFPREP con diferentes concentraciones de doxiciclina con el objetivo de determinar el umbral de expresión en este sistema reprimible. Como se muestra en la Figura 13, la detección empieza a ser apreciable a una concentración de 0,12  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina.



### Figura 13. Represión de la expresión de $M^o$ GFP en concentraciones limitantes de doxiciclina.

Detección de GFP correspondiente a la cepa CAF2- $M^o$ GFP<sup>REP</sup> creciendo durante 24 horas en medio líquido SD a 37 °C, en presencia de distintas concentraciones de doxiciclina (indicadas sobre las imágenes) o en ausencia del compuesto (control). Se realizaron diluciones seriadas en medio de cultivo del antibiótico, inoculándose todas ellas a densidad óptica de 0,01 de un cultivo crecido durante 24 horas previas sin presencia de doxiciclina. Las imágenes se obtuvieron por microscopía óptica y de fluorescencia (canal verde) y los histogramas mediante citometría de flujo (canal verde). La barra amarilla corresponde a 10  $\mu$ m.

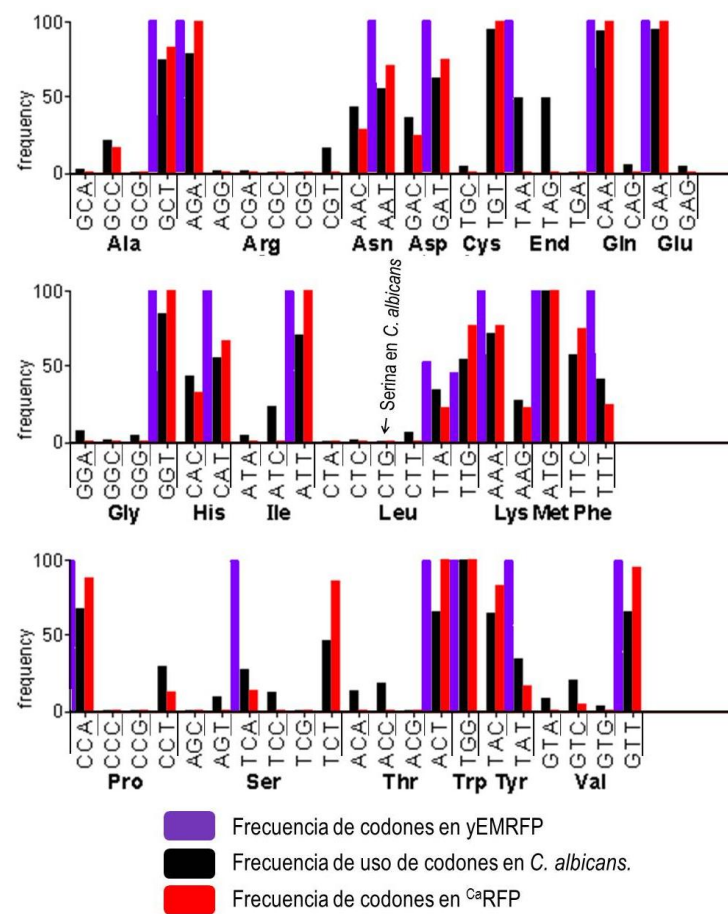
#### b) Desarrollo de una proteína fluorescente roja en *C. albicans*

La utilidad del sistema descrito para  $M^o$ GFP en el organismo de estudio nos condujo a explorar otras formas alternativas y complementarias de marcaje utilizando un fluorocromo diferenciable de la GFP. Teniendo en cuenta las mejoras conseguidas en las nuevas versiones de la proteína fluorescente roja (RFP) procedente de coral (DsRed) (Matz *et al.*, 1999) se decidió diseñar una versión adaptada a *C. albicans* de la RFP denominada dTomato (Shaner *et al.*, 2004).

##### b.1. Expresión y detección de dTomato en *C. albicans*

Para asegurar una expresión adecuada del gen heterólogo, se rediseñó la secuencia de DNA del gen dTomato de acuerdo al uso de codones del hongo, eliminándose los tripletes CTG (ver Materiales y Métodos 4.A.c.2). Una vez obtenido el gen adaptado a *C. albicans*,  $Ca$ RFP, éste se introdujo en los sistemas regulados por doxiciclina y se integró en la estirpe parental (CAF2) obteniéndose las cepas CAF2- $Ca$ RFP<sup>IND</sup> y CAF2- $Ca$ RFP<sup>REP</sup> (ver Materiales y Métodos 1.A).

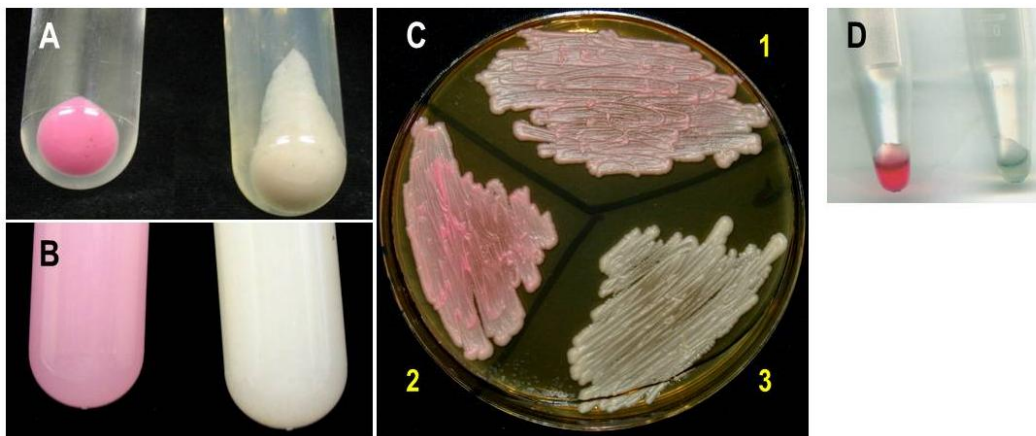
Durante el estudio de este nuevo gen reportero se publicó una adaptación de la RFP mCherry a levaduras denominada  $y$ EMRFP (Keppler-Ross *et al.*, 2008). Aunque en este trabajo se centraron en su utilidad en *S. cerevisiae*, también se mostró su funcionamiento en *C. albicans* como marcador celular. Las frecuencias de uso de codones en el gen  $y$ EMRFP se compara en la Figura 14 con un patrón establecido para *C. albicans* (ver Materiales y Métodos 4.A.c.2) y con la secuencia rediseñada del gen dTomato ( $Ca$ RFP).



**Figura 14. Frecuencia de utilización de codones en yEMRFP, en *C. albicans* y en <sup>Ca</sup>RFP.**

Frecuencia de uso de codones del gen que codifica para la proteína yEMRFP (morado), de distintos genes de *C. albicans* (negro) y del gen que codifica para la proteína <sup>Ca</sup>RFP (rojo). La gráfica es una modificación de las obtenidas del programa Codon Usage Analyzer (<http://gcu.schoedl.de/>).

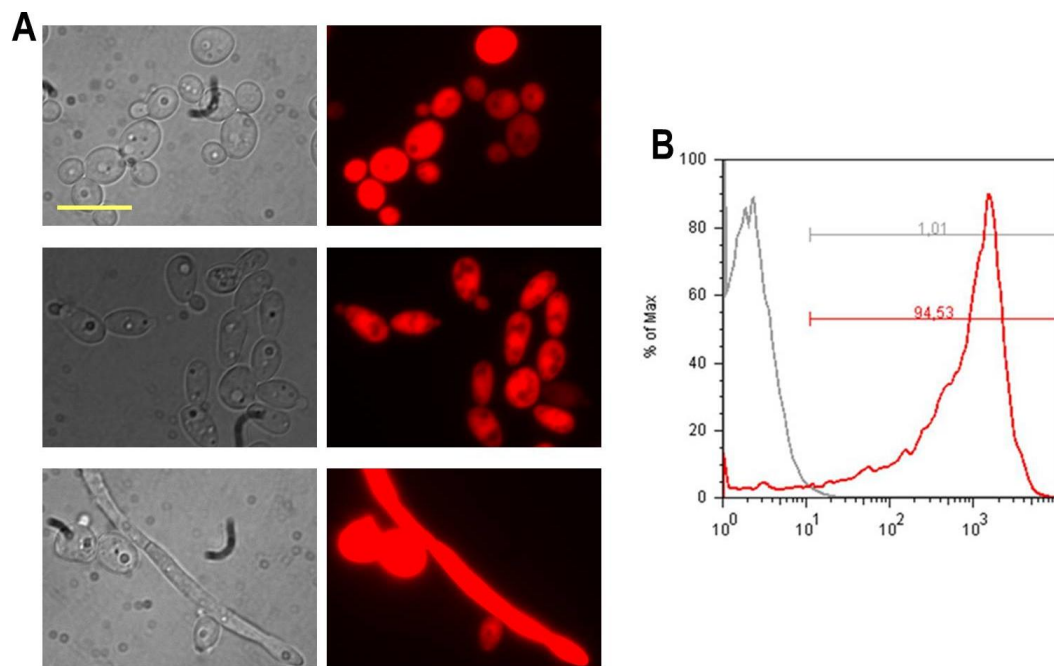
Al inducir la expresión de la <sup>Ca</sup>RFP durante el crecimiento en medio líquido (Figura 15B) o sólido (Figura 15C.1 y C.1) se pudo observar un color rojo rosáceo directamente en el cultivo debido a la presencia de la proteína roja. Este color se mantenía en el precipitado de células, estando ausente en sobrenadante de las mismas (Figura 15A). También fue evidente en un extracto proteico obtenido a partir de dichas células (Figura 15D). Sin embargo, una coloración análoga no se observó cuando se expresaba <sup>Mo</sup>GFP en idénticas condiciones (Figura 15C.3).



**Figura 15. Aspecto macroscópico de *C. albicans* expresando  $CaRFP$ .**

Los paneles A y B muestran el aspecto de un cultivo de la cepa CAF2- $CaRFP^{IND}$  tras 24 horas de crecimiento en medio SD en presencia (izquierda) o ausencia (derecha) de doxiciclina 10  $\mu\text{g/mL}$ . Las muestras del apartado A, denotan la presencia de color en las células centrifugadas y su ausencia en el medio de cultivo. En la figura C se muestra una placa de medio sólido YPD+doxiciclina (20  $\mu\text{g/mL}$ ) donde se sembraron dos clones de la cepa CAF2- $CaRFP^{IND}$  (1 y 2) y un clon de la cepa CAF2- $MoGFP^{IND}$  (3). La figura D corresponde a los extractos proteicos obtenidos a partir de la cepa CAF2- $CaRFP^{IND}$  tras crecer 24 horas en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de doxiciclina 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Se analizó el funcionamiento de la RFP como marcador fluorescente de forma análoga al estudio establecido para la GFP. La visualización microscópica de la proteína roja expresada en *C. albicans* fue muy satisfactoria, detectándose en el citoplasma en las dos principales morfologías estudiadas (blastospora e hifas) aunque se detectó una cierta heterogeneidad de nuevo en la población. No se observaron cambios significativos en función de la morfología celular (Figura 16A). La detección por citometría de flujo dio lugar a una clara separación entre las poblaciones (95% población positiva al expresar  $CaRFP$  frente a 1% de población positiva en el control), con una media de intensidad de fluorescencia en la positiva de 1096, frente a una media de 3 en la negativa (Figura 16B).



**Figura 16. Detección de  $CaRFP$  expresada en *C. albicans*.**

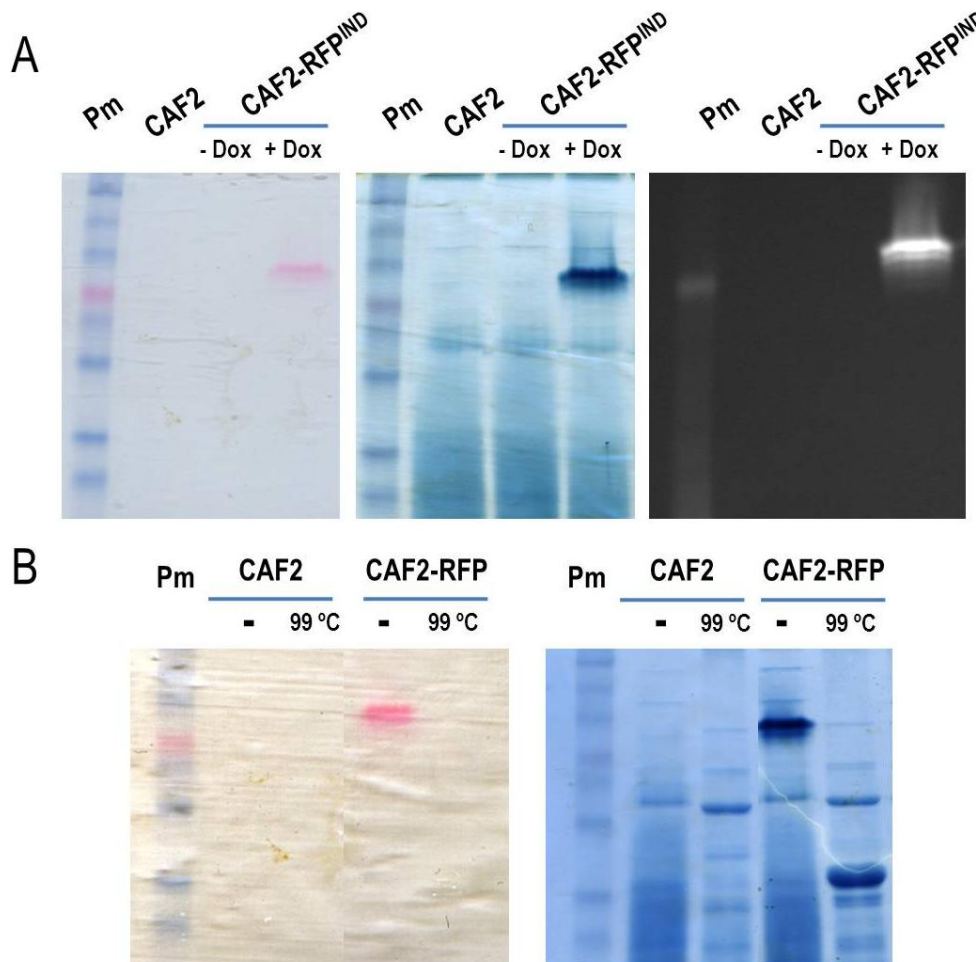
En la figura A se muestra la detección de RFP correspondiente a la cepa CAF2- $CaRFP^{REP}$  creciendo a 37 °C en medio líquido SD analizadas en fase estacionaria (imagen superior), exponencial (imagen intermedia) y formando hifas (imagen inferior). La inducción de la filamentación se llevó a cabo por adición de suero (20% v/v) a medio SD de cultivo tomándose las fotografías tras 18 horas de crecimiento. Las imágenes corresponden a microscopía óptica por contraste de fases (izquierda) y microscopía de epifluorescencia, en el canal rojo (derecha). La barra amarilla indica 10  $\mu$ m. En el panel B se muestran los histogramas obtenidos a partir de dos cultivos de la cepa CAF2- $CaRFP^{REP}$  tras 24 horas de crecimiento en presencia (perfil gris) o ausencia (perfil rojo) de doxiciclina (10  $\mu$ g/mL).

## b.2. Análisis electroforético de $CaRFP$

Con intención de caracterizar la proteína expresada en *C. albicans*, se analizó su migración electroforética. Al igual que en el extracto (Figura 15D), la proteína fue claramente detectada en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (SDS-PAGE) sin ningún tipo de tinción como una banda de 65 kDa de tamaño (Figura 17A). Asimismo, la tinción con azul de Coomassie reflejó la abundancia de la proteína en el extracto mientras que la excitación con luz ultravioleta (UV) también permitió visualizar claramente la proteína sobreexpresada (Figura 17A).

La RFP expresada en *C. albicans* tiende a generar dímeros al igual que dTomato (Shaner *et al.*, 2004). Esto se pudo confirmar sometiendo las muestras a un tratamiento a alta temperatura (99 °C durante 5 minutos) previamente a la separación electroforética. Dicho procedimiento disocia y desnaturiza el dímero, apareciendo una banda de igual intensidad con un tamaño aparente de  $\approx$  30 kDa. Este tratamiento adicional suprime la

fluorescencia (no mostrado) mientras que el uso de condiciones desnaturizantes convencionales (adición de tampón de carga conteniendo DTT 0,1 M y SDS 0,1 %, pero sin hervir) no parece alterar la señal (Figura 17B).



**Figura 17. Propiedades electroforéticas de RFP expresada en *C. albicans*.**

La figura A muestra la detección de <sup>Ca</sup>RFP en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (10% poliacrilamida) de extractos de la cepa CAF2-<sup>Ca</sup>RFP<sup>IND</sup> crecida durante 24 horas en presencia (+Dox, -Dox) de doxiciclina (10 µg/mL) en medio SD. La detección es posible tanto de forma directa (panel de la izquierda), por tinción con azul de Coomassie (panel central) o usando irradiación con luz ultravioleta (panel derecho). En la figura B se compara la migración electroforética de las muestras hervidas (99°C, 5 minutos) y sin hervir (-) de las cepas CAF2 y CAF2-<sup>Ca</sup>RFP<sup>IND</sup>, tanto sin tinción (panel de la izquierda) como teñidas con azul de Coomassie (panel de la derecha).

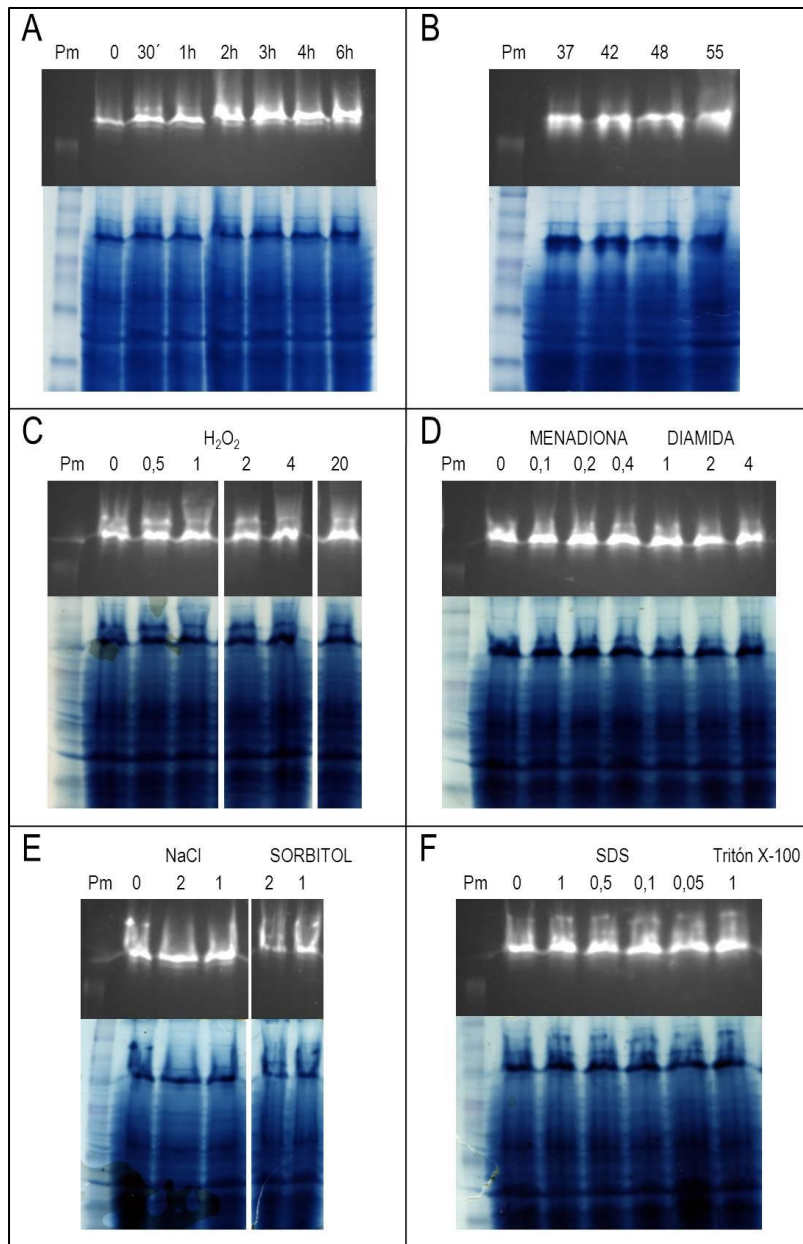
### b.3. Estudio de estabilidad de RFP en extractos proteicos

Previamente a la utilización de <sup>Ca</sup>RFP como gen reportero en diversos experimentos, nos pareció interesante determinar su estabilidad como proteína y como fluorocromo a la temperatura, a los detergentes y a proteasas endógenas. Por otro lado, numerosos

ensayos que realizamos en nuestro grupo de investigación implican la adición de compuestos que generan un estrés, ya sea de tipo osmótico u oxidativo. Por ello, y debido a su potencial capacidad de alterar la proteína y/o el fluorocromo se decidió incluir dichos compuestos en estos estudios de estabilidad.

Se sometió a distintas condiciones experimentales un extracto proteico conteniendo RFP obtenido a partir de células en idénticas condiciones a las indicadas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18, donde se compara la señal de fluorescencia de cada extracto con el correspondiente control si tratar. El mantenimiento del extracto a 37 °C hasta 6 horas en ausencia de inhibidor de proteasas (IP) no implicó una disminución apreciable de la señal de fluorescencia (Figura 18A). Igualmente, temperaturas entre 37 y 55 °C durante 15 minutos tampoco parecieron alterar la estructura de la proteína ni sus propiedades como fluorocromo (Figura 18B). En el resto de tratamientos se utilizó un tiempo y una temperatura fija, 1 hora a 37 °C. La adición de oxidantes (como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona y diamida) no modificó de forma notable la señal en el rango de concentraciones utilizados (de 1 a 4 mM para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de 0,1 a 0,4 mM para la menadiona y de 1 a 4 mM para la diamida) (Figura 18C y D). Sin embargo, el tratamiento con sorbitol (1 y 2 M) sí pareció afectar ligeramente la estabilidad de la RFP. Este hecho no fue, por el contrario observado utilizando cloruro sódico a 1 ó 2 M (Figura 18E). El tratamiento con detergentes iónicos y neutros (como SDS o Tritón X-100) no pareció influir tampoco de forma significativa en la señal de fluorescencia (Figura 18F).

Estos datos indican la alta estabilidad de <sup>Ca</sup>RFP en diferentes condiciones experimentales.



**Figura 18. Estabilidad de CaRFP en extractos proteicos.**

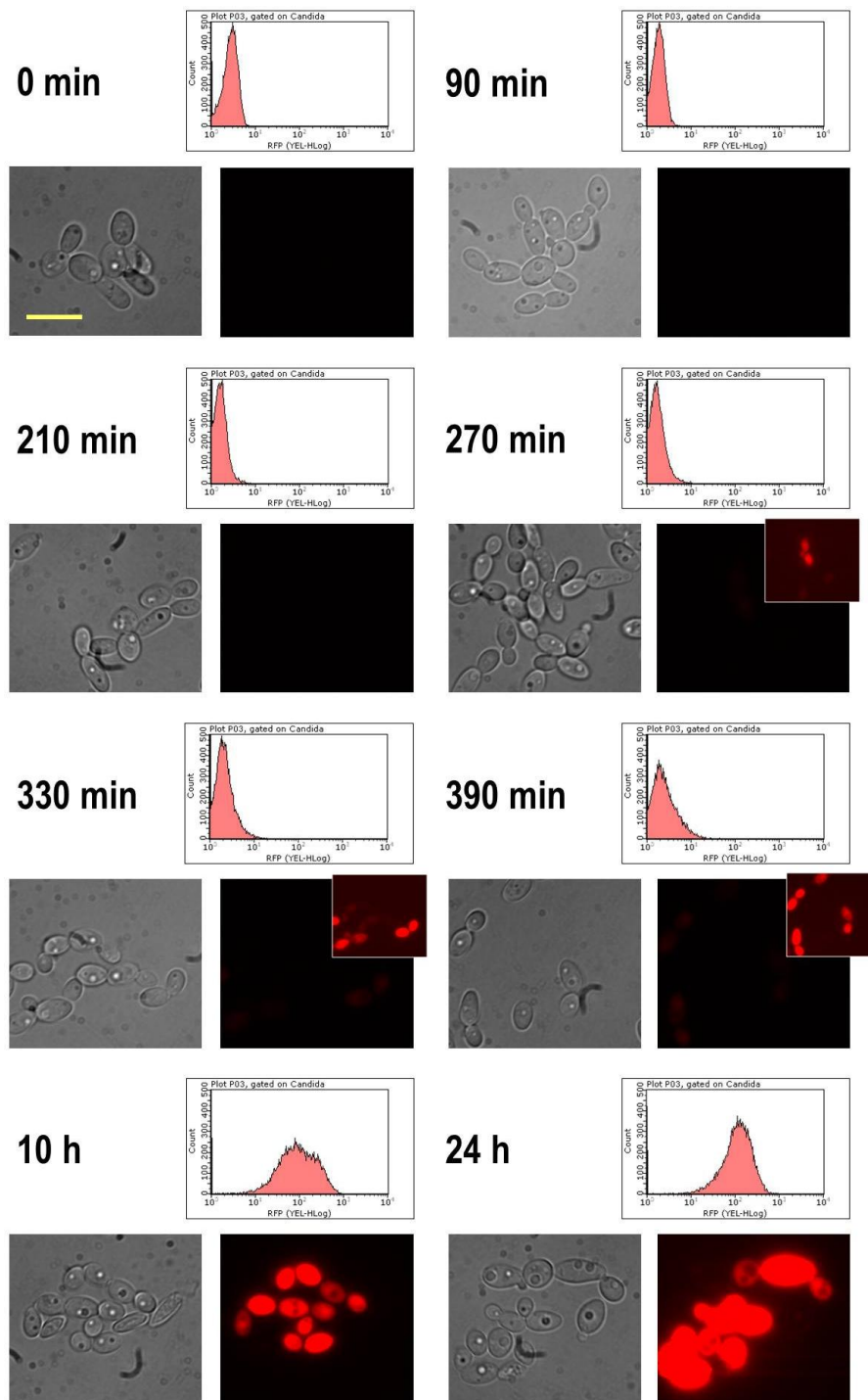
Efecto sobre la estabilidad de CaRFP de distintos agentes. La imagen superior indica la detección de RFP al ser excitada con UV, mientras que la inferior corresponde a la tinción con Azul de Coomassie del mismo gel. Los números sobre las imágenes indican el tiempo de incubación en minutos (') u horas (h) (A), la temperatura en grados centígrados (B) o la concentración del agente utilizado en escala milimolar (mM) (C y D), molar (M) (E) o en porcentaje (p/v) (F). Todas las muestras fueron mezcladas con tampón de carga 2X tras el tratamiento y previa su incorporación al gel (ver Materiales y Métodos 4.B).

#### **b.4. Dependencia de promotores regulados por doxiciclina**

Al igual que con la GFP, se decidió determinar la dependencia temporal y la concentración de antibiótico que permitiera una visualización de esta fluorescencia.

##### i Cinética de inducción y represión de la expresión de $CaRFP$

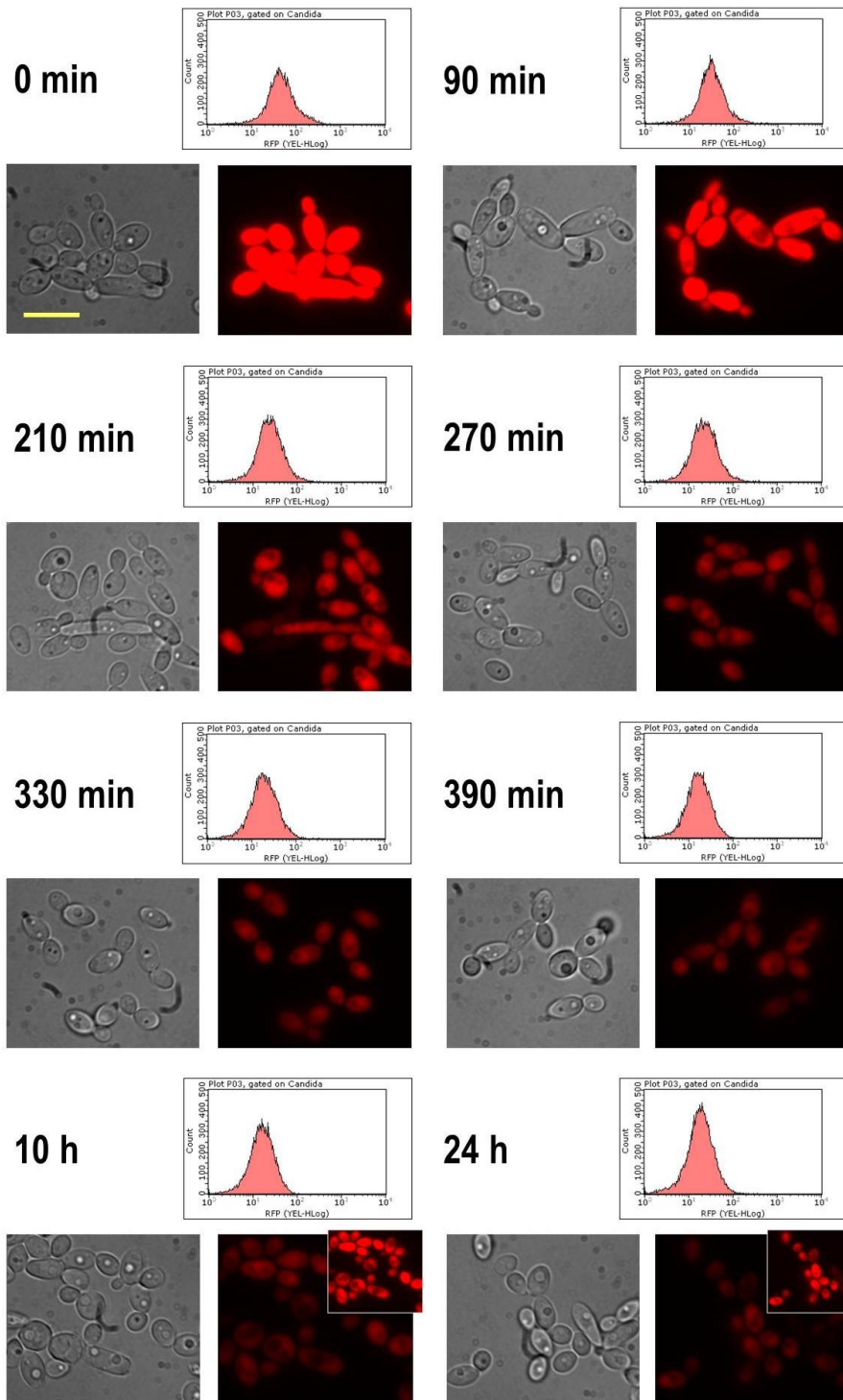
Como se aprecia en la Figura 19, la fluorescencia en la cepa CAF2- $CaRFP^{IND}$  es detectable por microscopía aproximadamente entre los 330 y 390 minutos, siendo óptima a las 10 horas, momento en el que ya se detecta también por FACS. El retardo en la detección respecto de la GFP (entre 60 y 120 minutos) pudiera deberse al tiempo que precisa el fluorocromo para su maduración, aproximadamente 1 hora más que en el caso de GFP (Shaner *et al.*, 2004).



**Figura 19. Cinética de inducción de la expresión de  $\text{CaRFP}$ .**

Detección de RFP correspondiente a la cepa CAF2- $\text{CaRFP}^{\text{IND}}$  creciendo en fase exponencial en medio líquido SD a 37 °C. Las imágenes y los perfiles de citometría se obtuvieron a los tiempos indicados tras la adición de doxiciclina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El cuadro izquierdo de cada tiempo corresponde a microscopía óptica y el derecho a microscopía de fluorescencia roja. Los cuadros pequeños implican un mayor nivel de luminosidad de la misma imagen a la que acompaña al objeto de apreciar el comienzo de aparición de señal fluorescente. Todas las fotos fueron tomadas utilizando el mismo nivel de exposición al objeto de hacer comparable la señal detectada. La barra amarilla corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

La cinética de represión de la expresión de la proteína roja en la cepa  $CaCAF2-RFP^{REP}$  se realizó, igualmente, para determinar los tiempos en los que se mantiene detectable tras inhibir su expresión. La detección por microscopía deja de ser buena a partir de 330 minutos de represión aproximadamente, aunque es perceptible hasta las 24 horas debido, probablemente, a la estabilidad de esta proteína.

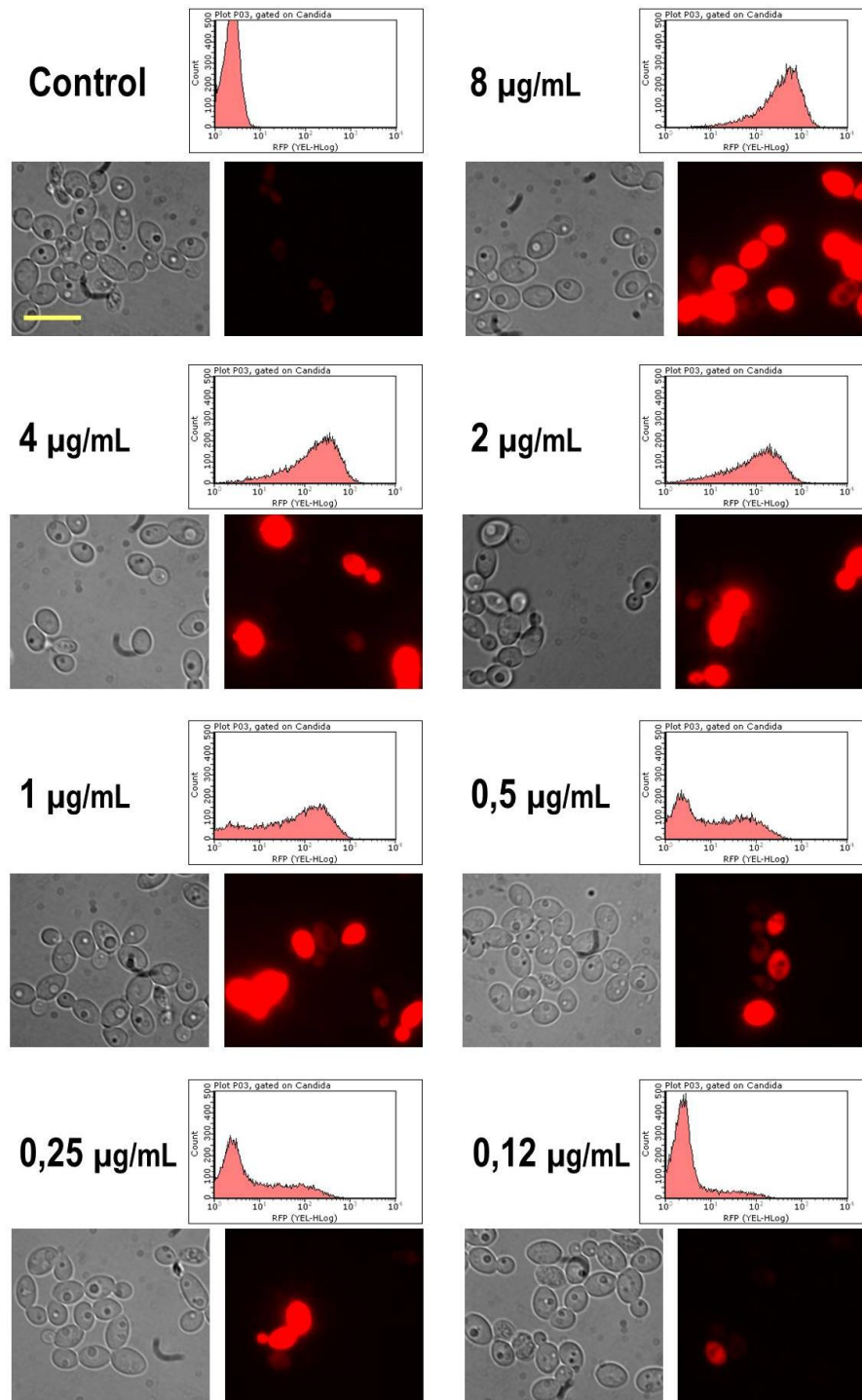


**Figura 20. Cinética de represión de la expresión de  $CaRFP$ .**

Detección de RFP correspondiente a la cepa CAF2- $CaRFP^{REP}$  creciendo en fase exponencial en medio líquido SD a 37 °C. Las imágenes y los perfiles de citometría se obtuvieron a los tiempos indicados tras la adición de doxiciclina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El cuadro izquierdo de cada tiempo corresponde a microscopía óptica y el derecho a microscopía de fluorescencia roja. Los cuadros pequeños corresponden a un mayor nivel de luminosidad de la misma imagen a la que acompañan, siendo dicho ajuste idéntico al aplicado en los cuadros pequeños de las Figura 10 y Figura 11 (cinéticas de GFP). Todas las fotos fueron tomadas utilizando el mismo nivel de exposición al objeto de hacer comparable la señal detectada. La barra amarilla corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

**ii Expresión de  $CaRFP$  a concentraciones limitantes de doxiciclina**

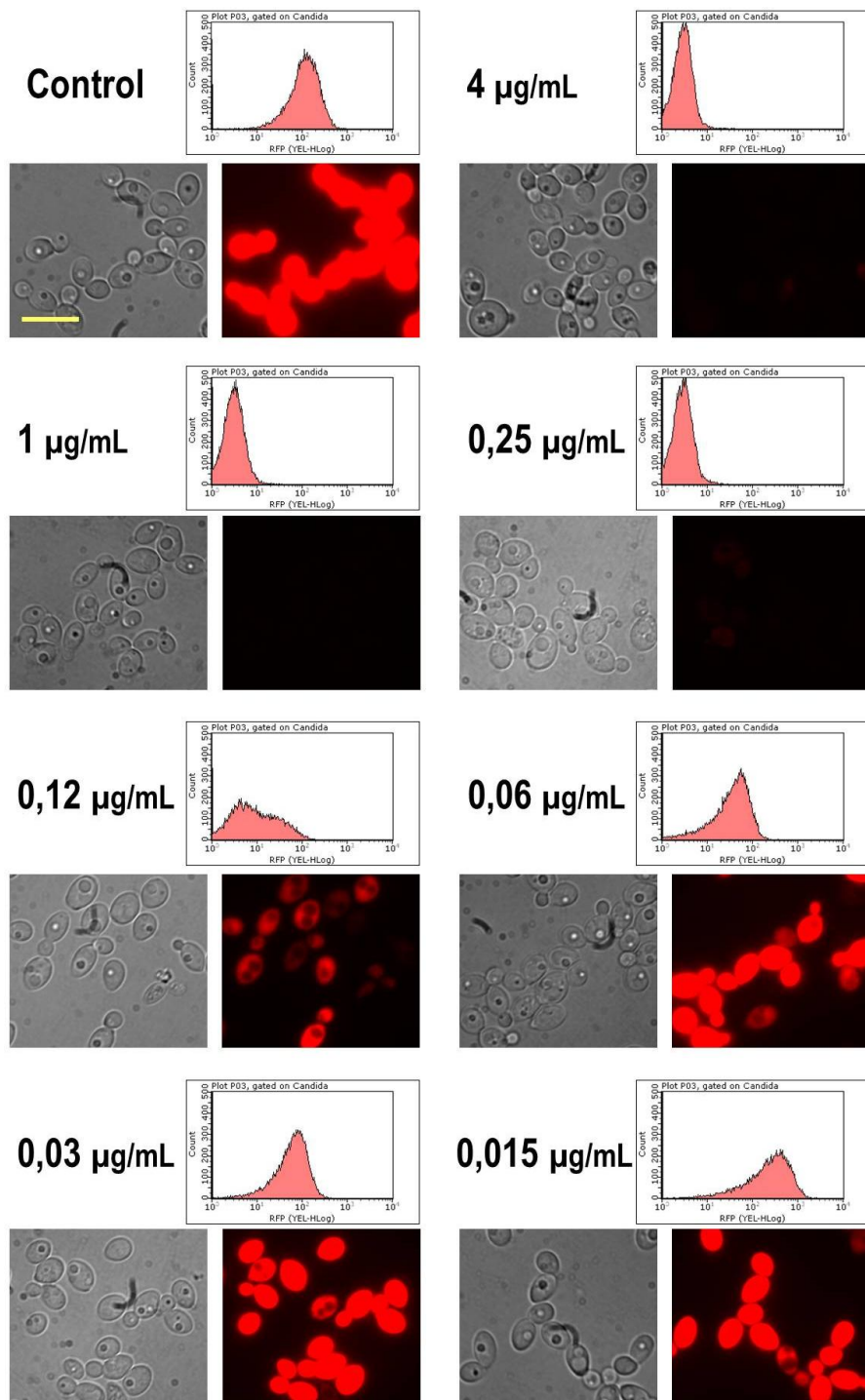
Con el propósito de estimar el rango de concentraciones de doxiciclina que inducen una expresión detectable de  $CaRFP$ , se realizó la inducción con distintas concentraciones del antibiótico a un tiempo fijo establecido empleando la cepa CAF2- $CaRFP^{IND}$ . Como muestra la Figura 21, la detección es óptima sólo a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concentración a la cual se obtiene una alta expresión en toda la población. Tanto por citometría de flujo como por microscopía se aprecia la existencia de una parte de la población deficiente en su nivel de expresión (intensidad  $< 10^2$ ) con concentraciones de doxiciclina por debajo de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 21. Inducción de la expresión de  $CaRFP$  a diferentes concentraciones de doxiciclina.**

Detección de RFP en la cepa CAF2- $CaRFP^{IND}$  creciendo durante 24 horas en medio líquido SD a 37 °C, en presencia de distintas concentraciones de doxiciclina (indicadas sobre las imágenes) o en ausencia del compuesto (control). Se realizaron diluciones seriadas del antibiótico en medio de cultivo, inoculándose todas ellas a densidad óptica de 0,01 a partir de un cultivo crecido durante 24 horas previas sin presencia de doxiciclina. Las imágenes se obtuvieron por microscopía óptica y de fluorescencia (canal rojo) y los histogramas mediante citometría de flujo. La barra amarilla corresponde a 10  $\mu$ m.

De forma similar, se efectuó el tratamiento con distintas concentraciones de doxiciclina de la cepa CAF2- $\text{CaRFP}^{\text{REP}}$  con el objetivo de determinar las concentraciones del represor que impiden una expresión detectable. Como se muestra en la Figura 22, la detección deja de ser óptima en presencia de 0,12  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina, concentración a la cual ya se aprecia, por citometría de flujo, células en las que no se llega a detectar la RFP.

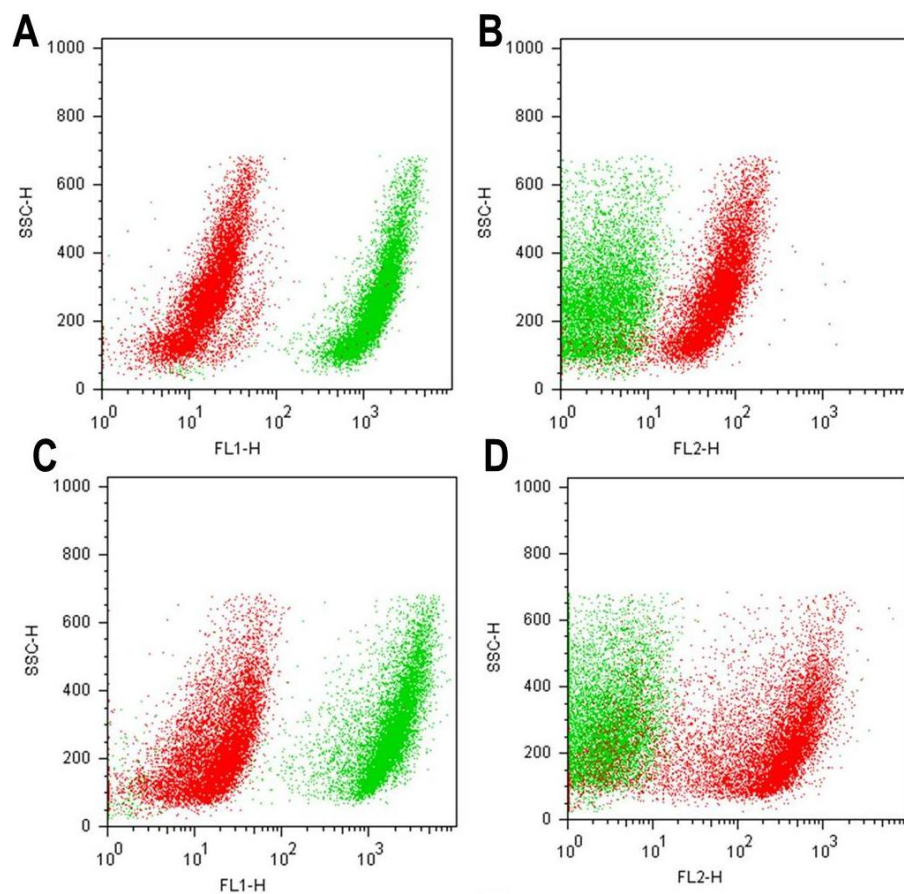


### Figura 22. Represión de la expresión de CaRFP a concentraciones limitantes de doxiciclina.

Detección de RFP en la cepa CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> tras crecer durante 24 horas en medio líquido SD a 37 °C en presencia de distintas concentraciones de doxiciclina (indicadas sobre las imágenes) o en ausencia del compuesto (control). Se realizaron diluciones seriadas del antibiótico en medio de cultivo, inoculándose todas ellas a densidad óptica de 0,01 a partir de un cultivo crecido durante 24 horas previas sin presencia de doxiciclina. Las imágenes se obtuvieron por microscopía óptica y de fluorescencia (canal rojo) y los histogramas mediante citometría de flujo. La barra amarilla corresponde a 10 μm.

#### b.5. Detección en medio líquido

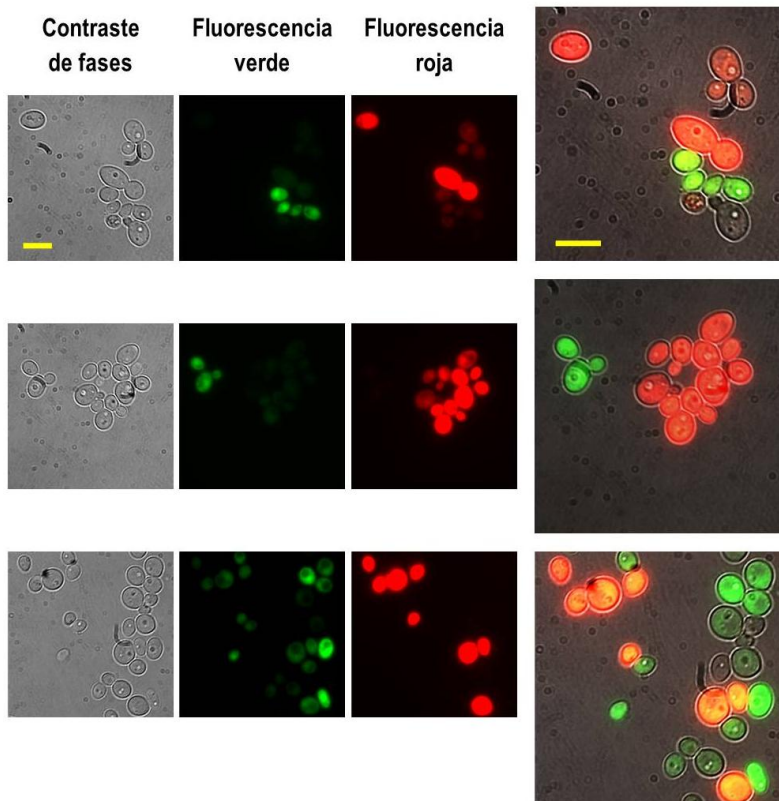
Una de las cualidades más interesantes para nosotros de la proteína fluorescente roja radica en su posible utilización conjunta con la GFP utilizando un marcaje dual en base a su rango espectral. Para evaluar esta posibilidad, se mezclaron células procedentes de las cepas CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> y se analizaron por citometría de flujo. Se pudieron diferenciar perfectamente ambas poblaciones, tanto en un cultivo de blastosporas (Figura 23A y B) como en crecimiento en condiciones de filamentación (Figura 23C y D).



### Figura 23. Detección conjunta de GFP y RFP por citometría de flujo.

Los gráficos muestran la detección por citometría de flujo de las cepas CAF2-GFP<sup>REP</sup> y CAF2-RFP<sup>REP</sup> tras 24 horas de crecimiento a 37 °C en medio SD. Las gráficas A y B corresponden a cultivos con células levaduriformes como morfología predominante, mientras que en los paneles C y D se analizaron formas hifales obtenidas tras crecimiento en suero 20% (v/v) en medio SD de cultivo analizándose tras 24 horas. En estos diagramas se representa la complejidad celular (SSC-H) en escala lineal frente a fluorescencia verde (FL1-H, paneles A y C) o roja (FL2-H, paneles B y D) en escala logarítmica (como es habitual en este tipo de estudios). Las poblaciones fueron seleccionadas en base a su fluorescencia y se representan con el color correspondiente (verde para GFP y rojo para RFP).

Por otro lado, se visualizaron conjuntamente por microscopía de fluorescencia las dos cepas anteriores. Como puede observarse, se pudieron distinguir perfectamente las levaduras marcadas con <sup>Mo</sup>GFP de las marcadas con <sup>Ca</sup>RFP (Figura 24).



**Figura 24. Visualización microscópica conjunta de dos cepas de *C. albicans* expresando GFP y RFP.**

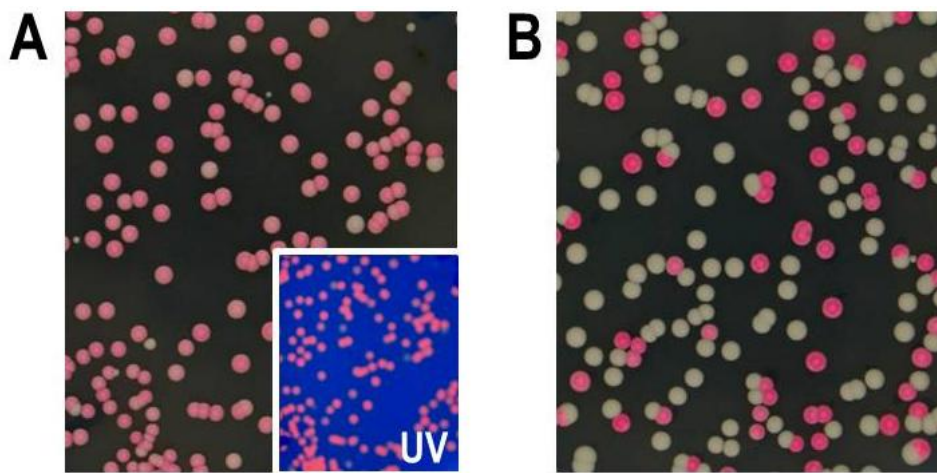
Se muestran tres muestras representativas de la detección conjunta de fluorescencia verde y roja en mezclas de las cepas CAF2-<sup>Mo</sup>GFP<sup>REP</sup> y CAF2-<sup>Ca</sup>RFP<sup>REP</sup>. La primera columna corresponde a microscopía óptica, mientras que las dos siguientes corresponden a microscopía de fluorescencia aplicando en cada una filtros diferentes (verde y rojo). La columna de la derecha representa la combinación de las tres imágenes anteriores. La banda amarilla corresponde a 10  $\mu$ m.

#### b.6. Detección de colonias individuales en medio sólido

La detección macroscópica de <sup>Ca</sup>RFP en medio sólido (Figura 15C) nos posibilita utilizar este gen informador para seguir la evolución de nuestra cepa en una muestra biológica obtenidas *in vivo* de ratón (de forma similar a lo indicado en el apartado 1.A.a). Confirmamos, en primer lugar, la facilidad identificación del marcador en colonias aisladas,

detectándose perfectamente la pigmentación rosácea, tanto a la luz visible (directa) como al irradiar con luz UV (Figura 25, izquierda).

Este hecho posibilitaba diferenciar colonias individuales en placa de dos cepas de *C. albicans* marcadas con distintas proteínas fluorescentes. De hecho, al sembrar conjuntamente las cepas CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> se pudo distinguir perfectamente, a simple vista, las CFUs correspondientes a cada cepa en función de la coloración (Figura 25 derecha). Estos resultados fueron validados mediante el estudio de colonias individuales por citometría de flujo.



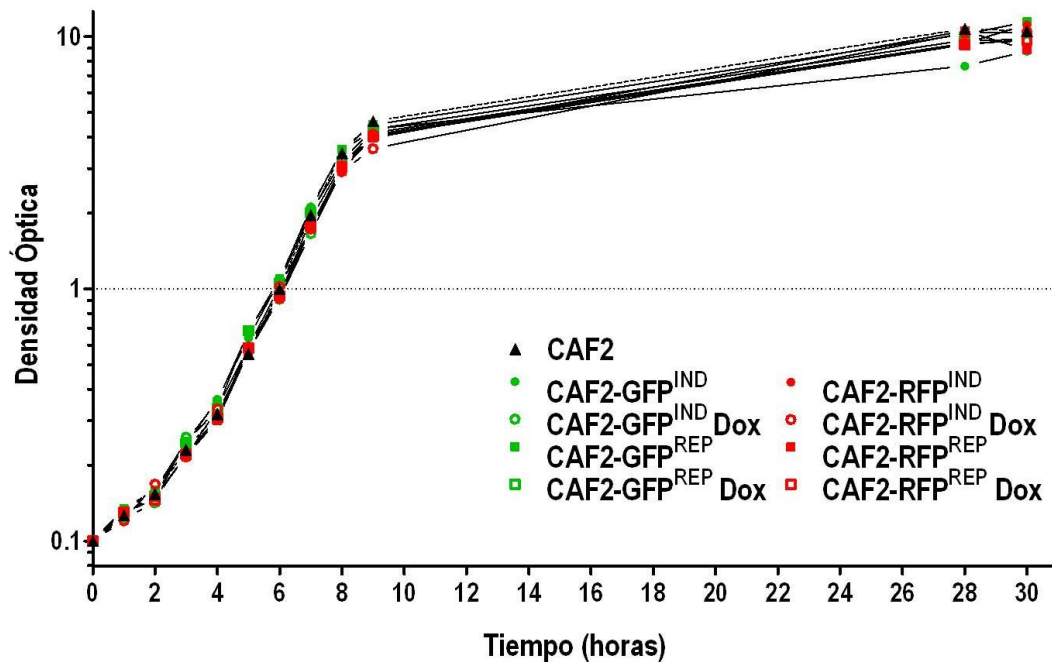
**Figura 25. Colonias de *C. albicans* expresando proteínas fluorescentes.**

Las imágenes muestran colonias de un cultivo de la cepa CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> expresando la proteína CaRFP (A) y de una mezcla cultivos de las cepas CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> (B). La imagen A-UV (incluida en A) corresponde a la irradiación con luz UV. Ambas crecieron en medio SD sólido, durante 48 horas, a 37 °C.

### b.7. Crecimiento *in vitro*

De forma adicional, quisimos evaluar si la doxiciclina (en el rango de concentraciones utilizadas para la inducción de las proteínas fluorescentes) o incluso la propia proteína heteróloga alteraban el crecimiento del hongo. Este dato es importante, puesto que como se verá, una de los objetivos y aplicaciones que nos planteábamos era seguir la evolución de una población fúngica en el intestino. La alteración de la tasa de crecimiento podría influir en la capacidad de mantener una tasa reproductiva adecuada. Como se observa en la figura siguiente, la expresión tanto de GFP como de RFP no afectó significativamente a la tasa de crecimiento en fase exponencial (30,8 min<sup>-1</sup> para CAF2, 30,1 min<sup>-1</sup> para CAF2-MoGFP<sup>IND</sup>, 30,5 min<sup>-1</sup> para CAF2-MoGFP<sup>REP</sup>, 29,6 min<sup>-1</sup> para CAF2-CaRFP<sup>IND</sup> y 29,9 min<sup>-1</sup> para CAF2-CaRFP<sup>REP</sup>). Tampoco se modificó la densidad óptica final alcanzada por

las cepas tras un crecimiento o/n (en todos los casos en el rango de D.O. de 8,5-10,5, Figura 26)



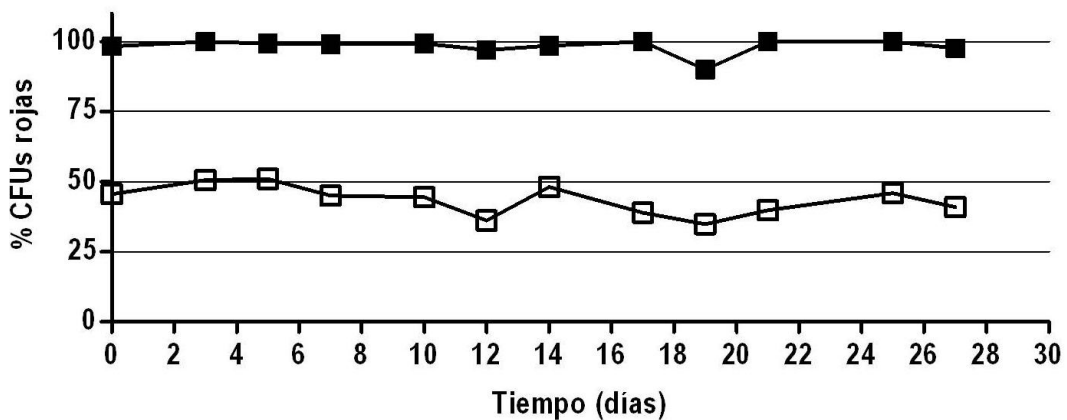
**Figura 26. Curvas de crecimiento de cepas de *C. albicans* portando diferentes construcciones genéticas que expresan GFP y RFP.**

Se representa el valor de densidad óptica obtenido a distintos tiempos. Se analizó la evolución del crecimiento de distintas cepas derivadas de CAF2, en medio SD a 37 °C a partir de cultivos en fase estacionaria que se refrescaron a una D.O. de 0,1. Las cepas se representan como se describe: silvestre (triángulos negros) y portando distintas construcciones genéticas con GFP (verde) y RFP (rojo) bajo los sistemas inducible (círculos) y reprimible (cuadrados) por doxiciclina. La presencia del antibiótico (Dox, 20 µg/mL) viene representada por símbolos huecos.

Finalmente, y a pesar de la aparente inocuidad de la expresión de los marcadores y de la doxiciclina a corto plazo, realizamos un estudio a largo plazo para poder validar ensayos *in vivo* posteriores de larga duración. De hecho, la relativa inestabilidad genómica del hongo (Selmecki *et al.*, 2005) podría conllevar la expulsión del gen reportero. Por otro lado, la posibilidad de establecer ensayos con dos cepas en competición portando las diferentes proteínas fluorescentes requiere la descartar previamente una pérdida de viabilidad relativa de alguna frente a la otra con el tiempo.

Por ello, se realizaron ensayos *in vitro* empleando un cultivo puro de la cepa CAF2-RFP<sup>REP</sup> y otro mixto con, aproximadamente, la misma proporción de las cepas complementarias CAF2-RFP<sup>REP</sup> y CAF2-GFP<sup>REP</sup>, expresando en todo momento los marcadores correspondientes (versiones reprimibles).

Se comprobó que durante 27 días y 11 crecimientos exponenciales seriados, el marcaje genético con  $CaRFP$  se detectaba en el  $98,3 \pm 2,8\%$  de las unidades formadoras de colonias (CFUs) en el cultivo puro y en una media del  $43,4 \pm 5,3\%$  de las colonias en el cultivo mixto (Figura 27). Ya que los valores obtenidos se acercan notablemente a lo esperado (100% en el cultivo puro, 45,6% de la mezcla inicial en el mixto) tras múltiples generaciones, concluimos que el marcaje es razonablemente estable a largo plazo y que la expresión de una de las proteínas fluorescentes no supone una ventaja o desventaja evolutiva frente a la expresión de la otra en las condiciones ensayadas.



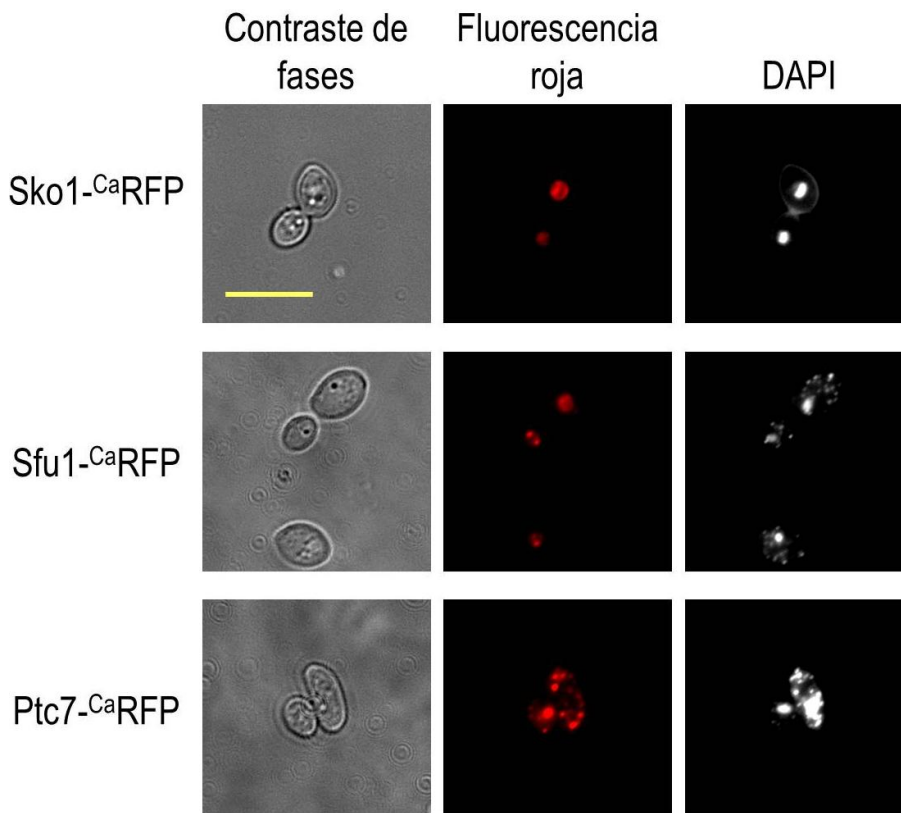
**Figura 27. Evolución de poblaciones *in vitro* de cepas de *C. albicans* expresando distintos genes reporteros fluorescentes.**

En los ensayos de estabilidad y competición *in vitro* a largo plazo se empleó un cultivo puro de la cepa CAF2- $CaRFP^{REP}$  (ensayo de estabilidad, cuadrados negros) y otro mixto de las cepas CAF2- $CaRFP^{REP}$  y CAF2- $MoGFP^{REP}$  (ensayo de competición, cuadrados blancos). Los cultivos, crecidos en medio SD, se analizaron periódicamente por siembra y recuento de CFUs y se reinocularon en medio fresco hasta una D.O. inicial de 0,1 cada 2-3 días hasta un total de 4 semanas aproximadamente. En el recuento de colonias procedentes de muestras del cultivo se considera el pigmento rojo-rosa confirmatorio de la expresión de RFP. La gráfica muestra el porcentaje de CFUs positivas para RFP en relación al total de colonias por placa.

### b.8. Utilidad de la $CaRFP$ en estudios de localización subcelular de proteínas

Un aspecto final al que prestamos atención fue evaluar la utilidad de esta proteína fluorescente para localizar proteínas a nivel subcelular, de forma similar a la GFP y sus variantes en *C. albicans* (Gerami-Nejad *et al.*, 2001). Para ello se escogieron varias proteínas de localización específica en este microorganismo. Por un lado Sko1 es un represor transcripcional implicado en construcción de la pared celular, filamentación y relacionado con la ruta HOG (Alonso-Monge *et al.*, 2010). *SFU1* codifica una proteína represora transcripcional de genes involucrados en la captación de hierro (Lan *et al.*, 2004). Por otro lado, Ptc7 ha sido descrita como una proteína fosfatasa tipo 2C de localización mitocondrial (Jiang *et al.*, 2001).

Se realizaron las construcciones para fusionar los tres ORFs a  $CaRFP$ , como se describe en Materiales y Métodos 4.A.c.2. La tinción con DAPI (10  $\mu\text{g/mL}$ ) permite la detección por fluorescencia azul de estructuras con DNA, ya sea núcleo o mitocondrias. Las proteínas de fusión  $Sko1-CaRFP$  y  $Sfu1-CaRFP$  mostraron una localización condensada dentro de la célula, co-localizando con DAPI (Figura 28), observándose, en ocasiones, dentro del núcleo incluso durante la citocinesis (no mostrado). En el caso de la expresión de  $PTC7-CaRFP$ , la señal fluorescente apareció como numerosas formaciones vesiculares distribuidas por la célula, parcialmente co-localizando con DAPI en estructuras no nucleares, presumiblemente correspondientes a las mitocondrias (Figura 28).



**Figura 28. Localización de proteínas de fusión  $Sko1-RFP$ ,  $Sfu1-RFP$  y  $Ptc7-RFP$ .**

Imágenes de microscopía visible, de fluorescencia en el canal rojo (izquierda) y en el azul (derecha). Se muestra la localización de la proteína de fusión  $Sko1-RFP$  (nuclear),  $Sfu1-RFP$  (nuclear) y  $Ptc7-RFP$  (mitocondrial). En ésta última se ha aumentado la luminosidad de la fluorescencia azul para permitir diferenciar las mitocondrias, mucho más pequeñas que el núcleo. La línea amarilla corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

Estos datos demuestran la utilidad de la  $CaRFP$  como marcador subcelular en *C. albicans*.

## 2. Estudio de la interacción de mutantes de *C. albicans* alterados en pared celular con el hospedador

La mayoría de los mutantes defectivos en señalización vía MAPKs han sido estudiados desde el punto de vista de su importancia en la biología del hongo y, en particular, en su implicación en un modelo de virulencia sistémica en ratón (Román *et al.*, 2007). Nos planteamos caracterizar en mayor profundidad la relevancia de estos elementos estudiando su participación en los distintos estadios de infección, usando diferentes modelos *in vitro* y *ex vivo*. Entre los modelos utilizados en este apartado, incluimos un modelo de adhesión e invasión epitelial (Dieterich *et al.*, 2002), un modelo de interacción con macrófagos residentes en peritoneo de ratón (Murciano *et al.*, 2006) y un modelo de maduración de células madre hematopoyéticas (Yáñez *et al.*, 2011).

### A. Análisis del contenido en $\beta$ -(1,3)-glucano

La pared fúngica se compone principalmente de quitina,  $\beta$ -glucano y proteínas manosiladas, componentes que pueden ser reconocidos en mayor o menor grado por diversos receptores inmunitarios del hospedador (Poulain and Jouault, 2004). La disposición diferencial de estas estructuras en la pared de nuestros mutantes podría implicar una alteración en el reconocimiento y por tanto en la respuesta desencadenada. Nos planteamos estudiar la exposición del  $\beta$ -(1,3)-glucano en la superficie celular, al ser este un componente clave de la respuesta inmunitaria del hospedador (Gantner *et al.*, 2005; Kimberg and Brown, 2008) y ser fácilmente analizable mediante el uso de anticuerpos específicos. Además, con excepción del mutante *cek1* (Galán-Díez *et al.*, 2010), no se ha caracterizado hasta el momento este parámetro en ningún mutante en señalización por MAPKs. Los resultados de este estudio ser recogen en la Figura 29.

Como puede observarse, el mutante *cek1* mostró una exposición aumentada de glucano (población positiva 85 % frente a 57 %; intensidad media de 60 frente a 43), tal y como se había descrito con anterioridad para este mutante. Igualmente, para este mutante, se observa una localización más homogénea y uniforme en la superficie en comparación con la cepa silvestre, en la que la localización se concentra en zonas específicas procedentes de las cicatrices de gemación (Gantner *et al.*, 2005; Galán-Díez *et al.*, 2010).

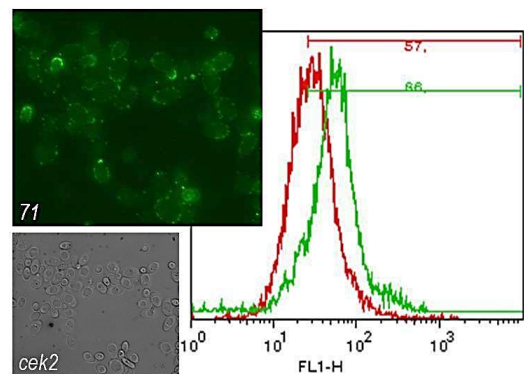
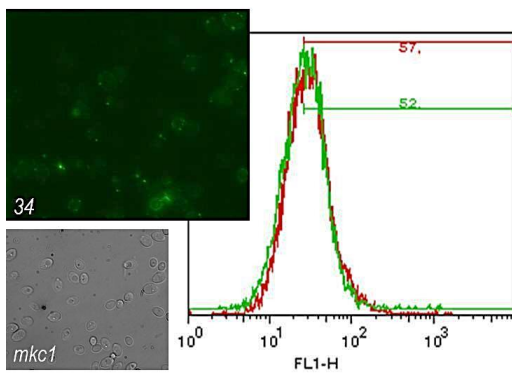
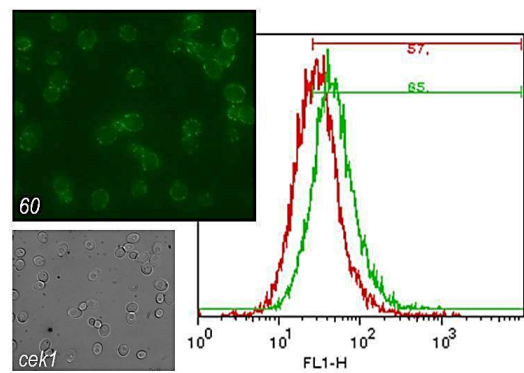
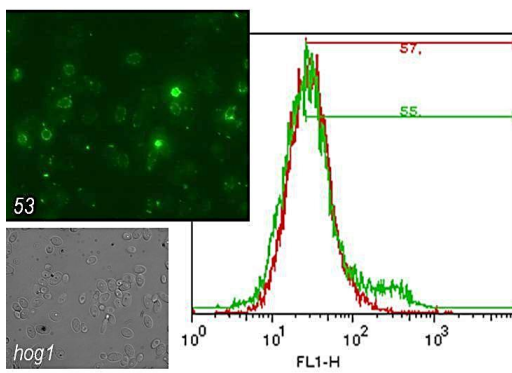
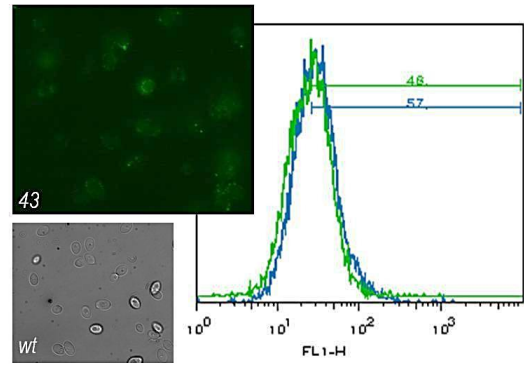
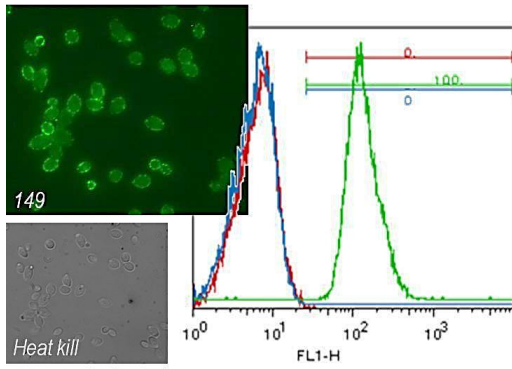
La delección de *HOG1* no condujo a una diferente cantidad de  $\beta$ -(1,3)-glucano expuesto en la levadura desarrollada (parte mayoritaria de la población), aunque sí en algunas yemas y células poco desarrolladas. De hecho, el porcentaje de población positiva se mantiene (55 % en el mutante frente a 57 % en CAF2) aunque la media de intensidad se ve aumentada (53 frente a 43), presumiblemente, por el valor superior de ésta población minoritaria. Curiosamente, el fenotipo de un doble mutante *cek1 hog1* es más acusado que el del mutante sencillo *cek1*, (intensidad media 108 en *cek1 hog1* frente a 60 en *cek1*) con cerca de un 92 % de la población positiva. El fenotipo de localización de la señal de fluorescencia observado es una combinación de los mutantes simples, siendo

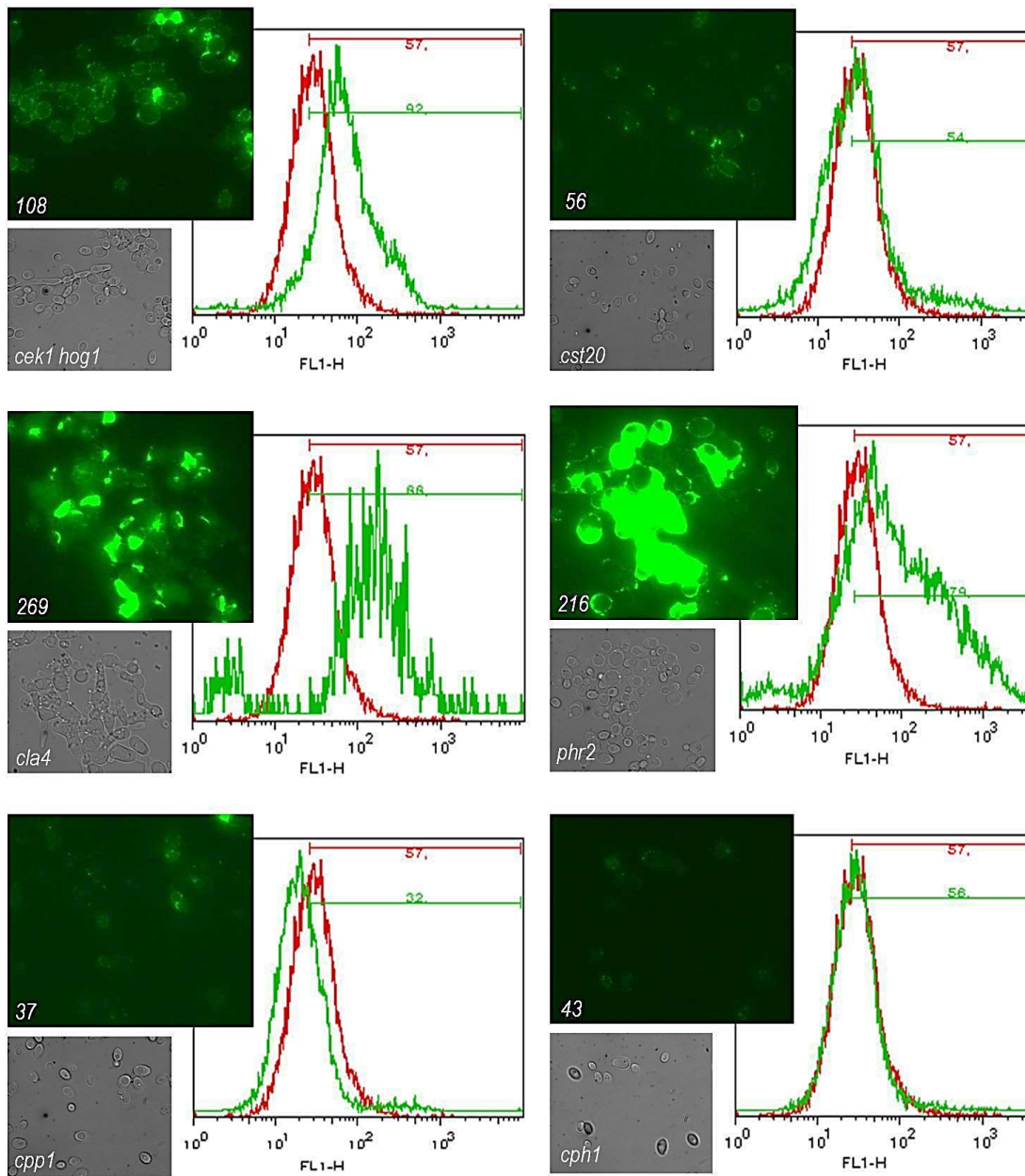
apreciable una alta exposición (repartida homogéneamente en toda la superficie celular) además de regiones de gran intensidad (en yemas y células poco desarrolladas).

El mutante *cek2* muestra también una mayor exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano (intensidad media de fluorescencia de 71 frente a 43) en mayor número de levaduras (86 % de positivas), sin verse diferencias claras en el patrón de localización. Este hecho es interesante, por cuanto hasta el momento no se conoce el papel de esta MAPK en *C. albicans* (aparte de su implicación en la ruta de apareamiento) (Chen *et al.*, 2002). La delección de *MKC1*, sorprendentemente dado el papel de este mutante en la construcción de la pared celular en *C. albicans*, no mostró ningún cambio en la composición o localización de  $\beta$ -(1,3)-glucano en la pared (52 % de positivas e intensidad media de 34).

Estos datos sugieren la implicación de las MAPKs Cek1 y Cek2 en la exposición de glucano en la superficie celular. Consistente con este hecho, la ausencia de Cpp1 (una fosfatasa de Cek1 que inactiva la ruta SVG) (Csank *et al.*, 1998; Schroppel *et al.*, 2000) se traduce en una disminución del glucano detectado (Figura 29, media de intensidad de 37 frente a 43; población positiva 32 frente a 57). La delección de *CPH1* (factor de transcripción dependiente de Cek1) (Köhler and Fink, 1996) o *CST20* (quinasa tipo p21 de la ruta de SVG) (Ushinsky *et al.*, 2002) no parece al modificar la exposición de glucano en la pared fúngica (intensidad 43 y 56 respectivamente, frente a 43; % población positiva 54 y 56 frente a 57).

Finalmente, incluimos en este estudio dos mutantes en los que se observó una exposición muy aumentada de glucano. *Cla4* es una quinasa tipo p21, con homología a *Cst20* (Ushinsky *et al.*, 2002), que se cree podría tener funciones similares en la ruta SVG, mientras que *Phr2* es una proteína de pared con actividad transglicosidasa de glucano, cuya expresión es dependiente del pH externo en la que ya se había descrito una mayor exposición de glucano (Muhlschlegel and Fonzi, 1997; Fonzi, 1999; Wheeler and Fink, 2006). En los mutantes *cla4* y *phr2* se muestra (Figura 29) una muy abundante cantidad de  $\beta$ -(1,3)-glucano expuesto, con unas medias de intensidad (269 y 216, respectivamente) por encima del valor del control positivo tratado con calor (149). Aun cuando la cuantificación del contenido en estos mutantes es dudosa dada la aparición de morfologías aberrantes en la célula en las condiciones ensayadas, la exposición mayoritaria del glucano en el mutante *cla4* parece tener lugar en las yemas incipientes, mientras que en *phr2* está repartido de forma homogénea, como ya se había descrito (Wheeler and Fink, 2006).





**Figura 29. Exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano en la pared de distintos mutantes en señalización.**

La determinación de la exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano se realizó por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos específicos para  $\beta$ -(1,3)-glucano y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488. Se tomaron imágenes de las células por microscopía óptica (recuadro inferior) y de fluorescencia (recuadro superior) y se analizaron las mismas mediante citometría de flujo (histogramas). El número en la esquina inferior izquierda de las imágenes de fluorescencia indica la media de intensidad de fluorescencia obtenida en el canal FL1-H (verde). Los números en los perfiles de citometría indican el porcentaje de población positiva según un baremo establecido a partir de los controles (CAF2). Se representa en rojo en todos los histogramas el perfil de la cepa parenta (CAF2) y en verde el del mutante correspondiente indicado. Los controles del experimento se muestran en el primer panel: levaduras sin tratar (azul), tratadas únicamente con el anticuerpo secundario (rojo) y control positivo de levaduras muertas por calor (verde); la media FL1 H obtenida en los controles negativos (levaduras solas o con secundario solo) fue de 7.

## B. Interacción de mutantes en MAPK con distintos tipos celulares del hospedador

### a) Interacción con células epiteliales: Adhesión e invasión

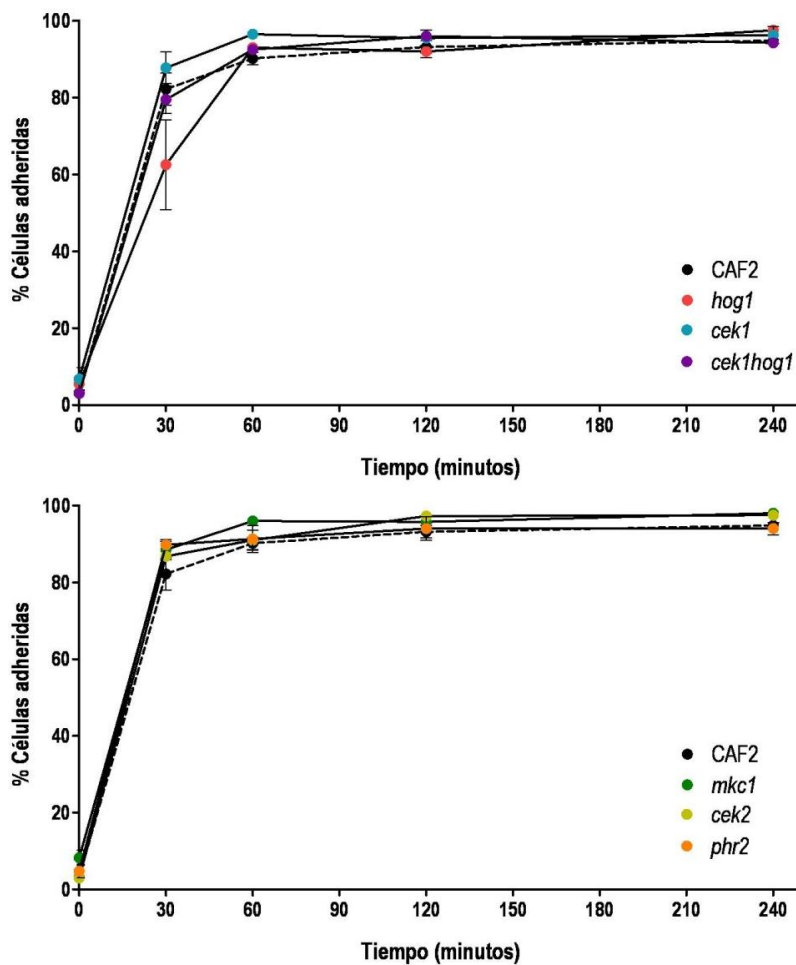
La adhesión a superficies es uno de los factores de virulencia más importantes de *C. albicans*. La contaminación por catéteres sigue hoy siendo una de las principales vías de infección por el hongo en el entorno hospitalario (Edmond *et al.*, 1999; Chandra *et al.*, 2001). El contacto de los microorganismos con las células epiteliales del hospedador es el primer paso para constituir una relación biológica entre ambos, ya sea para el establecimiento del mismo como comensal o para el inicio de la infección.

Dado el papel de las rutas MAPK en morfogénesis y en la construcción de pared celular, nos planteamos estudiar el proceso de adherencia a distintas superficies. En colaboración con el grupo del Dr. S. Rupp (Fraunhofer IGB, Stuttgart, Alemania), nos propusimos estudiar la adhesión *in vitro* de estos mutantes tanto a plástico (poliestireno) como utilizando los modelos epiteliales de adhesión e invasión establecidos y descritos anteriormente en este organismo (Dieterich *et al.*, 2002).

#### a.1. Adhesión a poliestireno

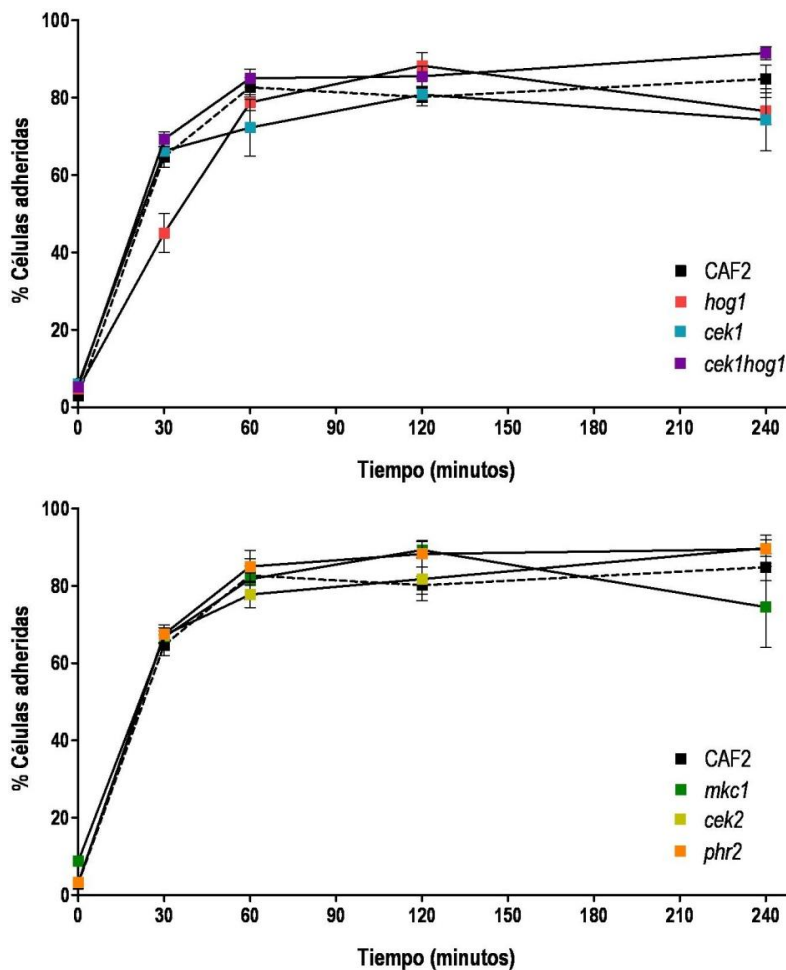
La adhesión al plástico poliestireno se analizó utilizando placas convencionales de cultivo de células de mamífero (ver Materiales y Métodos 3.B.b.1.i). Se analizó la capacidad de adhesión *in vitro* de las cepas de *C. albicans* mutantes en quinasas de tipo MAP (*hog1*, *cek1*, *cek1 hog1*, *mkc1* y *cek2*) y del mutante de transglicosidasa de pared *phr2*.

Los datos obtenidos (Figura 30) indican que, en general, todas las cepas estudiadas se comportaron igual que la parental CAF2, dando valores de adhesión superiores al 80% a partir de los 30 minutos de interacción. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el patrón de adhesión del mutante *hog1* (Figura 30, panel superior). A tiempos cortos (30 minutos) las células adheridas de esta cepa constituyen un  $62,5 \pm 11,7\%$  de media frente a al  $82 \pm 4,2\%$  de media de CAF2 ( $p < 0,05$  en una *t* de Student apareada); los valores a tiempos medios y largos son similares a la parental (85-95%).



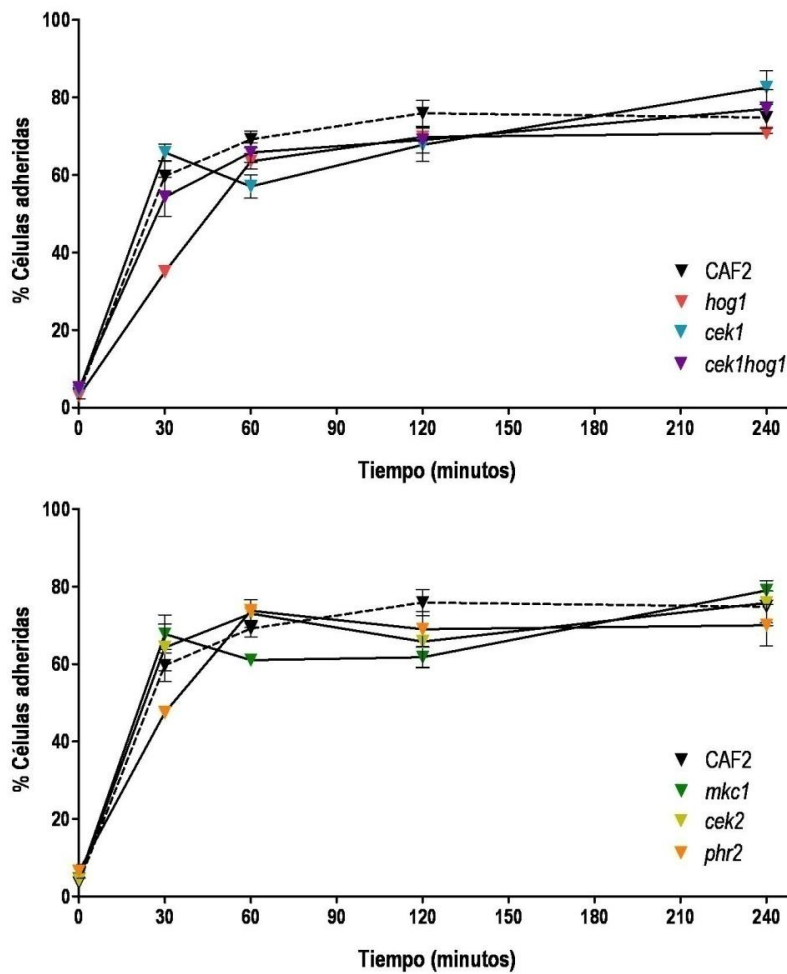
## a.2. Adhesión a epitelio intestinal

Para cuantificar la adhesión al epitelio intestinal, se utilizó la línea celular Caco2 (procedente de epitelio de colon) creciendo en monocapa. En este modelo, la mayoría de cepas ensayadas se comportaron básicamente igual que la silvestre, con adhesiones del orden del 65 % a los 30 minutos y que se mantienen cercanos al 80 % a tiempos más prolongados (Figura 31). De nuevo se observó una deficiencia parcial en la adhesión del mutante *hog1* sólo a tiempos cortos (30 min, Figura 31, panel superior) con una media de células adheridas del  $45 \pm 5$  % significativamente menor a la media de adhesión en la parental del  $64,6 \pm 2,6$  % ( $p < 0,01$  en *t* de Student apareada). De forma similar al caso anterior, los valores de adhesión a tiempos más largos son similares a los observados en el control (alrededor del 80 %).



### a.3. Adhesión a epitelio vulvovaginal

En el modelo de epitelio vulvovaginal, establecido con la línea celular A-431, los mutantes utilizados presentaron una capacidad de adhesión más irregular, proporcionando, en general, valores altos de adhesión (aunque inferiores a los obtenidos en el modelo intestinal). Los porcentajes de adhesión en este modelo obtenidos para los mutantes *mkc1*, *cek1*, *cek2*, *phr2* y *cek1 hog1* no difieren sustancialmente de los de la cepa silvestre CAF2 en el rango de tiempos ensayados (Figura 32). Sin embargo, de forma similar a lo descrito anteriormente, se vuelven a observar las diferencias a tiempos cortos en el mutante *hog1*. A los 30 minutos, este mutante presenta una adhesión del  $35 \pm 1,3$  % frente al  $59,6 \pm 4$  % de la CAF2 ( $p < 0,05$  en *t* de Student apareada) y, de nuevo, a tiempos medios y largos se recobra la adherencia hasta valores del 70-80 % (Figura 32, panel superior).



**Figura 32. Adhesión a células de origen vulvovaginal de distintos mutantes de *C. albicans*.**

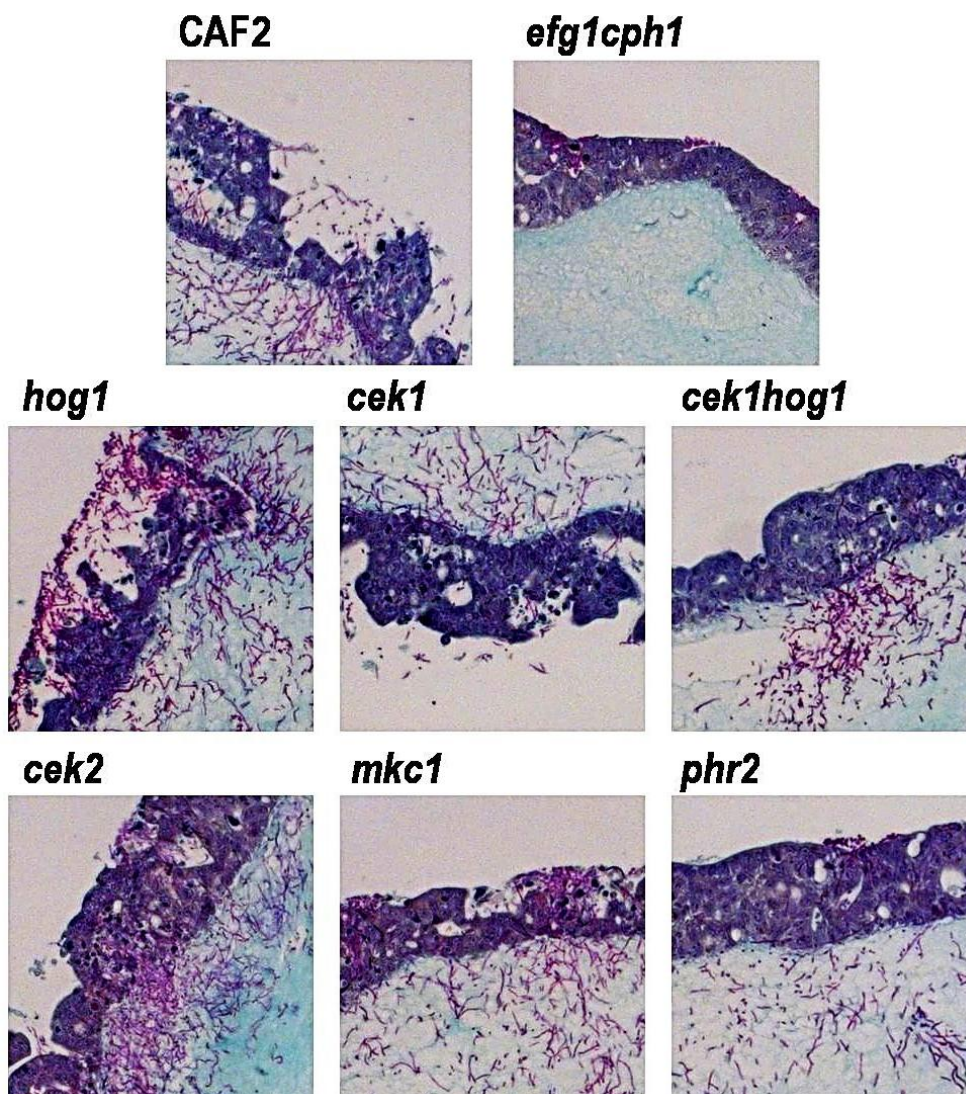
Para la realización del ensayo de adhesión *in vitro* se recogen las levaduras en fase exponencial de crecimiento en YPD, a 30 °C (para evitar filamentación). Una vez cuantificadas se ponen en contacto con la monocapa de células A431, en medio DMEM, a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. La cepa CAF2 se indica en línea discontinua. Las barras indican el error estándar de la media de 2 ó 3 experimentos independientes con dos réplicas por ensayo.

Del conjunto de datos obtenidos en los modelos de adhesión, podemos concluir que la falta de las MAPKs las *Cek1*, *Mkc1* y *Cek2*, así como de la transglicosidasa *Phr2* no afecta, al menos cuantitativamente, a la capacidad de adhesión de las células a células epiteliales. Por el contrario, la delección de *HOG1* se traduce en una disminución de la eficiencia de adhesión a tiempos cortos en diferentes modelos *in vitro*, que se recupera a partir de la hora de contacto; no ocurriendo este suceso ante la ausencia conjunta de *Cek1* y *Hog1*.

#### a.4. Ensayo de invasión

Una vez caracterizada la adhesión *in vitro*, nos planteamos estudiar la capacidad invasiva de dichos mutantes en un modelo tridimensional de epitelio intestinal (Dieterich *et al.*, 2002). Se ensayaron los mutantes de *C. albicans* anteriormente utilizados (*hog1*, *cek1*, *cek1 hog1*, *mkc1*, *cek2* y *phr2*). Se introdujo en este ensayo, como control negativo, el mutante *efg1 cph1* deficiente en dos factores de transcripción que limitan su capacidad de filamentación y que ha sido caracterizado anteriormente por el grupo del Dr. S. Rupp (Dieterich *et al.*, 2002).

Como ya se ha descrito, la capacidad *in vitro* de invadir el epitelio intestinal de mutantes *efg1 cph1* fue claramente defectuosa (observándose una incapacidad del hongo atravesando el epitelio). Por el contrario, ninguno de los mutantes ensayados (*hog1*, *cek1*, *cek1 hog1*, *mkc1* y *cek2*) mostraron una alteración evidente en comparación con la parental CAF2 y la cantidad de células atravesando el epitelio (según inspección visual) fue similar en todos los casos (Figura 33). Tampoco se apreció una diferencia clara en la penetración de las cepas ensayadas al analizar tiempos más cortos (12 horas, datos no mostrados). Estos datos sugieren que las MAPKs no son cruciales en invasión del epitelio en este modelo.



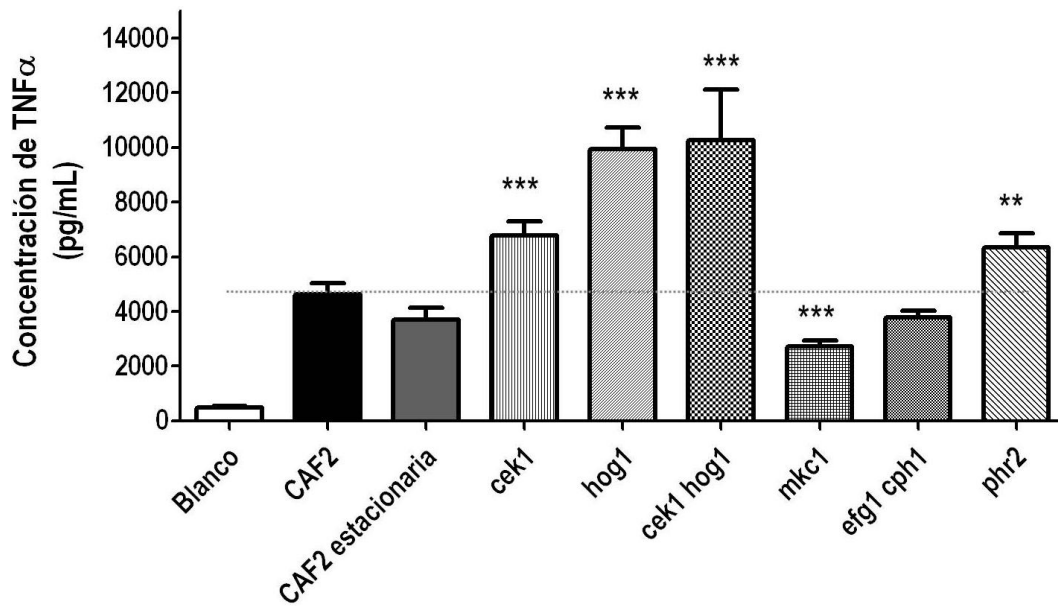
**Figura 33. Capacidad de invasión de distintos mutantes en quinasas tipo MAP.**

Para la realización del ensayo de invasión *in vitro* se recogieron las levaduras en fase exponencial de crecimiento en YPD, a 30 °C. Las células se pusieron en contacto con una monocapa confluyente de la línea celular Caco2 crecida sobre una matriz de colágeno. El contacto se mantuvo durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las muestras se incluyeron en parafina y se cortaron con un criostato como se indica en Materiales y Métodos. Tras la tinción histológica con hematoxilina-eosina, se realizaron fotografías por microscopía a 40X. Se muestran figuras representativas para cada mutante.

**b) Interacción con macrófagos peritoneales: liberación de TNF- $\alpha$** 

Uno de los mecanismos más importantes en la regulación de las células inmunitarias tras el reconocimiento de un patógeno es la liberación de citoquinas. Entre ellas, destacan las de acción proinflamatoria, como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6, producidas rápidamente por fagocitos tras su interacción con *C. albicans* (Presterl *et al.*, 1999). El TNF- $\alpha$  es esencial en el control de las candidiasis y su inhibición favorece el desarrollo de la enfermedad (Steinshamn and Waage, 1992; Netea *et al.*, 1995). Esta citoquina regula el reclutamiento de células fagocíticas, activa el estallido respiratorio e induce la expresión de moléculas coestimuladoras.

Nos planteamos determinar si un reconocimiento diferencial de mutantes en MAPKs podría implicar una diferente producción de citoquinas proinflamatorias y específicamente, de esta citoquina. En colaboración con el grupo de la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Gil (Facultad de Biología, Universidad de Valencia) se estudió el comportamiento *ex vivo* de macrófagos peritoneales residentes de ratón (Murciano *et al.*, 2006) al ser estimulados con distintos mutantes de *C. albicans*. Se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  en el medio de cultivo tras 24 horas de interacción de estos macrófagos con levaduras fijadas de la cepa parental CAF2 y de los mutantes *cek1*, *hog1*, *cek1 hog1*, *mkc1*, *efg1 cph1* y *phr2*.



**Figura 34. Liberación de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneales.**

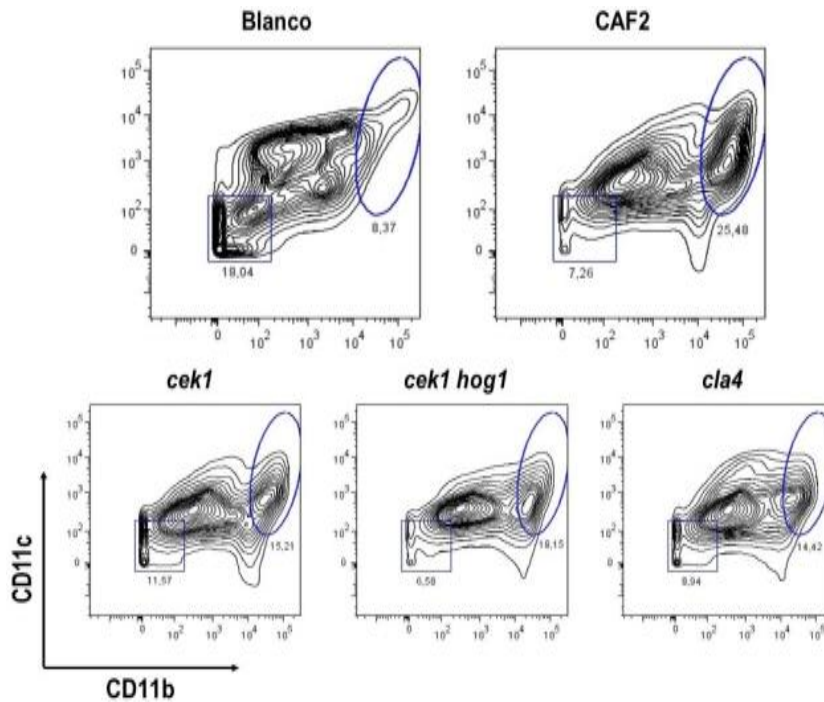
Los macrófagos, obtenidos de ratón, se mantuvieron en cultivo con RPMI+10% FCS. Tras 3 días, se estimuló con levaduras fijadas de los distintos mutantes durante 24 horas, tras las cuales se determinó la concentración de la citoquina TNF- $\alpha$  secretada. Se representa la media y el error estándar de la media de tres replicas biológicas de tres experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Los resultados obtenidos (Figura 34) mostraron diferencias muy significativas en la producción de TNF- $\alpha$  en función de la cepa utilizada en la estimulación. Así, los mutantes *hog1* y *cek1 hog1* provocan una liberación de la citoquina notablemente superior; aproximadamente el doble de la obtenida con la cepa parental (2,2 y 1,9 veces respectivamente). Aunque más leve, también se detectó un aumento significativo al estimular con los mutantes *cek1* y *phr2* de aproximadamente el 50% (1,5 y 1,4 veces respectivamente) en comparación con el control CAF2. Por otro lado, el mutante *mkc1* provocó una reducción significativa de la producción de TNF- $\alpha$  (un 60% del control). Finalmente, ni el doble mutante *efg1 cph1* ni la cepa parental obtenida en fase estacionaria de crecimiento (y no exponencial) provocaron cambios significativos en la liberación de esta citoquina.

### c) Interacción con células madre hematopoyéticas

En los últimos años, un tipo particular de células ha adquirido relevancia respecto al reconocimiento de PAMPs a pesar de que *a priori* se descartaba su interacción directa con microorganismos; éstas son las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC). Experimentos *ex vivo* han demostrado la capacidad de éstas células de reconocer *C. albicans*, induciéndose una diferenciación dependiente de TLR2 y Dectina-1 (Yáñez *et al.*, 2010;2011). De las especies celulares resultantes de esta diferenciación destacan las células dendríticas derivadas de monocito (moDCs) caracterizadas por ser positivas en CD11c, Ly6C y muy positivas en CD11b.

En colaboración con el grupo de la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Gil se analizó la diferenciación de HSPCs, concretamente linaje negativo (Lin<sup>-</sup>), de médula ósea al ser estimuladas con los mutantes de *C. albicans* de interés para nuestro estudio (*cek1*, *hog1*, *cek1 hog1*, *mkc1*, *efg1 cph1*, *phr2* y *cla4*). Los perfiles de diferenciación obtenidos al analizar la presencia de los marcadores CD11b y CD11c mostraron claramente la población de moDCs (que se confirmó eran Ly6C<sup>+</sup>) y se evidenciaron ciertas alteraciones dependiendo del mutante empleado en el estímulo (Figura 35).

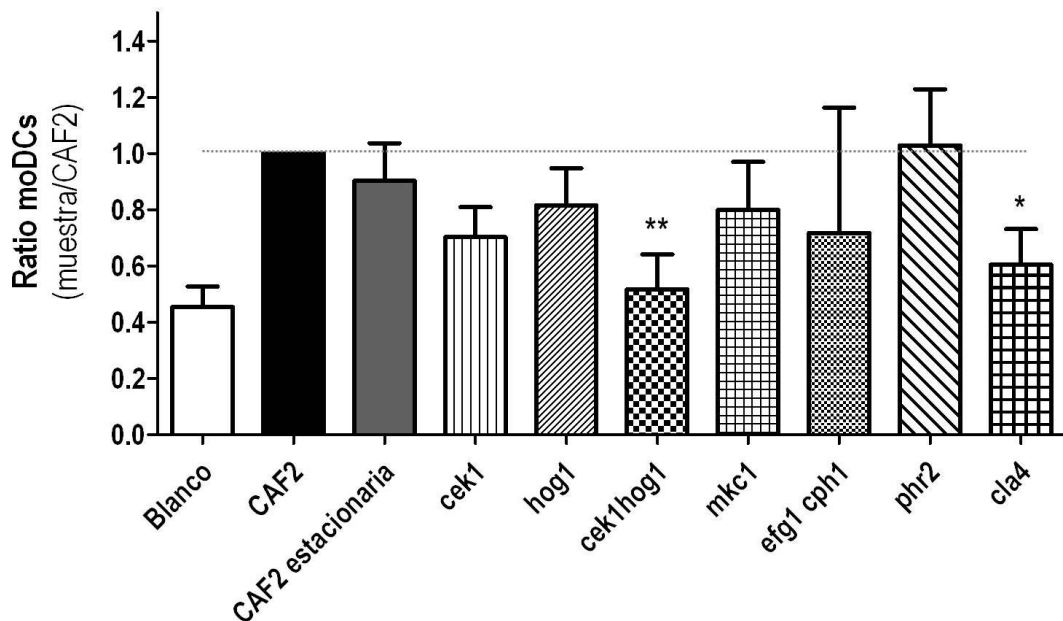


**Figura 35. Análisis de HSPCs estimuladas con distintos mutantes de *C. albicans*.**

Se muestran las poblaciones resultantes de la diferenciación de HSPCs Lin<sup>-</sup> de médula ósea al ser estimuladas con distintos mutantes (rotulado sobre el gráfico) de *C. albicans* durante 7 días. El marcaje de CD11b y CD11c permite identificar la población de moDCs (elipse azul) tal y como está descrito (Yáñez *et al.*, 2011).

Ante la dificultad para cuantificar dichas diferencias se optó por determinar el porcentaje de moDCs generadas frente al total de células y comparar este dato en la parental con el obtenido con los distintos mutantes (Figura 36). La variabilidad al repetir los experimento hace necesario expresar los datos relativos al control (CAF2) incluido en todos los ensayos. Para el análisis estadístico se emplearon tanto estos datos referidos (realizándose un ensayo de tipo ANOVA, *one-way ANOVA*), como los datos absolutos (realizándose la prueba *t* de Student apareada). Ambas comprobaciones arrojaron las mismas conclusiones respecto a las significancia de las diferencias (valor de *p*).

La alteración más relevante se observó en los mutante *cek1*, *cek1 hog1* y *cla4*, mientras que en el resto no se estableció una clara diferenciación del efecto obtenido con la parental (Figura 36). La estimulación con el mutante *cek1* supuso una reducción en el número de moDCs de aproximadamente el  $70 \pm 11$  % de media, con una significancia cercana a lo que se considera estadísticamente significativo ( $p=0,0536$ ). En el caso del mutante *cek1 hog1* se aprecia una mayor disminución bajando de media a un  $52 \pm 12$  % de las moDCs generadas por CAF2 ( $p<0,01$ ). De forma similar, el mutante *cla4* indujo una diferenciación menos eficiente que la parental induciendo de media un  $40 \pm 13$  % menos de moDCs ( $p<0,05$ ).



**Figura 36. Cuantificación de la diferenciación de HSCs a moDCs.**

Se muestran los porcentajes de moDCs obtenidos al estimular HSCs con los distintos mutantes (indicados) respecto al valor del control. Se determinó la población de moDCs según se muestra en la Figura 35 y se calcularon los porcentajes obtenidos en diversos experimentos independientes ( $n=13$  para CAF2 y blanco,  $n=7-9$  para el resto). Se representa la media y el error estándar de la media. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ .

### 3. Colonización de *C. albicans* en un modelo murino *in vivo*

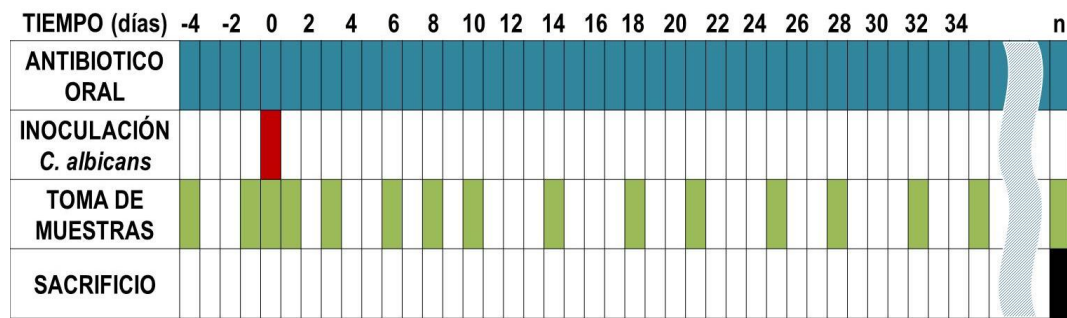
La capacidad de colonizar, esto es de establecerse permanentemente en un nicho apropiado, es un factor esencial en la biología de *C. albicans* y, evidentemente, un paso que condiciona la diseminación posterior en situaciones de inmunodepresión del hospedador (Takesue *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2009). El estudio de esta etapa puede ayudar a discernir dónde, cuándo y por qué se producen los desequilibrios entre los estados comensal y patógeno que llevan al desarrollo de la enfermedad y determinar la importancia de los factores fúngicos implicados.

En contraste con los estudios clásicos de virulencia, que han hecho uso principalmente del modelo de infección sistémica en ratón, un modelo de comensalismo nos acercaría más a las condiciones fisiológicas y/o patológicas en las que transcurre el desarrollo de una candidiasis. Nos planteamos en esta etapa poner a punto y estudiar un modelo de comensalismo como requisito para el estudio del comportamiento de mutantes alterados en señalización en dicho modelo.

#### A. Análisis y optimización del protocolo de colonización

Para estudiar la colonización por *C. albicans* nos basamos en un modelo desarrollado anteriormente en ratones no consanguíneos (Kinneberg *et al.*, 1999) en el cual se determinan los niveles del hongo y bacterias en ciego. Estos autores describieron la necesidad de un tratamiento antibiótico oral previo para permitir la presencia estable de *C. albicans* en este nicho. Nos planteamos evaluar los niveles de colonización y su evolución a lo largo del tiempo, por lo que se decidió hacer un seguimiento de los niveles del hongo en heces frescas, evitando el sacrificio innecesario de animales de experimentación. Por otro lado, y de cara a futuros experimentos, nuestro modelo requería el uso de ratones consanguíneos en los que hay disponible modelos modificados genéticamente (como es el caso de la estirpe silvestre C57BL/6). Así pues, se estableció un protocolo propio de estudio con el que se consiguió seguir la evolución de la permanencia intestinal de *C. albicans* en esta cepa de ratón tras una única inoculación intragástrica del hongo sin recurrir a técnicas invasivas.

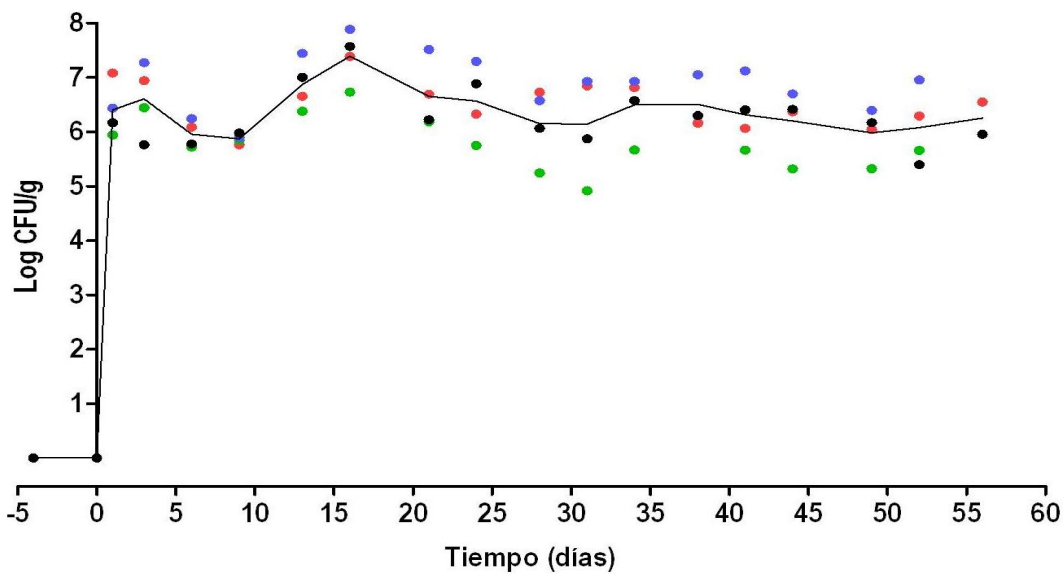
Los ratones fueron tratados rutinariamente (salvo que se indique lo contrario) con una mezcla antibiótica en el agua de bebida esterilizada compuesta por estreptomina 2 mg/mL, bacitracina 1 mg/mL y gentamicina 0,1 mg/mL, desde 4 días previos a la inoculación de *C. albicans*, renovándose cada 3-4 días. Se llevó a cabo una única inoculación de una suspensión de levaduras a  $10^8$  células/mL en un volumen de 100  $\mu$ L con cánula intragástrica, por lo que la dosis administrada es de  $10^7$  levaduras. Se tomaron muestras de heces desde el inicio del experimento (día -4, correspondiente al inicio del tratamiento antibiótico) cada dos o tres días, según se consideró necesario para un adecuado seguimiento del establecimiento del hongo en el sistema digestivo del ratón (Figura 37).



**Figura 37. Esquema del protocolo empleado en estudios de colonización por *C. albicans***

Se muestra el protocolo general de actuación a lo largo de los distintos experimentos. Se mantiene un tratamiento antibiótico en agua de bebida estéril a lo largo del experimento (azul), consistente en estreptomicina 2 µg/mL, bacitracina 1 µg/mL y gentamicina 0,1 µg/mL salvo que se indique lo contrario. En rojo se muestra el momento de la inoculación de  $10^7$  CFUs de *C. albicans*. La toma de muestra fecal (en verde) se hace de forma inmediata a su deposición, anotándose el individuo al que corresponda, de manera que se pueda hacer un seguimiento individual dentro del grupo. En negro se indica el día de sacrificio de los animales y fin del experimento.

La aplicación de este protocolo en la cepa silvestre de interés (CAF2, procedente del aislado clínico SC5314. Ver Materiales y Métodos 1.A) condujo al establecimiento de ésta en niveles altos (media de  $10^6$ - $10^7$  CFUs/gramo de heces) y estables durante un tiempo de hasta dos meses (tiempo máximo de seguimiento, Figura 38). Durante este periodo, no se afectó aparentemente la salud del animal, no detectándose comportamientos anormales, pérdida de peso (evaluada hasta el día 60) u otros signos externos de enfermedad (datos no mostrados). Estos valores son equiparables a los obtenidos durante 20 días con otra cepa silvestre de *C. albicans* (TIMM 0239) usando un protocolo similar al descrito (Tansho *et al.*, 2004).



**Figura 38. Colonización por *C. albicans* de ratones C57/BL6 durante 56 días.**

Se muestran cada uno de los valores de logaritmos de unidades formadoras de colonia correspondientes (CFUs, del inglés Colony Forming Units) de *C. albicans* (CAF2) obtenidas por gramo de heces. Cada color corresponde al valor obtenido por un ratón independiente determinado en el día indicado. La línea negra indica la media del grupo. Se inocularon  $10^7$  levaduras a día 0 por vía intragástrica a un grupo de 4 ratones con tratamiento antibiótico previo (desde día -4).

Nos planteamos analizar, en primer lugar, ciertos parámetros que nos permitieran comprender mejor el proceso de colonización que se establece y poder optimizar las condiciones de acuerdo a las necesidades de cada experimento. En concreto, nos centramos en poner a punto <sup>a)</sup> la detección de *C. albicans* en la muestra fecal <sup>b)</sup> el funcionamiento del sistema de expresión regulado por doxiciclina a nivel intestinal y <sup>c)</sup> la importancia de los tratamientos antibióticos en el establecimiento de una colonización estable que a continuación se describen.

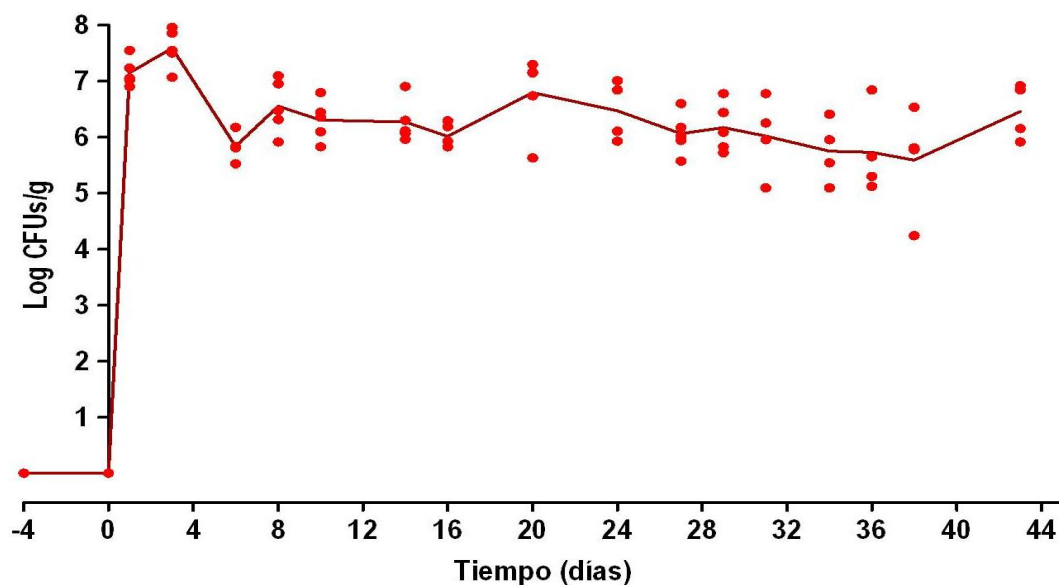
#### a) Detección en la muestra fecal

La primera variable a determinar fue evaluar la capacidad de detección de *C. albicans* de forma eficaz en muestras complejas, como son las heces de ratón. La manera tradicional de seguir el establecimiento de *C. albicans* en tracto gastrointestinal de ratón es el recuento de unidades formadoras de colonia (CFUs) por gramo de heces, que se correlaciona directamente con el nivel de colonización intestinal. Nosotros nos planteamos poner a punto la utilización de citometría de flujo para el recuento y caracterización de la población fúngica colonizadora. Para ello, se optó por utilizar como sistema modelo células de *C. albicans* marcadas genéticamente con <sup>C</sup>aRFP (comentado anteriormente) por <sup>1)</sup> permitir la detección directa, rápida y sencilla en placa en ausencia de ningún tipo de sustrato <sup>2)</sup> permitir la detección directa por técnicas de microscopía de epifluorescencia y/o

citometría de flujo, <sup>3)</sup> la ausencia de efectos perjudiciales para la levadura en condiciones de alta expresión de este marcador (ver Resultados 1.B.b.7) y <sup>4)</sup> la versatilidad que podría ofrecer combinar este marcaje con la  $M^oGFP$  si el experimento lo requiriera.

### a.1. Estabilidad *in vivo* de $CaRFP$ : identificación en muestras fecales por siembra en placa

Con intención de determinar la estabilidad genética del marcador utilizado *in vivo* llevamos a cabo un experimento de colonización utilizando la cepa  $CAF2-CaRFP^{REP}$  que seguimos durante 43 días (Figura 39). Teóricamente, un marcaje genético estable *in vitro* debería, razonablemente, serlo también *in vivo* durante el curso de la colonización.



**Figura 39. Estabilidad genética de la  $CaRFP$  en la cepa  $CAF2-CaRFP^{REP}$  durante la colonización intestinal.**

Se muestran los valores logarítmicos de unidades formadoras de colonia (CFUs, del inglés *Colony Forming Units*) correspondientes a la cepa  $CAF2-CaRFP^{REP}$  obtenidas a distintos tiempos por gramos de heces de un grupo de ratones ( $n=4$ ) inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4) como se indica en el protocolo descrito en la Figura 37.

No se observó la aparición de ninguna colonia blanca (correspondiente a una pérdida del marcador) en ratones colonizados con la cepa  $CAF2-CaRFP^{REP}$ , indicando la alta estabilidad genética de la integración durante el crecimiento en el lumen intestinal (Selmecki *et al.*, 2005). Los resultados mostrados indican, pues, que en el modelo y en las condiciones ensayadas, el marcaje de las células es estable durante el curso de la colonización.

## a.2. Detección directa de *C. albicans* en muestras de heces

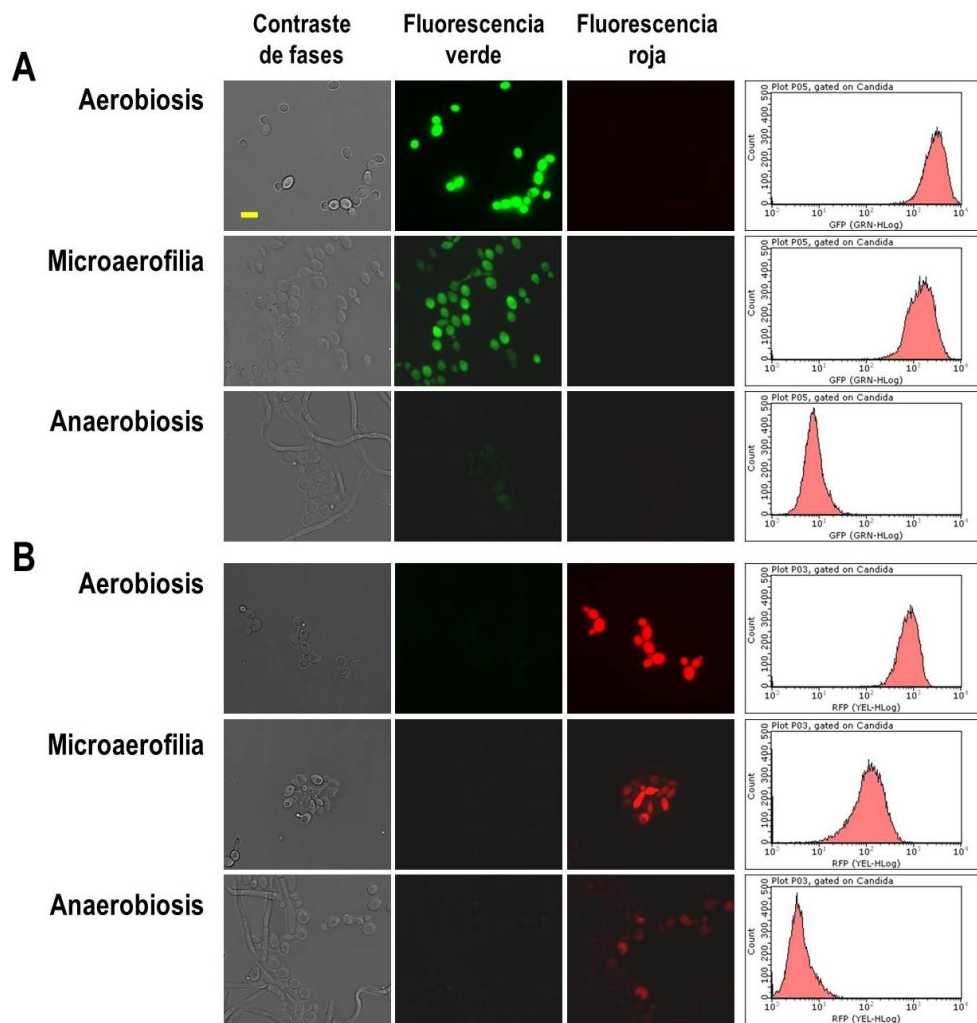
La detección directa de células fúngicas en las muestras fecales sería una herramienta de gran interés, no sólo por permitir obtener un dato cualitativo rápido de la presencia de nuestra cepa problema, sino por la posibilidad de cuantificar directamente la población fúngica sin recurrir a tediosos recuentos de CFUs en placa, bien directamente en el microscopio o mediante citometría de flujo (ver Materiales y Métodos 5.C).

### i Dependencia *in vitro* del oxígeno en los marcadores genéticos usados

Una limitación teórica de esta metodología es la dependencia con el oxígeno que padecen ciertas proteínas fluorescentes en el curso de la maduración del fluoróforo (Zhang *et al.*, 2006; Strack *et al.*, 2010) y la ausencia relativa de éste en el lumen intestinal (He *et al.*, 1999).

Previo a los ensayos *in vivo* se procedió al análisis *in vitro* de cómo este hecho pudiera alterar la detección de los marcadores en el estudio. Para ello, estudiamos la influencia del oxígeno en la detección tanto de <sup>Mo</sup>GFP como <sup>Ca</sup>RFP analizando el grado de fluorescencia de las cepas CAF2-<sup>Mo</sup>GFP<sup>REP</sup> y CAF2-<sup>Ca</sup>RFP<sup>REP</sup> creciendo en distintas condiciones de oxigenación *in vitro*.

Como se muestra en la Figura 40, en condiciones de anaerobiosis (<0,1% de O<sub>2</sub>) no pudimos detectar GFP. En el caso de la RFP no se pudo detectar de forma eficiente, aunque sí se observó una señal muy débil. Por el contrario, en situación de microaerofilia (6,2%-13,2% de O<sub>2</sub>) se generan formas funcionales tanto de la GFP como de la RFP. Finalmente, y como era de esperar, ambas fluorescencias fueron fácilmente detectadas en condiciones de normoxia (Figura 40).

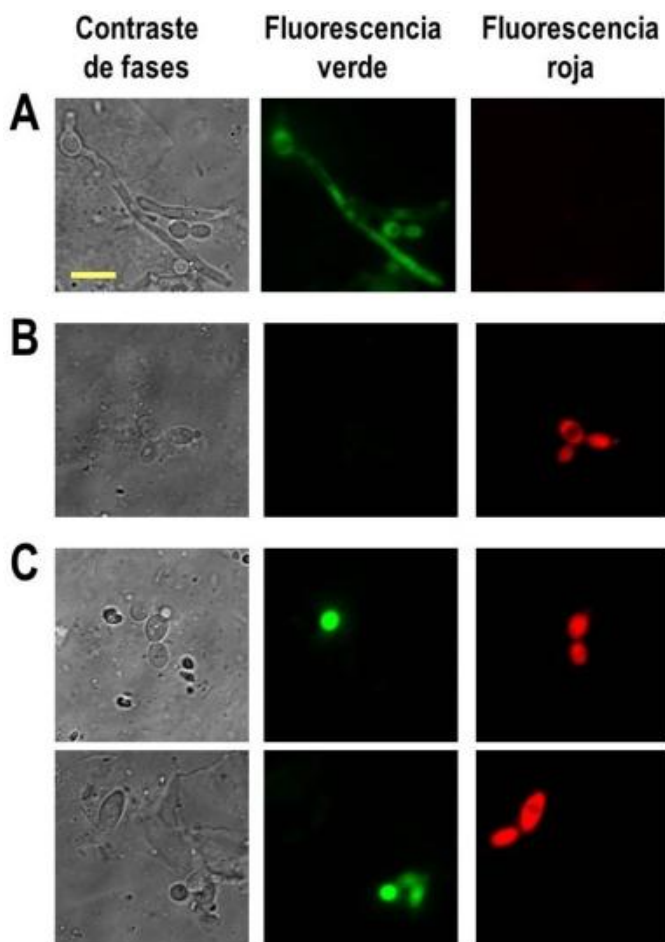


**Figura 40. Detección de proteínas fluorescentes en *C. albicans* con diferentes condiciones de oxigenación.**

Las imágenes corresponden a microscopía óptica (contraste de fases) y de epifluorescencia (verde y roja). Tanto las condiciones de anaerobiosis como las de microaerofilia se obtuvieron por cultivo en medio SD líquido, en una jarra de anaerobios con los sistemas comerciales adecuados, que se detallan en Materiales y Métodos. El cultivo se incubó a 37° C durante 72 horas. En condiciones de normoxia, las células fueron recogidas a las 24 horas de crecimiento en el mismo medio a 37 °C. Panel A: cepa CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> Panel B: a la cepa CAF2-CaRFP<sup>REP</sup>. La línea amarilla corresponde a 10 µm.

## ii Detección de *C. albicans* en heces por microscopía y FACS

Dada la detección positiva en condiciones de microaerofilia, nos dispusimos a comprobar si era posible la detección directa en heces. Ello precisaría, necesariamente, una cierta cantidad de oxígeno en la parte distal del intestino grueso de ratón para detectar la producción de estos marcadores. Por ello, colonizamos un grupo de 4 ratones y analizamos directamente muestras durante varios días directamente de las heces mediante microscopía de fluorescencia.



**Figura 41. Detección por microscopía de *C. albicans* en heces expresando proteínas fluorescentes.**

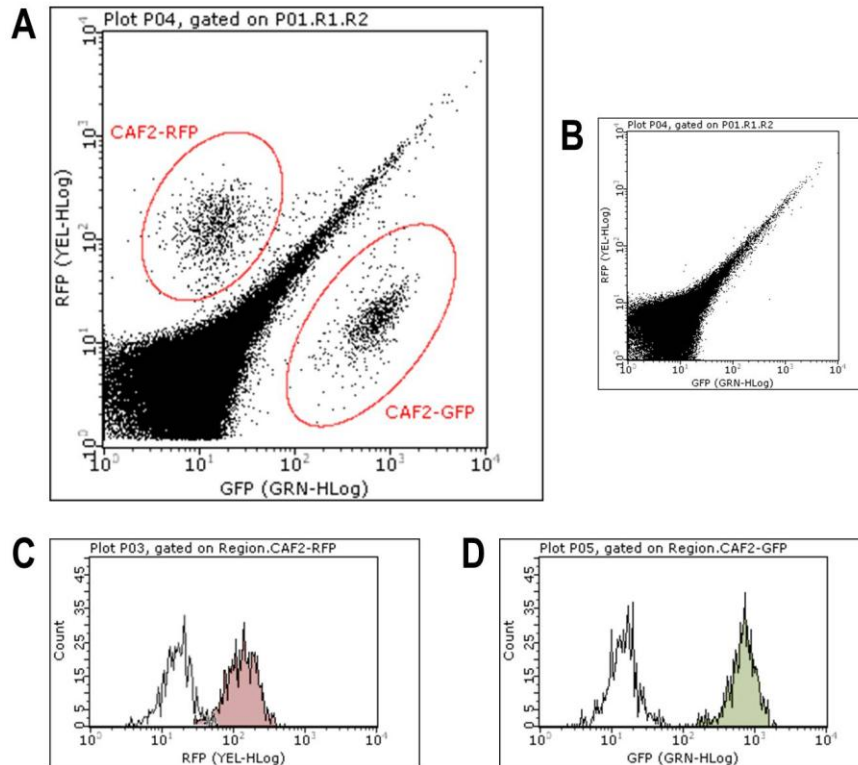
Las imágenes corresponden a homogenizados de heces frescas de ratones con *C. albicans* establecida en el intestino siguiendo el protocolo descrito. Se tomaron fotografías por microscopía óptica (contraste de fases) y de epifluorescencia verde y roja. El panel A corresponde a ratones inoculados con la cepa CAF2-MoGFP<sup>REP</sup>, el panel B a ratones inoculados con la cepa CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> y el C a ratones colonizados con una mezcla de ambas. La banda amarilla corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

Como puede observarse, fue posible detectar las células fúngicas directamente en heces frescas, pudiendo diferenciarse una cepa de otra en función del marcador expresado (Figura 41). La detección es estable durante un tiempo superior a los 30 días, sin que se aprecie una pérdida significativa en la producción de las proteínas fluorescentes (datos no mostrados).

Con intención de determinar si era posible usar la citometría como sistema de detección y recuento de células fúngicas en heces de ratones colonizados, colonizamos establemente un grupo de 4 ratones C57/BL6 con las cepas CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup>. A distintos días tras la colonización tomamos muestras de heces que fueron procesadas como se indica (Materiales y Métodos 7.A.a) y analizadas mediante citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 42A al enfrentar la fluorescencia roja a la fluorescencia verde se observa la aparición de dos poblaciones positivas para cada señal respectivamente, que no se observa al analizar heces de ratones no colonizados (Figura 42B). El análisis de estas poblaciones de *C. albicans* mostró una clara separación de cada una de ellas de las poblaciones negativas en el canal correspondiente. Así, CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> mostró una mayor resolución de la señal, con una media de fluorescencia de 667 frente a 14 (Figura 42D), que la cepa CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> con una media de intensidad

de 126 frente a 16,3 en las condiciones ensayadas (Figura 42C). Los eventos comunes observados en ambas Figuras A y B (triángulo central), corresponderían a poblaciones bacterianas con distinto grado de autofluorescencia.



**Figura 42. Detección por FACS de *C. albicans* en heces expresando proteínas fluorescentes.**

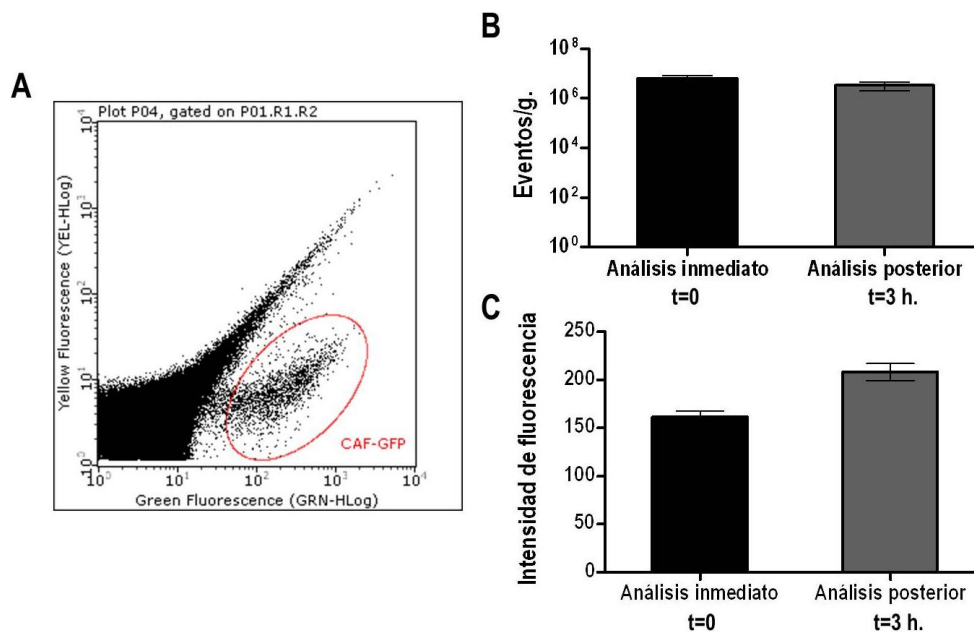
En el panel A se muestra la identificación por FACS de las cepas CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> en un homogenizado de muestra fecal de un ratón colonizado con dichas cepas siguiendo el protocolo descrito. El panel B muestra el aspecto de un análisis idéntico realizado en heces de ratones sin *C. albicans*. En el panel C se comparan los histogramas de intensidad de fluorescencia roja de la población seleccionada en el panel A correspondiente a CAF2-RFP (rojo) con un control negativo (perfil blanco), para el cual se empleó la población correspondiente a CAF2-GFP de la misma muestra. De manera similar, en el panel D se comparan los histogramas de intensidad de fluorescencia verde de la población seleccionada en el panel A correspondiente a CAF2-GFP (verde) con un control negativo (perfil blanco), para el cual se empleó la población correspondiente a CAF2-RFP de la misma muestra.

En conclusión, los resultados obtenidos indican la utilidad de la citometría de flujo para el análisis de poblaciones microbianas complejas intestinales, y en particular, de la colonización intestinal del ratón por *C. albicans*.

La cinética de formación del fluoróforo tanto en la GFP como DsRed incluye varios intermediarios (Zhang *et al.*, 2006; Strack *et al.*, 2010) que, con el oxígeno y el tiempo necesario, podrían dar las versiones maduras y funcionales de la proteína. La posible

acumulación de estas especies inmaduras podría minusvalorar el grado de expresión del marcador.

Con intención de determinar si este fenómeno era relevante en nuestras condiciones, analizamos una misma muestra en dos condiciones. En primer lugar, procesándolas rápidamente en condiciones de relativa anaerobiosis y, paralelamente, dejando oxigenarse la muestra durante 3 horas. Como puede observarse, existe un ligero aumento en la intensidad media de la señal fluorescente de la población positiva al demorar el análisis (media de 208 frente a 161, Figura 43C). Este incrementamiento no se tradujo, sin embargo, en un aumento en el número de células positiva para GFP, sino que incluso se detecta una pequeña disminución y no significativa ( $6 \times 10^6$  células/gramo frente a  $5 \times 10^6$ , Figura 43B). Estos datos indican que la completa maduración de la proteína fluorescente no es un factor crucial o condicionante a la hora de cuantificar el número de levaduras positivas.



**Figura 43. Dependencia del nivel de oxigenación en el análisis *ex vivo* por FACS de *C. albicans* en heces expresando GFP.**

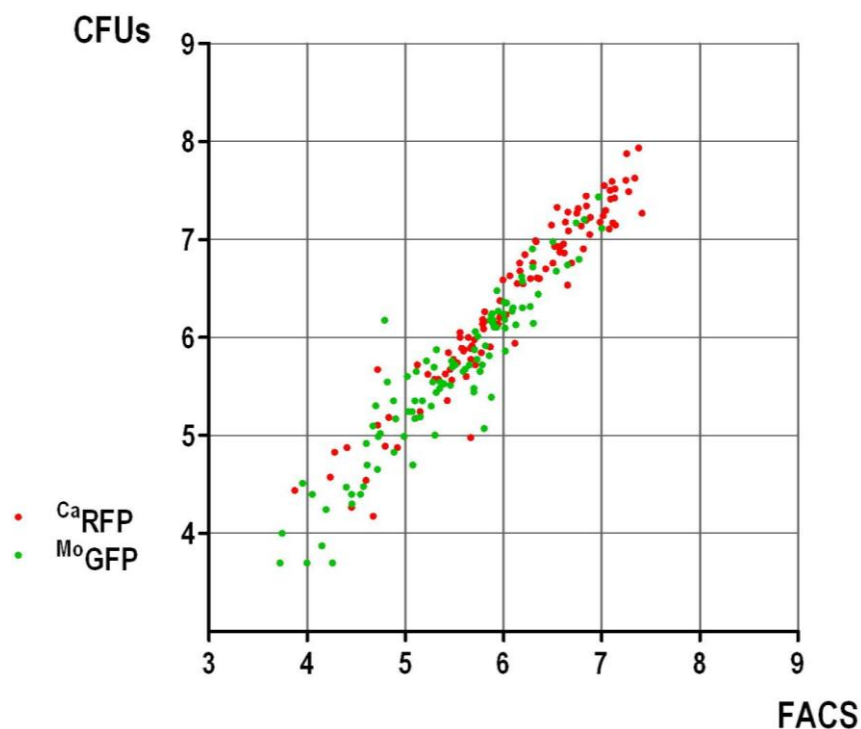
En el panel A se indica el perfil de la muestra de heces de un ratón colonizado con la cepa CAF2- $M_{0}$ GFP $^{REP}$  (según el protocolo descrito) y la población sobre la que se ha efectuado el análisis posterior (elipse roja). En el panel B se muestra la concentración celular de la cepa CAF2- $M_{0}$ GFP $^{REP}$  obtenida mediante citometría de flujo de una muestra analizada bien inmediatamente (en condiciones de limitación de oxígeno) o bien posteriormente tras permitir su oxigenación. En el panel C se comparan las medias de la intensidad de fluorescencia de la población correspondiente a la cepa CAF2- $M_{0}$ GFP $^{REP}$  en ambas condiciones.

### iii Validación de la citometría de flujo como sistema de recuento de la población fúngica fecal

Al objeto de validar la utilidad de la citometría de flujo como sistema de recuento de la población fúngica que coloniza la cavidad intestinal del ratón, analizamos 5 lotes de ratones colonizados con las cepas CAF2-*MoGFP*<sup>REP</sup> y CAF2-*CaRFP*<sup>REP</sup>.

La comparación entre los logaritmos de los valores obtenidos de cultivo en placa (CFUs) y de análisis por FACS permitió establecer una correlación lineal entre ambos (Figura 44) con un  $r^2=0,92$ . La pendiente obtenida fue cercana a 1, concretamente 1,063 (IC 95%=1,019-1,106), indicando una reducida (pero constante) desviación entre ellos. El análisis de cada cepa por separado no mostró una diferencia significativa entre las pendientes obtenidas por separado ( $p=0,9515$ ).

Los datos (Figura 44) revelan que existe un margen de correlación alta (en torno a las  $10^5$ - $10^7$  células por gramo) en el cual podemos obtener datos fiables de la concentración del hongo en la muestra fecal mediante el análisis por citometría de flujo. Niveles inferiores a  $10^3$ - $10^4$  células por gramo son difícilmente detectables por citometría.



**Figura 44. Comparación de la cuantificación de *C. albicans* en muestras de heces por citometría y recuento en placa.**

La figura muestra la cuantificación de *C. albicans* por gramo de heces, expresada en valores logarítmicos, correlacionándose la determinación por CFUs con la determinación por citometría de flujo. Los círculos rojos corresponden a cepas expresando RFP, mientras que los verdes indican valores de cepas expresando GFP.

Es importante destacar que la citometría, a pesar de sus ventajas, posee una sensibilidad menor que el cultivo de muestra (límite de detección aproximadamente  $10^4$  células/gramo de heces frente a  $\approx 5 \times 10^2$  células/gramo en la determinación por CFUs).

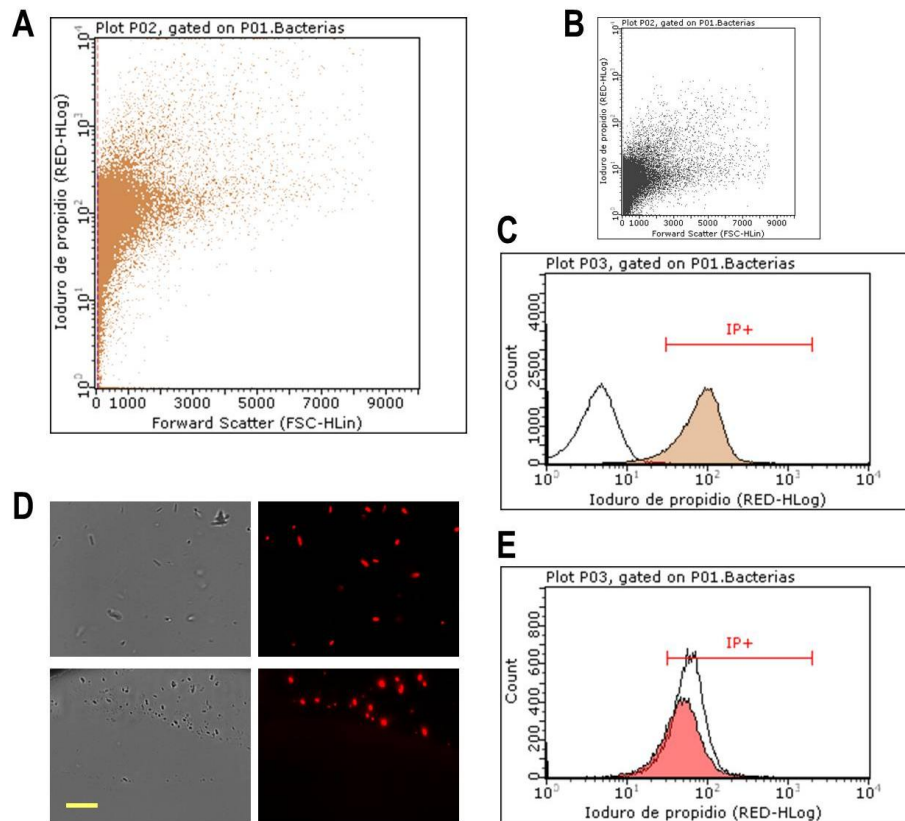
### a.3. Cuantificación de bacterias totales por citometría de flujo

El modelo de colonización descrito hasta la fecha implica una disminución importante de la microbiota bacteriana que permite el establecimiento de *C. albicans*. En el trabajo original de Kinneberg y cols. (Kinneberg *et al.*, 1999) se cuantifican los grupos de bacterias Gram positivas y Gram negativas (aerobias o facultativas), así como las anaerobias en ciego tras el tratamiento antibiótico y la instauración del hongo. Nosotros nos planteamos completar este estudio cuantificando el contenido bacteriano total, no solo en un determinado momento sino durante el curso de la colonización y alcanzando periodos más prolongados (hasta 21 días). Por otro lado, el empleo de métodos de cultivo habituales en la cuantificación, hace que la mayoría de las bacterias no sean analizadas, no pudiendo extraerse datos cuantitativos fiables. Por ello, nos planteamos diseñar una metodología independiente de cultivo que permitiera la cuantificación de la microbiota total de forma que se pueda hacer un seguimiento en heces a lo largo del tiempo.

La detección específica de bacterias en heces por citometría de flujo es posible siempre y cuando éstas estén marcadas con un fluorocromo adecuado (van der Waaij *et al.*, 1994). Utilizando ligeras modificaciones de una técnica descrita con anterioridad (ver Materiales y Métodos 7.A.a) fuimos capaces de detectar y cuantificar la microbiota directamente en muestras fecales obtenidas de ratón.

La tinción con yoduro de propidio de las muestras fecales (Figura 45A) permitió observar un claro desplazamiento de la población original no teñida (Figura 45B) hacia valores positivos, estableciéndose un perfil de citometría similar al descrito para bacterias en muestras de heces (van der Waaij *et al.*, 1994). La comparación de ambos perfiles en forma de histograma (Figura 45C) muestra una detección de un 86-90 % de eventos IP positivos (media de fluorescencia de 67), frente a un 1 % de eventos positivos autofluorescentes en la muestra sin teñir (media de fluorescencia de 4). El 10-14 % restante podría representar partículas inertes de la muestra (no teñidas) de acuerdo a lo descrito anteriormente (van der Waaij *et al.*, 1994) y a lo observado por microscopía de fluorescencia (Figura 45D), aunque una parte podrían corresponder a bacterias que se dejan de analizar por limitaciones de la técnica.

Se comprobó que en una muestra de heces de un ratón tratado varios días con antibióticos (13 días en el caso mostrado) se detecta una significativa disminución del número de bacterias por gramo (en el ejemplo mostrado,  $4 \times 10^8$  frente a  $1,7 \times 10^9$  células por gramo de heces), aunque éstas se tiñen de forma similar (Figura 45E).



**Figura 45. Detección de la microbiota fecal por citometría de flujo.**

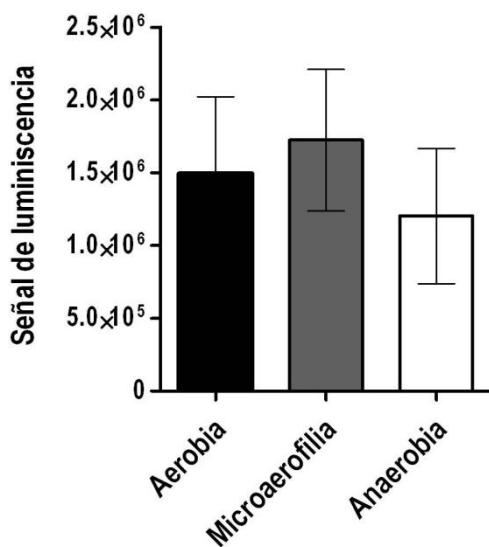
El panel A se muestra el aspecto de la población fecal bacteriana detectada tras su fijación (etanol 70%) y tinción con ioduro de propidio (IP) analizada en función del tamaño (FSC) y de la fluorescencia roja, apreciándose un desplazamiento en comparación con la misma muestra sin teñir (panel B). El apartado C resume los anteriores comparando ambas poblaciones en forma de histograma y mostrando el rango en que se considera la población como positiva para ioduro de propidio, sobre la que se realiza la cuantificación. En el panel D se observa por microscopía óptica (izquierda) y de fluorescencia roja (derecha) la eficiente y específica tinción de bacterias con ioduro de propidio en muestras fecales, la banda amarilla corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . Los histogramas de la figura E indican la tinción de bacterias de una muestra de heces procedente de ratones tratados con antibióticos (estreptomina 2 mg/mL, bacitracina 1 mg/mL y gentamicina 0,1 mg/mL durante 13 días) en color naranja, en comparación con una muestra diluida (1:10) de heces de ratones control sin tratar (perfil blanco).

El sistema de cuantificación fue igualmente utilizado en la cuantificación de bacterias intestinales tras el sacrificio de un grupo de cuatro ratones tratados con antibióticos durante 2 meses, con objeto de analizar la población en las distintas porciones del intestino. Se observaron valores similares a los obtenidos en heces ( $1,26 \times 10^9$  células/gramo) y bastante homogéneos en las distintas porciones intestinales analizadas: intestino delgado ( $1,49 \times 10^9$ ), ciego ( $1 \times 10^9$ ) e intestino grueso ( $1,63 \times 10^9$ ) (datos no mostrados).

## b) Utilidad del sistema de expresión regulado por doxiciclina durante la colonización gastrointestinal

Con intención de determinar la utilidad del sistema de expresión regulado por doxiciclina en el tracto gastrointestinal, nos planteamos estudiar dos aspectos importantes: Primero, si la concentración de oxígeno (limitante en el intestino) condicionaba, de alguna forma, la inducción/represión del promotor TET y, segundo, si era posible modular *in vivo* durante la colonización la expresión de dicho promotor mediante la adición de doxiciclina en el agua de bebida del animal y, en su caso, la cinética de dicho proceso.

Comprobamos, en primer lugar, el nivel de expresión del promotor TET en condiciones de anaerobiosis y de microaerofilia *in vitro* utilizando la cepa CAF2-<sup>Ca</sup>CbLuc<sup>REP</sup>. Se escogió este gen reportero (frente a las proteínas fluorescentes) por no intervenir el oxígeno en la maduración de la proteína, cuya concentración se estima fácilmente por ensayo de la actividad luciferasa en condiciones normales. La señal de luminiscencia presentó valores similares en todas las condiciones ensayadas (alrededor de  $1,5 \times 10^6$  unidades por millón de célula, Figura 46), lo que indica que la disponibilidad de oxígeno no influye significativamente en la regulación del promotor TET.



**Figura 46. Expresión de la enzima CbLuc en distintas condiciones de oxigenación.**

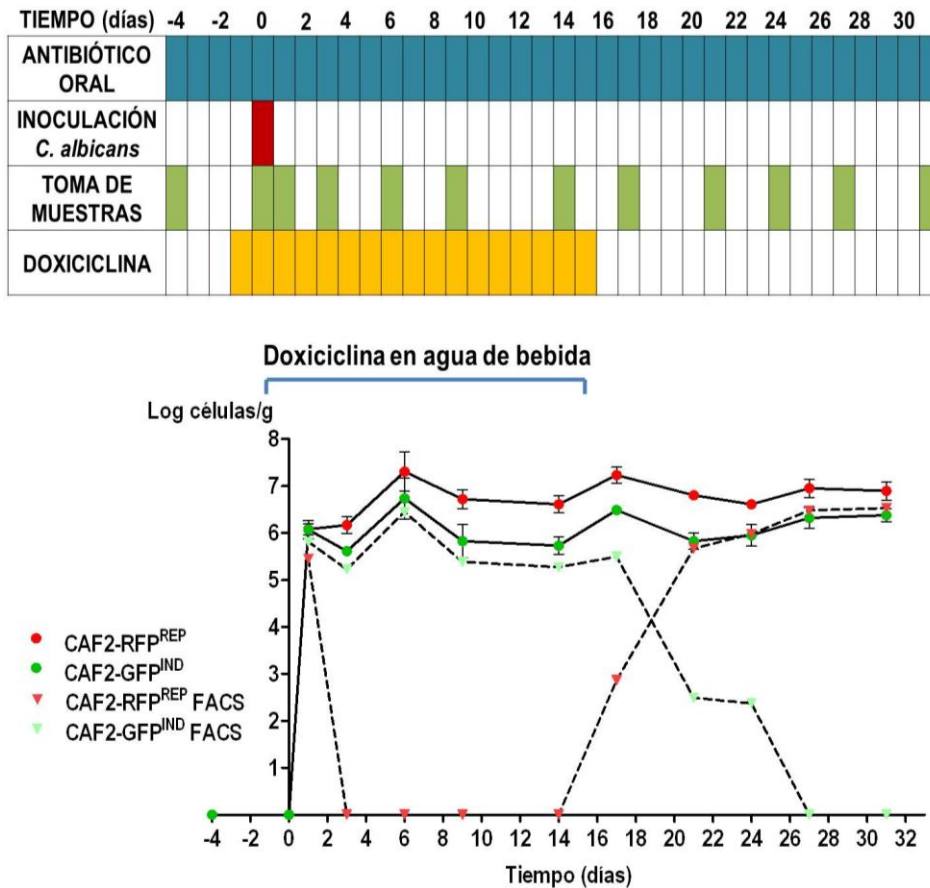
Señal de luminiscencia (unidades arbitrarias) representada en escala logarítmica, obtenidas para la cepa CAF2-CbLuc<sup>REP</sup> crecida *in vitro* en medio SD a 37 °C, durante 48 horas en condiciones de normoxia, anaerobiosis y microaerofilia (ver Materiales y Métodos 3.A.c). El ensayo de luminiscencia se realizó en condiciones normales de oxigenación inmediatamente tras obtener las células (ver Materiales y Métodos 5.A).

A continuación, se analizó la inducción/represión *in vivo* empleando cepas portadoras de proteínas fluorescentes. Para ello, se inoculó una mezcla de las cepas CAF2-<sup>Mo</sup>GFP<sup>IND</sup> y CAF2-<sup>Ca</sup>RFP<sup>REP</sup> en dos grupos de ratones con el tratamiento antibiótico estándar siendo analizados durante 30 días. La razón de introducir una mezcla de ambas cepas era poder estudiar el efecto de la doxiciclina simultáneamente tanto en el sistema inducible como en el reprimible, disminuyendo el número de animales de experimentación. Paralelamente, hicimos un recuento de levaduras viables en heces (CFUs) para confirmar el

establecimiento correcto de ambas cepas durante el curso de la colonización. Se estableció el tratamiento con doxiciclina oral (2 mg/mL) de la siguiente manera: al primer grupo de ratones (grupo A) desde el día -1 al día 15 (Figura 47) y al segundo grupo (grupo B) desde el día 15 al día 31 (Figura 48).

Para el primer experimento (grupo A) se recogieron las cepas CAF2-MoGFP<sup>IND</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> procedentes de un cultivo *in vitro* en SD a 37 °C durante 18 horas sin doxiciclina, de modo que sólo se permite la expresión de la RFP. Este cultivo se empleó en la inoculación de ratones con tratamiento mantenido con doxiciclina (Figura 47).

Se observa cómo tras 24 horas (día 1) aún se detecta la expresión remanente de RFP, que cae rápidamente, siendo indetectable a día 3 (círculos rojos) hasta la eliminación de la doxiciclina oral, a pesar de mantenerse siempre niveles altos de colonización por la cepa CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> (cuadrados rojos). Por otro lado, 24 horas parece ser suficiente para inducir la expresión de GFP en la mayor parte de la población (correspondiente a la cepa CAF2-MoGFP<sup>IND</sup>), detectado por FACS (Figura 47, círculos verdes) a niveles similares al cuantificado por CFUs (cuadrados verdes). Dichos valores se mantienen hasta la eliminación del compuesto inductor en el agua de bebida, lo cual provoca una disminución en la detección tras varios días. El lapso de aproximadamente 9 días desde la eliminación de la doxiciclina oral a la total expresión de RFP y desaparición de GFP se debe, probablemente, al tiempo necesario para un efectivo aclaramiento de la doxiciclina por parte del ratón.



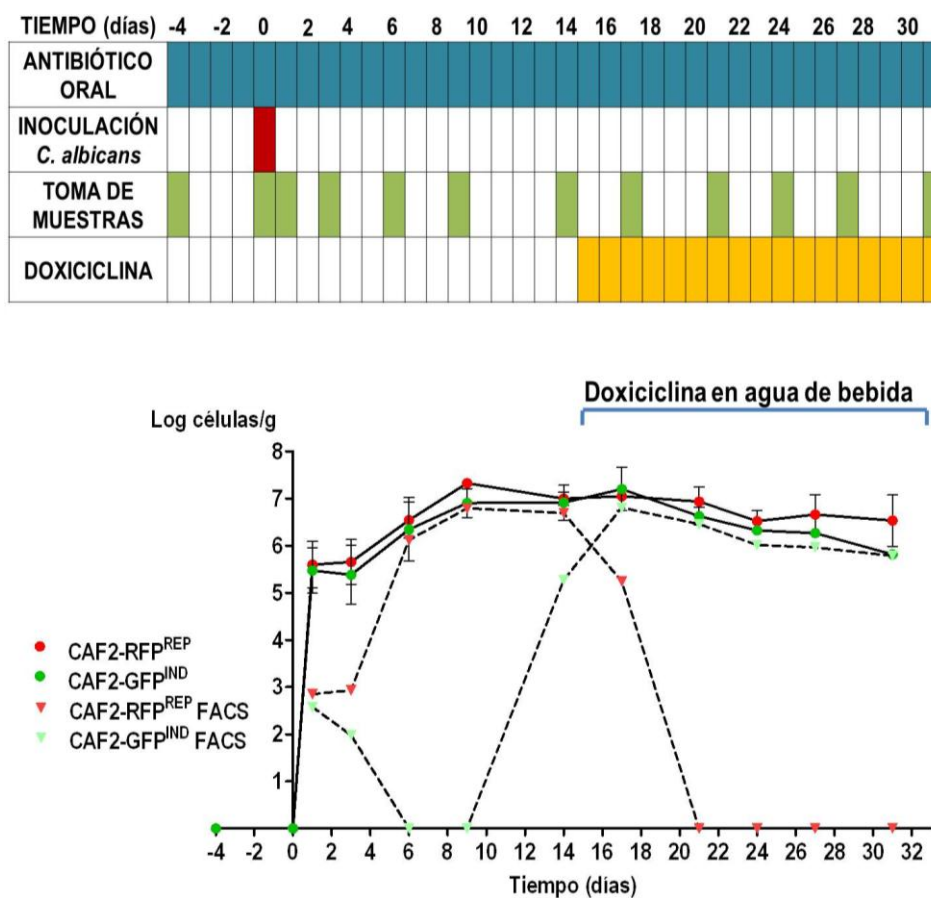
**Figura 47. Evolución de la expresión de proteínas fluorescente en *C. albicans* en colonización en presencia de doxiciclina y tras su eliminación (grupo A).**

Se muestran los niveles de colonización de las cepas CAF2-MoGFP<sup>IND</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> en heces de ratones tratados con antibióticos, medido por recuento de CFUs (círculos, línea continua) y la evolución de la expresión de proteínas fluorescentes por dichas cepas a lo largo del tiempo, mediante el análisis en heces por FACS (triángulos invertidos, línea discontinua), en función de la presencia de doxiciclina en el agua de bebida. Las levaduras inoculadas proceden de cultivos crecidos en SD a 37 °C durante 18 horas sin doxiciclina. Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección.

En un segundo experimento se recogieron las cepas CAF2-MoGFP<sup>IND</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> procedentes de un cultivo *in vitro* en SD a 37 °C durante 18 horas con doxiciclina, de modo que sólo se permite la expresión de la GFP, momento en que se inocularon en ratones sin tratamiento con doxiciclina (grupo B, Figura 48).

Se puede observar que tras 24 horas (día 1) sólo se detecta una mínima expresión remanente de GFP, siendo indetectable a día 6 (círculos verdes) hasta la instauración del tratamiento con doxiciclina oral, a pesar de mantenerse siempre niveles altos de colonización por la cepa CAF2-MoGFP<sup>IND</sup> (cuadrados verdes). Por otro lado parecen necesarios más de 3 días para una correcta inducción de la expresión de RFP (previamente reprimida) en la mayor parte de la población correspondiente a la cepa CAF2-CaRFP<sup>REP</sup>, observándose niveles detectados por FACS (Figura 48, círculos rojos)

similares a los cuantificados por CFUs (cuadrados rojos) sólo a partir del día 6, y manteniéndose hasta la adición del represor en agua de bebida. A partir de ese momento observamos una caída de la detección tras escasos días. En este caso, el intervalo de actuación de la doxiciclina es menor (2-3 días aproximadamente) desde la adición del compuesto hasta la represión efectiva de RFP e inducción de GFP. En éste último caso se detecta una población positiva en GFP incluso antes de la incorporación de doxiciclina, que corresponde a la aparición excepcional en este punto de una población de falsos positivos, no coincidentes, pero solapantes con la población de *Candida* seleccionada (datos no mostrados). Estos falsos positivos pueden ser eliminados mediante un ajuste más discriminatorio de la población CAF2-GFP, a costa de una pérdida de una pequeña proporción de verdaderos positivos.



**Figura 48. Evolución de la expresión de proteínas fluorescente en *C. albicans* durante colonización en ausencia de doxiciclina y tras su adición (grupo B).**

Niveles de colonización de las cepas CAF2-MoGFP<sup>IND</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup> en heces de ratones tratados con antibióticos, medido por recuento de CFUs (círculos, línea continua) y siguiendo la evolución de la expresión de proteínas fluorescentes por dichas cepas a lo largo del tiempo, analizado en heces por FACS (triángulos invertidos, línea discontinua), en función de la presencia de doxiciclina en el agua de bebida. Las levaduras inoculadas proceden de cultivos incubados en SD+doxiciclina (10 µg/mL) a 37 °C durante 18 horas.

### c) Influencia del tratamiento antibiótico oral

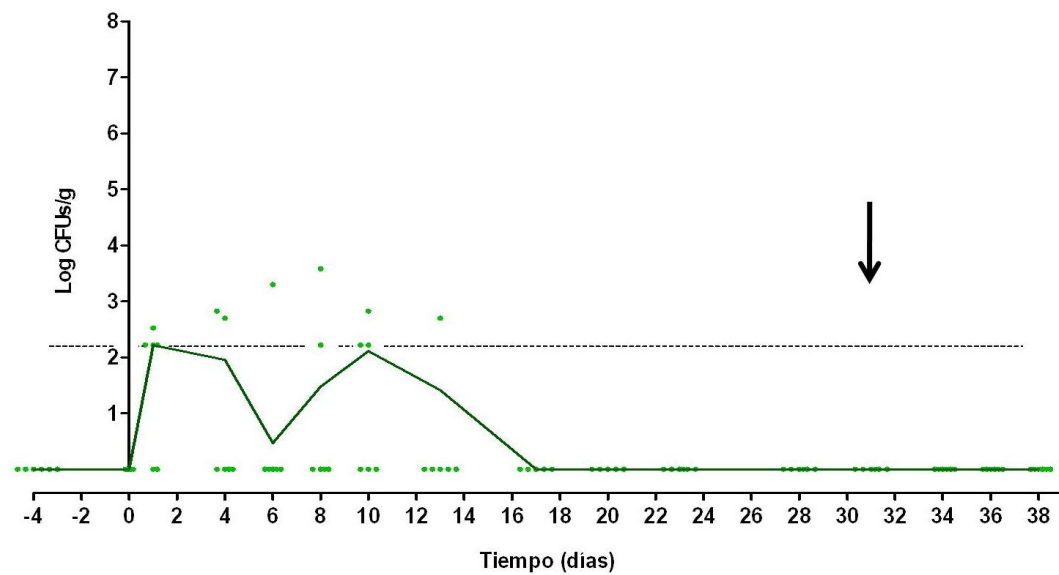
La disminución de la microbiota bacteriana para permitir la colonización por *C. albicans* requiere el uso combinaciones antibióticas de amplio espectro (Samonis *et al.*, 1990; Kinneberg *et al.*, 1999; Tansho *et al.*, 2004). Nosotros pretendimos profundizar en el papel que ejerce la terapia antibiótica en la colonización por *C. albicans* modificando los antibióticos introducidos, utilizando para ello las metodologías puestas a punto hasta este momento.

#### **c.1. Efecto de la eliminación y reinstauración del tratamiento antibiótico**

La omisión del tratamiento antibiótico previo en el agua de bebida provoca que, tras la inoculación, la detección del hongo en heces sea, desde el primer día, mínima y con una media siempre cercana al (o por debajo del) límite de detección por nuestro método (Figura 49) ( $\approx 500$  CFUs/gramo heces). De hecho, fue indetectable en más de la mitad de los individuos a partir del día 4, siendo los datos positivos resultado de un recuento de 1 ó 2 colonias por placa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kinneberg y col. utilizando otra cepa de ratón (BALB/c) a partir del análisis *post mortem* del ciego de animales (Kinneberg *et al.*, 1999) a un tiempo único de análisis de 3 días.

Los límites de detección inherentes a nuestro método permiten establecer ciertas dudas sobre la posibilidad de que existiera una colonización latente por *C. albicans* en el animal en lugar de una pérdida efectiva y real del microorganismo en el colon. Para descartar este hecho, se añadió un cóctel de antibióticos en el agua de bebida al día 32 y se siguió la evolución de la población por recuento de CFUs durante al menos 15 días adicionales. Como se muestra en la Figura 49 no se observó detectó en ningún caso población fúngica viable.

Estos datos indican que el hongo ha sido incapaz no sólo de establecerse en el nicho sino incluso de sobrevivir al tránsito a través del tracto intestinal.

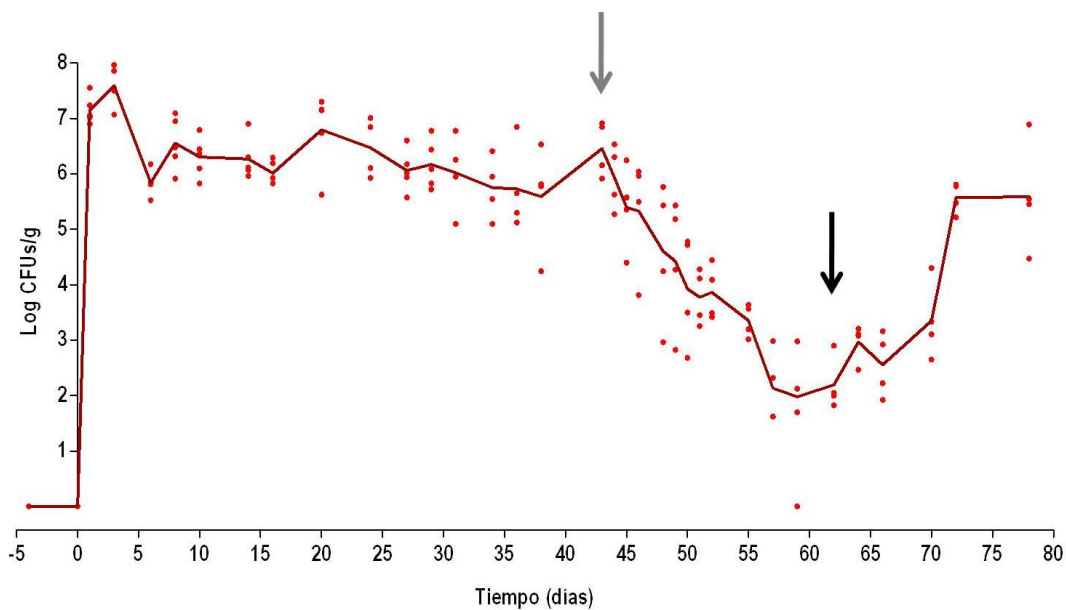


**Figura 49. Colonización por *C. albicans* en ratones con una microbiota endógena inalterada.**

Se muestran los valores de las unidades formadoras de colonia de la cepa de *C. albicans* CAF2-MoGFPREP obtenidas por cultivo de muestras fecales a los tiempos indicados de un grupo de ratones ( $n=6$ ) que fueron inoculados intragástricamente a día 0 con una dosis estándar (con  $10^7$  células) de células levaduriformes obtenidas por crecimiento en YPD a  $37^\circ\text{C}$ . Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección. La flecha negra indica el día en que se introdujo un cóctel antibiótico según el protocolo descrito al agua de bebida.

A continuación, intentamos determinar si la necesidad de una disminución en los niveles de población bacteriana era sólo esencial para el establecimiento inicial de la colonización o si era también importante durante el curso de la misma. Para ello colonizamos de forma estable ratones C57BL/6 ( $n=4$ ) y procedimos a eliminar los antibióticos del agua de bebida (día 45). Como se indica en la Figura 50, se produce una caída paulatina de los niveles fúngicos hasta llegar a valores prácticamente indetectables al cabo de dos semanas (Figura 50). La cinética lineal de pérdida de *Candida* al eliminar el antibiótico muestra una caída por día de 0,236 unidades logarítmicas de contenido del hongo por gramo de heces ( $r^2=0,94$ ).

Este suceso es reversible si se reinstaura el tratamiento antibiótico antes de la pérdida total del hongo (por debajo de 100 CFUs/gramo de heces,  $\approx 300$  células fúngicas totales por animal sin inoculación adicional, alcanzando de nuevo valores próximos a los iniciales ( $10^6$  CFUs/gramo de heces).



**Figura 50. Efecto del tratamiento antibiótico en la colonización por *C. albicans*.**

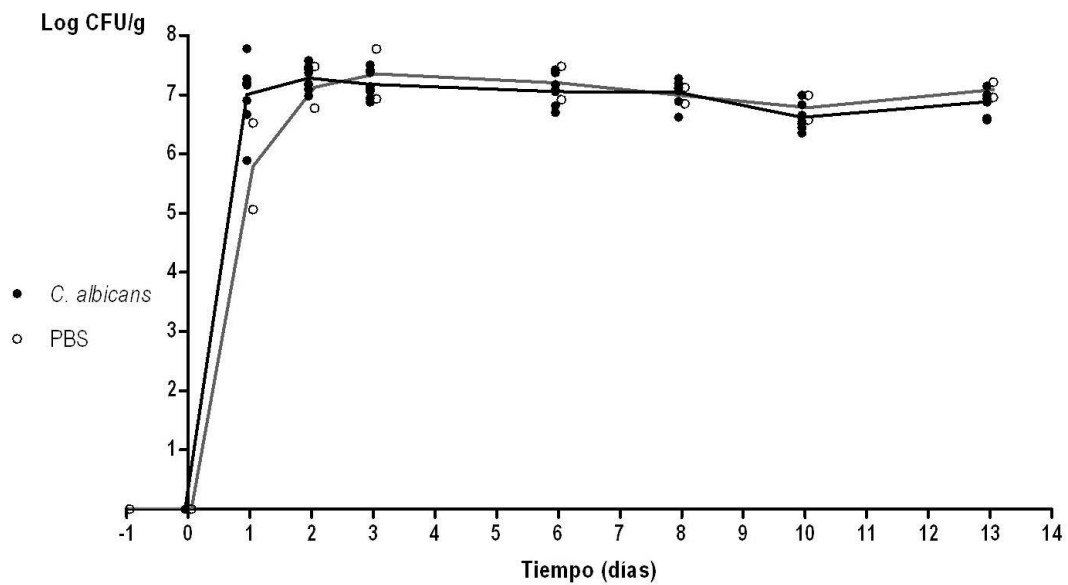
Se muestran los valores de unidades formadoras de colonias correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones ( $n=4$ ) inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). El símbolo en cero indica que el valor está por debajo del límite de detección. La flecha gris indica el día en que se retira el cóctel antibacteriano en el agua de bebida, mientras que la flecha negra indica el día en que se reinstauró el tratamiento antibiótico en el agua de bebida.

### c.2. Establecimiento de *C. albicans* en ratones no inoculados

Dada la capacidad de recuperación de la colonización fúngica tras la reinstauración del tratamiento antibiótico, nos planteamos la posibilidad de la existencia de transferencia horizontal en ratones que cohabitaran en las mismas condiciones durante el curso del experimento.

Por ello, mantuvimos 10 ejemplares cohabitando en una jaula, a los que se les administró el cóctel antibiótico estándar en el agua de bebida, como se ha descrito anteriormente, desde 4 previos a la inoculación. Se inocularon 8 de ellos con una dosis única de *C. albicans* de  $10^7$  células y se mantuvieron los dos restantes sin ser inoculados (PBS), analizándose la evolución de la población fúngica en heces tanto en los animales inoculados como no inoculados. Como se puede observar (Figura 51), y desde estadios muy tempranos (24 horas), observamos transferencia horizontal del microorganismo de los ratones inoculados a los no inoculados conviviendo en la misma jaula. Aunque en los primeros momentos (24 horas) los niveles son ligeramente inferiores ( $6,17 \times 10^5$  frente a  $1,01 \times 10^7$  CFUs por gramo), a partir del segundo día ambos grupos se mantienen en los mismos rangos de colonización por el hongo ( $\approx 10^7$ ). Esta colonización se mantuvo estable y continúa hasta el final del experimento (más de 15 días). Este hecho indica la capacidad de transferencia *C. albicans* en ratones conviviendo, probablemente por

coprofagia, y sugiere la suficiencia de una dosis baja de inóculo para el establecimiento de una colonización efectiva.



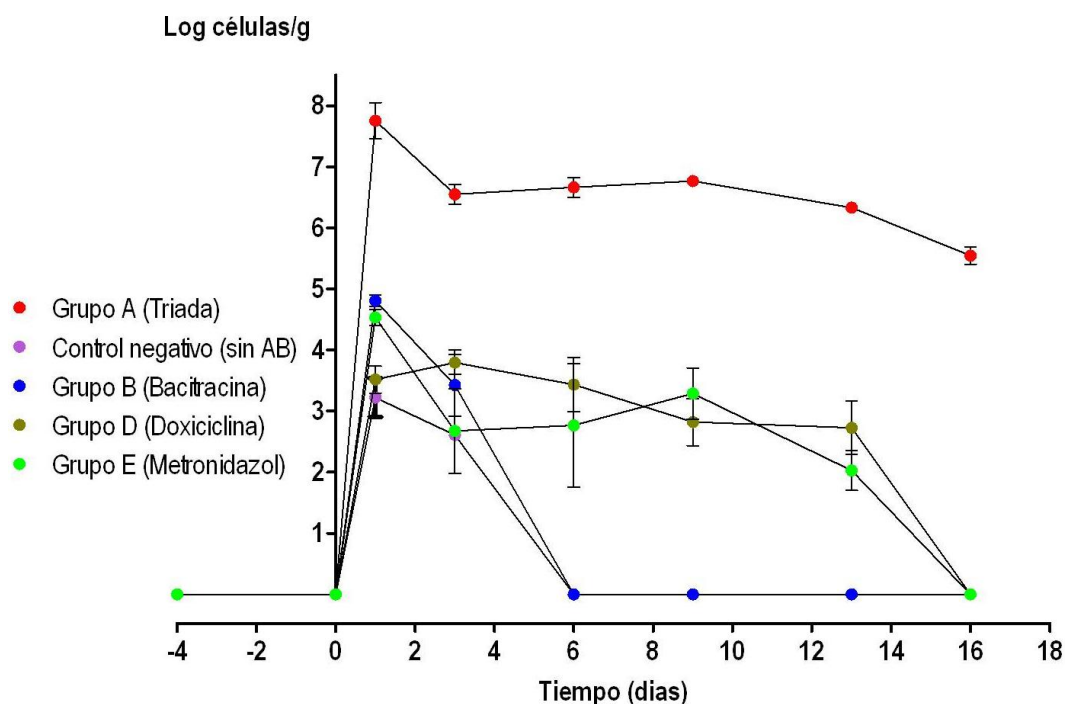
**Figura 51. Efecto del tratamiento antibiótico en ratones no inoculados.**

Se muestran los valores de unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos a partir de heces de dos grupos de ratones inoculados (tiempo 0) con el hongo (símbolos cerrados) o con PBS (símbolos abiertos). Todos ellos, cohabitando en la misma jaula y con tratamiento antibiótico desde día -4.

### c.3. Efecto de tratamientos antibióticos con distintas especificidades

Como una etapa adicional de la caracterización de la colonización gastrointestinal por *C. albicans*, intentamos determinar, si la colonización fúngica por *C. albicans* en nuestro modelo era posible simplemente por una reducción del nivel de bacterias intestinales o, adicionalmente, si existían grupos microbianos específicos que posibilitaban o impedían dicho proceso. Nuestra aproximación en este caso fue utilizar una monoterapia antibiótica con un espectro más reducido en lugar de la combinación habitual de antibióticos. El seguimiento de la colonización bacteriana en la microbiota total nos permitiría además estimar la relevancia de la misma desde un punto de vista cuantitativo.

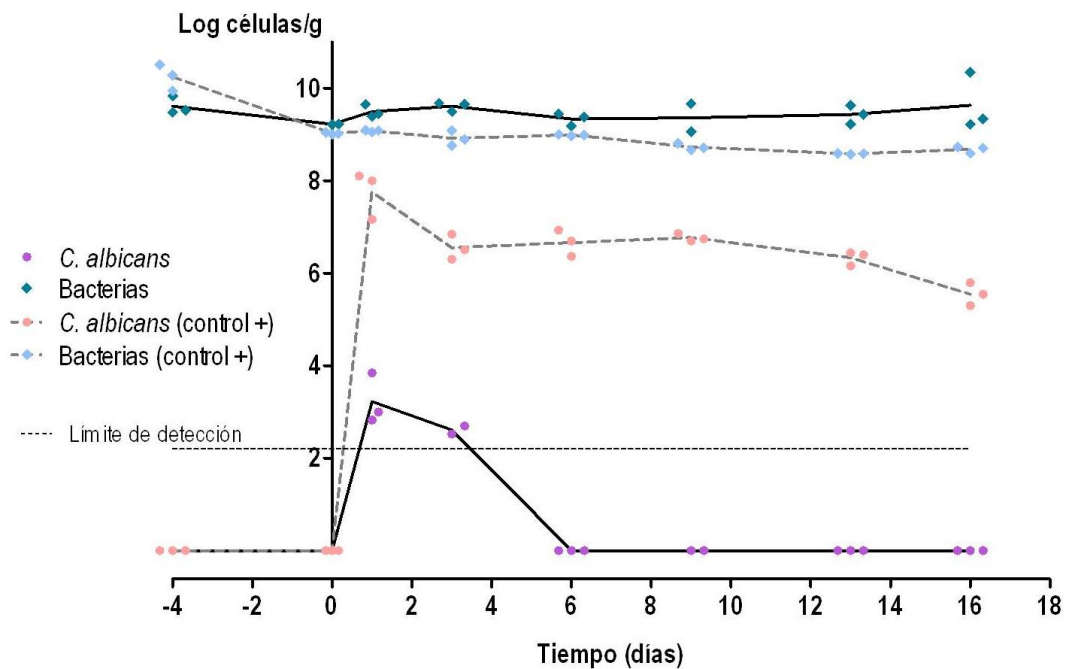
Los tratamientos que se emplearon fueron los siguientes: la combinación habitual como control positivo (estreptomicina 2 mg/mL, bacitracina 1 mg/mL y gentamicina 0,1 mg/mL, grupo A), bacitracina (acción predominante sobre microorganismos Gram positivos, grupo B), doxiciclina (bacteriostático de amplio espectro, grupo C) y metronidazol (efectivo principalmente sobre microorganismos anaerobios, grupo D). Los resultados resumidos en la Figura 52 se describen a continuación.



**Figura 52. Efecto de distintos antibióticos en la colonización por *C. albicans*.**

Se muestran los valores de unidades formadoras de colonias correspondientes a la cepa CAF2-<sup>Ca</sup>RFPREP obtenidas a distintos tiempos de heces en cinco grupos de ratones (n=3) con el tratamiento antibiótico oral indicado previo a la inoculación del hongo (desde día -4) o sin ningún tratamiento (control negativo). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección. Las barras de error muestran el error estándar de la media.

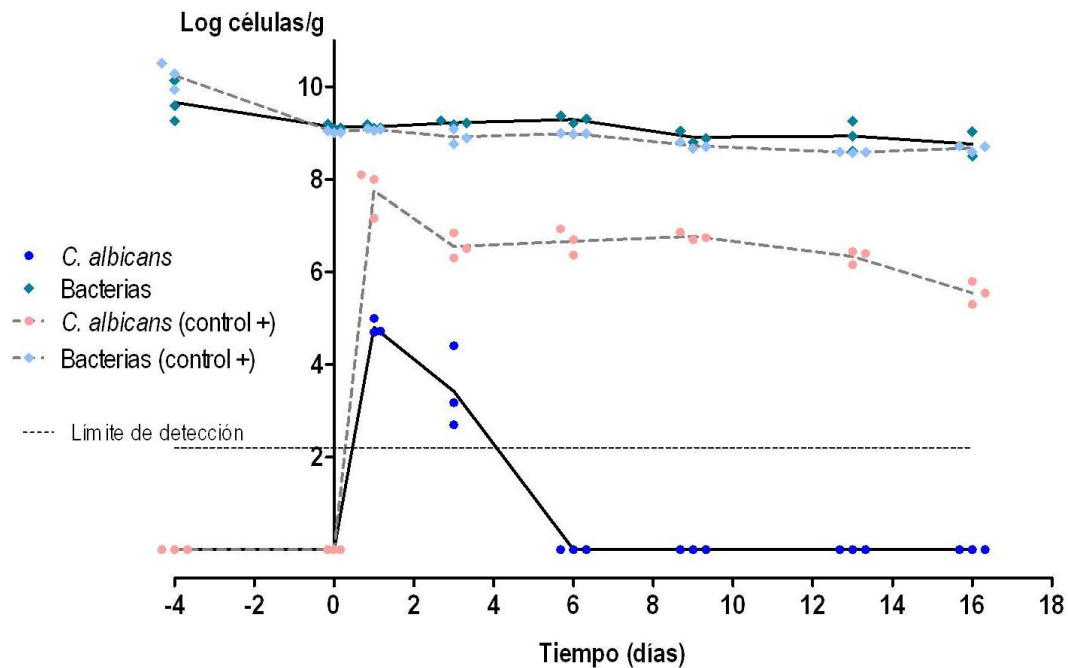
En ausencia de tratamiento antibiótico, la población bacteriana se mantiene estable durante el curso del experimento (16 días) entre  $3,2$  y  $4 \times 10^9$  células por gramo de heces. En estas condiciones *C. albicans* es incapaz de establecerse en el nicho intestinal. Sin embargo, sí fuimos capaces de detectar niveles transitorios de  $1,6 \times 10^3$  y  $4 \times 10^2$  CFUs por gramo de heces los días 1 y 3, respectivamente, tras la inoculación. A partir del tercer día los niveles fueron indetectables (Figura 53).



**Figura 53. Evolución de la colonización intestinal por *C. albicans* y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con bacitracina.**

Los círculos muestran los valores de unidades formadoras de colonias (CFUs) correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos a partir de heces de ratones inoculados (día 0). Los rombos indican los niveles de bacterias totales determinados por citometría de flujo. En línea discontinua se representa el control positivo de colonización (ratones tratados con la combinación estándar de antibióticos, grupo A). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección.

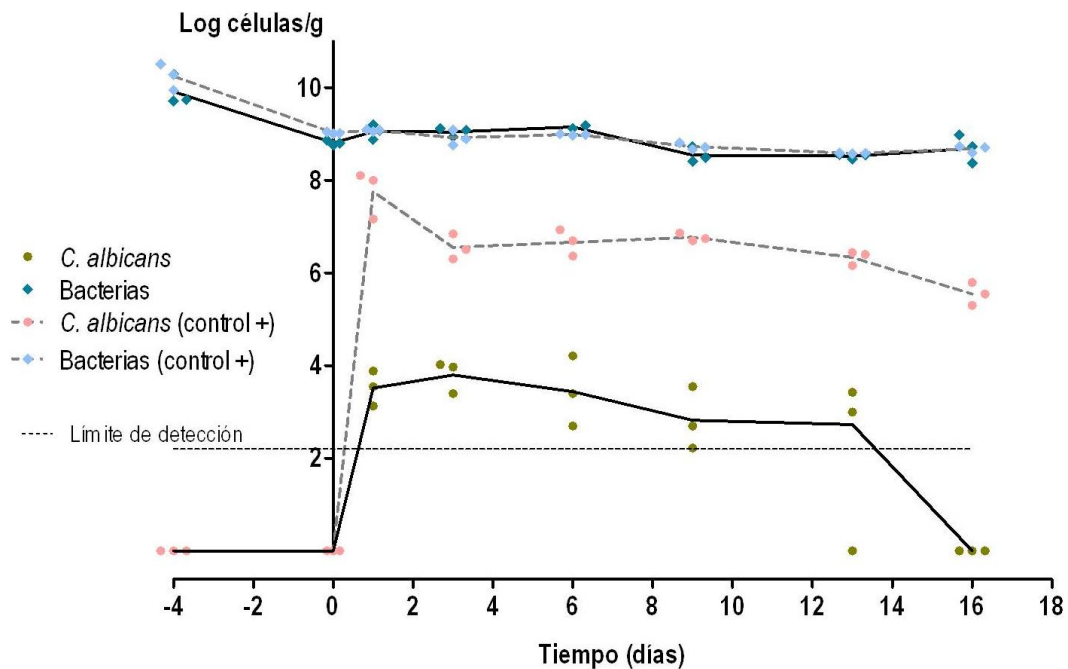
El tratamiento con bacitracina condujo a una detección de niveles medios ( $6,5 \times 10^4$  y  $2,7 \times 10^3$  células por gramo) de *C. albicans* en heces a tiempos cortos (1 y 3 días respectivamente). *C. albicans* deja de detectarse en heces a partir del día 6 (Figura 54). La disminución del contenido total de bacterias en este caso parece ser efectiva, aunque se aprecian valores superiores de microbiota respecto al control positivo en ciertos puntos.



**Figura 54. Evolución de la colonización intestinal por *C. albicans* y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con bacitracina.**

Los círculos muestran los valores de unidades formadoras de colonias (CFUs) correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos a partir de heces de ratones inoculados (día 0), tratados con bacitracina (1 mg/mL) desde día -4. Los rombos indican los niveles de bacterias totales determinados por citometría de flujo. En línea discontinua se representa el control positivo de colonización (ratones tratados con la combinación estándar de antibióticos, grupo A). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección.

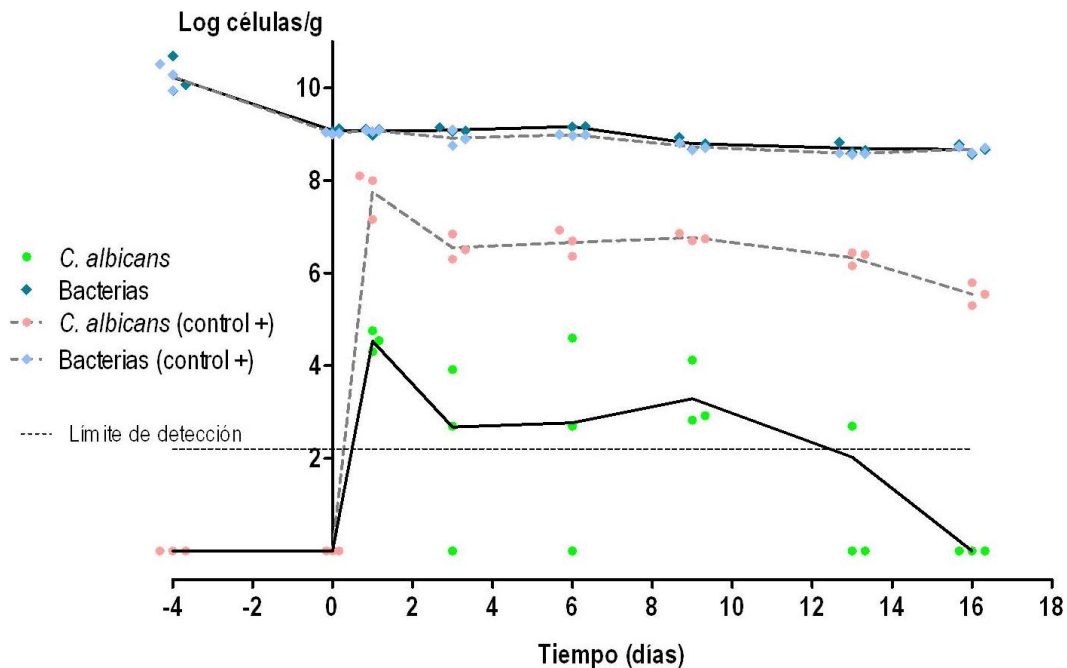
Por otro lado, el tratamiento con doxiciclina permite mantener una colonización media, entre  $5 \times 10^2$  y  $6 \times 10^3$  CFUs/gramo durante alrededor de dos semanas (Figura 55). A partir de este momento, la colonización deja de ser detectable, aunque es posible que se mantenga una baja colonización indetectable durante algún tiempo siguiendo la cinética observada. La población bacteriana por su parte se mantiene en niveles similares a los obtenidos en el control positivo.



**Figura 55. Evolución de la colonización intestinal por *C. albicans* y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con doxiciclina.**

Los círculos muestran los valores de unidades formadoras de colonias (CFUs) correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos a partir de heces de ratones inoculados (día 0), tratados con doxiciclina (2 mg/mL) desde día -4. Los rombos indican los niveles de bacterias totales determinados por citometría de flujo. En línea discontinua se representa el control positivo de colonización (ratones tratados con la combinación estándar de antibióticos, grupo A). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección.

El tratamiento con metronidazol permitió detectar en un primer momento  $3,47 \times 10^4$  células fúngicas por gramo de heces. Posteriormente los niveles bajaron manteniéndose entre  $10^2$  y  $2 \times 10^3$  de media hasta día 13, a partir del cual los niveles resultaron prácticamente indetectables (Figura 56). Por su parte, la detección de microbiota total muestra una disminución en la concentración bacteriana en heces similar a la del control positivo.



**Figura 56. Evolución de la colonización intestinal pro *C. albicans* y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con metronidazol.**

Los círculos muestran los valores de unidades formadoras de colonias (CFUs) correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos a partir de heces de ratones inoculados (día 0), tratados con metronidazol (1 mg/mL) desde día -4. Los rombos indican los niveles de bacterias totales determinados por citometría de flujo. En línea discontinua se representa el control positivo de colonización (ratones tratados con la combinación estándar de antibióticos, grupo A). Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección.

La coincidencia en casi todos los casos, excepto en el control negativo, en los niveles bacterianos con el control positivo indican que una disminución inespecífica de bacterias en el intestino no es suficiente para permitir una colonización por *C. albicans* efectiva y sostenida en del tiempo, sino que, probablemente se requiere una eliminación de ciertas poblaciones específicas.

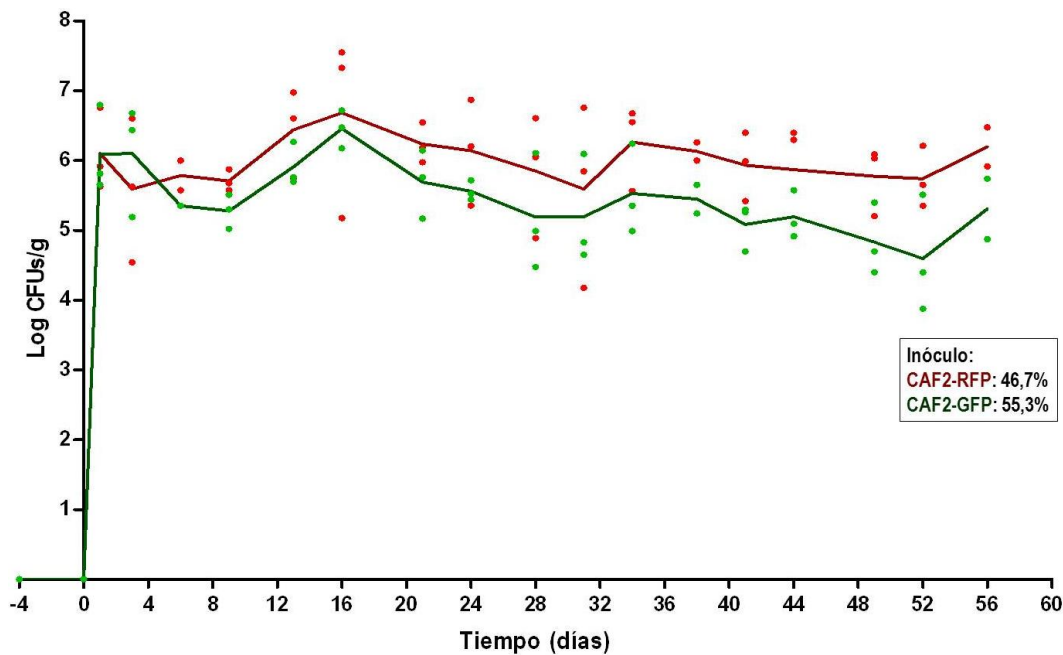
## **B. Relevancia de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs en la colonización intestinal por *C. albicans***

El estudio de las quinasas de tipo MAP en la adaptación del hongo a diversas situaciones de estrés ha puesto de manifiesto su importancia en la virulencia de este organismo usando un modelo de infección sistémica en ratón. Sin embargo no se conoce hasta el momento su relevancia en el establecimiento de colonización. En esta sección, hemos abordado su implicación en el proceso de colonización intestinal mediante experimentos de competición (mutante/silvestre) gracias a la utilización de los marcajes genéticos previamente desarrollados y comentados en el bloque de Resultados 1. 1.

### **a) Colonización de la cepa parental con dos marcadores distintos**

Aunque se había comprobado la estabilidad e inocuidad del marcaje con proteínas fluorescentes (ver Resultados 1.B.b.7), llevamos a cabo un experimento control en el que analizamos la capacidad de colonizar de la cepa parental expresando las proteínas fluorescentes (GFP y RFP), empleando las cepas CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup>. La finalidad fue determinar si la expresión de diferentes proteínas fluorescentes implicaba cierta ventaja o desventaja evolutiva en el modelo de colonización desarrollado. Se obtuvo una mezcla de ambas cepas en las que la proporción (estimada tanto por citometría como por recuento de CFUs) fue cercana al 50 %. Esta mezcla fue inoculada en el tracto gastrointestinal y se siguió la evolución de ambas cepas por recuento de CFUs a partir de las heces de los animales.

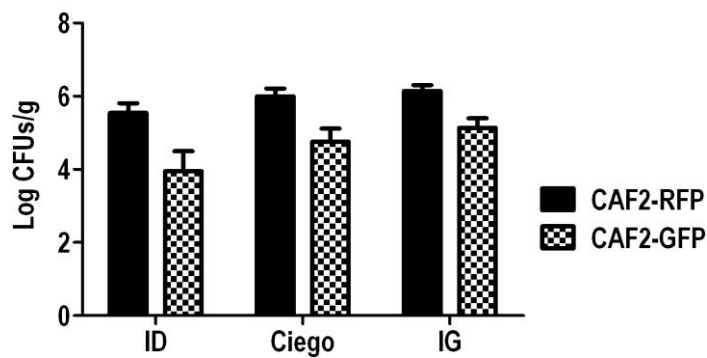
Como se muestra en la Figura 57, ambas cepas fueron capaces de establecerse en el tracto gastrointestinal de forma sostenida en el tiempo. Aunque se aprecian algunas diferencias constantes en los niveles detectados en heces de las dos cepas, éstas no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los puntos observados ( $p > 0,05$  en *t* de Student apareada). Además, es de destacar que ambas cepas mantuvieron dichas proporciones constantes a lo largo del periodo que duro el experimento (8 semanas). Esta diferencia de comportamiento podría deberse a una mayor ocupación inicial del nicho debido a hechos desconocidos; sin embargo, el hecho de que ambas permanezcan y en la misma proporción durante un periodo de tiempo tan largo hace improbable que ello sea debido a una diferente tasa de proliferación *in vivo*.



**Figura 57. Capacidad de colonización competitiva de las cepas CAF2-MoGFP y CAF2-CaRFP**

Se muestran los valores medios de unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un lote de ratones ( $n=3$ ) inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los círculos en color verde corresponden a la cepa CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> de GFP mientras que en rojo corresponden a CAF2-CaRFP<sup>REP</sup>. Se indica la composición del inóculo determinado por siembra en medio SD y recuento de CFUs.

El hecho de que nuestro análisis correspondiera a muestras de heces (reflejando, por ello, sólo la colonización en el ciego) no descartaba que la proporción de las cepas fuera diferente en otras localizaciones a lo largo del intestino. Por ello, y de forma complementaria, se analizó la presencia de ambas cepas (CAF2-MoGFP<sup>REP</sup> y CAF2-CaRFP<sup>REP</sup>) a lo largo del tracto intestinal mediante el análisis *post mortem* de los ratones colonizados (día 56). Como se muestra en la Figura 58, y de forma similar a la descrita por otros autores, se obtuvieron colonizaciones superiores en el intestino grueso ( $1,38 \times 10^6$  CFUs por gramo), frente a las obtenidas en el ciego ( $10^6$ ) y en el intestino delgado ( $3,5 \times 10^5$ ). Sin embargo, en todos los casos se mantuvieron las diferencias observadas en heces entre las cepas que, de nuevo, no son estadísticamente significativas ( $p=0,1895$  en *t* de Student apareada). Se conservaron aproximadamente las mismas proporciones a las correspondientes a la última muestra de heces tomada (aproximadamente una unidad logarítmica), salvo en el caso del intestino delgado ( $3,5 \times 10^5$  frente a  $10^4$  CFUs/gramo de media).



**Figura 58. Colonización competitiva de CAF2-GFP y CAF2-RFP a lo largo del tracto intestinal.**

Se representa la cantidad de *C. albicans* por gramo de contenido intestinal en diferentes porciones del tracto: ID refiere a intestino delgado e IG a intestino grueso. El grado de colonización se estimó por recuento de CFUs en medio SD-agar.

Concluimos, por tanto, que ambas cepas son capaces de colonizar de forma efectiva el tracto gastrointestinal de ratón aplicando el protocolo descrito.

### b) Importancia de la ruta de crecimiento vegetativo (SVG) en colonización

La ruta SVG está mediada por la MAPK *Cek1*. Esta ruta es de gran importancia debido a su implicación en el crecimiento invasivo y en la síntesis de la pared celular (Csank *et al.*, 1998) y, tal y como hemos mencionado, su ausencia determina una alterada exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano en la pared fúngica. Por ello, nos pareció interesante estudiar cómo afectan dichas alteraciones al establecimiento del equilibrio comensal en el intestino. En este trabajo hemos incluidos el comportamiento de dos mutantes: los mutantes *cek1*, alterados en la MAPK de la ruta de invasión y los mutantes *msb2*, defectuosos en una mucina que señala hacia esta MAPK (activándola) en respuesta, entre otros estímulos, a daños en la pared celular. Los fenotipos y comportamientos de ambos mutantes (ver Discusión) son similares en muchos aspectos pero no idénticos.

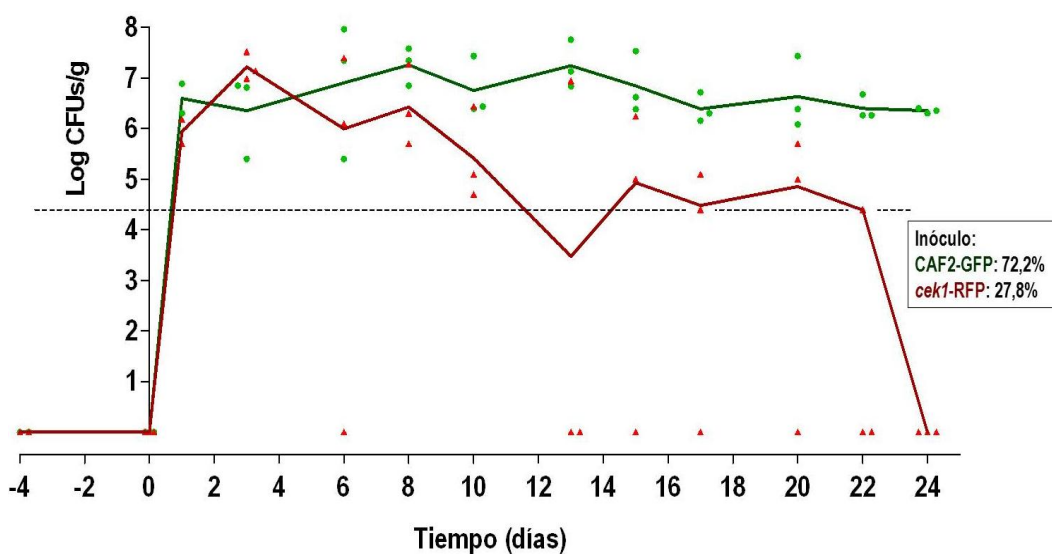
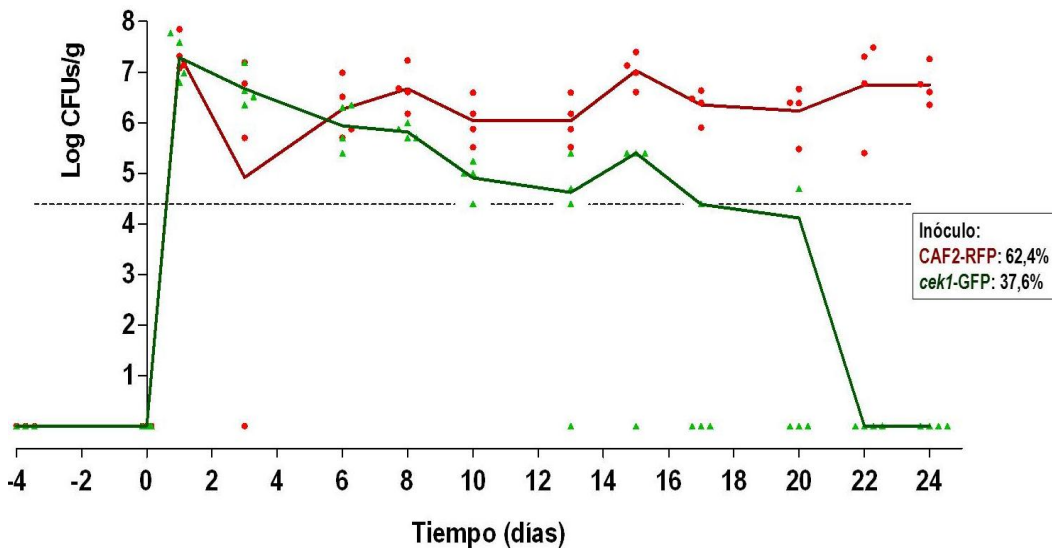
#### b.1. Colonización del mutante *cek1*

Para estudiar el papel de *Cek1* durante la colonización se diseñó un experimento de competición entre el mutante y la cepa parental isogénica utilizando la metodología de doble marcaje previamente validada y ya comentada. Se utilizaron, en este caso, las dos opciones de marcaje: CAF2- $CaRFP^{REP}$  con *cek1-MoGFP<sup>REP</sup>* y CAF2- $MoGFP^{REP}$  con *cek1-CaRFP<sup>REP</sup>*. Se prepararon las mezclas a inocular, introduciéndose intragástricamente en ratones pre-tratados con la combinación antibiótica estándar, haciéndose un seguimiento en heces de la permanencia de cada cepa.

A lo largo del experimento se observó la pérdida gradual del mutante *cek1* con el tiempo, a pesar de encontrarse en concentraciones similares o incluso superiores a los de la parental en los primeros días tras la inoculación (Figura 59). Así, hasta el octavo día tras las inoculación no se aprecia una clara predominancia entre ninguna de las cepas ensayadas, manteniéndose ambas en niveles similares de alrededor de  $10^6$ - $10^7$  células

fúngicas por gramo de heces. Sin embargo a partir de ese día se aprecia una disminución en la permanencia del mutante *cek1*, que se mantiene en niveles medios de entre  $1,3 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^5$  hasta aproximadamente 20-22 días tras la inoculación. La presencia de este mutante en heces fue indetectable a partir del día 24. La disminución paulatina, manteniéndose en niveles intermedios durante una media de 21 días sugiere, por tanto, un problema de adaptación al nicho con el tiempo. Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas cuando ambas cepas fueron crecidas de forma simultánea *in vitro* en medio de cultivo de laboratorio a  $37^\circ\text{C}$  lo cual demuestra que el comportamiento observado *in vivo* no se debe a defectos de crecimiento inherentes a la presencia o no de esta MAPK.

Al ajustar a una recta la evolución de los niveles del mutante *cek1* se observa que las pendientes de ambos experimentos no son significativamente distintas ( $p=0,4157$ ). El valor de la pendiente global obtenida indica que, en general, se pierden de media 0,13 unidades logarítmicas de CFUs/gramo por día.



### Figura 59. Capacidad de colonización del mutante *cek1* en competición con su parental.

Se muestran los valores medios de unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones (n=4) inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los círculos indican cepa parental (CAF2), mientras que los triángulos representan al mutante (*cek1*). El color verde implica la presencia de GFP y el rojo la expresión de <sup>Ca</sup>RFP. Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección. Se indica asimismo la composición del inóculo utilizado en cada caso calculado por siembra en medio SD y recuento de CFUs.

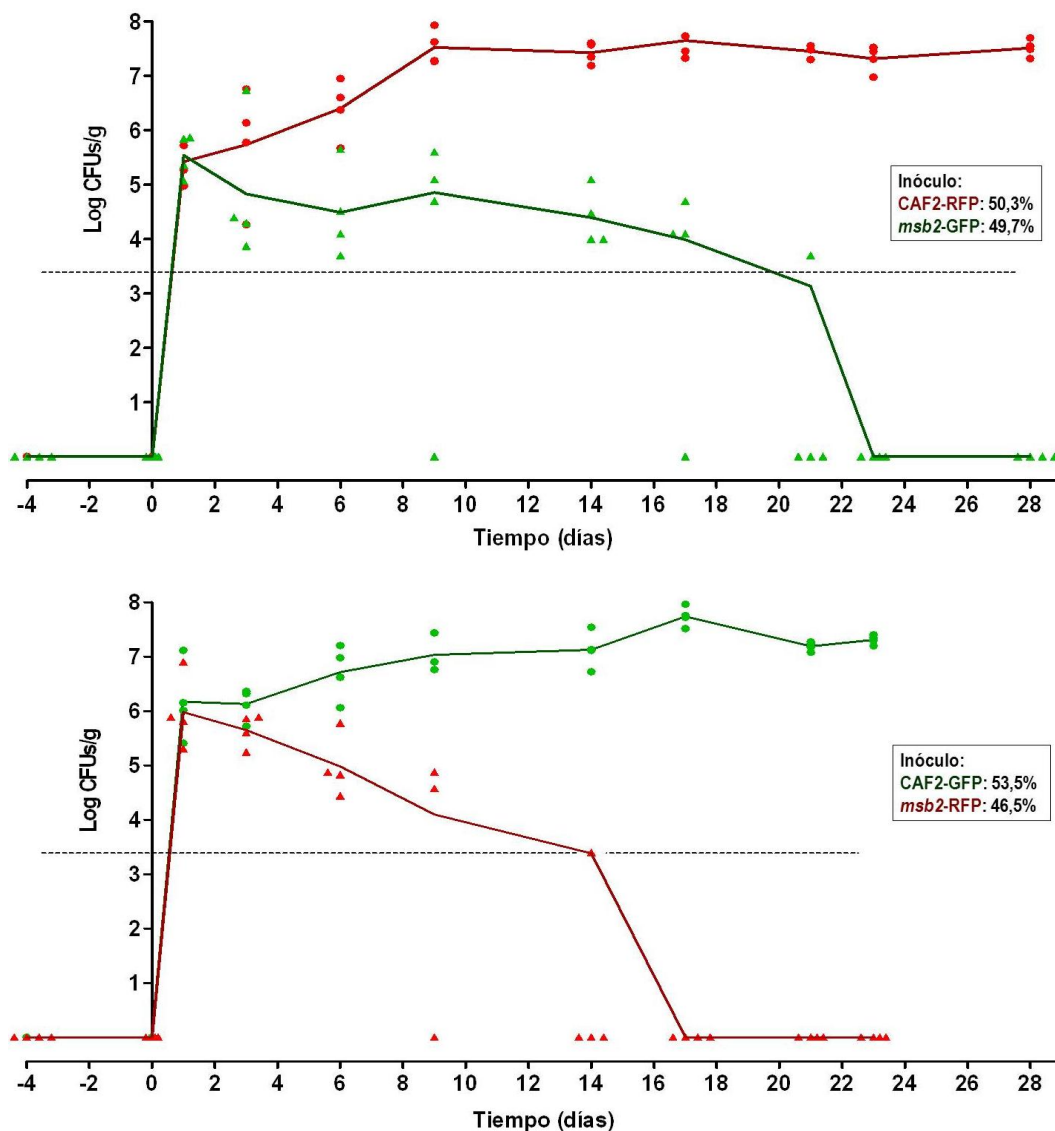
Estos datos indican la relevancia de la MAPK Cek1 en el establecimiento de *C. albicans* a nivel gastrointestinal en ratón.

#### b.2. Colonización del mutante *msb2*

Para determinar si el defecto en colonización del mutante *cek1* es dependiente de su activación por señalización mediada por la mucina Msb2, se planteó un experimento de competición similar al anterior. Se emplearon, de nuevo, las dos opciones de marcaje, sin observarse una diferencia relevante entre ellas. Se inocularon las mezclas CAF2-<sup>Ca</sup>RFP<sup>REP</sup> con *msb2*-<sup>Mo</sup>GFP<sup>REP</sup> y, por otro lado, CAF2-<sup>Mo</sup>GFP<sup>REP</sup> con *msb2*-<sup>Ca</sup>RFP<sup>REP</sup> tras el tratamiento antibiótico estándar.

El seguimiento en heces de las dos parejas de cepas mostró una pérdida de *msb2* con el tiempo similar a la observada en el mutante *cek1*. En éste caso, se partió igualmente de concentraciones similares a la parental en los primeros días tras la inoculación, produciéndose una disminución notable a partir del sexto día. El mutante se mantuvo en niveles medios de entre  $1,4 \times 10^3$  y  $9,6 \times 10^4$  CFUs por gramo hasta un tiempo de 14 y 21 días tras la inoculación disminuyendo, posteriormente, a valores prácticamente indetectable (Figura 60).

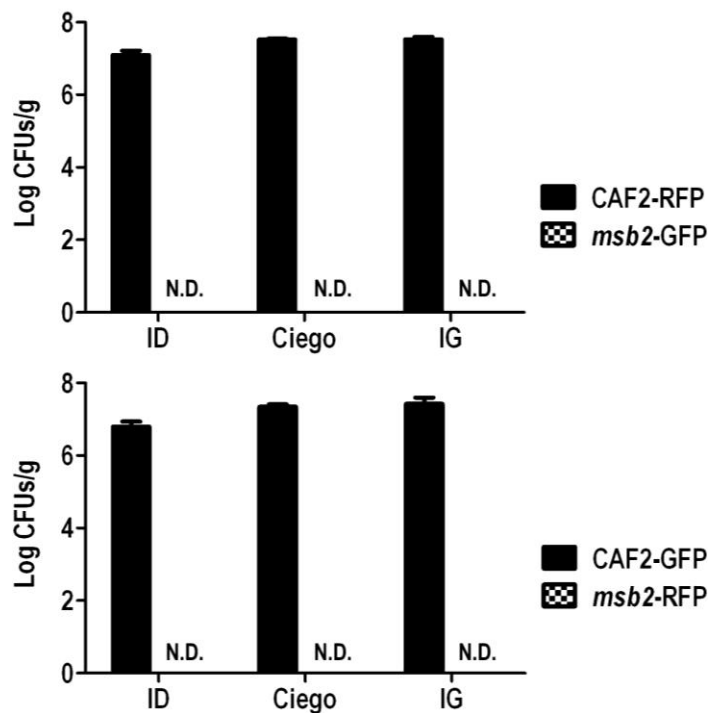
En el caso del mutante *msb2*, la correlación de las caídas de los niveles a una recta determina pendientes distintas en cada ensayo, aunque manteniendo una tendencia similar. En el primer caso se estimó una disminución media de 0,1 unidades logarítmicas de CFUs/gramo por día, mientras que en el segundo ensayo se obtiene una disminución media de 0,22 unidades logarítmicas de CFUs/gramo por día.



**Figura 60. Capacidad de colonización del mutante *msb2* en competición con su parental.**

Se muestran los valores medios de unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los círculos indican cepa parental (CAF2), mientras que los triángulos representan al mutante (*msb2*). El color verde implica presencia de GFP y el rojo expresión de  $CaRFP$ . Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección. Se indica la composición del inóculo determinado por siembra en medio SD y recuento de CFUs.

Se analizó, además, la presencia de CAF2 y *msb2* en intestino tras el periodo de seguimiento (día 24), para confirmar que la desaparición del mutante en heces se corresponde con su ausencia en el tracto digestivo. No se encontró células del mutante *msb2* en intestino delgado, ciego o en colon (Figura 61).



**Figura 61. Presencia de las cepas CAF2 y *msb2* en el lumen intestinal.**

Se representa la cantidad de *C. albicans* por gramo de contenido intestinal en diferentes porciones del tracto intestinal: ID refiere a intestino delgado e IG a intestino grueso. Se determinó por siembra en medio sólido y recuento de CFUs de la muestra. N.D. = No Detectado.

### c) Relevancia de la ruta HOG en colonización

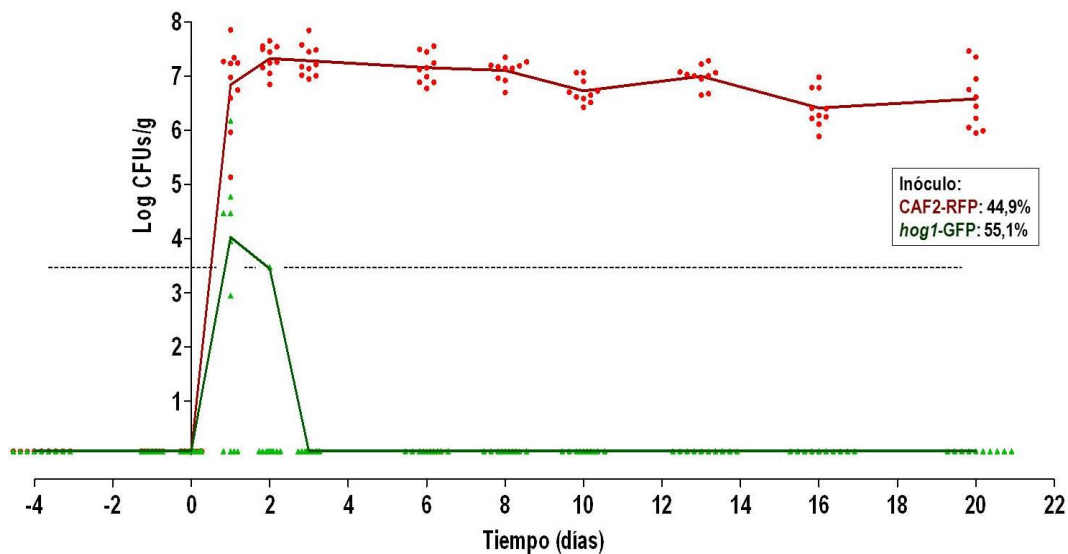
La ruta HOG, mediada por la MAPK Hog1, está implicada en la respuesta a numerosas situaciones de estrés, como son un aumento de la osmolaridad del medio, agentes oxidantes y presencia de metales pesados, entre otros (Alonso-Monge *et al.*, 2006). Los mutantes en esta ruta son menos virulentos a pesar de tener un fenotipo de hiperfilamentación (Alonso-Monge *et al.*, 1999). La MAPKK Pbs2 controla la activación de Hog1 y muestra numerosos fenotipos similares a los de los mutantes *hog1* (Arana *et al.*, 2005). De forma similar, nos planteamos estudiar su relevancia en el proceso de colonización gastrointestinal.

#### c.1. Colonización del mutante *hog1*

El comportamiento del mutante *hog1* se estudió mediante la realización de un experimento de competición con la cepa parental. Se utilizaron, para ello, las cepas CAF2- $\text{CaRFP}^{\text{REP}}$  y *hog1*- $\text{MoGFP}^{\text{REP}}$  y se preparó un inóculo que se administró a ratones tratados con antibiótico, siguiéndose en heces la evolución a lo largo del tiempo de cada una de las cepas.

Los resultados obtenidos (Figura 62) muestran claramente la incapacidad de colonizar de la cepa *hog1*. Tan sólo fuimos capaces de detectar niveles muy reducidos ( $10^4$  y  $3,2 \times 10^3$  células por gramo de heces de media) del mutante *hog1* al inicio del proceso (días 1 y 2,

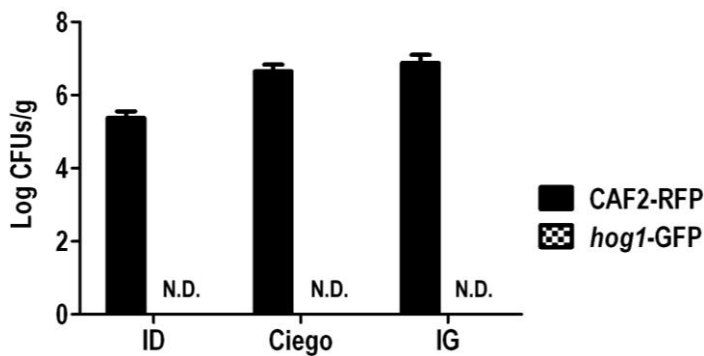
respectivamente). La cinética observada refleja, simplemente, tránsito intestinal y, en ningún caso, la existencia de una colonización real.



**Figura 62. Capacidad de colonización del mutante *hog1* en competición con su cepa parental.**

Se muestran los valores medios de unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los círculos indican cepa parental (CAF2), mientras que los triángulos representan al mutante (*hog1*). El color verde implica presencia de GFP y el rojo expresión de  $C^{\alpha}$ RFP. Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección. Se indica la composición del inóculo determinado por siembra en medio SD y recuento de CFUs.

Complementariamente, se analizó el contenido intestinal para descartar la presencia del mutante en dicho tracto a día 20. Se confirmó el mantenimiento de la cepa silvestre en las proporciones habituales, sin detectarse la presencia del mutante en ningún caso (Figura 63).



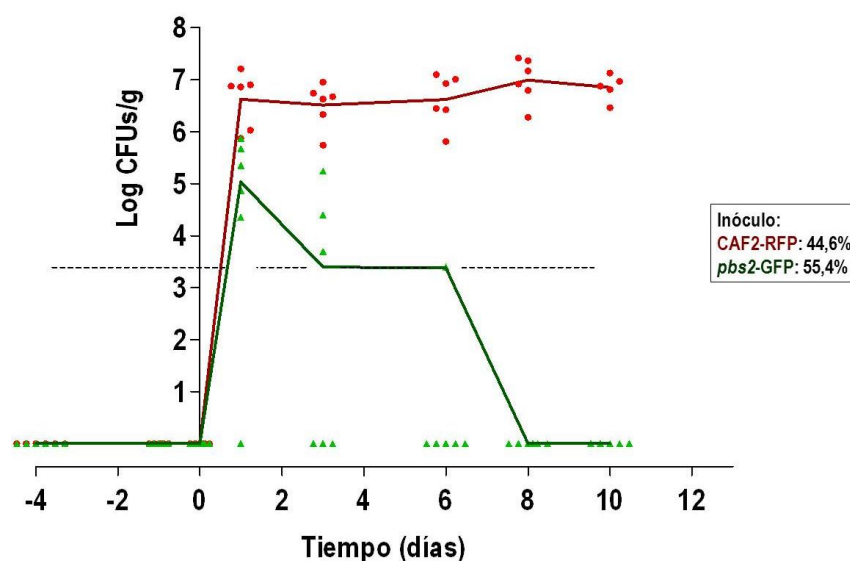
**Figura 63. Presencia de las cepas CAF2 y *hog1* en interior intestinal.**

Se representa la cantidad de *C. albicans* por gramo de contenido intestinal en diferentes porciones del tracto intestinal: ID refiere a intestino delgado e IG a intestino grueso. Se determinó por siembra en medio sólido y recuento de CFUs de la muestra. N.D. = No Detectado.

### c.2. Colonización del mutante *pbs2*

De forma similar, se comprobó la capacidad de establecimiento del mutante *pbs2*. En este experimento de competición se emplearon las cepas CAF2-*CaRFP*<sup>REP</sup> y *pbs2*-*MoGFP*<sup>REP</sup>, que fueron inoculadas en ratones en tratamiento con el cóctel antibiótico oral.

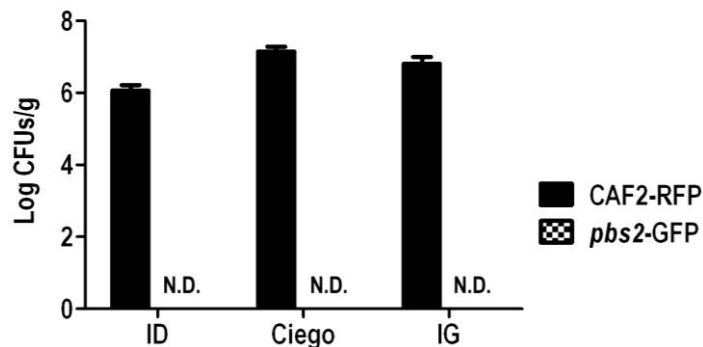
El perfil de colonización *pbs2* (Figura 64) resultó similar, aunque menos drástico, al observado en el mutante *hog1*. Se alcanzó un mayor nivel en inicio ( $10^5$  CFUs por gramo el día 1) aunque éste decae rápidamente a valores de  $2,5 \times 10^3$  CFUs/gramo (alrededor del límite de detección) a día 3 y 6, siendo prácticamente indetectable en días posteriores. Este comportamiento es similar al de una cepa silvestre colonizando ratones con microbiota sin alterar (ver Resultados 3.A.c.1 y c.3), lo que podría indicar una dificultad de adaptación al nicho análoga a la existente en alteraciones de la ruta HOG.



### Figura 64. Capacidad de colonización del mutante *pbs2* en competición con su parental.

Se muestran los valores medios de unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los círculos indican cepa parental (CAF2), mientras que los triángulos representan al mutante (*pbs2*). El color verde implica presencia de GFP y el rojo expresión de  $\text{CaRFP}$ . Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección. Se indica la composición del inóculo determinado por siembra en medio SD y recuento de CFUs.

Asimismo, el análisis del contenido intestinal a día 10 confirmó la ausencia del mutante a lo largo del tracto gastrointestinal de los ratones ensayados (Figura 65).



### Figura 65. Presencia de las cepas CAF2 y *pbs2* en interior intestinal.

Se representa la cantidad de *C. albicans* por gramo de contenido intestinal en diferentes porciones del tracto intestinal: ID refiere a intestino delgado e IG a intestino grueso. Se determinó por siembra en medio sólido y recuento de CFUs de la muestra. N.D. = No Detectado.

Colectivamente, estos datos indican la relevancia de la ruta HOG en el establecimiento de *C. albicans* en el tracto intestinal del ratón en el modelo de colonización utilizado.

#### d) Papel de la ruta de integridad celular en la colonización por *C. albicans*: Colonización del mutante *mkc1*

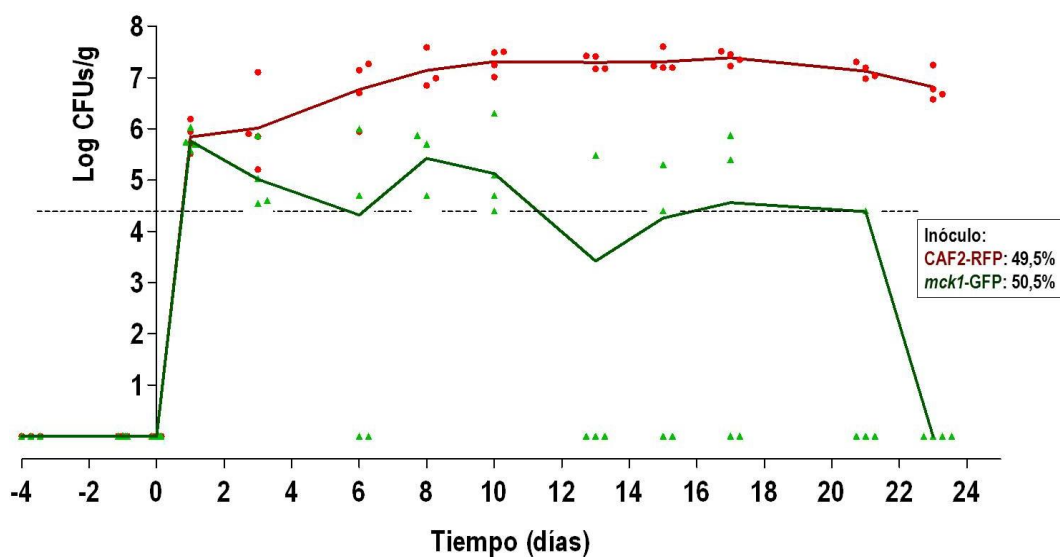
La ruta de integridad celular está mediada por la MAPK Mkc1. Esta ruta, está implicada en la respuesta frente al daño en la pared celular y en la formación de biopelículas (Navarro-García *et al.*, 1995; Navarro-García *et al.*, 1998; Kumamoto, 2005). Además, se ha relacionado esta ruta con la virulencia de *C. albicans* en el modelo sistémico en ratón, observándose una reducción de virulencia en mutantes *mkc1* (Diez-Orejas *et al.*, 1997).

El ensayo de competición establecido para determinar la relevancia de la MAPK Mkc1 en colonización *in vivo* fue similar a los descritos anteriormente. Las cepas involucradas fueron CAF2- $\text{CaRFP}^{\text{REP}}$  y *mkc1*- $\text{MoGFP}^{\text{REP}}$ , las cuales se inocularon en una mezcla de proporciones similares, en ratones con el tratamiento antibiótico en el agua de bebida.

El seguimiento de la presencia de *C. albicans* en heces mostró un defecto en la capacidad de colonización de la cepa *mkc1*, ya que tras un periodo inicial manteniéndose en niveles medios de colonización termina desapareciendo (Figura 66). Tras ser detectado a los mismos niveles que la parental a día 1, el mutante *mkc1* comienza a disminuir en su grado de colonización. Así, a día 3 ya disminuye el número de células por gramo detectadas de media a  $10^5$  mientras que la parental es capaz de establecerse a niveles estables entre  $10^6$  y  $10^7$ . Esta situación parece mantenerse hasta 10 días tras la inoculación, sin embargo a partir del día 13 los niveles medios detectados en heces están alrededor de  $4,4 \times 10^4$  (límite de detección). Finalmente, a partir del vigésimo primer día la presencia del mutante *mkc1* es prácticamente indetectable.

El mantenimiento a niveles medios hasta 17-21 días indica un problema de adaptación con el tiempo. Este hecho sugiere que esta ruta es importante para establecer una colonización eficaz del nicho intestinal.

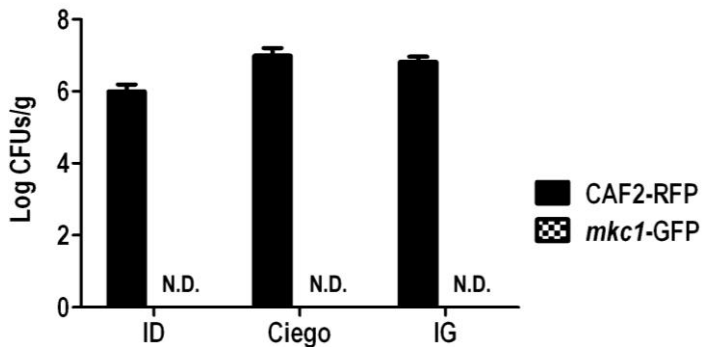
Al ajustar la evolución de los niveles del mutante *mkc1* a una recta se calcula una pérdida de media de 0,063 unidades logarítmicas de CFUs/gramo por día.



**Figura 66. Capacidad de colonización del mutante *mkc1* en competición con su parental.**

Se muestran los valores medios de unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenidas a distintos tiempos de heces de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo (desde día -4). Los círculos indican la cepa parental (CAF2), mientras que los triángulos representan al mutante (*mkc1*). El color verde implica presencia de GFP y el rojo expresión de  $CaRFP$ . Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección. Se indica la composición del inóculo determinado por siembra en medio SD y recuento de CFUs.

El análisis del contenido intestinal *post mortem* (día 24) mostró la pérdida total del mutante *mkc1* en los distintos tramos examinados: intestino delgado, ciego y colon. Se confirmó, así, el dato obtenido de las muestras de heces (Figura 67).



**Figura 67. Presencia de las cepas CAF2 y *mkc1* en interior intestinal.**

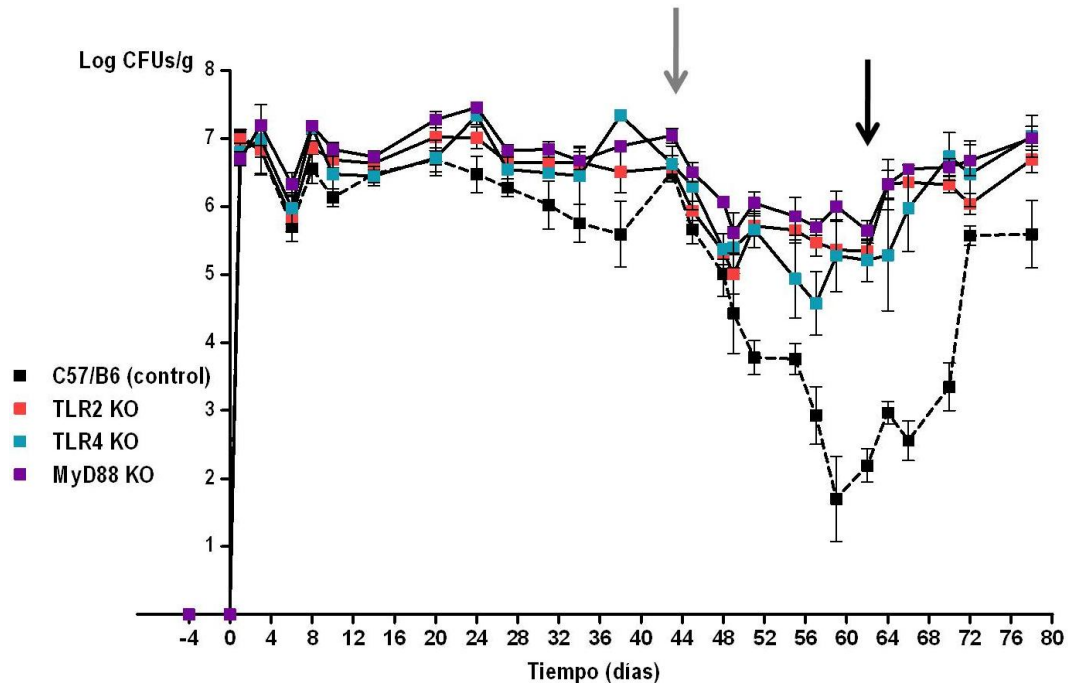
Se representa la cantidad de *C. albicans* por gramo de contenido intestinal en diferentes porciones del tracto: ID refiere a intestino delgado e IG a intestino grueso. Se determinó por siembra en medio sólido y recuento de CFUs de la muestra. N.D.= No Detectado.

### C. Colonización de ratones *Tlr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> y *Myd88*<sup>-/-</sup>

Los factores que influyen en la capacidad de colonización por *C. albicans* incluyen aspectos relacionados con el propio hongo, la microbiota intestinal y las defensas del hospedador. La relevancia de los receptores tipo Toll en la inmunidad innata (y más concretamente en el reconocimiento de los PAMPs), los convierten en un punto clave en la interacción con la microbiota intestinal, tanto bacteriana como fúngica. Dada la disponibilidad de estos ratones por el grupo de la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Gil (Universidad de Valencia), nos pareció relevante determinar el papel que estos receptores pudieran tener el establecimiento de un equilibrio comensal con *C. albicans*. Para ello, estudiamos la colonización por *C. albicans* en ratones defectivos en elementos de la señalización por TLRs, como son TLR2, TLR4 y la molécula adaptadora MyD88 utilizando el procedimiento descrito a lo largo de esta Tesis. Estos resultados se muestran en la Figura 68.

Como puede observarse, los niveles de colonización por *C. albicans* medidos en los grupos de ratones KO (*Tlr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> y *Myd88*<sup>-/-</sup>) fueron similares, sin que se detectaran diferencias estadísticamente significativas en comparación con ratones silvestres C57BL/6 durante más de 40 días. Sin embargo, se observó un comportamiento diferencial al eliminar el tratamiento antibiótico que, tal y como hemos mostrado, es crítico para el establecimiento del hongo en condiciones normales (Figura 68, flecha gris). La disminución de la colonización observada en el grupo de ratones silvestres no fue tal en los ratones defectivos en TLRs, en los cuales sí apareció una ligera disminución (de entre  $3,2 \times 10^6$ - $10^7$  a entre  $1$  y  $3,5 \times 10^5$  CFUs/gramo de heces) seguida de un mantenimiento estable en aproximadamente una décima parte de los niveles anteriores ( $3,5 \times 10^5$ ). Al reincorporar el cóctel antibiótico los valores de colonización volvieron a los subir a los

niveles de inicio (Figura 68, flecha negra) tanto en el grupo control que recuperó niveles de  $4 \times 10^5$  CFUs/gramo desde apenas  $10^2$ , en aproximadamente 10 días, como en los ratones *knockout* en los que se volvieron a detectar niveles por encima de  $4 \times 10^6$  CFUs por gramo de heces.



**Figura 68. Colonización por *C. albicans* en ratones defectivos en TLR2, TLR4 y MyD88.**

Se ensayaron, en dos experimentos independientes, 4 grupos de ratones (n=3-5 por grupo) inoculados con tratamiento antibiótico previo según el protocolo descrito. Se muestran los valores logarítmicos medios de las unidades formadoras de colonia por gramo de heces correspondientes a *C. albicans*. Los colores indican la cepa de ratón empleada: silvestre, C57BL/6 (negro), TLR2 KO (rojo), TLR4 KO (azul) y MyD88 KO (morado). Las barras de error representan el error estándar de la media. La flecha gris indica el día en que se retira el cóctel antibacteriano del agua de bebida, mientras que la flecha negra indica el día en que se reinstauró el tratamiento antibiótico habitual al agua de bebida.

Es difícil determinar, por el momento, si este efecto es directo, consecuencia de la falta reconocimiento del hongo por los TLRs, o indirecto, por una alteración significativa, por ejemplo, de la microbiota en los ratones KO.

#### D. Infección de órganos diana por *C. albicans*

La utilidad del modelo de colonización gastrointestinal desarrollado en este trabajo nos permite abordar otro proceso de interés como es la diseminación del hongo hacia órganos diana por vía sanguínea o linfática. Este proceso es inherente al desarrollo de una

candidiasis sistémica y es, con frecuencia, fatal. Entre los órganos diana afectados destacan el hígado, el riñón y el cerebro, donde se multiplica fácilmente, así como los ganglios linfáticos, donde tiene lugar una interacción con el sistema inmune que condiciona y modula la respuesta, y el control de la infección.

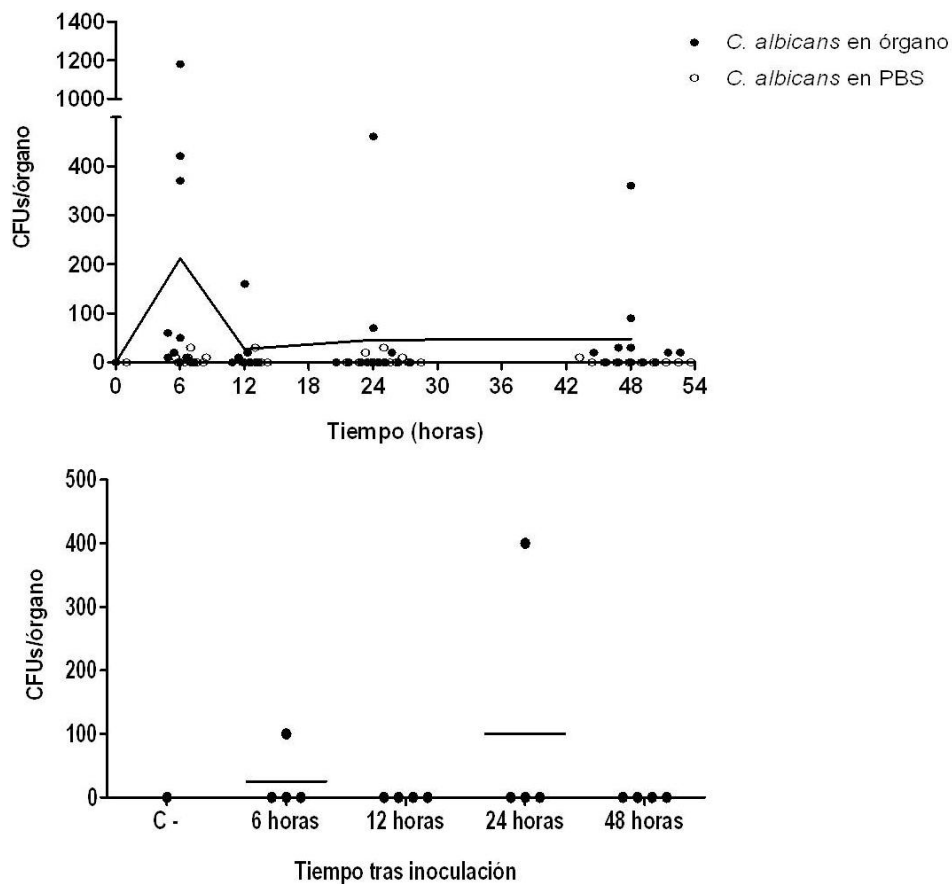
Así pues, nos planteamos el estudio de la diseminación a estos dos grupos de órganos utilizando dos modelos diferentes.

## a) Diseminación de *C. albicans* de origen gastrointestinal

### a.1. Ratones inmunocompetentes

Una aproximación técnica al estudio de la invasión se centra en su detección en órganos linfoides secundarios, ya que el mantenimiento del equilibrio comensal hace que no exista una diseminación hematógena y, por tanto, que no se detecte la presencia del hongo en hígado, riñón o cerebro. Se ha visto que algunas bacterias comensales son detectadas en placas de Peyer (PP) y en ganglios mesentéricos (MLN) durante un tiempo inicial limitado tras su inoculación intragástrica (Macpherson and Uhr, 2004). Este fenómeno apoya el hecho de que existe un continuo contacto del sistema inmune, a través de los MLN, con la microbiota que permite establecer la relación comensal. Nosotros quisimos evidenciar si durante el proceso de colonización gastrointestinal por *C. albicans* era posible detectar la presencia del hongo en órganos linfoides secundarios.

Para ello, obtuvimos las PPs y los MLN tras la inoculación intragástrica de ratones a 6, 12, 24 y 48 horas tras la inoculación (según se describen en Materiales y Métodos 7.B.a). Tal y como se muestra en la figura, fuimos capaces de detectar una pequeña presencia del hongo en éstos órganos (Figura 69). A pesar de la alta variabilidad entre individuos, nuestros resultados sugieren que tiene lugar un paso inicial por placas de Peyer (detectado a las 6 horas), desde donde, tras un cierto periodo, el hongo pasaría a ganglios mesentéricos (detectado a las 24 horas). Sin embargo, somos conscientes de que la baja reproducibilidad y limitaciones técnicas de este procedimiento requiere una optimización del mismo antes de extraer conclusiones.



**Figura 69. Presencia de *C. albicans* en placas de Peyer (PP) y ganglios mesentéricos (MLN).**

El gráfico superior indica las CFUs detectadas en distintas placas de Peyer de un lote de ratones ( $n=4$ ) a los tiempos indicados (6, 12, 24 y 48 h) tras la inoculación de  $10^8$  levaduras. Los símbolos abiertos representan las CFUs detectadas en el PBS del último lavado de cada placa de Peyer como indicativo de contaminación con el lumen intestinal (ver Materiales y Métodos). En el gráfico inferior se representan las CFUs detectadas en los ganglios mesentéricos de cuatro ratones a los tiempos indicados tras inoculación. Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección y la línea horizontal indica la media de los valores.

## a.2. Ratones inmunocomprometidos

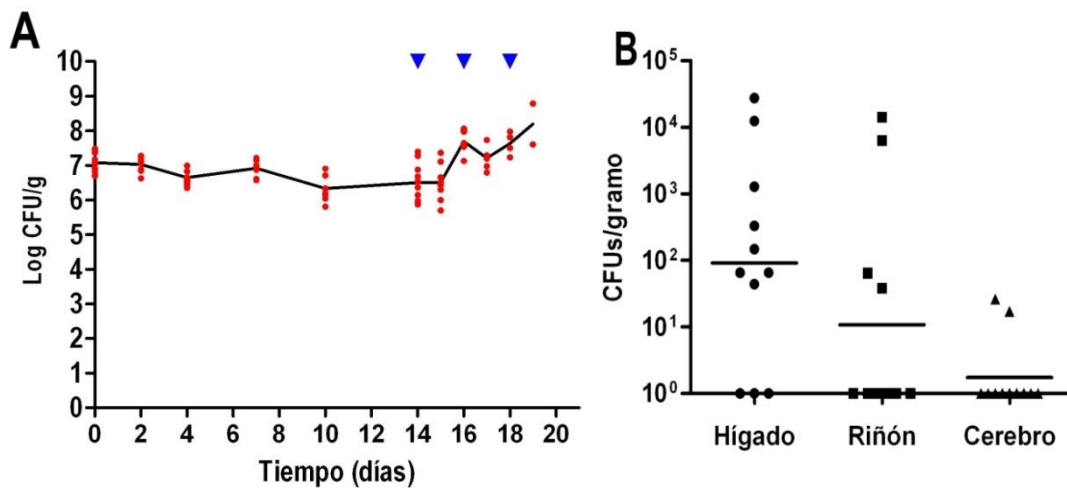
Se ha descrito que el tratamiento de ratones colonizados con *C. albicans* a una inmunosupresión farmacológica favorece el paso del hongo desde el intestino a vía sanguínea, pudiendo llegar a causar la muerte del animal (Koh *et al.*, 2008).

En nuestro caso, observamos que el tratamiento con ciclofosfamida vía intraperitoneal provoca un aumento de la colonización gastrointestinal (Figura 70A). En efecto, dos días tras el inicio del tratamiento se detecta un nivel medio de  $4 \times 10^7$  CFUs por gramo que se mantiene estable hasta el sacrificio de los animales. Estos niveles son significativamente

superiores ( $p < 0,001$  en  $t$  de Student) a los detectados previamente al tratamiento con ciclofosfamida, correspondientes a  $3,2 \times 10^6$  CFUs/gramo de heces.

Por otro lado, el estudio *post mortem* de ratones tratados con ciclofosfamida permitió detectar la presencia del hongo en órganos diana (Figura 70B). Así, se establece un estado de inmunodepresión suficiente para detectar la presencia del hongo en hígado (una media de  $10^2$  células/gramo de órgano) y riñón (una media de 10 células/gramo de órgano), siendo más errática la detección en cerebro (Figura 70B). En ocasiones, esta diseminación a órganos diana dependiente de inmunosupresión no ha sido detectada, lo cual sugiere la existencia de más factores implicados en dicho proceso.

A pesar de todo, la aplicación de ensayos de competición a este modelo permitiría determinar y estudiar la importancia de factores de virulencia implicados en el proceso de diseminación, pero no en el de colonización (paso previo necesario).



**Figura 70. Diseminación a órganos diana de *C. albicans* tras inmunosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones colonizados gastrointestinalmente.**

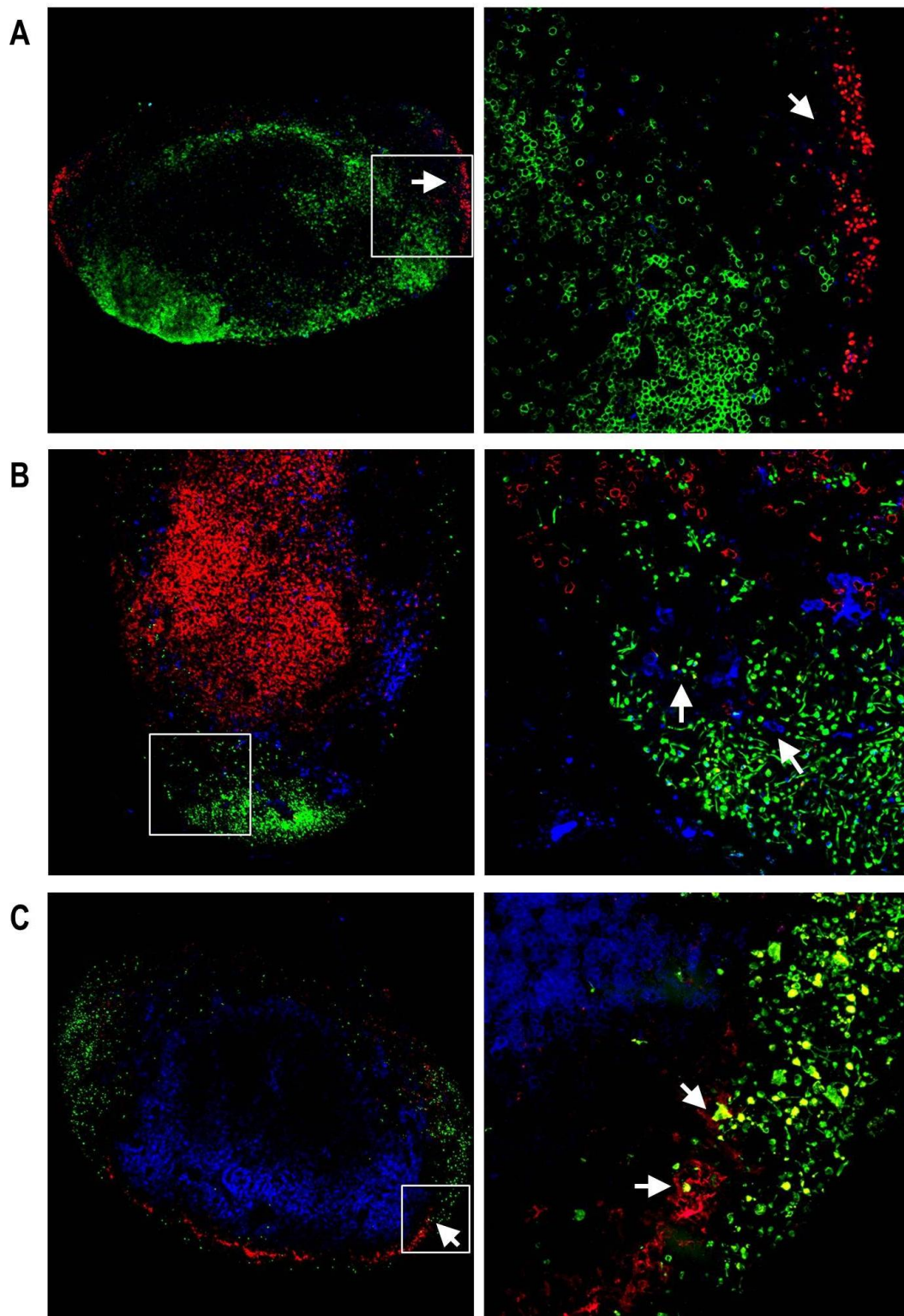
La gráfica A muestra los valores logarítmicos medios de las unidades formadoras de colonia correspondientes a *C. albicans* obtenida de heces a distintos tiempos durante el tratamiento con ciclofosfamida (triángulos azules), de un grupo de ratones inoculados con tratamiento antibiótico previo según el protocolo descrito. El gráfico de barras B indica los niveles de diseminación de *C. albicans* obtenidos en los distintos órganos diana tras el tratamiento con ciclofosfamida. Los símbolos en cero indican que el valor está por debajo del límite de detección.

## b) Análisis de la diseminación de *C. albicans* por vía linfática en el modelo de ganglio poplíteo

Debido a la dificultad en obtener un alto número de células fúngicas en MLN tras la inoculación intragástrica, se utilizó un segundo modelo para el estudio de *C. albicans* en ganglios linfáticos. La inoculación de microorganismos en la planta del pie del animal (IFP, *intra footpath*) determina su transporte vía linfática hacia el ganglio poplíteo (GP), localizado detrás de la rodilla. Este ganglio puede ser aislado con facilidad para su posterior análisis.

En colaboración con el grupo del Dr. Ulrich von Andrian (Harvard Medical School, Boston, EEUU), llevamos a cabo distintos experimentos para la puesta a punto de un método de detección en GP de *C. albicans* tras su inoculación IFP utilizando distintas dosis y distintos tiempos. Para ello, se estudiaron distintas dosis ( $10^6$  y  $10^7$  levaduras inoculadas) y distintos tiempos (1, 4, 6, 8, 12 y 24 horas) que permitieran una detección correcta del hongo en el ganglio poplíteo. Así, pudimos determinar que la detección óptima se consigue en las primeras horas, ya que se observa su presencia desde 1 hora (Figura 71A) hasta 4 horas (Figura 71B y C) tras la inoculación. A tiempos más prolongados no se detecta o sólo de forma marginal, lo que sugiere un completo aclaramiento del hongo.

Además se determinó la localización típica de *C. albicans* al llegar al GP, que resulta ser en el área subcapsular (Figura 71A), donde existe una aglomeración de macrófagos con los que parece interactuar y que podrían ser los responsables de su eliminación (Figura 71C). La relación con otro tipo de células inmunitarias residentes en ganglios como son linfocitos T, linfocitos B o células dendríticas parece ser más casual y menos relevante (Figura 71) en este ambiente.



**Figura 71. Visualización de la infección del ganglio poplíteo por *C. albicans*.**

Las imágenes mostradas corresponden a criocortes de ganglios poplíteos recogidos a distintos tiempos de ratones inoculados con *C. albicans* en la planta del pie. Las muestras fueron teñidas con anticuerpos específicos y observadas mediante un microscopio confocal (ver Materiales y Métodos 5.B.c). Los cuadrados delimitan la zona correspondiente a la ampliación mostrada a la derecha. Las correspondencias de colores son las siguientes:

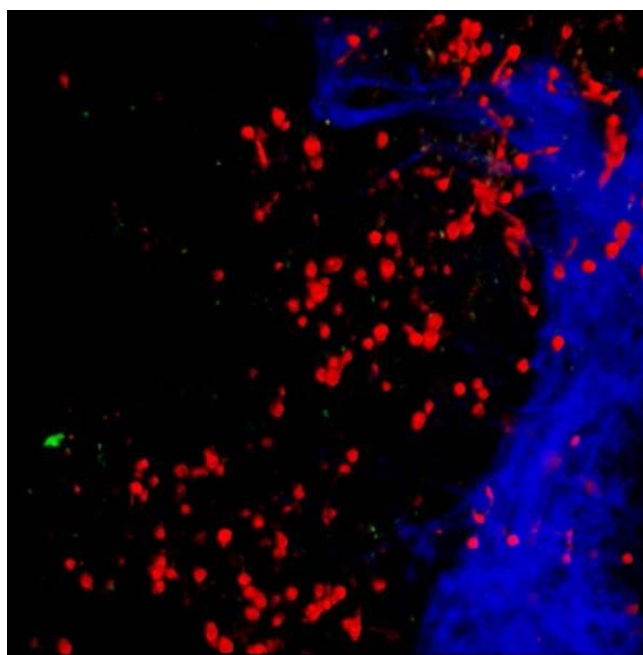
**A:** Rojo: *C. albicans* (CAF2-<sup>Cα</sup>RFP<sup>REP</sup>), Verde: linfocitos B y Azul: linfocitos T<sub>γδ</sub>.

**B:** Rojo: linfocitos T, Verde: *C. albicans* (CAF2-<sup>Mo</sup>GFP<sup>REP</sup>) y Azul: células dendríticas.

**C:** Rojo: macrófagos, Verde: *C. albicans* (CAF2-<sup>Mo</sup>GFP<sup>REP</sup>) y Azul: linfocitos B.

Una vez comprobada la capacidad de detectar el hongo marcado en ganglio poplíteo, tras su escisión, nos planteamos aplicar el sistema de infección *in vivo* y visualización *intra vital* en ratón, con la finalidad de poder observar la infección desencadenada mediante la utilización de microscopía multifotón (MPM). Con este tipo de microscopía se pueden generar imágenes fluorescente en tejidos sólidos intactos por su mayor poder de penetración (Denk *et al.*, 1990). La combinación de esta tecnología con la microscopía intravital (MP-IVM), que permite el estudio *in vivo* de poblaciones de diferentes células inmunitarias en órganos linfoides y tejidos periféricos, capacita el estudio de la migración celular mediante reconstrucciones tridimensionales en tejidos (Cahalan *et al.*, 2002).

Para facilitar la identificación de los folículos del ganglio poplíteo durante la visualización *intra-vital* se prepararon ratones quimera por transferencia adoptiva de LB marcados con GFP. Para ello se realizó una purificación de linfocitos B (LB) procedentes de ratones marcado con GFP en todas las células expresando las moléculas presentadoras MHC II, como son LB y DCs (Boes *et al.*, 2002) y a continuación fueron transferidas a ratones C57BL/6 mediante inyección intravenosa. Este proceso conlleva la migración de LB marcados a ganglios linfáticos, donde se habrá una población mixta de LB marcados y no marcados. Tras 24 horas, se procedió a la inoculación de la cepa CAF2-RFP<sup>REP</sup> por inyección en planta del pie. A las 4 horas post-inyección, el ratón fue anestesiado y mediante cirugía (incisión detrás de la rodilla) se accedió al nódulo linfático poplíteo para ser visualizado finalmente mediante microscopía multifotón. El video obtenido (Figura 72) muestra la visualización de la infección por *C. albicans* (en rojo) en un entorno vivo, apreciándose una movilidad mayor a la esperada.



**Figura 72. Observación *intra-vital* de *C. albicans* en ganglio linfático poplíteo.**

La película mostrada fue generada por imágenes tomadas en una preparación *intra vital* del ganglio poplíteo con un microscopio de dos fotones, cuatro horas tras la inoculación en planta del pie de la cepa CAF2-RFP<sup>REP</sup>. En verde se observan los LB procedentes de la transferencia adoptiva, en rojo se muestra *C. albicans* y en azul la señal del segundo armónico correspondiente a fibras de colágeno en la cápsula de ganglio. El vídeo completo se apota en soporte digital.

## Discusión

---



Conocer cómo los microorganismos patógenos se adaptan al medio que les rodea, colonizan un hospedador y producen enfermedades, es de enorme relevancia si queremos diseñar estrategias eficientes con las que combatir las infecciones que causan. La interacción entre hongos y las células de mamífero del hospedador es un área esencial para el diseño de nuevos enfoques hacia el control de las infecciones fúngicas. Ello permitiría, en una primera etapa, identificar cuál o cuáles son los procesos específicos de un patógeno (si es que existen) necesarios para el desarrollo de la infección así como las dianas moleculares responsables de ello y, en una segunda, diseñar fármacos eficientes que los bloqueen.

En el caso de patógenos oportunistas, el concepto de factor de virulencia es conceptualmente complejo (Casadevall and Pirofski, 1999;Odds *et al.*, 2003;Casadevall and Pirofski, 2003;2004) puesto que es realmente el sistema inmunitario y los mecanismos de defensa innatos del huésped los que controlan la aparición de la enfermedad, contribuyendo estos últimos, en muchos casos, a la propia patología (Casadevall and Pirofski, 2003). Sin embargo, es evidente que el bloqueo de aquellos procesos que condicionan el establecimiento, proliferación y daño al huésped es relevante desde el punto de vista clínico. Así, aun cuando la industria farmacéutica busca normalmente dianas de amplio espectro que garanticen la rentabilidad de la inversión hecha, nuevos antibióticos basados en dianas específicas de un determinado patógeno (fúngico en nuestro caso) presentarían ciertas ventajas frente a la terapia antifúngica tradicional. Por ejemplo, su presumible novedad en el mecanismo de acción podría llevar aparejada también una novedad estructural. Así, podrían ser utilizados de forma sinérgica con los existentes (azoles, equinocandinas, polienos) y permitirían disminuir la aparición y diseminación de resistencias frente a los antifúngicos tradicionales, alargando con ello su vida útil. Su especificidad permitiría también una menor alteración de la microbiota endógena, y con ello, menos posibilidad de aparición de supra infecciones en el curso del tratamiento. Por todo ello, en los últimos años, la búsqueda de estos factores en la levadura oportunista *C. albicans* ha experimentado un enorme auge, fruto también del desarrollo de nuevas metodologías genéticas para su manipulación y de el desarrollo modelos de infección adecuados. Buena parte de los estudios en el campo de la patogénesis fúngica se centran en conocer el mecanismo de adhesión, de invasión y de proliferación en el huésped (desde la perspectiva del patógeno) y de la respuesta inmunitaria (desde la perspectiva del huésped).

En este trabajo hemos estudiado el papel de diversas proteínas que intervienen en la señalización vía cascadas de quinasas de tipo MAP en el patógeno oportunista *C. albicans* que han sido objeto de estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, centrándonos en tres aspectos concretos de interés clínico: <sup>1)</sup> en la exposición superficial del  $\beta$ -(1,3)-glucano de la pared celular, <sup>2)</sup> en la interacción con distintos tipos de células de mamífero y <sup>3)</sup> en la colonización gastrointestinal en un modelo de ratón.

## 1. Reconocimiento inmunitario de mutantes de *C. albicans* alterados en pared

La respuesta inmunitaria del huésped frente a hongos depende en gran medida del reconocimiento de PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), que mayoritariamente forman parte de la pared celular fúngica, por parte de los PRRs (Receptores de Reconocimiento de PAMPs) presentes en células del huésped, principalmente del sistema inmunitario (Romani, 2004; Netea *et al.*, 2008a). Esto hace que las alteraciones en la pared fúngica puedan modular en buena medida dicha respuesta, tanto a nivel innato como adaptativo. La pared celular es una estructura muy organizada a nivel tridimensional, y cuyos principales componentes son polisacáridos de diferente grado de complejidad que, en algunos casos, entran a formar parte de las proteínas que recubren la célula. Es, por ello, un excelente blanco para el diseño de nuevos antifúngicos (Gozalbo *et al.*, 2004).

En los últimos años, se ha empezado a estudiar con cierto detalle el papel de diversos elementos de esta estructura en el reconocimiento inmunitario. Para asociar componentes específicos de la pared a los diferentes PRRs, se han empleado con frecuencia ligandos purificados y, en menor grado, células modificadas que presentan una alteración en la pared de *C. albicans* (Netea *et al.*, 2008a). Ello ha conducido a la identificación de diversos receptores que reconocen componentes específicos de la pared (Netea *et al.*, 2006; Jouault *et al.*, 2006).

Dectina-1 fue identificado como un receptor de  $\beta$ -(1,3)-glucano (Brown and Gordon, 2001; Brown *et al.*, 2003) y es el componente principal de la respuesta mediada por glucanos en el hospedador (Brown *et al.*, 2003; Brown and Gordon, 2005). Este receptor, ampliamente distribuido en mamíferos, se expresa en diversos tipos celulares, principalmente en fagocitos (monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) (Taylor *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2002) siendo capaz de reconocer glucano tanto en forma soluble, como asociado a un soporte celular (Brown, 2006; Rosas *et al.*, 2008). El  $\beta$ -(1,3)-glucano es considerado un componente esencial de la respuesta de tipo proinflamatoria (ver Goodridge *et al.*, 2009 para una revisión) que se desencadena en respuesta a la infección fúngica.

En *C. albicans* la exposición del  $\beta$ -(1,3)-glucano es, generalmente, mínima y localizada en las cicatrices de gemación que resultan de la división celular, por lo que se ha especulado que el crecimiento filamentosos es una estrategia de evasión de dicha respuesta, al no exponer glucano esta morfología en buena parte de su superficie (Gantner *et al.*, 2005). Estudios *ex vivo*, sin embargo, han puesto de manifiesto que realmente el glucano se expone en ambas formas, al menos durante el curso de una infección sistémica (Wheeler *et al.*, 2008). Trabajos con ratones *Dectina-1<sup>-/-</sup>* indicaban una menor respuesta inflamatoria en el curso de una infección sistémica a nivel general y en tejido gastrointestinal (Taylor *et al.*, 2007; Vautier *et al.*, 2012). Recientemente se ha demostrado que estos ratones no muestran alteraciones significativas en el curso de la colonización gastrointestinal, no

detectándose alteración en los niveles de colonización fúngica ni en el patrón de citoquinas producidas por células inmunes tras la inoculación intragástrica (Vautier *et al.*, 2012).

Los mutantes que hemos estudiado en nuestro grupo en los últimos años (alterados en elementos de señalización) presentan una menor virulencia en el modelo de candidiasis sistémica (Román *et al.*, 2007). Sin embargo, en este sistema, se estima frecuentemente el grado de virulencia de la cepa en términos de mortalidad o supervivencia de la población de ratones tras la infección con una dosis concreta, lo cual proporciona meramente un dato cuantitativo final del resultado de la infección, sin conocer en qué proceso o procesos pudieran existir alteraciones. Estudios de nuestro grupo han puesto en evidencia algunos de los mecanismos que parecen intervenir en el curso de la infección en estos mutantes; así, el mutante *hog1* muestra una mayor sensibilidad a estrés oxidativo ( $H_2O_2$  y menadiona) (Alonso-Monge *et al.*, 1999) lo que se traduce en una mayor sensibilidad a macrófagos y neutrófilos (Arana *et al.*, 2007). En el caso de los mutantes *cek1*, hemos descrito una mayor exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano, repartida discreta pero homogéneamente en su superficie y ello conlleva un mayor reconocimiento y activación de Dectina-1 en células dendríticas humanas (hDCs) y en transfectantes de una línea derivada de leucemia mieloide (K562) con Dectina-1, favoreciéndose así la mayor capacidad oxidativa y de producir lisis del macrófago (Galán-Díez *et al.*, 2010). Se ha observado también una exposición alta de este componente en células de *C. albicans* tratadas con caspofungina y en otros mutantes como *kre5*, *phr2*, *ssn8* y *chk1*, detectándose en todos los casos una localización homogénea, salvo en el mutante *ssn8*, en el cual el aumento en  $\beta$ -(1,3)-glucano se restringe a los extremos de células y filamentos (Wheeler and Fink, 2006; Klippel *et al.*, 2010). En todos estos casos se ha relacionado este fenotipo con un aumento de la actividad antifúngica de macrófagos *in vitro*. Se han descrito, por ejemplo, aumentos de la fagocitosis, en la acidificación del fagosoma y de la producción de IL-6 e IL-10 (Klippel *et al.*, 2010) o en la liberación de TNF- $\alpha$  (Wheeler and Fink, 2006).

En este trabajo hemos analizado este parámetro (exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano) en un conjunto de mutantes en elementos que participan en las tres rutas de señalización mediadas por MAPK descritas hasta el momento en *C. albicans* (Román *et al.*, 2007). El objetivo era relacionar cambios de la pared causados por la alteración en estas rutas con una modulación de la interacción del hongo con el huésped. La idea subyacente es que la superficie de los patógenos fúngicos se somete a cambios profundos como resultado de las condiciones ambientales (señalizados por estas vías) y que estas modificaciones son cruciales para la generación de la respuesta inmune, crítica en el control de la enfermedad.

En relación con la ruta de integridad celular, mediada por la MAPK Mkc1, nuestros datos sugieren que no participa significativamente en la exposición de  $\beta$ -glucano (Figura 29). Este hecho es llamativo, por cuanto la ruta está claramente involucrada en la construcción de la pared (Navarro-García *et al.*, 1998). Se ha descrito cómo los mutantes *pkc1* son osmóticamente frágiles, siendo sólo capaces de crecer en condiciones de estabilización

osmótica (Paravicini *et al.*, 1996). En el caso del mutante *mkc1*, nuestro grupo describió su mayor sensibilidad a sustancias que interfieren con la construcción de la pared celular como el rojo de Congo o zimoliasa así como ciertos agentes antifúngicos (Navarro-García *et al.*, 1995;1998). Estos efectos son más acusados en condiciones de elevada temperatura, una de las condiciones fisiológicas que activa la ruta y así, los mutantes *mkc1* muestran defectos en crecimiento a 42 °C y una pared con claras diferencias morfológicas al microscopio electrónico (Navarro-García *et al.*, 1995). De confirmarse la no implicación de la ruta PKC1 en exposición del glucano, sería una diferencia significativa de comportamiento con *S. cerevisiae*. En este organismo, el grupo de G. Fink (Whitehead Institute, Boston, USA) llevó a cabo un rastreo en la colección completa de mutantes disponibles (que cubre la casi totalidad de los genes de esta levadura no patógena) identificando un grupo involucrados en la ocultación del  $\beta$ -(1,3)-glucano. *SLT2* (el homólogo de *MKC1*) es una de las piezas centrales de esta red genética en la que aparecen otros elementos como *GAS1*, *KRE5*, *KRE6*, *SLA1* y *MNN10*, todos ellos relacionados con la síntesis de pared (Wheeler and Fink, 2006). Nuestro resultado es significativo, además, por cuanto se ha descrito que los mutantes *mkc1* muestran una diferente exposición de determinados epítomos de O-manano en la pared (Navarro-García *et al.*, 1998) y presentan una mayor sensibilidad a enzimas líticas de pared como la gluculasa, un extracto rico en diversos componentes entre los que se incluyen glucanasas. La viabilidad reducida de los mutantes *pkc1* supone una serie de dificultades técnicas para su manipulación, y por ello, no podemos concluir si este fenómeno es general a todos los elementos de la ruta. Recientemente en nuestro grupo se ha clonado y se está caracterizando el gen *MKK2*, la MAPKK involucrada en la activación de *Mkc1* (A. Miranda-Bedate, datos sin publicar) y dispondremos también de mutantes *BCY1* (la MAPKKK), por lo que podremos extraer conclusiones más sólidas que apoyen esta idea.

En relación a la ruta HOG, hemos observado una pequeña contribución al enmascaramiento de  $\beta$ -(1,3)-glucano (Figura 29). Para el mutante *hog1* se han evidenciado por nuestro grupo alteraciones significativas de la pared celular incluso en condiciones basales, es decir, en ausencia de estrés osmótico u oxidativo. Por ejemplo, se ha descrito que los mutantes *hog1* son más resistentes a inhibidores de la síntesis de quitina como la nikomicina y al rojo de Congo (Alonso-Monge *et al.*, 1999) en ausencia de estrés. En *S. cerevisiae*, la resistencia a calcofluor también depende de la presencia de una ruta HOG funcional (García-Rodríguez *et al.*, 2000) y se han descrito modificaciones de la pared celular en respuesta a una disminución de pH (Kapteyn *et al.*, 2001), aspecto éste de relevancia en el contexto de la infección por *C. albicans* en determinadas localizaciones como vagina o estómago. La delección de *HOG1* no se traduce en una diferencia en la cantidad de glucano detectada en la levadura desarrollada (parte mayoritaria de la población), aunque sí puntualmente en yemas y células poco desarrolladas, observándose un fenotipo comparable con el descrito anteriormente para el mutante *ssn8* (Wheeler and Fink, 2006). Esta observación apoya la idea de que la ruta HOG cumple un papel importante en la síntesis de la pared celular incluso en condiciones basales, aunque dicho efecto puede estar enmascarado o ser redundante desde el punto de vista funcional con la ruta SVG (Lee and Elion, 1999). De hecho, ambas rutas tienen un

papel complementario en numerosos aspectos de la biología celular y así, las MAPKs de la ruta presentan patrones de fosforilación diferentes de respuesta a estrés oxidativo y osmótico, producción de clamidosporas y sensibilidad/resistencia a inhibidores de pared (Eisman *et al.*, 2006). Estos datos podrían quizá explicar el aumento de la exposición observada en el doble mutante *cek1 hog1*, en el cual tendría lugar una desorganización de la estructura de la pared celular más intensa de la observada en los mutantes sencillos.

Con respecto a la tercera ruta, mediada por la MAP quinasa Cek1, nuestros datos confirman el ya indicado aumento de exposición del  $\beta$ -(1,3)-glucano en mutantes *cek1* y *hst7* (Galán-Díez *et al.*, 2010). Permiten además, extraer otras conclusiones: en primer lugar, la delección de *CST20* no implica un aumento significativo del  $\beta$ -(1,3)-glucano (Figura 29). Su homólogo en *S. cerevisiae*, *STE20*, codifica una PAK que fosforila a la MAPKKK Ste11, esencial para la activación de las MAPK Kss1/Fus3 (Drogen *et al.*, 2000). En *C. albicans*, la delección de esta proteína no impide dicha activación ni tiene un efecto apreciable sobre Mkc1 u Hog1 (Eisman *et al.*, 2006). Tampoco la delección de *MSB2*, *SHO1* ni *OPY2* que bloquean la activación de Cek1 en distintas condiciones (Román *et al.*, 2005;2009b;Herrero, 2012, Tesis Doctoral), afectan a la exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano (A.D. Prieto, datos no mostrados). Por tanto, la activación de Cek1 no está relacionada biunívocamente con la exposición de este componente de superficie, o lo que es lo mismo, su activación no es condición necesaria para el enmascaramiento del mismo. En la actualidad, desconocemos las razones de este fenómeno. Sólo la delección de los elementos Hst7 y Cek1, troncales de la ruta SVG, parece condicionar este proceso (Galán-Díez *et al.*, 2010) que pudiera quizá explicarse mediante el fenómeno de *cross talk* con otros elementos de rutas MAPK u otras vías. Existen un dato adicional que apoya el papel de la ruta SVG en el enmascaramiento del  $\beta$ -(1,3)-glucano: la delección de *CPP1* conlleva una reducción del mismo (Figura 29), y esta fosfatasa ha sido caracterizada por el grupo de M. Whiteway como supresora de ciertos fenotipos inherentes a la activación de Cek1 (Schroppe *et al.*, 2000).

La delección de *CEK2* (homóloga de Fus3) produce también un aumento de la exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano (Figura 29). Hasta el momento, esta proteína ha sido identificada como participante en el proceso de apareamiento de células diploides de *C. albicans* homocigotas en el *locus* que determina el tipo sexual (Chen *et al.*, 2000;2002), pero no se han descrito alteraciones en condiciones de crecimiento vegetativo. Nuestros datos apoyan la idea de que tanto Cek1 como Cek2 son capaces de participar en el proceso de enmascaramiento de glucano, sugiriendo una función no redundante para ambas proteínas en este proceso en *C. albicans*. El uso de dobles mutantes *cek1 cek2* o mutantes alterados adicionalmente en otros elementos de señalización está siendo llevado a cabo en nuestro grupo (I. Correia, datos sin publicar) y permitirá aportar nuevos datos en este sentido.

La delección de *CLA4*, una PAK similar a Cst20 implicada en el crecimiento hifal en este hongo implica un aumento drástico de la cantidad de glucano expuesto en superficie (Figura 29), además del ya descrito fenómeno de agregación y defectos en separación celular descrito por el grupo de M. Whiteway (Leberer *et al.*, 1997). En *S. cerevisiae*, Cla4

es una de las piezas centrales en el complejo que enmascara el glucano (Wheeler and Fink, 2006) y esta función, de acuerdo con nuestros datos, parece estar también conservada en *C. albicans*. De nuevo, la delección de *CLA4* no tiene efecto en la activación de Cek1 (Eisman *et al.*, 2006) y por tanto la participación de Cla4 en el enmascaramiento de glucano no parece guardar relación con la activación de esta MAPK.

Finalmente, la delección de *cph1* no se traduce en un aumento de exposición de glucano en superficie (Figura 29). Es importante indicar en este sentido que Cph1 es el homólogo de Ste12, implicado en crecimiento hifal y apareamiento en esta levadura, y sus funciones parece ser redundantes con otros factores de transcripción. Hasta el momento, se desconoce cuál o cuáles son los factores de transcripción mediadores de Cek1, habiéndose sugerido tanto Tec1 (Staib *et al.*, 2004; Morshausser, datos sin publicar) como Ace2 (Kelly *et al.*, 2004; Ernst, datos sin publicar) como receptores de la señalización. Ace2 es uno de los genes que en *S. cerevisiae* han sido identificados también como responsables del enmascaramiento de glucano (Wheeler and Fink, 2006). Futuros estudios de nuestro grupo irán encaminados a definir con mayor claridad el papel de estos elementos y otros en el fenómeno de enmascaramiento de glucano así como a la identificación del elemento mediador de la respuesta mediada por Cek1 en la ruta SVG. La disponibilidad de una colección de mutantes en factores de transcripción y activadores transcripcionales (grupos de A. Mitchell y D. Sanglard) que está siendo analizada en la actualidad en nuestro grupo (I. Correia y E. Román, datos sin publicar) puede arrojar información en un futuro sobre este fenómeno.

Con independencia de los elementos implicados, parece claro que uno de los procesos desencadenados en respuesta a esta exposición es la modulación de la respuesta inmunitaria (Brown *et al.*, 2003; Gow *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2009). Nuestro grupo ha descrito que la mayor activación de Cek1 por Dectina-1 se traduce en un incremento de la fagocitosis y un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y TNF- $\alpha$  por parte de células dendríticas humanas obtenidas a partir de monocitos (Galán-Díez *et al.*, 2010). Estos resultados se correlacionan directamente con los estudios que describen que la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 es dependiente del reconocimiento del  $\beta$ -(1,3)-glucano de la pared fúngica por Dectina-1 (Rogers *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2006; Wheeler and Fink, 2006). En el estudio de Wheeler y cols., de los 79 genes implicados en enmascaramiento de glucano, 68 son también reconocidos con Dectina-1 y un elevado porcentaje (aunque, significativamente, no todos), 48 (60%) muestran una mayor producción de TNF- $\alpha$ .

En nuestro caso, hemos estudiado esta respuesta midiendo la liberación de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneales murinos (Figura 34). Este método ha sido empleado para poner de manifiesto la relevancia de TLR2 en el reconocimiento del *C. albicans* (Gil and Gozalbo, 2009), ya que, comparados con el control, los macrófagos *Tlr2*<sup>-/-</sup> presentan una reducción de un 65-78% en la liberación de TNF- $\alpha$  (Murciano *et al.*, 2007). Al ensayar algunos mutantes alterados en las rutas de MAPKs pudimos comprobar que todos aquellos con una mayor exposición de glucano (*cek1*, *cek1 hog1* y *phr2*) conducen también a un aumento en la liberación de la citoquina de entre un 50 y un 100% más, en

comparación con la parental. Sin embargo, hemos observado que el aumento en la liberación de TNF- $\alpha$  no se relaciona en todos los casos con un gran aumento de la exposición de glucano en superficie, como también han puesto de manifiesto otros autores para *S. cerevisiae* (Wheeler and Fink, 2006). Así parece suceder en el mutante *hog1*, aunque el aumento puntual observado en ciertas zonas de la superficie celular pudiera ser suficiente para producir un incremento en la liberación de esta citoquina, como se ha descrito que ocurre con el mutante *ssn8* (Wheeler and Fink, 2006). A pesar de todo, no se puede descartar que algunos de estos mutantes expresen diferencialmente otros ligandos de importancia reconocidos, por ejemplo, vía TLRs. Estamos realizando en la actualidad otros experimentos que miden la exposición de otros componentes celulares en nuestros mutantes, como la quitina o los manósidos, que también son importantes moduladores de la respuesta inmune (Poulain and Jouault, 2004). De hecho, datos de nuestro grupo sugieren que en mutantes *cek1*, la exposición de  $\alpha$  y  $\beta$ -manósidos está aumentada, lo cual apoya la idea de una alteración general de la organización (y quizá de la porosidad) de la pared celular (E. Román, datos sin publicar).

Es necesario indicar que los datos obtenidos en este apartado, aunque obviamente reproducibles, han sido obtenidos en unas condiciones definidas de crecimiento (*in vitro*), normalmente en medio activo de crecimiento (medio rico). Una alteración de dichas condiciones (fase de crecimiento, pH del medio, presencia de CO<sub>2</sub> y/o morfología celular) pueden tener un efecto considerable en la modificación de la superficie fúngica y con ello, la exposición de diferentes componentes, aunque, en nuestro caso, la estimulación con la cepa parental obtenida en fase estacionaria de crecimiento no implica una diferencia significativa en la liberación de TNF- $\alpha$  por macrófagos (Figura 34), por lo que se infiere que el reconocimiento, en estas condiciones, es independiente de la fase de crecimiento. Análisis *in vitro* relacionan claramente la diferente morfología, por ejemplo, con la exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano, al no detectarse más que en cicatrices de gemación ausentes en hifas (Gantner *et al.*, 2005; Heinsbroek *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios *ex vivo* han puesto de manifiesto que en el curso de la infección sistémica por *C. albicans* se alternan ambas morfologías y que el aumento de la exposición superficial de este componente ocurre tanto en levaduras como en hifas en estas condiciones (Wheeler *et al.*, 2008). Es difícil por ello, predecir la implicación de este fenómeno (exposición de glucano) en el curso de una infección experimental. Un dato importante en este sentido sería ensayar la virulencia de nuestros mutantes en ratones deficientes en *Dectina-1*<sup>-/-</sup>, aunque se han descrito resultados contradictorios sobre la relevancia de este receptor en estudios *in vivo* (Taylor *et al.*, 2007; Saijo *et al.*, 2007; Vautier *et al.*, 2012). Sin embargo, no ha sido imposible por el momento disponer de estos ratones en nuestro grupo. En cualquier caso, sería crucial establecer en estos estudios la ruta de infección, puesto que como ya se ha comentado *Dectina-1* no es crucial en el proceso de colonización gastrointestinal en ratón por *C. albicans* pero sí durante el curso de una infección sistémica (Vautier *et al.*, 2012).

Otro proceso de gran interés, recientemente descrito, es la maduración de las células madre hematopoyéticas inducida por *C. albicans* (Yáñez *et al.*, 2009;2010;2011). La proliferación y diferenciación de las células madre y progenitores hematopoyéticos

(HPSCs) está regulada por citoquinas y factores de transcripción (Iwasaki and Akashi, 2007). Entre las situaciones que se ha visto pueden afectar a estos procesos destacan la inflamación e infecciones (Basu *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2005; Serbina *et al.*, 2009). Los HPSCs expresan algunos TLRs en su superficie y que su estimulación *in vitro* con ligandos específicos de estos receptores induce la proliferación y maduración de estas células de forma dependiente de la proteína adaptadora MyD88 (Nagai *et al.*, 2006). Así mismo, se ha descrito que la presencia de *C. albicans* en el medio de cultivo también implica una inducción de la proliferación y de la diferenciación en progenitores, no comprometidos con linajes, de la médula ósea para generar principalmente células dendríticas derivadas de monocitos o moDCs (Yáñez *et al.*, 2011). Dicha alteración por el hongo en la diferenciación es dependiente de la señalización vía TLR2/MyD88 y Dectina-1 e independiente de TLR4. Al estimular las células madre de médula ósea de ratones *knockout* con *C. albicans* la proporción de moDCs detectadas decae notablemente en función de si está ausente MyD88 (44%), TLR2 (49%) o Dectina-1 (22%) respecto a ratones control (calculado de datos en Yáñez *et al.*, 2011).

La alteración de la maduración de HPSCs dependiente de TLRs y Dectina-1 sugiere que exista un mecanismo de defensa basado en la generación de células mieloides que ayuden a contener la infección tras la estimulación por ligando del patógeno. Este reconocimiento podría darse en la médula ósea, al llegar microorganismos o los ligandos vía sanguínea o, más probablemente, por interacción de los progenitores con estos componentes durante sus migraciones sistémicas esporádicas, que acaban de nuevo en la médula ósea donde se orquestaría la diferenciación.

En el presente trabajo hemos estudiado como distintos mutantes en elementos de señalización de *C. albicans* con la pared alterada inducen o afectan la maduración de progenitores hematopoyéticos no comprometidos con linaje (células Lin<sup>-</sup>) obtenidos de médula ósea. La estimulación con los mutantes *cek1*, *cek1 hog1* y *cla4* implicó una disminuida capacidad de formar moDCs (70%, 52% y 60%, respectivamente) por parte de la HPSCs en comparación a la cepa parental CAF2 (Figura 36). Como ya se ha visto, los tres mutantes citados presentan una mayor exposición de glucano en la superficie celular, por lo que el fenómeno observado podría atribuirse a una dañina sobreactivación de Dectina-1. Sin embargo, debido a que los valores obtenidos con el mutante *phr2* se asemejan a los obtenidos con la cepa parental, esta explicación no es válida para explicar todos los casos o la totalidad del proceso, aunque se puede sugerir una influencia parcial de esta interacción.

Se asume que la diferenciación de células madre hematopoyéticas es un proceso afectado de forma multifactorial; sin embargo es interesante como mutantes con una pared notablemente alterada afectan esta situación, confirmando que existe un reconocimiento diferencial de las distintas cepas mutantes que durante la infección podría modular la respuesta inmunitaria por generación de un patrón alterado en la producción de células mieloides.

## 2. Colonización y diseminación de *C. albicans* en un modelo murino *in vivo*

Los modelos de estudio en animales de experimentación permiten correlacionar los datos de investigaciones *in vitro* con estudios clínicos. El modelo más empleado para estudiar la relevancia de factores de virulencia de *C. albicans* y de elementos del sistema inmunitario ha sido el establecimiento de una infección sistémica en ratón por inoculación directa en la vena lateral de la cola. Sin embargo, este tipo de estudios son poco fisiológicos, ya que la principal vía de instauración de una candidiasis sistémica es por una diseminación de origen endógeno. Es en el tracto gastrointestinal donde se encuentra el principal reservorio de este hongo, comportándose como comensal, salvo que estados de inmunodepresión permitan su desarrollo como patógeno (Mavor *et al.*, 2005). Aunque puede encontrarse en otras mucosas del hombre, principalmente la oral y la vaginal, éstas no suelen ser el foco de la enfermedad sistémica sino de infecciones en mucosa (candidiasis oro-faríngea y vaginal). Así pues, la capacidad de *C. albicans* de colonizar el tracto gastrointestinal del huésped es un factor esencial que condiciona la diseminación posterior en situaciones de susceptibilidad.

Los modelos animales para el estudio de *C. albicans* que más relevancia han tenido en los últimos años se han centrado en la mucosa digestiva. Estos estudios de la interacción *in vivo* con el huésped se pueden clasificar en tres tipos básicos: la recreación de candidiasis oro-faríngea (OPC), la simulación de una candidiasis crónica en la mucosa gástrica (CMC) y los estudios de colonización gastrointestinal mantenida.

Aunque no exclusivamente, los modelos de OPC y CMC han sido utilizados principalmente para estudiar aspectos inmunológicos relativos a la presencia de *C. albicans* en dicha mucosa. En modelos de OPC se han observado y caracterizado por primera vez la respuesta de tipo Th17 frente a *C. albicans* (Farah *et al.*, 2006; Conti *et al.*, 2009) y la influencia del complejo inflamasa NLRP3 en el desarrollo de una respuesta antifúngica eficaz (Hise *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2009). Por su parte, el modelo de CMC se ha utilizado para estudiar la influencia de las vías de señalización dependientes de receptores tipo *Toll* (TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, MyD88, TRIF y TIR8) (Bellocchio *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2008), la relevancia del balance entre las respuestas Th1/Th17 (Zelante *et al.*, 2007), así como el papel de IL-22, una citoquina recientemente asociada a la protección frente a *C. albicans* (De Luca *et al.*, 2010). Sin embargo, estos modelos son poco prácticos para un estudio a largo plazo que pretenda considerar las características del microorganismo y su transición de comensal a patógeno, ya que no consiguen una colonización estable a pesar de emplear un gran inóculo ( $10^8$  levaduras en CMC) y, además, tienden a emplear procedimientos oclusivos y/o tratamientos inmunodepresores (en la OPC).

En este trabajo hemos considerado más conveniente emplear el tercer tipo de ensayo, en el cual se puede establecer un seguimiento del comportamiento del hongo en distintas condiciones durante el proceso de colonización gastrointestinal. Entre sus ventajas más

evidentes está el que se emplea, generalmente, una dosis puntual del microorganismo, consiguiéndose una colonización estable a niveles de  $\approx 10^7$  levaduras/gramo de heces durante varios meses, sin que se aprecie un daño o patogénesis en el huésped; ello permite suponer que se ha instaurado un equilibrio comensal entre el hongo y el huésped. La principal desventaja es que, dado que *C. albicans* no forma parte de la microbiota habitual del ratón, el establecimiento sostenido del hongo requiere una modificación de la microbiota intestinal o una alteración del huésped. Para la instauración de una colonización gastrointestinal se han usado ratones neonatos, gnotobióticos o inmunodeprimidos (Pope *et al.*, 1979; Balish *et al.*, 1984; Clemons *et al.*, 2006); modificaciones de la alimentación (Yamaguchi *et al.*, 2005); la inducción química de colitis (Jawhara and Poulain, 2007) y el tratamiento antibiótico oral. Este último método ha sido el más utilizado, aplicándose distintos protocolos según el grupo y el estudio llevado a cabo (Helstrom and Balish, 1979; Kennedy and Volz, 1985; Samonis *et al.*, 1990; Kinneberg *et al.*, 1999; Mellado *et al.*, 2000; Tansho *et al.*, 2004; White *et al.*, 2007; Koh *et al.*, 2008; Cutler *et al.*, 2011).

En nuestro caso hemos empleado un tratamiento antibiótico por ser, creemos, menos traumático para el animal. Para ello, se suelen emplear combinaciones antibióticas que conduzcan a un amplio espectro (Kinneberg *et al.*, 1999; Tansho *et al.*, 2004; White *et al.*, 2007; Koh *et al.*, 2008) o una combinación de tetraciclina y glucosa oral (Mellado *et al.*, 2000). En este trabajo el tratamiento antibiótico es, prácticamente, la única manipulación que se ejerce sobre los animales de experimentación. De hecho, según nuestros datos (Figura 49), en ausencia de este tratamiento, la recuperación del hongo en heces es escasa ( $\approx 100$  levaduras/gramo de media) siendo incapaz de colonizar el nicho. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Kinneberg y cols. (1999) tras el análisis al tercer día del contenido fúngico de ciego de ratones inoculados oralmente. Sin embargo, en este trabajo no se abordan dos aspectos importantes: <sup>1)</sup> si se mantiene un nivel de *Candida* por debajo del límite de detección (en su caso  $10^3$  CFUs por gramo de ciego) y <sup>2)</sup> si el efecto de los antibióticos es necesario únicamente para el inicio de la colonización o si también se precisa posteriormente para su mantenimiento.

Nuestros datos indican una eliminación total del hongo del tracto gastrointestinal de ratones no tratados con antibióticos (Figura 49) y la instauración del tratamiento antibiótico tras 14 días sin detectar *C. albicans* en heces no implica un re-establecimiento de niveles detectables ( $>1,7 \times 10^2$ ). Hemos comprobado que, a pesar de mantenerse una colonización alta ( $10^6$ - $10^7$  CFUs/gramo), estable y prolongada (45 días), en el momento que se prescinde de la terapia antibiótica se produce una caída acusada de la concentración de *C. albicans* en heces hasta llegar a niveles de alrededor de 150 levaduras/gramo de heces tras 14 días sin tratamiento (Figura 50). Este proceso es completamente reversible ya que partiendo incluso estos niveles de colonización, que estimamos en torno a  $\approx 300$ -400 levaduras/ratón, se recuperan un media de  $10^6$  levaduras por gramo de heces al reinstaurar la terapia antibiótica oral (Figura 50).

Los datos de otros autores indicaban que bastan  $10^3$  células de *C. albicans* por inoculación intragástrica para detectar niveles altos ( $\approx 10^6$  CFUs/g) en ciego a 3 y 7 días

(Kinneberg *et al.*, 1999); nosotros hemos confirmado que con esa dosis se obtiene una colonización alta y estable en nuestro modelo (datos no mostrados en este trabajo). De hecho, la detección de transferencia horizontal en un tiempo reducido (primeras 24 horas) en ratones cohabitando en la misma jaula (Figura 51) sugiere que la dosis mínima capaz de colonizar sea incluso menor. Es importante destacar en este contexto, que se ha descrito recientemente la posibilidad de transferencia horizontal entre ratones estabulados en distintas jaulas cuando ambos grupos están sometidos a terapia antibiótica (Cutler *et al.*, 2011). Nosotros no hemos detectado este fenómeno, de gran importancia puesto que podría haber comprometido parte de nuestros datos. Hasta el momento, desconocemos si este tipo de transmisión horizontal entre animales se debe a una manipulación incorrecta por el experimentador, pero supondría un cambio importante en la noción que tenemos de este microorganismo y de su transmisibilidad. *C. albicans* ha sido clasificada como patógeno tipo 2 (clasificación del *Advisory Committee on Dangerous Pathogens*) aunque se ha propuesto, precisamente considerando la dificultad en su transmisión una reclasificación de este patógeno (MacCallum and Odds, 2004). En cualquier caso, una diferencia importante entre estos estudios y los nuestros es la forma de conseguir la colonización (inoculación directa en nuestro caso, suspensiones del hongo en el agua de bebida en el descrito) que quizá pudiera facilitar la contaminación por aerosoles o fómites.

Un segundo dato importante estudiado por Kinneberg y cols. (1999) se refiere al tipo de bacterias afectadas durante el tratamiento antibiótico estándar (estreptomicina 2 mg/mL, bacitracina 1 mg/mL y gentamicina 0,1 mg/mL) y su posible relación con la colonización del hongo. En dicho trabajo se han utilizado, principalmente, sistemas basados en el cultivo tradicional de microorganismos que presentan la ventaja de poder diferenciar (aunque parcialmente) distintos grupos y la gran desventaja de omitir el amplio abanico de los microorganismos no cultivables. Estos autores indican una disminución apreciable en el número de población Gram positiva y una caída drástica en la población anaerobia. En estos últimos, los niveles de  $10^9$  bacterias/gramo en ciego en condiciones normales bajan a valores no detectables ( $<10^3$  bacterias/gramo) tras 6 días de tratamiento antibiótico oral. Sin embargo, estos autores utilizan unas condiciones de cultivo en anaerobiosis (medio Wilkins–Chalgren agar suplementado con 50  $\mu$ g/mL de gentamicina) que no permiten eliminar completamente la bacterias anaerobias facultativas lo cual sugeriría, según sus datos, que esta población también desaparece.

En nuestro trabajo hemos empleado un método independiente de cultivo que detecta y cuantifica el total de bacterias de la muestra de heces, permitiendo así observar el comportamiento de la microbiota cultivable y no cultivable a lo largo del tiempo (Figura 45). Así, hemos puesto de manifiesto que existe, efectivamente, una disminución clara de la microbiota bacteriana tras el tratamiento con este cóctel antibiótico (hasta un 90% menos comparando con el control sin tratar). Se ha visto que dicho efecto es constante con el tiempo (hasta 20 días, Figura 53), lo que sugiere que en el curso de la colonización no se generan microorganismos resistentes a la combinación antibiótica o, si sucede, estos no son capaces de proliferar excesivamente en la microbiota resultante. Hemos comprobado que este suceso es necesario, pero no suficiente, para el establecimiento de *C. albicans* durante largos periodos, ya que se observan niveles de colonización bacteriana similares

a los observados con un tratamiento oral de tipo monoterapia (doxiciclina o metronidazol) sin que en estos casos se obtenga una colonización por *C. albicans* alta, ni permanente (superior a 2 semanas en niveles detectables) (Figura 54, 55 y 56). Estos datos son difíciles de interpretar ya que no se pueden relacionar con la población de bacterias viables. Sin embargo, tenemos diversos motivos que nos hacen confiar en la veracidad de los datos obtenidos. Por un lado la metodología está adaptada de un trabajo (van der Waaij *et al.*, 1994) en el cual se analiza la microbiota bacteriana por FACS y mediante microscopía de fluorescencia en muestras de heces (en este caso de humanas) para confirmar la presencia específica de bacterias positivas al yoduro de propidio. Nosotros hemos podido observar por microscopía una tinción eficiente de bacterias en las muestras de heces de ratón (Figura 45). Además, al cuantificar el contenido de *C. albicans* fluorescentes en heces hemos observado una buena correlación con los datos obtenidos de cultivo y el recuento de CFUs de *C. albicans* (Figura 44).

En este trabajo hemos abordado también el papel de algunos genes implicados en señalización, en el crecimiento y adaptación de *C. albicans* al nicho gastrointestinal. Existen numerosos estudios que correlacionan la función de diversos genes con la virulencia en el modelo sistémico, pero relativamente pocos en un modelo de colonización. Determinar qué genes son relevantes a este nivel es de gran importancia ya que el establecimiento gastrointestinal puede considerarse como una etapa esencial en la patogénesis, pero también es relevante durante el equilibrio comensal. Es evidente, que estos factores no tienen que coincidir necesariamente con los relevantes durante el crecimiento *in vitro*, pero tampoco con los requeridos en el modelo de virulencia sistémica. De hecho, se han descrito genes de *C. albicans* implicados en virulencia sistémica que no parecen intervenir en colonización (como *RBT1* y *RBT4*) y otros de gran importancia a nivel gastrointestinal que no parecen participar en la infección sistémica (como *EFH1*) (Braun *et al.*, 2000; White *et al.*, 2007).

Un problema inherente a este tipo de estudio es proporcionar datos suficientemente precisos del grado de colonización para determinar la diferente capacidad de las cepas objeto de estudio en colonizar. Por ello, en este trabajo hemos introducido ensayos de competición entre una cepa silvestre y otra mutante al objeto de minimizar la variabilidad intrínseca al uso de animales de experimentación y establecer valores relativos que posibilitaran analizar el comportamiento de poblaciones mixtas en ambientes complejos.

Existen pocos estudios que hayan hecho uso de este tipo de análisis en *C. albicans*. Uno de ellos analiza la contribución en virulencia sistémica del *locus MTL* y ha permitido definir diferencias en la capacidad de diseminación a órganos al combinar una cepa mutante y la parental en el mismo ensayo de virulencia sistémica. Para ello se han utilizado dos metodologías. La primera consistió en identificar mediante amplificación de secuencias específicas por PCR de colonias *C. albicans* de las muestras obtenidas (50 colonias por muestra) asignándose a la cepa mutante o a la parental (Lockhart *et al.*, 2005). El segundo método implica la diferenciación de colonias expresando GFP (GFP positivas frente a

negativas) detectado con un sistema especial de fluorescencia (IVIS 200 *imaging system*) (Wu *et al.*, 2007). También se ha descrito un sistema semicuantitativo, que emplea el recuento de CFUs crecidas en medio selectivo (por resistencia a nirsotricina) respecto del número de colonias en medio no selectivo, que ha permitido confirmar la mayor permanencia en mucosa bucal de mutantes *efh1* y la mayor eliminación de mutantes *efg1* del tracto gastrointestinal respecto a la cepa parental (White *et al.*, 2007; Pierce and Kumamoto, 2012). La necesidad de dos siembras diferentes, en vez de una en un medio diferencial, presenta la desventaja de carecer de un control interno real. Estos ensayos resultan menos prácticos por la metodología, la necesidad de equipos específicos o por no ofrecer un control interno.

Otro sistema descrito emplea mutantes marcados mediante un código de barras de DNA (*DNA barcodes*). Este método permitiría la identificación genética de numerosas cepas a la vez y ha sido recientemente desarrollado para generar y marcar una librería de mutantes en *C. albicans* (Oh *et al.*, 2010). Este sistema admite el ensayo de un gran número de mutantes en un menor número de experimentos y, de hecho, está siendo utilizado actualmente en el laboratorio de A. Johnson (University of California, San Francisco) para definir qué factores de transcripción están implicados en el establecimiento en el tracto gastrointestinal (C. Pérez, datos sin publicar, Simposio Fundación Areces 2012, Badajoz). Una limitación de este tipo de estudios, sin embargo, es el límite inferior de la dosis fúngica inoculada, lo cual hace que cada mutante quede bastante diluido en la muestra inoculada que podría ser crítico en ciertas situaciones (*bottleneck effect*). Además, los mutantes favorecidos en colonización (como por ejemplo *efh1*), podrían estar muy sobrerrepresentados y dificultar el análisis del resto, lo que requeriría un estudio posterior adicional. El estudio poblacional es más evidente en los genes o mutantes detectados en la muestra final (positivo) que en los ausentes (negativo) y puede ser difícil extraer conclusiones de este estudio en ciertos casos dada la variabilidad de muestra/animal.

En este trabajo se ha diseñado y empleado un sistema de marcaje fluorescente de *C. albicans* que nos permite el seguimiento del hongo en muestras biológicas complejas a través de múltiples técnicas complementarias como son crecimiento colonial, la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo (Figura 16, 25, 41 y 42). Ambas proteínas fluorescentes (<sup>M</sup>GFP y <sup>Ca</sup>RFP) son fácilmente diferenciables entre sí y de la población no marcada, lo que permite la detección conjunta y discriminación de las dos poblaciones en una misma muestra. Nuestros datos indican que la expresión de cualquiera de estas proteínas no altera el *fitness* de las cepas *in vitro* (Figura 26 y 27). Al ser la detección de la cepa parental y del mutante ensayado simultánea, se introduce, pensamos, una mayor versatilidad metodológica y un mayor control de la variabilidad inherente a este tipo de experimentación. Por otro lado, en nuestro sistema, la colonización se inicia con una dosis suficientemente elevada de ambas cepas ( $10^7$  levaduras), con lo cual se minimiza el efecto *bottleneck* que podría limitar el establecimiento efectivo y equivalente de las dos poblaciones de *C. albicans* inoculadas.

Actualmente se desconoce el mecanismo por el que *C. albicans* modifica su relación respecto al huésped pasando del comensalismo a la patogénesis. Es posible que durante la colonización el hongo esté continuamente intentando provocar una infección que sería controlada por un eficiente sistema inmunitario. Sin embargo, recientemente se ha especulado sobre un mecanismo más complejo que relacionaría cambios fenotípicos en parte de la población del hongo con la percepción del estado inmunitario del huésped (proceso denominado *immunosensing*) (Kumamoto and Pierce, 2011). Según estos autores coexistirían dos tipos principales de poblaciones: uno relacionado con una colonización comensal autorregulada y poco activa inmunológicamente y otra patogénica, desregulada, invasiva e inmunoactiva, que estaría controlada por el sistema inmunológico. El balance entre estas poblaciones resultaría en el establecimiento o no de un proceso patogénico (Kumamoto and Pierce, 2011). La inducción de estos cambios fenotípicos podría involucrar al factor de transcripción Efh1, asociado a una autorregulación del tamaño de la poblacional durante la colonización, dado que la falta de este gen implica un aumento en los niveles de colonización por el hongo (White *et al.*, 2007). Sin embargo, pero parece claro que deberían existir una serie de mecanismos de detección e integración de señales (del medio externo o de señalización por quórum) asociados a este proceso. De hecho, recientemente se ha descrito la influencia del factor de transcripción Efg1 (mediador de la ruta de señalización por PKA) en el proceso de colonización gastrointestinal por *C. albicans*, observándose una pérdida del mutante *efg1* con el tiempo en ratones *wild type*, pero no en ratones atímicos (*nude*) (Pierce and Kumamoto, 2012).

Las rutas mediadas por MAPKs son sistemas especializados en detectar señales externas y generar una respuesta específica para inducir una adaptación adecuada, por lo que hemos considerado importante analizar su papel durante la colonización del tracto gastrointestinal del hospedador. Nuestros estudios aportan información sobre el papel de estos elementos de señalización en el modelo murino de colonización gastrointestinal.

Como hemos indicado, la ruta HOG en *C. albicans* está implicada en diversos procesos que conducen a una menor virulencia en el modelo sistémico (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Román *et al.*, 2007) pero se desconocía su función en el establecimiento como comensal. La principal función atribuida a esta ruta es la respuesta a distintos tipos de estrés, como el aumento de osmolaridad, estrés oxidativo, presencia de metales pesados, siendo los mutantes en elementos de la ruta sensibles a dichos estímulos. Sin embargo, también se relaciona con la biogénesis de la pared fúngica y la morfogénesis fúngica, que puede ser clave para la adhesión y la supervivencia en el huésped, ya que la interrupción de la ruta supone un mayor crecimiento filamentosos en condiciones no inductoras y una incapacidad para formar clamidosporas por un mecanismo independiente del factor de transcripción Efg1 (Alonso-Monge *et al.*, 1999;2003;2006; Román *et al.*, 2007). Nuestros datos indican que el mutante *hog1* es incapaz de colonizar el tracto gastrointestinal (Figura 62). La mínima detección de células del mutante (de media  $3,2 \times 10^3 - 10^4$  CFUs/gramo) sólo en los primeros días sugiere una completa ausencia de proliferación *in vivo* y/o que simplemente detectamos excreción del microorganismo, pero en cualquier caso no un

establecimiento. Este efecto es también observado (aunque menos acusado) en mutantes *pbs2*, lo que sugiere la ruta HOG es esencial para el establecimiento gastrointestinal.

Existen diferentes causas que pueden explicar el fenotipo observado. Se ha especulado que las alteraciones observadas *in vitro* en el mutante *hog1* pudieran afectar la capacidad de adhesión de este mutante a células de mamífero (Román *et al.*, 2007). Nuestros estudios *in vitro* en este trabajo, han mostrado, de hecho, un defecto parcial en la adhesión a células epiteliales de origen humano (gastrointestinal y vaginal) y a poliestireno (Figura 30, 31 y 32). Este efecto es leve y se observa únicamente a tiempos cortos (30 minutos) pero puede ser crucial en condiciones *in vivo* en que el microorganismo dispone de una ventana física (región del intestino) y temporal para la colonización durante la cual ha de competir con la microbiota endógena. Es evidente que las condiciones en el interior del animal son mucho más complejas y claramente, más selectivas, que en los modelos epiteliales utilizados, destacando especialmente la presencia de mucus y sales biliares. El mucus es una capa compleja que tapiza el epitelio gastrointestinal rica en glicoproteínas (mucinas) en la que también se encuentran péptidos antimicrobianos, inmunoglobulinas y lípidos (Juge, 2012). Se sabe que la presencia de bacterias está limitada a la capa externa, de forma que el epitelio queda parcialmente aislado de la gran carga microbiana presente en el lumen intestinal (Johansson *et al.*, 2008). Se ha propuesto que las mucinas pueden actuar como receptores para patógenos microbianos, que se unen a estas estructuras por medio de diversos tipos de adhesinas, desencadenándose cambios en la producción de mucina y en la glicosilación (McGuckin *et al.*, 2011). Así pues, se debe considerar el mucus como un elemento esencial en la regulación de la relación entre los microorganismos (comensales o patógenos) y el hospedador (Johansson *et al.*, 2011), por lo que es de gran importancia el establecimiento de modelos *in vivo*.

Es importante comentar que algunos autores dudan de la utilidad de usar en experimentos de infección en mucosas cepas derivadas de la silvestre SC5314, dada la supuesta limitación en colonización de superficies *in vivo* de esta cepa (Taylor *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2007; Naglik *et al.*, 2008). En nuestro caso, esta elección viene impuesta por el fondo genético utilizado en la construcción de los mutantes indicados y la introducción de controles adecuados. Recientemente se ha complementado un estudio sobre la colonización de ratones defectivos en Dectina-1 con la inclusión de cepas aisladas de infecciones en mucosas (AM2003-013 y AM2003-016), sin que se hayan obtenido resultados diferente a los previos con la cepa SC5314 (Vautier *et al.*, 2012), lo que sugiere que las cepas derivadas de SC5314 serían igualmente válidas al estudiar colonización gastrointestinal.

Podemos proponer razones relacionadas con la sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico para la ausencia de colonización del mutante *hog1*. Por ejemplo, el tracto gastrointestinal presenta porciones con distinta osmolaridad en función de la digestión enzimática de los alimentos, de compuestos secretados por el huésped usados en la digestión de los alimentos o incluso del mucus que tapiza las cavidades. En el intestino existen además microambientes específicos enriquecidos selectivamente en determinada microbiota. Otra razón que podría impedir el establecimiento de mutantes *hog1* en el intestino sería su

mayor sensibilidad a estrés oxidativo (Alonso-Monge *et al.*, 2003). El mutante *hog1* es eliminado más eficientemente por células fagocíticas *in vitro* (macrófagos y PMNs), detectándose en esas mismas condiciones un aumento de expresión de genes reporteros dependientes de estrés oxidativo en *C. albicans* lo que sugiere indica una activación de la ruta (Arana *et al.*, 2007). Aunque *a priori* no conocemos datos que relacionen el tracto intestinal con la presencia de agentes oxidantes, hay que tener en cuenta que la inmunidad innata presente asociada a mucosas incluye células fagocíticas que podrían participar en el control del hongo a ese nivel empleando mecanismos oxidativos. Se desconoce si *C. albicans* interacciona con este tipo de células durante la colonización comensal o cuál es la vía preferente de invasión del epitelio, pero nuestros datos sugieren que se produce una entrada transitoria en placas de Peyer (Figura 69), donde abundan células fagocíticas.

Otro aspecto que podría también explicar este fenómeno sería la mayor sensibilidad del mutante *hog1* a determinados compuestos de naturaleza antifúngica secretados por las células del huésped. En humanos se han descrito una serie de péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) entre los que destacan la histatina 5 (Hst 5) y la catelicidina LL-37 que presentan una actividad anti-*Candida* por distintos mecanismos (Dale and Fredericks, 2005). La Hst 5 es producida por glándulas salivares y en *C. albicans* produce daños a nivel mitocondrial tras penetrar en la célula y en menor medida en la membrana plasmática, mientras que LL-37 (producido por neutrófilos y en saliva) es retenido en la membrana celular del hongo donde genera una desorganización de la bicapa lipídica con la consecuente alteración de la permeabilidad (Helmerhorst *et al.*, 1999; Den Hertog *et al.*, 2005). Se ha descrito que los mutantes *hog1* son más sensibles a Hst 5 (Vylkova *et al.*, 2007), lo cual podría ser debido a su toxicidad mitocondrial (Helmerhorst *et al.*, 1999; Alonso-Monge *et al.*, 2009). La producción de histatinas en ratón no ha sido comprobada, aunque se conocen otros péptidos como la catelicidina CRAMP (producido en saliva y mucosa) que cumplen un papel similar (Murakami *et al.*, 2002) y podría ser responsable de la inhibición del mutante *hog1* en el tracto gastrointestinal.

Por último, la alteración en la morfogénesis podría ser otra razón que explicara el comportamiento observado, ya que el mutante *hog1* muestra una capacidad aumentada de inducir un crecimiento filamentoso, aunque no está bloqueado en un estadio morfológico concreto (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Sin embargo, pensamos que tendría una relevancia menor puesto que se ha descrito que mutantes anclados en uno de los estados morfológicos (filamentación o levadura) no presentan alteraciones en su establecimiento gastrointestinal (Koh *et al.*, 2008). No consideramos que la capacidad de formación de clamidosporas (deficiente en este mutante) sea crítica en este proceso, aunque actualmente esta idea no puede ser descartada completamente.

En relación con la ruta SVG, mediada por la MAPK Cek1, nuestros datos indican un papel importante de la ruta SVG en el mantenimiento prolongado de *C. albicans* en el huésped, tal y como se desprende del estudio de los mutantes *cek1* y *msb2* (Figura 59 y 60). Los

datos indican que en efecto, ambos mutantes son capaces de establecerse durante un periodo de tiempo diferente (21 y 17 días respectivamente), existiendo, por ello, proliferación *in vivo*. Es tentativo, por el momento, determinar las causas de este defecto. Los mutantes *cek1* crecen de forma similar a la cepa parental en condiciones de laboratorio en una gran variedad de condiciones experimentales (temperatura, pH, cantidad de nutrientes entre otros) y tienen una capacidad similar de adherirse a diferentes soportes (Figura 30, 31 y 32). Curiosamente, el mutante *cek1* muestra una mayor resistencia a células fagocíticas de diferentes orígenes (Arana *et al.*, 2007), de igual forma a lo que ocurre con los mutantes *cla4* (Marcil *et al.*, 2002), y no presenta una mayor susceptibilidad a agentes oxidantes, por lo cual quizá la respuesta fagocítica *in vivo* no es esencial en el control de la proliferación del microorganismo. Este mutante presenta rasgos fenotípicos importantes como relacionados con la capacidad de señalar daños en pared mediante alteraciones en glicosilación y vía digestión enzimática de la pared que podrían determinar, en periodos prolongados pequeñas modificaciones de la tasa de crecimiento y una eficaz eliminación del microorganismo en el tracto gastrointestinal. Cek1 es una proteína de vida media corta y su activación está regulada por *quorum sensing* (Román *et al.*, 2009a), proceso que puede tener relevancia *in vivo* en el contexto de poblaciones microbianas complejas.

En relación a Msb2, las hipótesis sobre su incapacidad de establecimiento de una colonización mantenida en el tiempo pueden ser parcialmente solapantes con las anteriores y por tanto considerarse que es debido a la falta de activación de Cek1. Se ha descrito que la mucina Msb2 se procesa durante el crecimiento, liberándose al medio extracelular un fragmento proteico de elevado peso molecular que es capaz de unir e inactivar péptidos fungicidas como Hst 5 y LL-37. Como consecuencia, los mutantes *msb2* son más susceptibles que la cepa parental a la acción de LL-37, aunque, curiosamente, no a Hst 5 (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). Es tentativo especular con que es la sensibilidad a este péptido u otros (como CRAMP), frente a los que Msb2 pueda interaccionar, la responsable de la eliminación de *msb2* tras largos periodos de colonización. Sin embargo, dado que en nuestro ensayo el mutante se encuentra en presencia de la cepa parental, hay que considerar que la liberación de fragmentos Msb2\* por la cepa silvestre podría ser suficiente para crear un ambiente de protección frente a péptidos fungicidas, en el que la falta de Msb2 en ciertas células no sería crucial. El uso de ratones *CRAMP<sup>-/-</sup>* (Nizet *et al.*, 2001), cuyo análisis iniciaremos en los próximos meses podrá arrojar información en este sentido.

Finalmente, el ensayo del mutante *mkc1* en el modelo de colonización competitiva nos indica que la ruta de integridad celular es también importante para el establecimiento gastrointestinal de *C. albicans*. El patrón temporal de mantenimiento en el intestino se asemeja más al observado en mutantes de la ruta SVG que de la ruta HOG, permaneciendo a niveles medios ( $10^4$ - $10^5$  CFUs/gramo) unos 20 días (Figura 66), que consideramos un problema de colonización a largo plazo.

Hay diversos aspectos fenotípicos del mutante *mkc1* llamativos que podrían quizá bien explicar el comportamiento observado. Este mutante tiene una alteración en la estructura o en la capacidad de reparación de la pared, como se deduce de su sensibilidad a compuestos que desorganizan la pared celular como la cafeína, la zimoliasa o la tunicamicina (Navarro-García *et al.*, 1995;1998;2005). Esta modificación de la pared no parecen alterar su adhesión en los modelos indicados (Figura 30, 31 y 32) por lo que quizá este tipo de alteraciones no serían condicionantes en el fenómeno observado. Por otro lado, la termosensibilidad de este mutante es patente a 42 °C, pero no presenta defectos de crecimiento a 37 °C (Navarro-García *et al.*, 1995), por lo que no parece que estuviera asociada con el efecto observado. Sin embargo hay dos aspectos que pensamos pueden ser más relevantes en el contexto de estos estudios *in vivo*: su sensibilidad a detergentes como SDS (Navarro-García *et al.*, 1998) y su defecto parcial en la formación de biopelículas *in vitro* (Kumamoto, 2005).

La presencia en el intestino de sustancias emulgentes como las sales biliares podría explicar la desaparición paulatina del mutante *mkc1* ya que se ha descrito su incapacidad de crecer en presencia de SDS 0,05 % *in vitro* (Navarro-García *et al.*, 1998). Aunque el establecimiento mayoritario de *C. albicans* ocurre en el ciego y en el intestino grueso (zonas libres de sales biliares por la recirculación entero-hepática) una depleción del hongo en el intestino delgado podría justificar la deficiencia observada en la permanencia a largo plazo en competición con la silvestre. Sin embargo, no parece que sea un proceso crítico, ya que el paso inicial tras la inoculación fue efectivo y permitió la supervivencia del mutante tal como se desprende de los niveles detectados en los primeros días (similares a la cepa parental).

Por otro lado, la alteración en la formación de *biofilms* y la sensibilidad a modificaciones de la pared celular podría ser una combinación de factores crítica para la permanencia continuada en un nicho tan hostil como el tracto gastrointestinal. Las biopelículas son la forma más efectiva de permanecer y crecer sobre una superficie sólida, pero además aumentan la resistencia a agresiones químicas y a antifúngicos, es decir, a compuestos que podrían alterar la pared fúngica, por lo que se podría estar generando una alteración sinérgica. La formación de biopelículas por *Candida* aún no ha sido demostrado en el tracto gastrointestinal (Harriott and Noverr, 2011) salvo por la cepa SC5314 (pero no por la cepa ICU1, hiperfilamentosa *in vitro* en ausencia de fosfato) en condiciones de ausencia forzada de fosfato por resección del 30 % del hígado y 48 horas de ayuno (Romanowski *et al.*, 2012). Sin embargo, se cree que se puede asumir la existencia gastrointestinal de estas estructuras en condiciones más fisiológicas en base a las observaciones de estudios en otras mucosas como la vaginal y la oral donde han sido frecuentemente detectados y estudiados (Harriott and Noverr, 2011).

Los receptores tipo *Toll* han sido estudiados con cierto detalle por diversos grupos por su importancia en la respuesta frente a *C. albicans*. La mayoría de los estudios realizados han sido *in vitro*, *ex vivo* o tras infección sistémica de ratones. Actualmente, se acepta que

TLR2 y TLR4 son los principales TLRs implicados en la respuesta frente a *C. albicans*. Aunque, como se ha comentado, en ocasiones se hayan obtenido resultados controvertidos respecto a la susceptibilidad en infección sistémica (Netea *et al.*, 2002; Bellochio *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2004; Villamon *et al.*, 2004b; Murciano *et al.*, 2006), ambos cumplen un papel importante en la defensa frente al hongo. TLR2 se ha asociado con el reconocimiento de distintos componentes presentes en la pared de *C. albicans* como son el PLM (Jouault *et al.*, 2003), el  $\beta$ -(1,3)-glucano en colaboración con Dectina-1 (Gantner *et al.*, 2003) y de  $\beta$ -(1,2)-manano conjuntamente con Galectina-3 (Jouault *et al.*, 2006). Por su parte, TLR4 ha sido ampliamente estudiado por ser activado por el LPS de bacterias (Poltorak *et al.*, 1998), mientras que en *C. albicans* se ha asociado al reconocimiento del hongo a través de O-manano (Netea *et al.*, 2006).

Nuestros datos indican la relevancia de los TLRs en el mecanismo de colonización gastrointestinal por *C. albicans*. Es importante destacar que en estadios tempranos, no detectamos diferencias claras entre los ratones *knockout* y los ratones control; estos efectos son, sin embargo evidentes al suspender el tratamiento antibiótico: en ratones control (C57BL/6) se produce una caída de los niveles de *C. albicans*, hasta llegar casi a desaparecer, causado por la recuperación de los niveles de microbiota endógena. Sin embargo, en ratones *Tlr2<sup>-/-</sup>*, *Tlr4<sup>-/-</sup>* y *Myd88<sup>-/-</sup>* (todos se comportaron de forma similar) esta caída se detiene al cabo de una semana, alcanzándose un valor estable de  $10^6$  CFUs por gramo de heces. Las relaciones entre los niveles de colonización por *C. albicans* observados en ratones *knockout* y control es aproximadamente 100 veces al cabo de 8 días tras la eliminación del tratamiento antibiótico y de 10000 veces al cabo de 19 días (Figura 68).

Este papel para los receptores TLR2 y TLR4, entre otros, se ha estudiado en mucosa gástrica por otros autores utilizando un modelo de candidiasis mucocutánea (CMC). Se ha descrito que los niveles de permanencia de *C. albicans* en el estómago tras una semana desde la inoculación de  $10^8$  levaduras son de 2 a 3 veces mayores en ratones *Tlr2<sup>-/-</sup>*, *Tlr4<sup>-/-</sup>* y *Myd88<sup>-/-</sup>* que en ratones control. Según dos trabajos publicados, los niveles medios corresponden a  $3,1-5,1 \times 10^4$  en *Tlr2<sup>-/-</sup>*,  $6-7 \times 10^4$  en *Tlr4<sup>-/-</sup>* y  $8 \times 10^4$  en *Myd88<sup>-/-</sup>* comparado con entre  $2,5$  y  $3 \times 10^4$  CFUs de *C. albicans* por órgano en ratones control (Bellochio *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2007) sin que se aprecien signos de enfermedad. Esta persistencia es mayor en ratones *Tlr4<sup>-/-</sup>*, detectándose niveles superiores incluso en la segunda semana, apareciendo en este modelo algún signo inflamatorio (De Luca *et al.*, 2007). Además de las limitaciones inherentes a este modelo descritas anteriormente, en este trabajo se emplean cepas de *C. albicans* obtenidas por mutagénesis química y, por tanto, poco definidas genéticamente. Además, los niveles de *Candida* y las diferencias obtenidas por estos autores son muy pequeñas (comparado con la cantidad inoculada,  $10^8$  levaduras) y se indican por órgano (y no por gramo de tejido), lo cual complica la validez estadística e interpretación de estos estudios. Además, sólo se analiza la contribución de estos elementos (TLR2, TLR4 y MyD88) en etapas tempranas de la interacción debido a que no se establece una colonización sostenida.

Es ciertamente especulativo conocer las razones de este efecto, que pudiera ser debido a una falta de reconocimiento del hongo por los TLRs, a una alteración de la microbiota o a una combinación de ambos efectos. Recientemente se ha descrito que los ratones defectivos en MyD88 tienen alteraciones en los principales grupos microbianos que forman la microbiota, de manera que existe un aumento poblacional del grupo de bacterias filamentosas segmentadas (SFB) en el intestino delgado y una mayor variabilidad de las poblaciones bacterianas entre individuos, lo que sugiere una disbiosis y diferente control sobre la microbiota comensal (Larsson *et al.*, 2012). La presencia de este grupo de bacterias comensales (SFB) se ha relacionado con una inducción de la respuesta Th17, ya que están presentes sólo en ratones con microbiota inductora de Th17, mientras que no se detectan en ratones con una falta de células Th17 debida a una ausencia de microbiota inductora de esta respuesta (Ivanov *et al.*, 2009). La respuesta Th17 es la principal implicada en la inmunidad frente a hongos, y muy especialmente a nivel de mucosas (Conti and Gaffen, 2010). Aunque existían datos en que se describía que esta respuesta era independiente de la señalización por TLRs (Atarashi *et al.*, 2008; Ivanov *et al.*, 2009) recientemente se ha demostrado lo contrario utilizando una aproximación metodológica más rigurosa, es decir, que el desarrollo de la respuesta Th17 depende de la señalización vía MyD88 inducida por la microbiota comensal siendo en este caso independiente de la presencia de IL-6 (Shaw *et al.*, 2012).

No es descartable que la deficiencia inmunitaria relativa a la falta de señalización vía TLRs pudiera favorecer la proliferación de fenotipos con mayor capacidad de colonización o más capacitados para competir con la microbiota bacteriana como se ha sugerido (Kumamoto and Pierce, 2011). A falta de estudios más profundos, una alteración en la respuesta Th17 podría ser explicar la alteración de los niveles de *Candida* en nuestro modelo. Dicho efecto, podría estar ocurriendo por un mecanismo directo o indirecto (debido a la alteración de la microbiota por ausencia de TLR2, TLR4 o MyD88).

Un aspecto final que hemos intentado abordar en este trabajo es estandarizar un método para analizar y cuantificar la diseminación de procedencia endógena gastrointestinal evitando el desarrollo de una enfermedad sistémica grave. El carácter oportunista de *C. albicans*, por el que su capacidad de producir infección depende del estado inmune del huésped, hace difícil diseñar modelos para el estudio *in vivo* de la invasión y diseminación desde el tracto gastrointestinal a órganos diana.

Tradicionalmente, la translocación a ganglios linfáticos mesentéricos ha sido más ampliamente estudiada en bacterias, por ser el componente mayoritario de la microbiota intestinal. Dado que en animales sanos normalmente no se aíslan bacterias de MLNs, se han desarrollado una serie de metodologías que favorecen dicha translocación basadas en un sobrecrecimiento bacteriano, en la inmunodepresión del huésped o en daño o en un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal (Berg, 1995). Algunos de estos métodos, como el uso de ratones inmunológicamente inmaduros (Cole *et al.*, 1988) o la

aplicación del hongo en una mucosa intestinal atrofiada (por falta de nutrientes en un *Thiry-Vella loop*) de ratas y cobayas con lesiones por quemaduras térmicas (50% de su superficie), han permitido observar el paso de *C. albicans* a través del epitelio intestinal (Inoue *et al.*, 1988; Alexander *et al.*, 1990). De hecho, se han detectado por microscopía electrónica levaduras pasando a través de enterocitos intactos (aparentemente sin formación de fagosoma) y asociadas a macrófagos en PPs.

Los ensayos de translocación desarrollados más recientemente se han centrado en detectar la presencia del hongo en dianas sistémicas como hígado y riñón. La mayoría de estos modelos emplean tratamientos que deprimen la respuesta inmunitaria (ciclofosfamida, 5-fluor-uracilo (5FU), compuestos esteroideos o combinaciones de ellos) y/o modifican la funcionalidad de la mucosa digestiva consiguiendo una diseminación que es, en muchos casos errática al detectarse sólo en una parte de los individuos (Mellado *et al.*, 2000; Bendel *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2005). Los métodos que más éxito han tenido a la hora de obtener una alta diseminación reproducible en un alto porcentaje de individuos implican tratamientos agresivos y/o el análisis de ratones inmunodeprimidos en fases avanzadas de la enfermedad, en estado moribundo o tras su muerte causada por la infección (Clemons *et al.*, 2006; Koh *et al.*, 2008).

Clemons y cols. (2006) establecen un fuerte tratamiento antibiótico que incluye una combinación oral (0,2 mg/mL de gentamicina, 1 mg/mL de clindamicina y 1 mg/ml de vancomicina en agua de bebida) y una administración parenteral de imipenem/cilastatina diaria (5 mg/ratón) desde 3 días previos a la inoculación oral del hongo. Dicho tratamiento, junto a la inmunodepresión por 5-FU, implica una diseminación alta de *C. albicans* de origen gastrointestinal (mediana de  $3,3 \times 10^4$  CFUs/hígado) en todos los ratones supervivientes tras 20 días de tratamiento (8 de 10), aunque también se muestran valores inferiores a tiempos más cortos. Sin embargo, se describe también una cierta diseminación del hongo en ausencia de 5-FU (mediana de  $8,3 \times 10^2$  CFUs/hígado) tras 20 días (Clemons *et al.*, 2006), lo cual sugiere que el tratamiento antibiótico empleado está afectando negativamente, no sólo a la microbiota bacteriana, sino también al huésped. Aunque no se ha detectado mortalidad en este último grupo a 20 días (tiempo máximo de seguimiento), no se puede descartar que tuviera lugar en periodos más prolongados, no ensayados, como consecuencia de la diseminación detectada.

Por su parte, Koh y cols. (2008) tras promover por tratamiento antibiótico oral el establecimiento gastrointestinal por *C. albicans*, inducen una inmunodepresión con ciclofosfamida (tres dosis de 150 mg/Kg a días alternos) con la que se obtiene una mortalidad por *Candida* en el 100% de los individuos. Describen que en todos los ratones ensayados se detectan niveles elevados del hongo en hígado (mediana de  $5 \times 10^4$  CFUs/gramo) a 4 y 5 días tras el tratamiento indicado. Estos niveles parecen originarse como consecuencia de una proliferación activa del hongo en ese órgano y no sólo de la diseminación. Por otro lado, a pesar de que indican que se analiza la diseminación a MLNs, no analizan los datos obtenidos al establecer una inmunodepresión (Koh *et al.*, 2008).

A pesar de que en general parece requerirse una fuerte alteración del huésped para detectar una translocación efectiva de microorganismos, otros autores han logrado este objetivo sin inducir alteración alguna del huésped. Así, Macpherson y Uhr (2004) han descrito el paso del comensal *Enterobacter cloacae* a través de placas de Peyer a MLNs (entre 800 y 1000 CFUs/órgano), llegando a identificar que estas bacterias son transportadas a los órganos linfoides mediante células dendríticas (Macpherson and Uhr, 2004). Esta permanencia en MLN para *E. cloacae* es temporal (hasta 48 horas tras la inoculación), pero ocurre de forma fisiológica, sin necesidad de alterar el huésped con inmunosupresores y parece crucial para el establecimiento de un equilibrio comensal entre el huésped y el microorganismo (Macpherson and Uhr, 2004).

En nuestro caso, hemos aplicado la metodología experimental descrita por estos autores a nuestro modelo, donde hemos detectado a tiempos cortos tras la inoculación intragástrica presencia de *Candida* en placas de Peyer y ganglios mesentéricos. La máxima detección en PPs que hemos obtenido ha sido en estadios iniciales de la infección (6 horas), mientras que en MLNs se ha observado aproximadamente a las 24 horas (Figura 69). Esta cinética, sugiere que en condiciones fisiológicas existe una entrada de *C. albicans* a MLNs que tiene lugar vía PPs. El empleo de otras cepas de *Candida* para este tipo de estudios puede ser crítico, ya que este proceso puede estar muy condicionado por la relación evolutiva entre el microorganismo y el huésped. *C. albicans* no es un habitante normal del tracto digestivo del ratón, aunque se han descrito especies como *Candida pintolopesii* (Savage and Dubos, 1967) que sí parecen serlo.

Múltiples estudios han empleado el ganglio poplíteo como sistema para detectar alteraciones inmunológicas y de hecho es un modelo muy extendido para el estudio de reacciones alérgicas por diversos compuestos (Ravel and Descotes, 2005). La infección de este órgano con microorganismos patógenos, principalmente virus, ha permitido estudiar el papel de distintos elementos del sistema inmunitario, entre los que destaca la relevancia de los macrófagos subcapsulares (y su estrecha su relación con los LB) en la respuesta adaptativa frente a la infección vírica, empleándose, entre otras técnicas, la microscopía confocal y multifotón (Junt *et al.*, 2007; Iannaccone *et al.*, 2010; Moseman *et al.*, 2012). La infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) ha sido la más ampliamente estudiada. Se ha observado que este patógeno se acumula en zonas definidas del suelo del seno subcapsular (SCS) durante horas tras la infección, co-localizando con los macrófagos residentes en ese compartimento (Junt *et al.*, 2007). La eliminación de estos macrófagos subcapsulares (por tratamiento con clodronato liposomal) implica la infección por VSV de los nervios periféricos de la cápsula del ganglio que estaban rodeados por las células fagocíticas deplecionadas, lo cual atribuye a los macrófagos de SCS un papel protector frente a la neuroinvasión (Iannaccone *et al.*, 2010). Además, viriones procedentes de VSV son detectados en LB específicos para antígenos de este virus en el seno subcapsular y en folículos superficiales (Junt *et al.*, 2007). La infección por otros virus como el de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) se detecta también en los macrófagos SCS, aunque también en células de la médula (Sung *et al.*,

2012), mientras que un virus híbrido de la inmunodeficiencia humana y de simio (SHIV) se ha descrito localizado en LT CD4+ de las áreas paracorticales de MLNs (Igarashi *et al.*, 2001).

En nuestro trabajo hemos observado que este modelo es perfectamente aplicable al estudio de la infección por *Candida* y hemos podido establecer las dosis y tiempos a los que su detección es efectiva en este órgano. Mediante microscopía confocal se ha determinado que la localización preferente del hongo al infectar ganglios es el seno subcapsular donde parece interactuar con los macrófagos subcapsulares, siendo éste el tipo de célula con el que *C. albicans* se relaciona preferentemente (Figura 71). La zona con una alta densidad de macrófagos SCS aparece libre de células fúngicas lo cual sugiere una aclaramiento de *C. albicans* por parte de estos fagocitos, dado que a tiempos superiores a 4 horas la detección del hongo es muy escasa. Tampoco se ha observado la presencia del hongo en los folículos ni en la médula del ganglio a ningún tiempo o dosis ensayados. La actividad de los macrófagos SCS en la eliminación del hongo a este nivel, además de implicar mecanismos innatos, podría establecer el inicio de una respuesta adaptativa frente al hongo como ocurre al infectar con virus (Junt *et al.*, 2007). Esta posibilidad, aún no comprobada, permitiría establecer un modelo para el estudio del desarrollo de una respuesta adaptativa durante la infección fúngica. Aunque la vía de inoculación no es la fisiológica, los resultados que se obtienen deben poder extrapolarse satisfactoriamente al comportamiento de cepa y huésped en otros ganglios linfáticos en una similar fase de la infección. De hecho, los estudios que emplean agentes virales en este modelo, como el VSV o el LCMV, tampoco se basan en el lugar natural de entrada (Junt *et al.*, 2007; Iannacone *et al.*, 2010; Moseman *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2012). Otra clara ventaja es que es un modelo poco estudiado en patógenos extracelulares, por lo que la información potencial que pueda aportar está aún por explotar y nuestro grupo ya ha dado un paso respecto a su utilización.



# Conclusiones

---



1. El gen dTomato (variante de DsRed), optimizado para su expresión en el hongo patógeno *C. albicans*, codifica una proteína roja fluorescente (<sup>Ca</sup>RFP) que es funcional, estable y no tóxica en esta levadura. Este marcador puede utilizarse como gen reportero, permitiendo la identificación de células que lo portan bien directamente en medio sólido o líquido como mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Este gen es útil en localización subcelular de proteínas en *C. albicans* como se ha demostrado mediante la construcción de fusiones a los genes *SKO1* (nuclear), *SFU1* (nuclear) y *PTC7* (mitocondrial).
2. En los modelos *in vitro* ensayados, las MAPKs Cek1, Cek2, Mkc1 y Hog1, así como Phr2, no parecen ser determinantes en la adhesión de *C. albicans* a soportes de poliestireno ni a células epiteliales intestinales (Caco2) o vulvovaginales (A431); tampoco parecen alterar la invasión a través de células epiteliales (Caco2).
3. La delección de genes *CEK1*, *CEK2* o *CLA4* (pero no *CPH1*), implicados en la ruta de invasividad/apareamiento en *C. albicans*, provoca un aumento de la exposición de  $\beta$ -(1,3)-glucano en la pared fúngica. La interrupción simple de *HOG1* (ruta de respuesta a alta osmolaridad) no provoca cambios importantes, aunque si acrecienta el fenotipo en un fondo *cek1*, mientras que la ausencia de *Mkc1* (ruta de integridad celular) no provoca alteraciones significativas del glucano expuesto.
4. Los mutantes *cek1*, *hog1*, *cek1 hog1* y *phr2* inducen un aumento en la liberación de TNF- $\alpha$  *ex vivo* por macrófagos peritoneales residentes de ratón. Los mutantes *cek1*, *cek1 hog1* y *cla4* (pero no *phr2*) provocan una alteración en la maduración de progenitores hematopoyéticos inducida por *C. albicans* por la que se ve disminuida su capacidad de formar moDCs.
5. La ruta HOG es crucial para el establecimiento de una colonización en un modelo de ratón, como se demuestra de la incapacidad de mutantes *hog1* y *pbs2* de establecerse en el tracto gastrointestinal en ratones C57BL/6. Por otro lado, tanto Cek1 como Mkc1, son capaces de colonizar, aunque su ausencia impide un mantenimiento efectivo a medio-largo plazo en experimentos de competición con una cepa silvestre.
6. La señalización a través de TLR2, TLR4 o MyD88 interviene de forma importante en la eliminación intestinal de *C. albicans* comensal en presencia de una microbiota normal en un modelo de colonización murino.
7. La infección por *C. albicans* en planta del pie de ratón provoca su diseminación temprana al ganglio poplíteo donde se localiza en el área subcapsular, interaccionando principalmente con macrófagos residentes en esa zona. El comportamiento del hongo en el dicho ganglio puede ser visualizado fácilmente en tejidos intactos y a tiempo real.



# Planteamientos futuros

---



El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha consistido, principalmente, en la puesta a punto y la caracterización preliminar de un modelo de colonización gastrointestinal en ratón por *C. albicans*. Para ello, hemos establecido una metodología que supone el uso de cepas marcadas fluorescentemente que pueden ser analizadas tanto mediante cultivo tradicional como mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos han permitido definir el papel de algunos elementos de rutas de transducción de señal en este proceso. Existen diversos planteamientos que nos gustaría analizar en un futuro próximo.

En primer lugar, nos gustaría determinar las razones de los defectos de colonización observados. Hasta el momento, nuestras hipótesis están basadas en nuestro conocimiento de la fisiología de los mutantes analizados *in vitro*: sin embargo, el ambiente *in vivo* es mucho más complejo, y será necesario profundizar en el modelo (papel de la microbiota endógena, utilización de colecciones de alelos de los mutantes descritos, sistemas de expresión regulada *in vivo*, por ejemplo) para determinar el estadio o estadios del proceso alterados. Ello implicará, entre otros, la utilización de modelos de adhesión y translocación *ex vivo* en el epitelio gastrointestinal, cuyo desarrollo se está diseñando en la actualidad. En segundo lugar, intentaremos definir con mayor precisión la ruta utilizada por el microorganismo en el curso de la diseminación sistémica mediante la utilización de otros modelos de ratón, estudios histológicos y análisis de poblaciones. Ello posibilitaría definir -utilizando nuestros estudios competitivos- diferencias entre cepas mutantes y silvestres en la diseminación sistémica, aspecto que consideramos de relevancia básica y clínica. Finalmente, un interés a largo plazo que querríamos explorar sería la utilización de cepas no alteradas en colonización -pero incapaces de invadir- como cepas vacunales seguras o inmunomoduladores de la respuesta inmunitaria para la prevención de las candidiasis.



# Materiales y Métodos

---



## 1. Tipos celulares empleados

### A. Microorganismos

Las cepas de microorganismos utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 2. Para facilitar la lectura de este trabajo nos hemos referido a las distintas cepas de *C. albicans* como *genX*, para la cepa homocigota *genX/genX* en fondo heterocigoto Ura+ (*URA3/ura3*). En caso de expresión de un gen heterólogo, se añade a la cepa el nombre del gen tras un guión, con la información sobre su promotor si procede. La bacteria *E. coli* se ha empleado exclusivamente para la transformación y amplificación de plásmidos utilizados posteriormente en *C. albicans*.

A continuación (Tabla 2) se resumen las cepas de microorganismos empleadas en este trabajo:

MICROORGANISMO	CEPA	GENOTIPO	NOMENCLATURA ABREVIADA EN TEXTO Y FIGURAS	REFERENCIA
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$ F'	<i>K12</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <sub>u169</sub> <i>supE44 thi1 recA1 endA1 hsdR17</i> <i>gyrA relA1</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) F'		(Hanahan, 1988)
<i>S. thermophilus</i>	ATCC 19987	Silvestre	St	(Tilsala-Timisjarvi and Alatossava, 1997)
<i>C. albicans</i>	SC5314	Silvestre		(Gillum et al., 1984)
<i>C. albicans</i>	CAI-4	<i>ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434/ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434</i>		(Fonzi and Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	CAF2	<i>ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434/ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434-URA3</i>	wt (CAF2)	(Fonzi and Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	RM1000	<i>ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434/ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434</i> <i>his1</i> $\Delta$ :: <i>hisG/his1</i> $\Delta$ :: <i>hisG</i>		(Negredo et al., 1997)
<i>C. albicans</i>	RM100	<i>ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434/ura3</i> $\Delta$ :: <i>imm434</i> <i>his1</i> $\Delta$ :: <i>hisG/his1</i> $\Delta$ :: <i>hisG-URA3-hisG</i>	wt (RM100)	(Negredo et al., 1997)
<i>C. albicans</i>	BEC73	RM1000 <i>cek2</i> $\Delta$ :: <i>cat-URA3-cat/cek2</i> $\Delta$ :: <i>cat</i>	<i>cek2</i>	(Navarro-Garcia et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	CK43B-16	CAI-4 <i>cek1</i> $\Delta$ :: <i>hisG-URA3-hisG/cek1</i> $\Delta$ :: <i>hisG</i>	<i>cek1</i>	(Csank et al., 1998)
<i>C. albicans</i>	HI3-21	CAI-4 <i>hog1</i> :: <i>hisG/hog1</i> :: <i>hisG-URA3-hisG</i>	<i>hog1</i>	(Inés Correia, no publicado)

<i>C. albicans</i>	CM1613	CAI-4 mkc1Δ::hisG-URA3-hisG/mkc1Δ::hisG	mkc1	(Navarro-García et al., 1995)
<i>C. albicans</i>	CLJ5	CAI-4 cla4Δ::hisG-URA3-hisG/cla4Δ::hisG	cla4	(Leberer et al., 1997)
<i>C. albicans</i>	CFM-2	CAI-4 phr2Δ::hisG-URA3-hisG/phr2Δ::hisG	phr2	(Muhlschlegel and Fonzi, 1997)
<i>C. albicans</i>	CP29-1-7	CAI-4 cpp1Δ::hisG-URA3-hisG/cpp1Δ::hisG	cpp1	(Csank et al., 1997)
<i>C. albicans</i>	JKC19	CAI-4 cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG-URA3-hisG	cph1	(Köhler and Fink, 1996)
<i>C. albicans</i>	HLC69-pRM1	CAI-4 efg1Δ::hisG/efg1Δ::hisG cph1Δ::hisG/cph1Δ::hisG LEU2/leu2::pRM1-URA3	efg1 cph1	(Federico Navarro, no publicado)
<i>C. albicans</i>	CDH25	CAI-4 cst20Δ::hisG/cst20Δ::hisG-URA3-hisG	cst20	(Leberer et al., 1996)
<i>C. albicans</i>	E5	CAI-4 cek1Δ::hisG/cek1Δ::hisG hog1::hisG/hog1::hisG ARD1/ard1::FRT SAP2pr-FLP-URA3	cek1 hog1	(Arana et al., 2007)
<i>C. albicans</i>	FCCa27	CAI-4 msb2Δ::hisG/msb2Δ::hisG-URA3-hisG	msb2	(Szafranski-Schneider et al., 2012)
<i>C. albicans</i>	BRD3-37	RM1000 pbs2Δ::cat/pbs2Δ::cat-URA3-cat	pbs2	(Arana et al., 2005)
<i>C. albicans</i>	PPD1	CAF2 ADH1/adh1::rtTA pTET-StlacZ-SAT1	CAF2-lacZ <sup>IND</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD2	CAF2 ADH1/adh1::tTA pTET-StlacZ-SAT1	CAF2-lacZ <sup>REP</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD3	CAF2 ADH1/adh1::tTA pTET-CaCbLUC-SAT1	CAF2-CaCbLUC <sup>REP</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PAP1	CAF2 ADH1/adh1::rtTA pTET-MoGFP-SAT1	CAF2-MoGFP <sup>IND</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	COA6-3	CAF2 ADH1/adh1::tTA pTET-MoGFP-SAT1	CAF2-MoGFP <sup>REP</sup>	(Inês Correia, no publicado)
<i>C. albicans</i>	PAP2	CAF2 ADH1/adh1::rtTA pTET-CaRFP-SAT1	CAF2-CaRFP <sup>IND</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD7	CAF2 ADH1/adh1::tTA pTET-CaRFP-SAT1	CAF2-CaRFP <sup>REP</sup>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD8	CAF2 ADH1/adh1::tTA pTET-SFU1-CaRFP-SAT1	CAF2-SFU1-CaRFP	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD9	CAF2 ADH1/adh1::tTA pTET-SKO1-CaRFP-SAT1	CAF2-SKO1-CaRFP	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD10	CAF2 ADH1/adh1::tTA pTET-PTC7-CaRFP-SAT1	CAF2-PTC7-CaRFP	Este trabajo

<i>C. albicans</i>	PPD11	<i>cek1</i> ADH1/ <i>adh1::tTA</i> pTET- <i>MoGFP</i> - SAT1	<i>cek1-MoGFP<sup>REP</sup></i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD12	<i>cek1</i> ADH1/ <i>adh1::tTA</i> pTET- <i>CaRFP</i> - SAT1	<i>cek1-CaRFP<sup>REP</sup></i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD13	<i>msb2</i> ADH1/ <i>adh1::tTA</i> pTET- <i>MoGFP</i> - SAT1	<i>msb2-MoGFP<sup>REP</sup></i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD14	<i>msb2</i> ADH1/ <i>adh1::tTA</i> pTET- <i>CaRFP</i> - SAT1	<i>msb2-CaRFP<sup>REP</sup></i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	COA10-9	<i>hog1</i> ADH1/ <i>adh1::tTA</i> pTET- <i>MoGFP</i> - SAT1	<i>hog1-MoGFP<sup>REP</sup></i>	(Inês Correia, no publicado)
<i>C. albicans</i>	PPD15	<i>pbs2</i> ADH1/ <i>adh1::tTA</i> pTET- <i>MoGFP</i> - SAT1	<i>pbs2-MoGFP<sup>REP</sup></i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	PPD16	<i>mkc1</i> ADH1/ <i>adh1::tTA</i> pTET- <i>MoGFP</i> - SAT1	<i>mkc1-MoGFP<sup>REP</sup></i>	Este trabajo

**Tabla 2: Relación de cepas microbianas utilizadas: genotipos y origen.**

## B. Líneas celulares de mamífero

Los cultivos celulares procedentes de mamífero empleados para los estudios de interacción con *C. albicans* se resumen a continuación:

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	UTILIDAD	REFERENCIA
Caco2	Epitelio intestinal	Modelo de adhesión e invasión.	ATCC HTB-37
A-431	Epitelio vulvovaginal	Modelo de adhesión.	ATCC CRL-1555
Macrófagos	Peritoneo de ratón (C57BL/6)	Producción de TNF- $\alpha$	Línea primaria.
Células madre hematopoyéticas	Médula ósea de ratón (C57BL/6)	Diferenciación en células inmunitarias.	Línea primaria.

**Tabla 3. Líneas celulares empleadas.**

## 2. Animales de experimentación

La manipulación de ratones de experimentación se ha llevado a cabo en tres animalarios distintos, según la disponibilidad de cepas de ratón o de técnicas a emplear. Las

condiciones de mantenimiento y de experimentación han sido similares en todos los casos y acordes a la normativa de cada ubicación.

Todos los protocolos experimentales y procedimientos empleados en animales de experimentación han sido previamente aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal correspondiente al laboratorio en que se llevaron a cabo.

## A. Estabulados en la Universidad Complutense de Madrid

Los ensayos de colonización por *C. albicans* correspondientes a la puesta a punto del sistema (ver Resultados 3.A), ensayos de competición con mutantes (ver Resultados 3.B), así como los ensayos de diseminación de origen gastrointestinal (ver Resultados 3.D.a) se han llevado a cabo en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, localizado en la Facultad de Medicina (Campus de Moncloa).

En todos los casos se han empleado ratones hembra C57BL/6J (B6) de 6-8 semanas de edad procedentes de Harlan Laboratories.

## B. Estabulados en la Universidad de Valencia

Los ratones utilizados los para ensayos de colonización por *C. albicans* correspondientes a ratones defectivos en TLRs y MyD88 (ver Resultados 3.C), así como los empleados para la obtención de cultivos celulares primarios, ya sean macrófagos peritoneales (ver Resultados 2.B.b) o células madre de médula ósea (ver Resultados 2.B.c) fueron mantenidos en el animalario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia (Campus de Burjassot).

En el caso de los ratones *knockout* en TLR2, TLR4 y MyD88 fueron gentilmente aportados por la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Gil. Ratones C57BL/6J (B6) de 6-8 semanas de edad, usados como control en colonización y para la obtención de cultivos primarios se obtuvieron de Charles River Laboratories.

## C. Estabulados en Harvard Medical School

Los experimentos de diseminación en ganglio poplíteo (ver Resultados 3.D.b) se efectuaron en el animalario de la Harvard Medical School localizado en el Armenisse Building (Harvard University, Campus de Longwood, Boston, MA). Los ratones empleados fueron C57BL/6J (B6) de 6-8 semanas de edad, que se obtuvieron de Charles River Laboratories, MHCII-EGFP *knockin* en el mismo fondo criados en el animalario.

### 3. Manipulación y análisis de estirpes celulares

#### A. Microorganismos

##### a) Medios de cultivo

Los medios de cultivo, para crecimiento de bacterias y levaduras, se utilizaron tanto en forma líquida como sólida, a los que se añaden un 2% peso/volumen (p/v) de agar se detallan en la Tabla 4. El agua utilizada para su disolución fue agua desionizada mediante sistemas de purificación Millipore, siendo posteriormente esterilizados en autoclave (121 °C, 22 min) o por filtración (para YPD libre de LPS).

MEDIO	COMPOSICIÓN	UTILIDAD	REFERENCIA
LB	1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura y 0.5 % NaCl	Medio rico utilizado para el crecimiento de bacterias.	(Sambrook et al., 1989)
LB-agar	1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.5 % NaCl y 2 % de agar.	Medio sólido utilizado para el crecimiento de bacterias. La adición de ampicilina 100 µg/mL se realizó para seleccionar transformantes portadores de plásmidos con resistencia a dicho antibiótico	(Sambrook et al., 1989)
YPD	1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % de glucosa	Medio completo para el cultivo de levaduras.	(Sherman et al., 1986)
YPD libre de LPS	1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % de glucosa	Medio completo para el cultivo de levaduras. El LPS es eliminado por tratamiento con polimixina B-agarosa.	
YPD-agar	1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % de glucosa y 2 % de agar.	Medio sólido completo para el cultivo de levaduras. La adición de nurotricina 200 mg/L se realizó para la selección de transformantes portadores del plásmido integrativo cuya construcción genética portan el gen de resistencia al citado antibiótico (pNIM1 y derivados).	(Sherman et al., 1986)
SD	2 % glucosa, 0,17 % base nitrogenada para levaduras, 0,5 % SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> y 0,19 % de mezcla de aminoácidos.	Medio de composición definida utilizado para el crecimiento de levaduras de forma rutinaria.	(Sherman et al., 1986)
SD Suero (20% FBS)	SD, suero fetal bovino estéril (Bio Whittaker, Bélgica)	Medio inductor de la filamentación en <i>C. albicans</i>	(Gow and Gooday, 1982)
SD-agar	2 % glucosa, 0.17 % base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 0.5 % SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 0,19 % de mezcla de aminoácidos y 2 % de agar.	Medio de composición definida utilizado para el crecimiento de levaduras de forma rutinaria.	(Sherman et al., 1986)
SD-XGal	SD-agar, tampón fosfato 70 mM ajustado a pH=7 y X-Gal 40 µg/mL.	Medio de detección de la expresión de lacZ en <i>C. albicans</i> .	(Uhl and Johnson, 2001)

**Tabla 4. Medios de cultivo utilizados con microorganismos.**

## b) Inducción de la transición polimórfica

La formación de hifas o crecimiento filamentoso se indujo por adición al medio de cultivo de un 20% de suero, recogándose las células tras 18 horas de crecimiento a 37 °C.

## c) Condiciones de oxigenación

El cultivo *in vitro* en distintas condiciones de oxigenación se llevó a cabo en jarras de anaerobiosis empleando el sistema comercial *GenBox Anaer* (Biomerieux) para generar anaerobiosis y *GenBox Microaer* (Biomerieux) para generar microaerofilia. Los cultivos en medio SD se mantuvieron a 37°C en agitación durante 72 horas.

La eliminación de oxígeno en muestras de heces se favoreció por aplicación de vacío a la muestra durante aproximadamente un minuto y posterior cierre hermético de tubo conteniendo la muestra.

## d) Tinción de componentes de la pared glucano

Los análisis fenotípicos de exposición de  $\beta$ -1,3-glucano de la pared de *Candida albicans* se llevaron a cabo mediante tinción de dicho compuesto por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Las levaduras fueron lavadas en PBS y bloqueadas 30 minutos con BSA (albumina sérica bovina) al 2% en PBS para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Las preparaciones fueron incubadas 1 hora a 4 °C con el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -(1,3)-glucano (Biosupplies, Australia Pty Ltd) diluido 1:200 en PBS con 2% BSA. Tras lavar 3 veces con PBS, las muestras se incubaron 1 hora a 4 °C con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa488 (Molecular Probes) diluido 1:200 en PBS con 2% BSA. Una vez lavadas (tres veces con PBS) las muestras fueron analizadas por citometría de flujo y microscopia de fluorescencia.

Un control negativo (2<sup>a</sup> capa) fue tratado solamente con el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo. Además se realizó la inactivación de levaduras por calor para obtener un control positivo (*heat killed*, HK).

## e) Inactivación de levaduras

En los experimentos de tinción del  $\beta$ -1,3-glucano de la pared celular fúngica se empleó un control inactivado por calor. Para ello se lavaron las levaduras procedentes de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento con PBS y se hirvieron en 1 mL de PBS a 99 °C durante 30 minutos.

En los experimento de interacción con macrófagos peritoneales y con células madre de médula ósea de ratón se requirió fijar las levaduras empleadas. Para ello se recogieron por centrifugación levaduras en fase exponencial de crecimiento (D.O.=0,8) de un cultivo en YPD libre de LPS a 30 °C. Tras ser lavadas dos veces con PBS estéril (Gibco) se incubaron en formaldehído al 4% a una concentración de  $4 \times 10^7$  células/mL durante 30 minutos. Tras este tiempo se eliminó el fijador lavando con PBS dos veces y se determinó

la concentración celular por recuento en hemocitómetro. A continuación se separó cada muestra en alícuotas que fueron mantenidas a -80 °C hasta su utilización.

## B. Líneas celulares

### a) Medios empleados

Los medios de cultivo para crecimiento de líneas celulares están detallados en la Tabla 5.

MEDIO	COMPOSICIÓN	UTILIDAD	REFERENCIA
<i>DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)</i>	<i>Medio rico en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa al que se le añade suero fetal bovino (10 %), glutamina y antibióticos (gentamicina)</i>	<i>Medio rico para cultivo de células epiteliales.</i>	<i>Gibco</i>
<i>RPMI 1640 con GlutaMAX</i>	<i>Medio rico en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa al que se le añade suero fetal bovino (10%) y antibióticos (penicilina/estreptomina)</i>	<i>Medio rico para cultivo de macrófagos.</i>	<i>Gibco</i>
<i>RPMI Lin-</i>	<i>RPMI 1640 con GlutaMAX al que se le añade suero fetal bovino (5%), antibióticos, SCF (20 ng/mL), IL-7 (10 ng/mL) y Flt-3 ligand (100 ng/mL).</i>	<i>Medio rico para cultivo de células madre hematopoyéticas.</i>	<i>Gibco</i>

**Tabla 5. Medios de cultivo utilizados para cultivos celulares.**

### b) Obtención y utilización de líneas celulares

Todos los tipos celulares se incubaron en estufas de cultivos celulares a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa controlada.

#### b.1. Líneas celulares inmortalizadas

Las líneas celulares Caco2 y A-431 se mantuvieron rutinariamente en cultivo en medio DMEM en frascos (*flask*) de 75 cm<sup>2</sup> hasta la generación de una monocapa de células confluentes, siendo el medio de cultivo remplazado cada 2-3 días. Se procedió al recrecimiento de las líneas celulares cuando se consideró necesario, nunca más tarde de 7 días y nunca superando el número de pases recomendado. Para ello se trataron las células adheridas al *flask* con tripsina (0,25% en PBS) a 37°C, previo lavado con PBS atemperado. Se recogieron las células por centrifugación a 1000 r.p.m., se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio DMEM fresco a la concentración final deseada. La densidad celular viable se determinó mediante hemocitómetro (cámara de Neubauer) utilizando el colorante vital azul de Tripan (Sigma).

### i Ensayo de adhesión

Para el modelo epitelial de adhesión las líneas celulares A-431 y Caco2 fueron crecidas en medio DMEM en placas de 24 pocillos hasta la generación de una monocapa de células confluentes. Tras el contacto *Candida*-Epitelio se recuperaron las fracciones adheridas y no adheridas a distintos tiempos (0, 30, 60, 120 y 240 minutos) y se sembraron en YPD-agar. La adhesión a poliestireno se efectuó en las mismas condiciones, pero en ausencia de células epiteliales. Por recuento de CFUs se obtuvo el porcentaje de adhesión mediante la fórmula siguiente:

$$\%Adhesión = \frac{adheridas}{adheridas + no adheridas} \times 100$$

### ii Ensayo de invasión

Para el modelo de invasión se usó la línea celular Caco2 crecida sobre una matriz de colágeno, sostenida por unos insertos (*ThinCert*) con membrana microporosa adaptable a placas de 24 pocillos. La formación de la matriz de colágeno se consiguió mediante gelificación de una solución de colágeno, obtenida de cola de rata, con una solución tampón (bicarbonato sódico, HEPES, NaOH, DMEM, FBS y gentamicina), mediante incubación a 37°C. Tras mantener el contacto *Candida*-Caco2 durante 12 y 24 horas se fijaron con solución de Bouin (Sigma). Tras lavar con agua, se deshidrataron por pases en sucesivas concentraciones crecientes de etanol que finalmente es eliminado lavando con xilol. A continuación, las muestras se incluyeron en parafina líquida (60°C) que se dejó enfriar en un molde donde solidifica formando un bloque que puede ser cortado con un micrótopo. Los cortes se efectuaron con un micrótopo rotatorio (Leica RM2145) a temperatura ambiente, obteniéndose cortes de 3 µm. Las muestras sufrieron un proceso de tinción rutinaria con eosina y hematoxilina previo a su observación.

## b.2. Líneas celulares primarias

### i Macrófagos

Los macrófagos peritoneales residentes se obtuvieron en condiciones estériles, por lavado peritoneal con 8-10 mL de PBS en ratones sin tratar recién sacrificados por dislocación cervical. La suspensión recogida se diluyó en medio RPMI fresco a 4°C y se centrifugó en frío a 1000 rpm durante 5 minutos. Finalmente se cuantificó el número de viables con hemocitómetro empleando el colorante vital azul de Tripan (Sigma).

A continuación se repartieron 200 µL de una suspensión a 10<sup>6</sup> células/mL en medio RPMI por pocillo en una placa de 96 pocillos y se llevó a incubar. Al cabo de 24 horas se refrescó el medio para eliminar las células no adheridas, seleccionándose los macrófagos. Tras 48 horas más de incubación se volvió a cambiar el medio y se añadió el estímulo, que se mantuvo durante 24 horas, momento en el que se recogieron los sobrenadantes que se almacenaron a -80°C hasta la determinación de citoquinas.

## ii Células madre hematopoyéticas

Las células madre hematopoyéticas se obtuvieron de las médulas óseas de fémures y tibias de ratones tras su sacrificio por dislocación cervical. Se escindieron los huesos de las patas traseras y se cortaron los extremos dejando al descubierto la parte medular. A continuación se hizo pasar PBS estéril repetidas veces por el conducto, lavándose las células de la médula que se recogen en un tubo. Tras homogenizar y filtrar la suspensión con un filtro de nylon (70  $\mu\text{m}$ , BD) se determinó la concentración de células en hemocitómetro.

La purificación de células HPSC linaje negativo (Lin-) se llevó a cabo por selección negativa inmunomagnética utilizando un método comercial (Miltenyi Biotec, Madrid). En primer lugar se incubaron las células de médula ósea con un cóctel de anticuerpos anti-Lin (específicos para marcadores de células maduras) marcados con biotina durante un tiempo de 15 minutos a 4°C. A continuación se añadieron anticuerpos anti-biotina conjugados con microesferas magnética y se incubaron otros 15 minutos a 4°C. Seguidamente se lavó con PBS y se pasó por una columna acoplada a un imán que retiene las células unidas a las microesferas. Así pues con los sucesivos lavados con tampón de purificación (PBS con 0,5% BSA y 2 mM EDTA) se eluyen específicamente las células Lin-.

Las células purificadas se concentraron y se pusieron en cultivo inmediatamente en medio RPMI Lin- en placas de 24 ó 96 pocillos a una concentración de  $8 \times 10^5$  células/mL, añadiéndose además los correspondientes estímulos. Se procedió a la diferenciación celular durante 7 días, cambiándose el medio al cuarto día, renovándose igualmente el estímulo.

## 4. Técnicas de biología molecular

### A. Manipulación de DNA

Las técnicas de manipulación de DNA, como son el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*, electroforesis de DNA en geles de agarosa, determinación de la pureza y concentración de DNA, etc., se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). *E. coli* se transformó rutinariamente según el protocolo Hanahan (1988).

Para la integración de construcciones genéticas en *C. albicans* se siguió el sistema de transformación desarrollado por Köhler y colaboradores que combina un tratamiento químico con un choque eléctrico por electroporación (Köhler *et al.*, 1997), así como el sistema desarrollado por Joachim Morschhäuser, usándose como marcador de selección dominante el antibiótico nirsotricina (Park and Morschhauser, 2005).

Los plásmidos resultantes fueron digeridos con *Kpn* I y *Ksp* I para su posterior integración ectópica en la región cromosómica del gen *ADH1* del DNA genómico de *C. albicans* seleccionándose los clones positivos por resistencia a nirsotricina (200 µg/mL).

### a) Resumen de plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo, para transformar *C. albicans* o como base para la construcción de otros plásmidos, se resumen en la Tabla 6. Los oligonucleótidos usados para amplificar genes por PCR se muestran en la Tabla 7.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<i>pNIM1-MoGFP</i>	<i>bla ADH1Pr ca-rtTA SAT1 OP4-TetOPr MoGFP ADH1Term</i>	(Park and Morschhauser, 2005)
<i>pNIM1R</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr ADH1Term</i>	(L.E. Cowen, sin publicar)
<i>pNIM1-St lacZ</i>	<i>bla ADH1Pr ca-rtTA SAT1 OP4-TetOPr St lacZ ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pNIM1R-St lacZ</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr St lacZ ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pUC57-CaCbLuc</i>	<i>ori bla lacZ CaCbLuc</i>	Este trabajo
<i>pNIM1R-CaCbLuc</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr CaCbLuc ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pNIM1R-MoGFP</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr MoGFP ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pUC57-CaRFP</i>	<i>ori bla lacZ CaRFP</i>	Este trabajo
<i>pNIM1-CaRFP</i>	<i>bla ADH1Pr ca-rtTA SAT1 OP4-TetOPr CaRFP ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pNIM1R-CaRFP</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr CaRFP ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pNIM1R-SFU1-CaRFP</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr SFU1CaRFP ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pNIM1R-SKO1-CaRFP</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4TetOPr SKO1CaRFP ADH1Term</i>	Este trabajo
<i>pNIM1R-PTC7-CaRFP</i>	<i>bla ADH1Pr ca-tTA SAT1 OP4-TetOPr PTC7CaRFP ADH1Term</i>	Este trabajo

**Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA 5'-3'	GENE AMPLIFICADO
<i>StLacZ_UP</i>	<i>TGAGTCGACGTCCATGAACATGACTGAAAAAATTCAA</i>	<i>lacZ</i>
<i>StLacZ_LW</i>	<i>GTATGGATCCCATTTAGTGGTTCAATCATGAAGCTTAATTG</i>	
<i>Sko1_UP</i>	<i>CAGCTCGAGGACGATGTCCAGTGACGTAAG</i>	<i>SKO1</i>
<i>Sko1_LW</i>	<i>GATCTCGAGGCTGTAGGATTTAAAGTAGTTGGTATAG</i>	
<i>Sfu1_UP</i>	<i>GGAGTCGACATTAATGCCTACCTCACCTAC</i>	<i>SFU1</i>
<i>Sfu1_LW</i>	<i>CATGTCGACCGTCCATTTAACAACCTTCCCAATAG</i>	
<i>Ptc7_UP</i>	<i>GGAGTCGACGTTGATGTCGATGTTATTAACAATTC</i>	<i>PTC7</i>
<i>Ptc7_LW</i>	<i>CATGTCGACCGTTTAACTTTACCAACACAACCG</i>	

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

## b) Descripción del sistema regulado por tetraciclina

Las construcciones de DNA utilizadas en este trabajo están basadas en el sistema de represión dependiente de tetraciclina de *E. coli*, TetR/tetO. Existen tres versiones diferentes de este sistema (Eckert and Muhlschlegel, 2009): La primera es el original, en el que TetR (represor Tet) se expresa constitutivamente y se une al operador (tetO) en ausencia de tetraciclina impidiendo así la expresión del gen regulado. En contacto con derivados de tetraciclina (doxiciclina) TetR cambia de conformación perdiendo la capacidad de unirse al DNA y, por tanto, permitiendo la expresión. La segunda versión se ha obtenido por fusión del dominio de unión a DNA de TetR a un dominio activador de la transcripción (por ejemplo de Gal4, Eno1,...) dando lugar a un trans-activador (tTA). En este caso la unión a tetO resulta en una activación de la expresión, que se inhibe cuando por la adición de doxiciclina el trans-activador pierde la capacidad de unirse al DNA. Es, por tanto, un sistema reprimible por doxiciclina (Dox<sup>REP</sup>). En la tercera opción lo que se fusiona al dominio activador es una versión de TetR (reverse TetR, rTetR) cuya relación presencia de doxiciclina-unión al DNA es inversa, es decir, se une a tetO en presencia de doxiciclina, pero no en su ausencia. De esta manera se consigue que el antibiótico se comporte como inductor al favorecer la unión del trans-activador inverso (rtTA, reverse tetracycline trans-activator) al operador (sistema Dox<sup>IND</sup>). Estos dos últimos sistemas se ha aplicado con éxito a *C. albicans* (Nakayama *et al.*, 2000;Roemer *et al.*, 2003;Park and Morschhauser, 2005).

El plásmido integrativo pNIM1-MoGFP (Park and Morschhauser, 2005), que funciona con el sistema Dox<sup>IND</sup>, fue cedido por el grupo del Dr. Joachim Morschhäuser (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Röntgenring*). El plásmido pNIM1R, que se basa en el sistema Dox<sup>REP</sup>, fue cedido por el grupo de la Dra. Leah E. Cowen (*Department of Molecular Genetics, University of Toronto*).

En ambos plásmidos el (r)tTA procede de la fusión (r)TetR-Gal4 y está expresado por el promotor constitutivo *ADH1*. El promotor regulado se compone de un derivado mínimo del promotor *OP4* con siete repeticiones de la secuencia *tetO* (Park and Morschhauser, 2005). La presencia del marcador dominante *SAT1*, permite la selección de transformantes por resistencia al antibiótico nirsotricina (200 µg/mL). La construcción está flanqueada por el promotor y la secuencia terminadora del gen *ADH1*, permitiéndose así la integración por recombinación homóloga en el *locus* de dicho gen *ADH1* (que codifica la proteína alcohol deshidrogenasa) en el DNA genómico del hongo.

## c) Construcciones genéticas realizadas en plásmidos de *C. albicans*

A continuación se describe la obtención y construcción de las construcciones genéticas empleadas:

### c.1. Clonación de <sup>Mo</sup>GFP

La versión modificada del gen GFP para su utilización en *C. albicans* fue obtenida del plásmido pNIM1-<sup>Mo</sup>GFP cedido por el grupo del Dr. Joachim Morschhäuser (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Röntgenring*). En la secuencia de dicho gen fueron sustituidos los codones CTG por TTG (Morschhäuser *et al.*, 1998) permitiendo la expresión de la forma funcional de la proteína fluorescente, por lo que en este trabajo nos referimos a dicho alelo como <sup>Mo</sup>GFP.

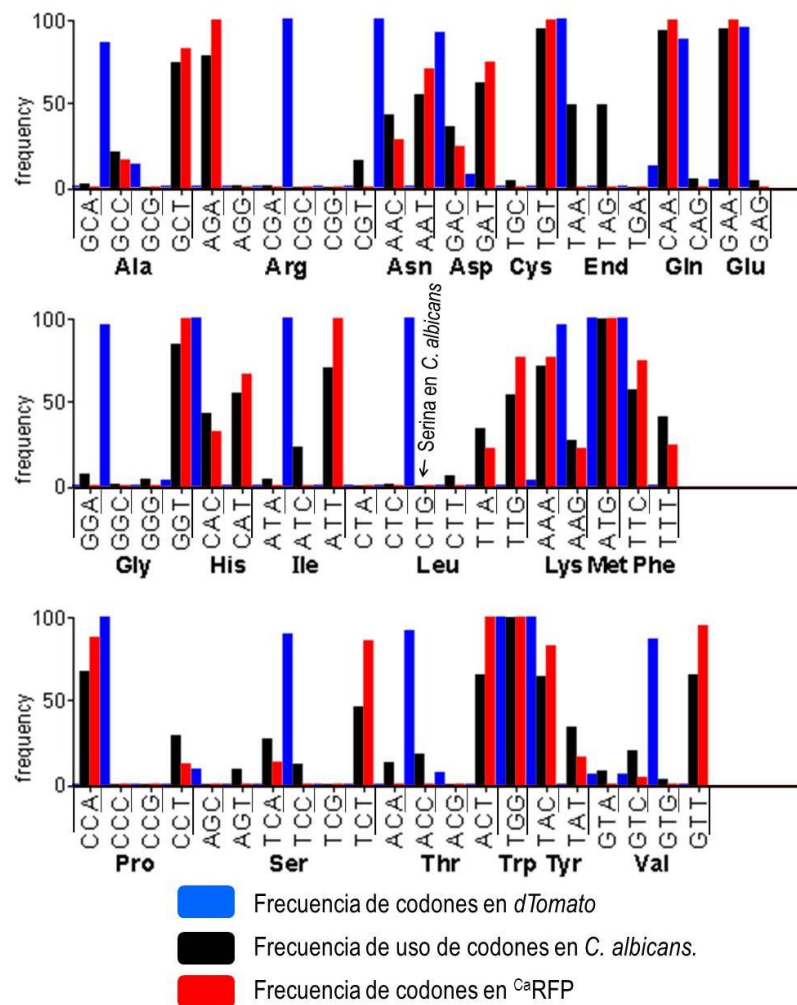
El plásmido pNIM1R-<sup>Mo</sup>GFP se obtuvo por sustitución del trans-activador rTA del pNIM1-<sup>Mo</sup>GFP por el tTA del pNIM1R tras digerir ambos con las enzimas de restricción *Ava* I y *Kpn* I. De esta manera se consigue obtener dos sistemas de alta versatilidad y elevada expresión de proteína fluorescente bajo un control estricto.

### c.2. Construcción de <sup>Ca</sup>RFP

La secuencia de DNA de dTomato (Figura 73 azul) posee 17 leucinas, todas ellas codificadas por el codón CTG. Dado que este codón codifica serina en *C. albicans* se optó por rediseñar *de novo* la secuencia de DNA del gen con objeto de optimizar todos los codones del gen y facilitar la expresión de esta proteína heteróloga en nuestro sistema biológico. Se estudió el uso de codones de dicho microorganismo y se realizó un estudio de la frecuencia de uso de codones (Figura 73 negro) en genes altamente expresados. Para ello, se recopiló de la base de datos *Candida Genome Database* (<http://www.candidagenome.org>) las secuencias de los genes *HWP1*, *ENO1*, *MRPS9* y *ACT1*. La combinación de dichas secuencias dio lugar a una muestra representativa del genoma del hongo, cuya frecuencia en codones debería correlacionarse lógicamente con el uso de codones del hongo y, por tanto, con la disponibilidad de RNA de transferencia a la hora de sintetizar una proteína determinada.

Para diseñar el gen, que denominamos <sup>Ca</sup>RFP, se sustituyó sistemáticamente los codones en fase por los de mayor frecuencia relacionados en el patrón establecido. En los casos en los que el predominio de un codón no es total (ácido aspártico, asparragina, histidina, lisina, leucina, fenilalanina y tirosina) se optó por alternar entre las dos opciones mayoritarias, dando preferencia a la más frecuente. Se evitó, obviamente, utilizar el codón CTG (que codifica serina en vez de leucina) al objeto de poder utilizar la misma construcción con otros microorganismos (como *S. cerevisiae*).

En el diseño de dicha secuencia se eliminaron del mismo los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción de uso frecuente y se añadieron dos sitios de reconocimiento para los enzimas *Eag* I y *Not* I. Los puntos de corte *Eag* I permiten la obtención de la secuencia intacta del gen que puede subclonarse en el sitio *Not* I, generándose el dímero en tándem (análogo a tdTomato). Por último se estableció la frecuencia de codones del gen diseñado (Figura 73 rojo) y se comparó con el patrón (Figura 73 negro).



**Figura 73. Frecuencia de utilización de codones en *dTomato*, en genes de *C. albicans* y en *CaRFP*.**

Frecuencia de uso de codones del gen que codifica para la proteína *dTomato* (azul), de distintos genes de *C. albicans* (negro) y del gen que codifica para la proteína *CaRFP* (rojo). La gráfica es una modificación de las obtenidas del programa Codon Usage Analyzer (<http://gcu.schoedl.de/>).

Una vez diseñado y sintetizado (*GenScript Corporation*), el gen *CaRFP* fue introducido en el vector *pNIM1-MoGFP* (Park and Morschhauser, 2005) tras la digestión con las enzimas de restricción *Sal I-Not I*, eliminándose así el gen *MoGFP* e introduciéndose la construcción que codifica para la adaptación a *C. albicans* de la RFP *dTomato* (Shaner *et al.*, 2004). De esta manera se obtuvo el plásmido *pNIM1-CaRFP*. A continuación se obtuvo el plásmido *pNIM1R-CaRFP* repitiendo el proceso anteriormente descrito de intercambio de trans-activadores.

Los genes *SKO1*, *SFU1* y *PTC7* de *C. albicans* fueron amplificados por PCR específica (Roche), empleando como molde DNA genómico total procedente de la cepa SC5314 del hongo. La incorporación de secuencias de reconocimiento por enzimas de restricción

(*Sal I* y *Xho I*) en los oligonucleótidos empleados como cebadores permitió su introducción en fase con el gen <sup>Ca</sup>RFP.

### c.3. Obtención del gen *lacZ* de *S. thermophilus*

El gen *lacZ* de *S. thermophilus* fue amplificado por PCR específica (Roche), empleando como molde DNA genómico total procedente de una colonia de dicho microorganismo. La incorporación de secuencias de reconocimiento por las enzimas de restricción (*Sal I* y *Bgl II*) en los oligonucleótidos empleados como cebadores permitió su introducción en los plásmidos regulados por doxiciclina.

### c.4. Obtención del gen <sup>Ca</sup>CbLUC

De forma análoga a <sup>Ca</sup>RFP, para obtener el gen <sup>Ca</sup>CbLuc se sustituyó sistemáticamente los codones en fase por los de mayor frecuencia en función del patrón establecido, evitando incorporar codones CTG. En el diseño de dicha secuencia se eliminaron, igualmente, los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Una vez diseñado y sintetizado (*GenScript Corporation*), el gen <sup>Ca</sup>CbLuc fue introducido en el plásmido pNIM1R tras digestión con enzimas de restricción (*Sal I* y *Bgl II*).

## B. Manipulación de proteínas

Las muestras de levaduras se recogieron en tubos de 10 mL, se centrifugaron y se resuspendieron en buffer de lisis a 4°C (50mM TrisHCl pH=8, 10% glicerol, 1% tritonX-100, 0,1% SDS, 150mM NaCl, 50 mM de NaF, 1mM ortovanadato sódico, 50 mM beta-glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico, 5mM EDTA pH=8) para ser transferidas a tubos de centrífuga.

Los extractos proteicos se obtuvieron mediante la ruptura mecánica por perlas de vidrio, tal y como se ha descrito para levaduras (Martin *et al.*, 2000) adaptando a *C. albicans* los pulsos de ruptura en la Fast-prep (3 repeticiones de 30 segundos). A todos los extractos proteicos se les adicionó tampón de carga 2x (Tris HCl 0,1M pH=6,8, 20% glicerol, 4% SDS y azul de bromofenol) previamente a su carga en el gel de poliacrilamida. Posteriormente se llevó a cabo la separación electroforética. La separación de proteínas se llevó a cabo mediante SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 10 %, en cubetas Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) a voltaje constante de 150 voltios.

Salvo que se indique lo contrario se evitó hervir las muestras para permitir la detección de fluorescencia *in situ* en un transiluminador de ultravioleta, las imágenes se tomaron con una cámara Panasonic CCD acoplada al software ScionImage. La tinción de proteínas como control de carga se realizó con azul de Coomassie, una tinción específica de proteínas.

Para los experimentos *in vitro* de la determinación de la estabilidad de extractos proteicos se añadieron los compuestos correspondientes al extracto. Estos agentes, su mecanismo de acción y su utilidad se detallan en la Tabla 8.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	UTILIDAD Y CARACTERÍSTICAS
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	0,5, 1, 2, 4 y 20 mM	Oxidante. Estudios de estrés oxidativo.
Diamida	1, 2 y 4 mM	Generadores de aniones superóxido. Estudios de estrés oxidativo
Menadiona	100, 200 y 400 $\mu$ M	
Cloruro sódico (NaCl)	1 y 2 M	Incrementan la osmolaridad externa.
Sorbitol	1 y 2 M	Estudios de sensibilidad a alta osmolaridad
Dodecil sulfato sódico (SDS)	0,05, 0,1, 0,5 y 1 %	Desnaturalización de proteínas y aporte de carga negativa.
Triton X-100	1 %	Desnaturalización de proteínas
Inhibidor de proteasas	10 %	Inhibe proteasas sin emplear EDTA (Roche)

**Tabla 8. Compuestos empleados en experimentos de estabilidad de extractos proteicos.**

## 5. Técnicas de luminiscencia, microscopía y citómetro de flujo

### A. Medida de luminiscencia

Para la determinación de actividad luciferasa se recogieron, por centrifugación, células de cultivos en medio SD a 37°C y se lavaron con solución de luciferasa (30 mM citrato sódico pH=2,5, 15 mM  $MgSO_4$ ). Para cada experimento, se mezclaron 50  $\mu$ L de suspensión celular con el mismo volumen de solución de luciferina (30 mM citrato sódico pH=2,5, 15 mM  $MgSO_4$  y 50  $\mu$ M de luciferina). La cuantificación de la señal de luminiscencia se realizó en un luminómetro (*OPTCOMP I*) durante 10 segundos en modo de integración de señal expresándose los resultados en unidades arbitrarias emitidas por  $10^6$  células de levadura. Cada medida se realizó por triplicado.

### B. Microscopía

#### a) Microscopía óptica

Las imágenes de microscopía de preparaciones celulares en fresco se tomaron por contraste de fases en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U con un objetivo oil 100X.

Las fotografías de las muestras de invasión se realizaron a través de una cámara a color acoplada al microscopio con un objetivo 40X, mediante el uso de un soporte informático de captación de imágenes en condiciones uniformes para todas ellas.

#### b) Microscopía de epifluorescencia

Para la visualización de fluorescencia (azul, verde o roja) se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U, adquiriendo las imágenes con una cámara Hamamatsu ORCA-ER-

CCD utilizando el software Aquacosmos 1.3. Los filtros utilizados son Nikon UV-2A (DAPI), Nikon B-2E/C para el verde (GFP y Alexa488) y Nikon G-2A para el rojo (RFP y yoduro de propidio). Salvo que se indique lo contrario, todas las imágenes de visualización de Alexa488, GFP y  $Ca^{2+}$ RFP fueron tomadas (ganancia, exposición) procesadas (brillo y contraste) entre sí de forma idéntica utilizando el programa Aquacosmos 1.3.

### c) Microscopia Confocal y MP-IVM

Las imágenes de confocal fueron tomadas con un microscopio invertido Olympus Fluoview BX50WI empleando los objetivos 10x/0.4, 20x/0.5 y 60x/1.4 y procesadas usando el software Volocity (Improvision).

La microscopía de dos fotones se realizó con un sistema Bio-Rad 2100MP. Para la excitación de 800 nm y la generación del segundo armónico se empleó un láser Tsunami Ti:Sapphire con una bomba láser de 10-W MillenniaXs (Spectra-Physics). Las imágenes secuenciales se montaron en forma de película mediante el software Volocity (Improvision).

## C. Citometría de flujo

### a) Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos utilizados para citometría de flujo, microscopía y purificación se detallan en la Tabla 9.

ANTICUERPOS	CARACTERÍSTICAS	USO	CASA COMERCIAL
<i>anti-<math>\beta</math>-(1,3)-glucano</i>	<i>Monoclonal</i>	<i>Tinción de <math>\beta</math>-glucano</i>	<i>Biosupplies, Australia Pty Ltd</i>
<i>anti-rabbit_Alexa488</i>	<i>Ac secundario</i>	<i>Tinción de <math>\beta</math>-glucano</i>	<i>Molecular Probes</i>
<i>Cóctel anti-Lin_biotina</i>	<i>CD5, CD45R, CD11b, Gr-1, 7-4 y Ter-119</i>	<i>Purificación de HSCs</i>	<i>Miltenyi Biotec</i>
<i>anti-biotina_magnetic beads</i>	<i>Microesferas magnética</i>	<i>Purificación de HSCs y LB</i>	<i>Miltenyi Biotec</i>
<i>FcR Blocking Reagent</i>	<i>Bloquea FcR</i>	<i>Tinción HSCs diferenciadas</i>	<i>Miltenyi Biotec</i>
<i>anti-CD11c_APC</i>	<i>Clon N418</i>	<i>Tinción HSCs diferenciadas</i>	<i>Miltenyi Biotec</i>
<i>anti-CD11b_PE</i>	<i>Clon M1/70</i>	<i>Tinción HSCs diferenciadas</i>	<i>eBioscience</i>
<i>anti-F4/80_PE-Cy7</i>	<i>Clon BM8</i>	<i>Tinción HSCs diferenciadas</i>	<i>eBioscience</i>

<i>anti-Ly6C_PerCP-Cy5.5</i>	Clon AL-21	Tinción HSCs diferenciadas	BD Pharmingen
<i>FcR-blocker</i>	Clon 2.4G2	Tinción de ganglio poplíteo	BD Pharmingen
<i>anti-B220_biotina</i>	Clon RA3-6B2	Purificación de LB	BioLegend
<i>anti-B220_Alexa488</i>	Clon RA3-6B2	Tinción de ganglio poplíteo	BioLegend
<i>anti-B220_Alexa647</i>	Clon RA3-6B2	Tinción de ganglio poplíteo	BioLegend
<i>anti-<math>\gamma\delta</math>TCR_APC</i>	Clon GL3	Tinción de ganglio poplíteo	eBioscience
<i>anti-CD3_Alexa568</i>	Clon 17A2	Tinción de ganglio poplíteo	BioLegend
<i>anti-CD11c_Alexa647</i>	Clon N418	Tinción de ganglio poplíteo	BioLegend
<i>anti-CD169_biotina</i>	Clon Ser4	Tinción de ganglio poplíteo	(Iannacone et al., 2010)
<i>Streptavidina_Alexa488</i>	Secundario	Tinción de ganglio poplíteo	BioLegend

**Tabla 9. Anticuerpos utilizados en este trabajo.**

## b) Aparatos empleados

Los aparatos de citometría y *software* asociado empleados en el presente trabajo fueron los siguientes:

Los citómetros FACScan y FACSCalibur (Becton Dickinson) del servicio de citometría de la UCM fueron utilizados para la determinación de la exposición de glucano y para la detección de proteínas fluorescente en *C. albicans*. El *software* empleado para el análisis de los datos correspondiente fue FloJo.

El citómetro FACSCanto (BD Biosciences) y su programa FACSDiva del servicio de citometría de la Universidad de Valencia fueron empleados para el análisis multifluorescente de las células diferenciadas a partir de células madre hematopoyéticas.

El citómetro Guava EasyCyte (Millipore) y su programa InCyte se utilizó para la detección de proteínas fluorescentes en *C. albicans* (de cultivo y en muestras de heces) y para la cuantificación de *C. albicans* y microbiota total en muestras de heces.

## 6. Determinación de citoquinas

La determinación de TNF- $\alpha$  liberado por macrófagos tras su estimulación con *C. albicans* se realizó por ensayo inmunoenzimático (ELISA). Se recogieron los sobrenadantes tras la centrifugación de las muestras y fueron conservados en alícuotas a -80°C hasta su determinación, siendo desechados una vez descongelados. Empleando un sistema comercial de ELISA específico para TNF- $\alpha$  (eBioscience) se analizó la concentración de esta citoquina en distintas diluciones de las muestras de manera que la determinación estuviera dentro del límite de confianza. Se compararon las densidades ópticas obtenidas con el patrón conocido aportado en el *kit* para concretar los valores en pg/mL.

## 7. Ensayos en animales de experimentación

### A. Ensayo de colonización

#### a) Protocolo general

Los ensayos de colonización del tracto gastrointestinal del ratón con *C. albicans* fueron realizados rutinariamente, salvo que se indique lo contrario, de la siguiente manera:

Cada grupo de entre 3 y 6 ratones aproximadamente es mantenido en una jaula con lecho, en condiciones ilimitadas de comida y bebida, durante todo el experimento. Desde su recepción, se establece un periodo de entre 3 y 7 días de aclimatamiento, durante el cual se procede a su marcaje individual en la oreja.

Se instaura un tratamiento antibiótico en agua estéril de bebida, que se mantendrá durante todo el experimento, consistente en 2 mg/mL de estreptomina (Sigma), 1 mg/mL de bacitracina (Sigma) y 0,1 mg/mL de gentamicina (Sigma).

Tras cuatro días de tratamiento oral se procede a la inoculación única de  $10^7$  levaduras en 100  $\mu$ L de PBS estéril mediante una cánula intragástrica. Las levaduras se obtienen de un cultivo *overnight* y son lavadas con PBS estéril previamente a ajustar la concentración de la suspensión.

Previamente a cualquier intervención y de forma periódica (cada 2-4 días) se obtienen muestras de heces frescas en las que se comprueba la presencia de *C. albicans*. Para ello, las muestras obtenidas individualmente de cada ratón son homogenizadas mecánicamente en PBS estéril, ajustándose a una concentración de 40 mg/mL.

Una vez obtenida la suspensión madre se procede a manipularla diferencialmente en función del parámetro a determinar:

- Determinación de *C. albicans* por CFUs: se procede sembrando directamente en placas de SD-agar las diluciones adecuadas en PBS de las muestras.
- Determinación de *C. albicans* por FACS: se filtra la muestra por un *cell strainer* de nylon de 40  $\mu\text{m}$  de poro y se diluye en PBS para su paso por citometría de flujo.
- Determinación de bacterias por FACS: el filtrado anterior se fija con etanol (concentración final de 70%) durante 1 hora. Se lava con PBS y se tiñe con yoduro de propidio (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) previamente a su análisis.

### b) Obtención de contenido intestinal

El análisis *post mortem* del contenido intestinal se realiza por obtención en condiciones asépticas del intestino completo. Una vez recogido el contenido de las porciones correspondientes se homogeniza mecánicamente en PBS estéril y se ajusta a una concentración de 40 mg/mL, prosiguiendo de forma idéntica a las muestras de heces.

## B. Ensayos de diseminación

### a) Estudio de placas de Peyer y ganglios mesentéricos

Para la determinación de contenido en *C. albicans* en PPs y MLNs se inoculó intragástricamente  $10^8$  células la cepa CAF2- $\text{CaRFP}^{\text{REP}}$  a ratones tratados oralmente con antibióticos (2 mg/mL estreptomycin, 1 mg/mL bacitracina y 0,1 mg/mL gentamicina). A distintos tiempos tras la inoculación se sacrificaron los animales en cámara de  $\text{CO}_2$ , obteniéndose, primeramente y en condiciones asépticas los ganglios mesentéricos. A continuación, se escindió el intestino completo donde se fueron identificando y aislando las placas de Peyer de mayor tamaño. Tras 3 lavados intensivos con PBS estéril, cada PP fue incubada durante 10 minutos en una solución de nistatina 24  $\mu\text{M}$  (Sigma) con el objetivo de eliminar los elementos fúngicos no internalizados en el órgano. Posteriormente se lavó con PBS estéril dos veces para eliminar el antifúngico. Tanto los MLNs como las PPs fueron disgregados en un filtro de nylon de 40  $\mu\text{m}$  y sembrados en placas de SD-agar para el recuento de CFUs.

### b) Análisis de órganos diana: Hígado, riñón y cerebro

Para la cuantificación de la presencia de *C. albicans* en hígado, riñón y cerebro se partió de grupos de ratones previamente colonizados con la cepa CAF2- $\text{CaRFP}^{\text{REP}}$  como hemos descrito previamente. La pauta de administración de ciclofosfamida fue 150 mg/Kg de peso intraperitoneal cada 48 horas hasta cumplir 3 dosis consecutivas. Pasadas 24 horas tras la última administración, se procedió al sacrificio de los animales en atmósfera de  $\text{CO}_2$ , obteniéndose en condiciones asépticas los órganos de interés. Una vez pesados se homogenizaron en 1 mL de PBS estéril empleando un homogenizador rotatorio y se sembraron las diluciones apropiadas en placas de SD-agar para el recuento de unidades formadoras de colonia.

## c) Estudio de ganglio poplíteo

### c.1. Preparación nódulos linfáticos para microscopía confocal

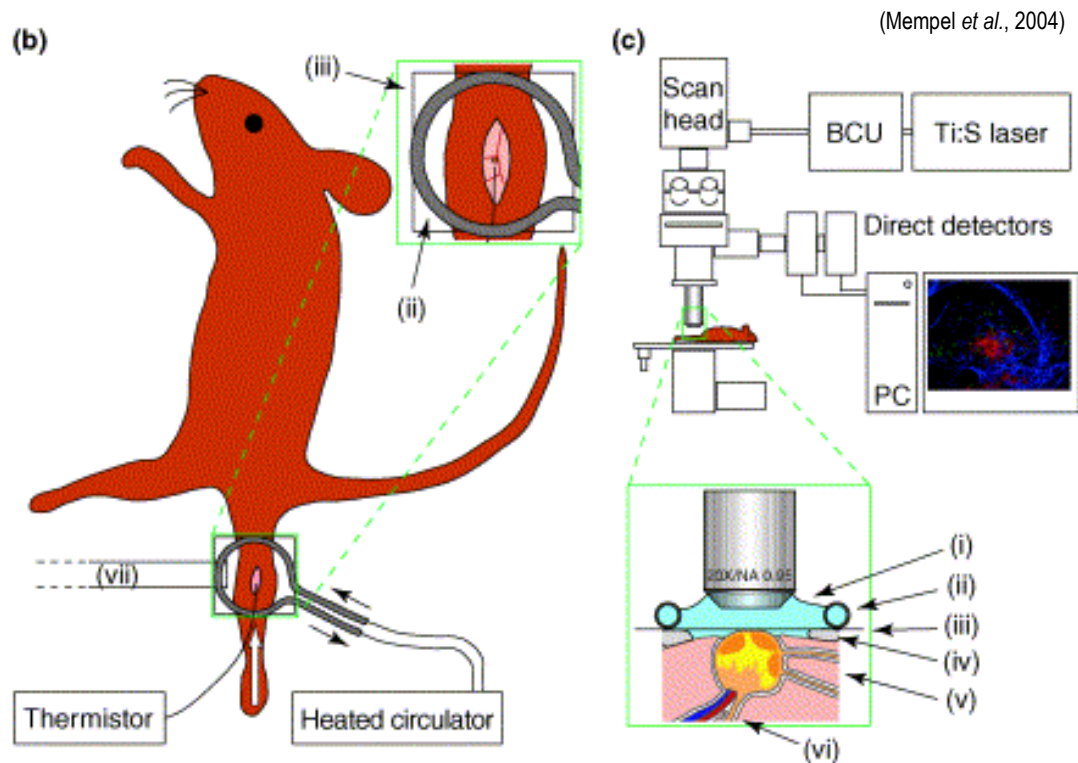
Tras la inoculación plantar (IFP) de *C. albicans*, se sacrificó al ratón en cámara de CO<sub>2</sub> y se obtuvo inmediatamente el ganglio poplíteo que se fijó durante 4 horas a 4 °C en una solución tampón de lisina con 1% de paraformaldehído/periodato (PLP). A continuación el ganglio fue lavado con PBS y pasado por concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30%) para establecer una crioprotección. Posteriormente la muestra se congeló rápidamente en líquido para congelar tejidos (Triangle Biomedical Sciences) y se mantuvieron a -80°C. Secciones de 30 µm fueron obtenidas en un criostato Leica CM1900 y se montaron en portaobjetos *Superfrost Plus* (VWR). Se realizó la tinción con anticuerpos específicos fluorescentes tras el bloqueo de los receptores de Fc (ver Tabla 9). Finalmente, las muestras se montaron en una solución FluorSave (EMDCalbiochem) y se cubrieron con un portaobjetos para su observación.

### c.2. Preparación *intra vital*

La Figura 74 muestra un esquema de la preparación para visualización intra-vital del ganglio poplíteo de ratón.

Para la transferencia adoptiva de LB marcados con GFP se purificaron linfocitos B por selección positiva inmunomagnética utilizando un método comercial (Miltenyi Biotec). Se incubaron las células procedentes bazo y ganglios linfáticos de ratones MHC II-GFP (Boes *et al.*, 2002) con un anticuerpo anti-B220 (específicos LB) marcados con biotina y anticuerpos anti-biotina conjugados con microesferas magnética.

Las células obtenidas se transfirieron a ratones C57BL/6 mediante inyección intravenosa. Tras 24 horas, se procedió a la inoculación de la cepa CAF2-RFP<sup>REP</sup> por inyección en planta del pie. Tras la inoculación en la planta del pie de *C. albicans*, el ratón fue anestesiado por administración intraperitoneal con una mezcla de ketamina y xilazina (50/10 mg/kg de peso) y situado en una plataforma adaptada. El ganglio poplíteo fue preparado por micro-cirugía y expuesto al exterior. A continuación, el nódulo se sumergió en suero salino y se cubrió con un cubreobjetos. Una sonda de temperatura colocada cerca del ganglio permitió monitorizar la temperatura local, mantenida a 36-38 °C a lo largo de todo el proceso.



**Figura 74. Técnicas de microscopía *intra vital* para la visualización de la infección en el ganglio linfático poplíteo.**

El nódulo poplíteo recibe linfa de la pata trasera (flecha blanca). La preparación en este nódulo es apropiada para la realización de microscopía multifotón *intra-vital* porque sus pequeñas dimensiones permiten visualizar la corteza profunda. Se realiza una pequeña incisión en la piel en el hueso trasero de la rodilla para acceder al nódulo poplíteo el cual tiene que ser mantenido inmerso en suero salino rodeado con vaselina para poder trabajar en él (i) y posteriormente sellarlo con un cubreobjetos (ii). El cubreobjetos se pega con pegamento a un soporte metálico ajustable (iii). El movimiento del tejido se previene mediante la utilización de abrazaderas percutáneas en las estructuras de superficies óseas de la espina dorsal, pelvis y pata trasera (no mostrado). El flujo de sangre y linfa eferente salen por el hilo del nódulo linfático (vii), mientras que la de los vasos aferentes (viii) entra en el nódulo por el polo distal. El pulso de láser de luz infrarroja de un láser Titanium:Sapphire (Ti:S) se escanea sobre un campo visual de un número alto de lentes. Figura obtenida de Mempel *et al.*, 2004.

## 8. Estadística y soporte bioinformático

Salvo que se indique lo contrario se calculan y representan las medias de los valores  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). En presencia de datos por debajo del límite de detección la media se calculó ajustando por el método de Cohen para análisis de datos censurados (Cohen, Jr., 1959).

Para la comparación de las medias entre dos grupos se usó la prueba *t* de Student apareada de dos colas. La comparación entre 3 o más grupos se llevó a cabo por un análisis *one-way* ANOVA con *post-test* de Dunnett (comparación con el control).

Durante la realización de este trabajo se han consultado diferentes bases de datos y se han empleado diferentes herramientas bioinformáticas. Las más utilizadas han sido las siguientes:

**Pubmed.** Base de datos de revistas científicas de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

**Candida Genome Database.** Base de datos desarrollada por el Consorcio europeo Galar Fungail para el análisis del genoma de *C. albicans*. Contiene información sobre secuencias de DNA, proteínas, homólogos en *S. cerevisiae*, etc. <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>

**Graphical Codon Usage Analyser 2.0.** Herramienta disponible para el estudio y comparativa de la frecuencia de uso de codones de distintos microorganismos y de secuencias problema. <http://gcu.schoedl.de/>

**Prism (GraphPad).** Programa de integración, representación y análisis estadístico de datos.

**Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).** Permite la búsqueda de homologías y las comparaciones entre todas las secuencias disponibles en las bases de datos, tanto de DNA como de proteínas. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

# Listado de figuras y tablas

---



## Listado de Figuras

Figura 1: Morfologías celulares de <i>C. albicans</i> .....	12
Figura 2: Organización esquemática de la pared celular fúngica. ....	13
Figura 3: Esquema general de rutas de MAPKs.....	19
Figura 4: Rutas de transducción de señales mediadas por quinasas tipo MAP en <i>C. albicans</i> .....	21
Figura 5: Principales células del sistema inmunitario y PRRs implicados en el reconocimiento fúngico. ....	32
Figura 6. Cultivo sólido de <i>C. albicans</i> expresando el gen <i>StlacZ</i> . ....	56
Figura 7. Funcionalidad de la enzima CbLuc en <i>C. albicans</i> . ....	57
Figura 8. Expresión de <sup>Ca</sup> CbLuc en función de la fase de crecimiento. ....	58
Figura 9. Detección de GFP expresada en <i>C. albicans</i> . ....	59
Figura 10. Cinética de inducción de <sup>Mo</sup> GFP en medio SD. ....	61
Figura 11. Cinética de represión de la expresión de <sup>Mo</sup> GFP. ....	62
Figura 12. Inducción de la expresión de <sup>Mo</sup> GFP a concentraciones limitantes de doxiciclina. .....	64
Figura 13. Represión de la expresión de <sup>Mo</sup> GFP en concentraciones limitantes de doxiciclina. ....	66
Figura 14. Frecuencia de utilización de codones en yEMRFP, en <i>C. albicans</i> y en <sup>Ca</sup> RFP. .....	67
Figura 15. Aspecto macroscópico de <i>C. albicans</i> expresando <sup>Ca</sup> RFP. ....	68
Figura 16. Detección de <sup>Ca</sup> RFP expresada en <i>C. albicans</i> . ....	69
Figura 17. Propiedades electroforéticas de RFP expresada en <i>C. albicans</i> . ....	70
Figura 18. Estabilidad de <sup>Ca</sup> RFP en extractos proteicos. ....	72
Figura 19. Cinética de inducción de la expresión de <sup>Ca</sup> RFP. ....	74
Figura 20. Cinética de represión de la expresión de <sup>Ca</sup> RFP. ....	76
Figura 21. Inducción de la expresión de <sup>Ca</sup> RFP a diferentes concentraciones de doxiciclina. .....	77

Figura 22. Represión de la expresión de $CaRFP$ a concentraciones limitantes de doxiciclina.....	79
Figura 23. Detección conjunta de GFP y RFP por citometría de flujo.....	80
Figura 24. Visualización microscópica conjunta de dos cepas de <i>C. albicans</i> expresando GFP y RFP.....	80
Figura 25. Colonias de <i>C. albicans</i> expresando proteínas fluorescentes.....	81
Figura 26. Curvas de crecimiento de cepas de <i>C. albicans</i> portando diferentes construcciones genéticas que expresan GFP y RFP. ....	82
Figura 27. Evolución de poblaciones <i>in vitro</i> de cepas de <i>C. albicans</i> expresando distintos genes reporteros fluorescentes.....	83
Figura 28. Localización de proteínas de fusión Sko1-RFP, Sfu1-RFP y Ptc7-RFP. ....	84
Figura 29. Exposición de $\beta$ -(1,3)-glucano en la pared de distintos mutantes en señalización. ....	88
Figura 30. Adhesión a poliestireno de distintas cepas mutantes de <i>C. albicans</i> .....	90
Figura 31. Adhesión a células de epitelio intestinal de distintas cepas mutantes de <i>C. albicans</i> . ....	91
Figura 32. Adhesión a células de origen vulvovaginal de distintos mutantes de <i>C. albicans</i> . ....	92
Figura 33. Capacidad de invasión de distintos mutantes en quinasas tipo MAP. ....	94
Figura 34. Liberación de TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneales. ....	95
Figura 35. Análisis de HSPCs estimuladas con distintos mutantes de <i>C. albicans</i> .....	96
Figura 36. Cuantificación de la diferenciación de HSCs a moDCs. ....	97
Figura 37. Esquema del protocolo empleado en estudios de colonización por <i>C. albicans</i> .....	99
Figura 38. Colonización por <i>C. albicans</i> de ratones C57/BL6 durante 56 días.....	100
Figura 39. Estabilidad genética de la $CaRFP$ en la cepa CAF2- $CaRFP^{REP}$ durante la colonización intestinal. ....	101
Figura 40. Detección de proteínas fluorescentes en <i>C. albicans</i> con diferentes condiciones de oxigenación.....	103
Figura 41. Detección por microscopía de <i>C. albicans</i> en heces expresando proteínas fluorescentes.....	104

Figura 42. Detección por FACS de <i>C. albicans</i> en heces expresando proteínas fluorescentes.....	105
Figura 43. Dependencia del nivel de oxigenación en el análisis <i>ex vivo</i> por FACS de <i>C. albicans</i> en heces expresando GFP.....	106
Figura 44. Comparación de la cuantificación de <i>C. albicans</i> en muestras de heces por citometría y recuento en placa.....	107
Figura 45. Detección de la microbiota fecal por citometría de flujo.....	109
Figura 46. Expresión de la enzima CbLuc en distintas condiciones de oxigenación. ....	110
Figura 47. Evolución de la expresión de proteínas fluorescente en <i>C. albicans</i> en colonización en presencia de doxiciclina y tras su eliminación (grupo A). ....	112
Figura 48. Evolución de la expresión de proteínas fluorescente en <i>C. albicans</i> durante colonización en ausencia de doxiciclina y tras su adición (grupo B). ....	113
Figura 49. Colonización por <i>C. albicans</i> en ratones con una microbiota endógena inalterada.....	115
Figura 50. Efecto del tratamiento antibiótico en la colonización por <i>C. albicans</i> .....	116
Figura 51. Efecto del tratamiento antibiótico en ratones no inoculados.....	117
Figura 52. Efecto de distintos antibióticos en la colonización por <i>C. albicans</i> . ....	118
Figura 53. Evolución de la colonización intestinal por <i>C. albicans</i> y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con bacitracina. ....	119
Figura 54. Evolución de la colonización intestinal por <i>C. albicans</i> y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con bacitracina. ....	120
Figura 55. Evolución de la colonización intestinal por <i>C. albicans</i> y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con doxiciclina. ....	121
Figura 56. Evolución de la colonización intestinal por <i>C. albicans</i> y del contenido total de bacterias en presencia de tratamiento antibiótico con metronidazol. ....	122
Figura 57. Capacidad de colonización competitiva de las cepas CAF2- <sup>Mo</sup> GFP y CAF2- <sup>Ca</sup> RFP .....	124
Figura 58. Colonización competitiva de CAF2-GFP y CAF2-RFP a lo largo del tracto intestinal.....	125
Figura 59. Capacidad de colonización del mutante <i>cek1</i> en competición con su parental. ....	127

Figura 60. Capacidad de colonización del mutante <i>msb2</i> en competición con su parental. .....	128
Figura 61. Presencia de las cepas CAF2 y <i>msb2</i> en el lumen intestinal.....	129
Figura 62. Capacidad de colonización del mutante <i>hog1</i> en competición con su cepa parental. ....	130
Figura 63. Presencia de las cepas CAF2 y <i>hog1</i> en interior intestinal. ....	131
Figura 64. Capacidad de colonización del mutante <i>pbs2</i> en competición con su parental. .....	132
Figura 65. Presencia de las cepas CAF2 y <i>pbs2</i> en interior intestinal. ....	132
Figura 66. Capacidad de colonización del mutante <i>mkc1</i> en competición con su parental. .....	133
Figura 67. Presencia de las cepas CAF2 y <i>mkc1</i> en interior intestinal. ....	134
Figura 68. Colonización por <i>C. albicans</i> en ratones defectivos en TLR2, TLR4 y MyD88. .....	135
Figura 69. Presencia de <i>C. albicans</i> en placas de Peyer (PP) y ganglios mesentéricos (MLN). ....	137
Figura 70. Diseminación a órganos diana de <i>C. albicans</i> tras inmunosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones colonizados gastrointestinalmente.....	138
Figura 71. Visualización de la infección del ganglio poplíteo por <i>C. albicans</i> . ....	141
Figura 72. Observación <i>intra-vital</i> de <i>C. albicans</i> en ganglio linfático poplíteo. ....	142
Figura 73. Frecuencia de utilización de codones en dTomato, en genes de <i>C. albicans</i> y en <sup>Ca</sup> RFP.....	191
Figura 74. Técnicas de microscopía <i>intra vital</i> para la visualización de la infección en el ganglio linfático poplíteo.....	199

## Listado de Tablas

Tabla 1. Principales genes reporteros descritos en <i>C. albicans</i> .....	25
Tabla 2: Relación de cepas microbianas utilizadas: genotipos y origen. ....	181
Tabla 3. Líneas celulares empleadas. ....	181
Tabla 4. Medios de cultivo utilizados con microorganismos. ....	183
Tabla 5. Medios de cultivo utilizados para cultivos celulares. ....	185
Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo. ....	188
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. ....	188
Tabla 8. Compuestos empleados en experimentos de estabilidad de extractos proteicos. ....	193
Tabla 9. Anticuerpos utilizados en este trabajo. ....	195



## Bibliografía

---



- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**:593-623.: 593-623.
- Akins, R.A. (2005) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **43**: 285-318.
- Akira, S., and Hemmi, H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* **85**: 85-95.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511.
- Alangaden, G.J. (2011) Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infect Dis Clin North Am* **25**: 201-225.
- Alex, L.A., Korch, C., Selitrennikoff, C.P., and Simon, M.I. (1998) *COS1*, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7069-7073.
- Alexander, J.W., Boyce, S.T., Babcock, G.F., Gianotti, L., Peck, M.D., Dunn, D.L. *et al.* (1990) The process of microbial translocation. *Ann Surg* **212**: 496-510.
- Almeida, R.S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J.E. *et al.* (2008) the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* **4**: e1000217.
- Alonso-Monge, R., Carvahlo, S., Nombela, C., Rial, E., and Pla, J. (2009) The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiol* **155**: 413-423.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J. *et al.* (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Román, E., Negredo, A.I., Eisman, B., Nombela, C., and Pla, J. (2003) The Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Essential in the Oxidative Stress Response and Chlamydospore Formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 351-361.
- Alonso-Monge, R., Roman, E., Arana, D.M., Prieto, D., Urrialde, V., Nombela, C., and Pla, J. (2010) The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 587-601.
- Alonso-Monge, R., Román, E., Nombela, C., and Pla, J. (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**: 905-912.
- Andrulis, K.A., Riggle, P.J., Kumamoto, C.A., and Tzipori, S. (2000) Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. *J Clin Microbiol* **38**: 2317-2323.
- Arana, D.M., Alonso-Monge, R., Du, C., Calderone, R., and Pla, J. (2007) Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol*.
- Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., and Pla, J. (2005) The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiol* **151**: 1033-1049.
- Arana, D.M., and Pla, J. (2012) Use of Luciferases as a Tool to Analyze Fungal Physiology in Association with Gene Transcription. In *Biotechnology of Fungal Genes*. V.K.Gutpa, and M.Ayyachamy (eds), pp. 173-188.

- Arana,D.M., Prieto,D., Roman,E., Nombela,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2009) The role of the cell wall in fungal pathogenesis. *Microb Biotechnol* **2**: 308-320.
- Aratani,Y., Koyama,H., Nyui,S., Suzuki,K., Kura,F., and Maeda,N. (1999) Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* **67**: 1828-1836.
- Argimon,S., Wishart,J.A., Leng,R., Macaskill,S., Mavor,A., Alexandris,T. *et al.* (2007) Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**: 682-692.
- Ariizumi,K., Shen,G.L., Shikano,S., Ritter,R., III, Zukas,P., Edelbaum,D. *et al.* (2000a) Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* **275**: 11957-11963.
- Ariizumi,K., Shen,G.L., Shikano,S., Xu,S., Ritter,R., III, Kumamoto,T. *et al.* (2000b) Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275**: 20157-20167.
- Atarashi,K., Nishimura,J., Shima,T., Umesaki,Y., Yamamoto,M., Onoue,M. *et al.* (2008) ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* **455**: 808-812.
- Baillie,G.S., and Douglas,L.J. (1999) Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* **48**: 671-679.
- Balish,E., Balish,M.J., Salkowski,C.A., Lee,K.W., and Bartizal,K.F. (1984) Colonization of congenitally athymic, gnotobiotic mice by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **47**: 647-652.
- Balish,E., Filutowicz,H., and Oberley,T.D. (1990) Correlates of cell-mediated immunity in *Candida albicans*-colonized gnotobiotic mice. *Infect Immun* **58**: 107-113.
- Banuett,F. (1998) Signalling in the yeasts: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 249-274.
- Barelle,C.J., Manson,C.L., MacCallum,D.M., Odds,F.C., Gow,N.A., and Brown,A.J. (2004) GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*. *Yeast* **21**: 333-340.
- Basu,S., Hodgson,G., Zhang,H.H., Katz,M., Quilici,C., and Dunn,A.R. (2000) "Emergency" granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood* **95**: 3725-3733.
- Bates,S., MacCallum,D.M., Bertram,G., Munro,C.A., Hughes,H.B., Buurman,E.T. *et al.* (2005) *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem* **280**: 23408-23415.
- Bell,J.K., Mullen,G.E., Leifer,C.A., Mazzoni,A., Davies,D.R., and Segal,D.M. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**: 528-533.
- Bellocchio,S., Montagnoli,C., Bozza,S., Gaziano,R., Rossi,G., Mambula,S.S. *et al.* (2004) The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol* **172**: 3059-3069.
- Bendel,C.M., Wiesner,S.M., Garni,R.M., Cebelinski,E., and Wells,C.L. (2002) Cecal colonization and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and dexamethasone. *Pediatr Res* **51**: 290-295.
- Benninger,R.K., Hao,M., and Piston,D.W. (2008) Multi-photon excitation imaging of dynamic processes in living cells and tissues. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **160**: 71-92.
- Berg,R.D. (1995) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* **3**: 149-154.
- Berman,J., and Sudbery,P.E. (2002) *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* **3**: 918-930.

- Biswas,K., and Morschhauser,J. (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **56**: 649-669.
- Blander,J.M., and Medzhitov,R. (2006) Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* **440**: 808-812.
- Bockmuhl,D.P., and Ernst,J.F. (2001) A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* **157**: 1523-1530.
- Boes,M., Cerny,J., Massol,R., Op den,B.M., Kirchhausen,T., Chen,J., and Ploegh,H.L. (2002) T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* **418**: 983-988.
- Bozza,S., Zelante,T., Moretti,S., Bonifazi,P., DeLuca,A., D'Angelo,C. *et al.* (2008) Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. *J Immunol* **180**: 4022-4031.
- Brandhorst,T.T., Wuthrich,M., Finkel-Jimenez,B., Warner,T., and Klein,B.S. (2004) Exploiting type 3 complement receptor for TNF-alpha suppression, immune evasion, and progressive pulmonary fungal infection. *J Immunol* **173**: 7444-7453.
- Braun,B.R., Head,W.S., Wang,M.X., and Johnson,A.D. (2000) Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**: 31-44.
- Braun,B.R., and Johnson,A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**: 105-109.
- Brown,A.J., Odds,F.C., and Gow,N.A. (2007) Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **10**: 307-313.
- Brown,G.D. (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**: 33-43.
- Brown,G.D., and Gordon,S. (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**: 36-37.
- Brown,G.D., and Gordon,S. (2005) Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol* **7**: 471-479.
- Brown,G.D., Herre,J., Williams,D.L., Willment,J.A., Marshall,A.S., and Gordon,S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**: 1119-1124.
- Brown,G.D., Taylor,P.R., Reid,D.M., Willment,J.A., Williams,D.L., Martinez-Pomares,L. *et al.* (2002) Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**: 407-412.
- Bryant,C., and Fitzgerald,K.A. (2009) Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol* **19**: 455-464.
- Bueter,C.L., Lee,C.K., Rathinam,V.A., Healy,G.J., Taron,C.H., Specht,C.A., and Levitz,S.M. (2011) Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *J Biol Chem* **286**: 35447-35455.
- Cahalan,M.D., Parker,I., Wei,S.H., and Miller,M.J. (2002) Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* **2**: 872-880.
- Calderon,L., Williams,R., Martinez,M., Clemons,K.V., and Stevens,D.A. (2003) Genetic susceptibility to vaginal candidiasis. *Med Mycol* **41**: 143-147.
- Calderone,R.A., and Fonzi,W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 327-335.
- Calera,J.A., Zhao,X.J., and Calderone,R. (2000) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 518-525.

- Cambi,A., Gijzen,K., de Vries,J.M., Torensma,R., Joosten,B., Adema,G.J. *et al.* (2003) The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**: 532-538.
- Campbell,R.E., Tour,O., Palmer,A.E., Steinbach,P.A., Baird,G.S., Zacharias,D.A., and Tsien,R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7877-7882.
- Cantero,P.D., Lengsfeld,C., Prill,S.K., Subanovic,M., Roman,E., Pla,J., and Ernst,J.F. (2007) Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-O-mannosylation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **64**: 1115-1128.
- Capilla,J., Clemons,K.V., and Stevens,D.A. (2007) Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol* **45**: 657-684.
- Care,R.S., Trevethick,J., Binley,K.M., and Sudbery,P.E. (1999) The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* **34**: 792-798.
- Casadevall,A., and Pirofski,L.A. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* **67**: 3703-3713.
- Casadevall,A., and Pirofski,L.A. (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **1**: 17-24.
- Casadevall,A., and Pirofski,L.A. (2004) The weapon potential of a microbe. *Trends Microbiol* **12**: 259-263.
- Cassone,A., Marconi,P., and Bistoni,F. (1987) Cell wall of *Candida albicans* and host response. *Crit Rev Microbiol* **15**: 87-95.
- Cenci,E., Mencacci,A., Spaccapelo,R., Tonnetti,L., Mosci,P., Enssle,K.H. *et al.* (1995) T helper cell type 1 (Th1)- and Th2-like responses are present in mice with gastric candidiasis but protective immunity is associated with Th1 development. *J Infect Dis* **171**: 1279-1288.
- Chaffin,W.L., Lopez-Ribot,J.L., Casanova,M., Gozalbo,D., and Martinez,J.P. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 130-180.
- Chalfie,M., Tu,Y., Euskirchen,G., Ward,W.W., and Prasher,D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Chamilos,G., Lionakis,M.S., Lewis,R.E., and Kontoyiannis,D.P. (2007) Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis* **7**: 42-55.
- Chandra,J., Kuhn,D.M., Mukherjee,P.K., Hoyer,L.L., McCormick,T., and Ghannoum,M.A. (2001) Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J Bacteriol* **183**: 5385-5394.
- Chauhan,N., Inglis,D., Román,E., Pla,J., Li,D., and Calderone,R. The response regulator gene [*SSK1*] of *Candida albicans* functions in the adaptation of cells to hydrogen peroxide. 2003. Ref Type: Conference Proceeding
- Chauhan,N., Latge,J.P., and Calderone,R. (2006) Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* **4**: 435-444.
- Cheetham,J., Smith,D.A., da Silva,D.A., Doris,K.S., Patterson,M.J., Bruce,C.R., and Quinn,J. (2007) A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **18**: 4603-4614.
- Chen,C.G., Yang,Y.L., Cheng,H.H., Su,C.L., Huang,S.F., Chen,C.T. *et al.* (2006) Non-lethal *Candida albicans* *cph1/cph1 efg1/efg1* transcription factor mutant establishing restricted zone of infection in a mouse model of systemic infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* **19**: 561-565.

- Chen,J., Chen,J., Lane,S., and Liu,H. (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **46**: 1335-1344.
- Chen,J., Wang,Q., and Chen,J.Y. (2000) *CEK2*, a Novel MAPK from *Candida albicans* Complement the Mating Defect of *fus3/kss1* Mutant. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **32**: 299-304.
- Cheng,S.C., Sprong,T., Joosten,L.A., Van der Meer,J.W., Kullberg,B.J., Hube,B. *et al.* (2012) Complement plays a central role in *Candida albicans*-induced cytokine production by human PBMCs. *Eur J Immunol* **42**: 993-1004.
- Cheng,S.C., van,d., V, Lenardon,M., Stoffels,M., Plantinga,T., Smeekens,S. *et al.* (2011) The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* **90**: 357-366.
- Chiang,L.Y., Sheppard,D.C., Bruno,V.M., Mitchell,A.P., Edwards,J.E., Jr., and Filler,S.G. (2007) *Candida albicans* protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* **9**: 233-245.
- Clemons,K.V., Gonzalez,G.M., Singh,G., Imai,J., Espiritu,M., Parmar,R., and Stevens,D.A. (2006) Development of an orogastrointestinal mucosal model of candidiasis with dissemination to visceral organs. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2650-2657.
- Clemons,K.V., Spearow,J.L., Parmar,R., Espiritu,M., and Stevens,D.A. (2004) Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans* vaginitis correlates with host estrogen sensitivity. *Infect Immun* **72**: 4878-4880.
- Cohen,A.C., Jr. (1959) Simplified Estimators for the Normal Distribution When Samples Are Singly Censored or Truncated. *Technometrics* **1**: 217-237.
- Cole,G.T., Seshan,K.R., Pope,L.M., and Yancey,R.J. (1988) Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *J Med Vet Mycol* **26**: 173-185.
- Conti,H.R., and Gaffen,S.L. (2010) Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* **12**: 518-527.
- Conti,H.R., Shen,F., Nayyar,N., Stocum,E., Sun,J.N., Lindemann,M.J. *et al.* (2009) Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* **206**: 299-311.
- Cormack,B.P., Bertram,G., Egerton,M., Gow,N.A.R., Falkow,S., and Brown,A.J.P. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiol* **143**: 303-311.
- Cowan,K.J., and Storey,K.B. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* **206**: 1107-1115.
- Csank,C., Makris,C., Meloche,S., Schröppel,K., Röllinghoff,M., Dignard,D. *et al.* (1997) Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 Family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **8**: 2539-2551.
- Csank,C., Schröppel,K., Leberer,E., Harcus,D., Mohamed,O., Meloche,S. *et al.* (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**: 2713-2721.
- Cubitt,A.B., Heim,R., Adams,S.R., Boyd,A.E., Gross,L.A., and Tsien,R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455.
- Curtis,M.M., and Way,S.S. (2009) Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* **126**: 177-185.
- Cutler,J.E. (2001) N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:75-86.: 75-86.

- Cutler, J.E., Corti, M., Lambert, P., Ferris, M., and Xin, H. (2011) Horizontal transmission of *Candida albicans* and evidence of a vaccine response in mice colonized with the fungus. *PLoS One* **6**: e22030.
- d'Ostiani, C.F., Del, S.G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A. *et al.* (2000) Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* **191**: 1661-1674.
- Dabrowa, N., and Howard, D.H. (1981) Proline uptake in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **127**: 391-397.
- Dale, B.A., and Fredericks, L.P. (2005) Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* **7**: 119-133.
- Dale, B.A., Kimball, J.R., Krisanaprakornkit, S., Roberts, F., Robinovitch, M., O'Neal, R. *et al.* (2001) Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* **36**: 285-294.
- Dalle, F., Wachtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D. *et al.* (2010) Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* **12**: 248-271.
- De Backer, M.D., Magee, P.T., and Pla, J. (2000) Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **54**: 463-498.
- De Bernardis, F., Arancia, S., Morelli, L., Hube, B., Sanglard, D., Schafer, W., and Cassone, A. (1999) Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular *SAP2*, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* **179**: 201-208.
- De Luca, A., Montagnoli, C., Zelante, T., Bonifazi, P., Bozza, S., Moretti, S. *et al.* (2007) Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, andIDO-dependent inhibition of Rorc. *J Immunol* **179**: 5999-6008.
- De Luca, A., Zelante, T., D'Angelo, C., Zagarella, S., Fallarino, F., Spreca, A. *et al.* (2010) IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol* **3**: 361-373.
- de Repentigny L. (2004) Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **7**: 324-329.
- Den Hertog, A.L., van, M.J., van Veen, H.A., Van't, H.W., Bolscher, J.G., Veerman, E.C., and Nieuw Amerongen, A.V. (2005) Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *Biochem J* **388**: 689-695.
- Den Hertog, A.L., van, M.J., Veerman, E.C., Valentijn-Benz, M., Nazmi, K., Kalay, H. *et al.* (2006) The human cathelicidin peptide LL-37 and truncated variants induce segregation of lipids and proteins in the plasma membrane of *Candida albicans*. *Biol Chem* **387**: 1495-1502.
- Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**: 73-76.
- Dennehy, K.M., Ferwerda, G., Faro-Trindade, I., Pyz, E., Willment, J.A., Taylor, P.R. *et al.* (2008) Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* **38**: 500-506.
- Deslauriers, N., Coulombe, C., Carre, B., and Goulet, J.P. (1995) Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **11**: 45-55.
- Diamond, M.S., Garcia-Aguilar, J., Bickford, J.K., Corbi, A.L., and Springer, T.A. (1993) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* **120**: 1031-1043.

- Dieterich,C., Schandar,M., Noll,M., Johannes,F.J., Brunner,H., Graeve,T., and Rupp,S. (2002) *In vitro* reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology* **148**: 497-506.
- Diez-Orejas,R., Molero,G., Navarro-García,F., Pla,J., Nombela,C., and Sánchez-Pérez,M. (1997) Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for a mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun* **65**: 833-837.
- Dixon,D.M., McNeil,M.M., Cohen,M.L., Gellin,B.G., and La,M., Jr. (1996) Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep* **111**: 226-235.
- Donini,M., Zenaro,E., Tamassia,N., and Dusi,S. (2007) NADPH oxidase of human dendritic cells: role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur J Immunol* **37**: 1194-1203.
- Doyle,S.L., and O'Neill,L.A. (2006) Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* **72**: 1102-1113.
- Doyle,T.C., Burns,S.M., and Contag,C.H. (2004) In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cell Microbiol* **6**: 303-317.
- Doyle,T.C., Nawotka,K.A., Kawahara,C.B., Francis,K.P., and Contag,P.R. (2006a) Visualizing fungal infections in living mice using bioluminescent pathogenic *Candida albicans* strains transformed with the firefly luciferase gene. *Microb Pathog* **40**: 82-90.
- Doyle,T.C., Nawotka,K.A., Purchio,A.F., Akin,A.R., Francis,K.P., and Contag,P.R. (2006b) Expression of firefly luciferase in *Candida albicans* and its use in the selection of stable transformants. *Microb Pathog* **40**: 69-81.
- Drogen,F., O'Rourke,S.M., Stucke,V.M., Jaquenoud,M., Neiman,A.M., and Peter,M. (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol* **10**: 630-639.
- Dromer,F., Chevalier,R., Sendid,B., Improvisi,L., Jouault,T., Robert,R. et al. (2002) Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3869-3876.
- Eckert,S.E., and Muhlschlegel,F.A. (2009) Promoter regulation in *Candida albicans* and related species. *FEMS Yeast Res* **9**: 2-15.
- Edmond,M.B., Wallace,S.E., McClish,D.K., Pfaller,M.A., Jones,R.N., and Wenzel,R.P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* **29**: 239-244.
- Eisman,B., Alonso-Monge,R., Román,E., Arana,D., Nombela,C., and Pla,J. (2006) The Cek1 and Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinases Play Complementary Roles in Cell Wall Biogenesis and Chlamyospore Formation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 347-358.
- Elahi,S., Pang,G., Clancy,R., and Ashman,R.B. (2000) Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun* **68**: 5771-5777.
- Enjalbert,B., Smith,D.A., Cornell,M.J., Alam,I., Nicholls,S., Brown,A.J., and Quinn,J. (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.
- Epstein,J., Eichbaum,Q., Sheriff,S., and Ezekowitz,R.A. (1996) The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **8**: 29-35.
- Ernst,J.F., and Prill,S.K. (2001) O-glycosylation. *Med Mycol* **39 Suppl 1:67-74**: 67-74.

- Fanello,S., Bouchara,J.P., Jousset,N., Delbos,V., and LeFlohic,A.M. (2001) Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. *J Hosp Infect* **47**: 46-52.
- Farah,C.S., Hu,Y., Riminton,S., and Ashman,R.B. (2006) Distinct roles for interleukin-12p40 and tumour necrosis factor in resistance to oral candidiasis defined by gene-targeting. *Oral Microbiol Immunol* **21**: 252-255.
- Felk,A., Kretschmar,M., Albrecht,A., Schaller,M., Beinhauer,S., Nichterlein,T. *et al.* (2002) *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* **70**: 3689-3700.
- Ferwerda,B., Ferwerda,G., Plantinga,T.S., Willment,J.A., van Sriel,A.B., Venselaar,H. *et al.* (2009) Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* **361**: 1760-1767.
- Fidel,P.L., Jr., Cutright,J., and Steele,C. (2000) Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* **68**: 651-657.
- Filler,S.G., and Sheppard,D.C. (2006) Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog* **2**: e129.
- Fonzi,W.A. (1999) *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* **181**: 7070-7079.
- Fonzi,W.A., and Irwin,M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Forsyth,C.B., and Mathews,H.L. (2002) Lymphocyte adhesion to *Candida albicans*. *Infect Immun* **70**: 517-527.
- Forsyth,C.B., Plow,E.F., and Zhang,L. (1998) Interaction of the fungal pathogen *Candida albicans* with integrin CD11b/CD18: recognition by the I domain is modulated by the lectin-like domain and the CD18 subunit. *J Immunol* **161**: 6198-6205.
- Fradin,C., Kretschmar,M., Nichterlein,T., Gaillardin,C., d'Enfert,C., and Hube,B. (2003) Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **47**: 1523-1543.
- Fradin,C., Poulain,D., and Jouault,T. (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* **68**: 4391-4398.
- Fraser,I.P., Takahashi,K., Koziel,H., Fardin,B., Harmsen,A., and Ezekowitz,R.A. (2000) *Pneumocystis carinii* enhances soluble mannose receptor production by macrophages. *Microbes Infect* **2**: 1305-1310.
- Frohm,M., Agerberth,B., Ahangari,G., Stahle-Backdahl,M., Liden,S., Wigzell,H., and Gudmundsson,G.H. (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* **272**: 15258-15263.
- Galán-Díez,M., Arana,D.M., Serrano-Gomez,D., Kremer,L., Casasnovas,J.M., Ortega,M. *et al.* (2010) *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal CEK1-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. *Infect Immun* **78**: 1426-1436.
- Gale,C.A., Bendel,C.M., McClellan,M., Hauser,M., Becker,J.M., Berman,J., and Hostetter,M.K. (1998) Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* **279**: 1355-1358.
- Gantner,B.N., Simmons,R.M., Canavera,S.J., Akira,S., and Underhill,D.M. (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**: 1107-1117.

- Gantner,B.N., Simmons,R.M., and Underhill,D.M. (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* **24**: 1277-1286.
- Garber,G. (2001) An overview of fungal infections. *Drugs* **61 Suppl 1**: 1-12.
- García-Rodríguez,L.J., Duran,A., and Roncero,C. (2000) Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol* **182**: 2428-2437.
- Garside,P., and Brewer,J.M. (2008) Real-time imaging of the cellular interactions underlying tolerance, priming, and responses to infection. *Immunol Rev* **221**: 130-146.
- Gaur,N.A., Manoharlal,R., Saini,P., Prasad,T., Mukhopadhyay,G., Hoefer,M. *et al.* (2005) Expression of the CDR1 efflux pump in clinical *Candida albicans* isolates is controlled by a negative regulatory element. *Biochem Biophys Res Commun* **332**: 206-214.
- Geijtenbeek,T.B., Krooshoop,D.J., Bleijs,D.A., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Grabovsky,V. *et al.* (2000a) DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* **1**: 353-357.
- Geijtenbeek,T.B., Torensma,R., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Adema,G.J., van,K.Y., and Figdor,C.G. (2000b) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**: 575-585.
- Gerami-Nejad,M., Berman,J., and Gale,C.A. (2001) Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast* **18**: 859-864.
- Gerhardt,A., Hammer,T.R., Balluff,C., Mucha,H., and Hoefer,D. (2012) A model of the transmission of micro-organisms in a public setting and its correlation to pathogen infection risks. *J Appl Microbiol* **112**: 614-621.
- Gil,M.L., and Gozalbo,D. (2009) Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci* **14**: 570-582.
- Gillum,A.M., Tsay,E.Y.H., and Kirsch,D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182.
- González,M.M., Diez-Orejas,R., Molero,G., Alvarez,A.M., Pla,J., Nombela,C., and Sánchez-Pérez,M. (1997) Phenotypic characterization of a *Candida albicans* strain deficient in its major exoglucanase. *Microbiol* **143**: 3023-3032.
- Goodridge,H.S., Simmons,R.M., and Underhill,D.M. (2007) Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **178**: 3107-3115.
- Goodridge,H.S., Wolf,A.J., and Underhill,D.M. (2009) Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev* **230**: 38-50.
- Gow,N.A. (1997) Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol* **8**: 43-55.
- Gow,N.A., and Gooday,G.W. (1982) Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **128**: 2187-2194.
- Gow,N.A., and Hube,B. (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*.
- Gow,N.A., Netea,M.G., Munro,C.A., Ferwerda,G., Bates,S., Mora-Montes,H.M. *et al.* (2007) Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* **196**: 1565-1571.
- Gozalbo,D., Roig,P., Villamon,E., and Gil,M.L. (2004) *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**: 117-135.

- Gringhuis,S.I., den,D.J., Litjens,M., van Het,H.B., van,K.Y., and Geijtenbeek,T.B. (2007) C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **26**: 605-616.
- Gross,O., Gewies,A., Finger,K., Schafer,M., Sparwasser,T., Peschel,C. *et al.* (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**: 651-656.
- Gross,O., Poeck,H., Bscheider,M., Dostert,C., Hanneschlager,N., Endres,S. *et al.* (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* **459**: 433-436.
- Hanahan,D. (1988) Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning. Glover,D.M. (ed). Oxford: IRL Press, pp. 109-135.
- Hara,H., Ishihara,C., Takeuchi,A., Imanishi,T., Xue,L., Morris,S.W. *et al.* (2007) The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* **8**: 619-629.
- Harriott,M.M., and Noverr,M.C. (2011) Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol* **19**: 557-563.
- Harry,J.B., Oliver,B.G., Song,J.L., Silver,P.M., Little,J.T., Choiniere,J., and White,T.C. (2005) Drug-induced regulation of the *MDR1* promoter in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2785-2792.
- He,G., Shankar,R.A., Chzhan,M., Samouilov,A., Kuppusamy,P., and Zweier,J.L. (1999) Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4586-4591.
- Heim,R., Prasher,D.C., and Tsien,R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12501-12504.
- Heim,R., and Tsien,T.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelenghts and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**: 178-182.
- Heinsbroek,S.E., Brown,G.D., and Gordon,S. (2005) Dectin-1 escape by fungal dimorphism. *Trends Immunol* **26**: 352-354.
- Helmerhorst,E.J., Breeuwer,P., Van't,H.W., Walgreen-Weterings,E., Oomen,L.C., Veerman,E.C. *et al.* (1999) The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* **274**: 7286-7291.
- Helstrom,P.B., and Balish,E. (1979) Effect of oral tetracycline, the microbial flora, and the athymic state on gastrointestinal colonization and infection of BALB/c mice with *Candida albicans*. *Infect Immun* **23**: 764-774.
- Hermann,H., Hacker,U., Bandlow,W., and Magdolen,V. (1992) pYLZ vectors: *Saccharomyces cerevisiae*/*Escherichia coli* shuttle plasmids to analyze yeast promoters. *Gene* **119**: 137-141.
- Herre,J., Gordon,S., and Brown,G.D. (2004a) Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* **40**: 869-876.
- Herre,J., Marshall,A.S., Caron,E., Edwards,A.D., Williams,D.L., Schweighoffer,E. *et al.* (2004b) Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* **104**: 4038-4045.
- Herskowitz,I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**: 187-197.
- Hida,N., Awais,M., Takeuchi,M., Ueno,N., Tashiro,M., Takagi,C. *et al.* (2009) High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases. *PLoS One* **4**: e5868.
- Hise,A.G., Tomalka,J., Ganesan,S., Patel,K., Hall,B.A., Brown,G.D., and Fitzgerald,K.A. (2009) An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **5**: 487-497.

- Hodges,A., Sharrocks,K., Edelman,M., Baban,D., Moris,A., Schwartz,O. *et al.* (2007) Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* **8**: 569-577.
- Hoffmann,J.A., Kafatos,F.C., Janeway,C.A., and Ezekowitz,R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318.
- Hoyer,L.L. (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 176-180.
- Hsu,Y.M., Zhang,Y., You,Y., Wang,D., Li,H., Duramad,O. *et al.* (2007) The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* **8**: 198-205.
- Huang,W., Na,L., Fidel,P.L., and Schwarzenberger,P. (2004) Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* **190**: 624-631.
- Hube,B. (1999) Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* **15**: 65-68.
- Hull,C.M., Raisner,R.M., and Johnson,A.D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**: 307-310.
- Iannaccone,M., Moseman,E.A., Tonti,E., Bosurgi,L., Junt,T., Henrickson,S.E. *et al.* (2010) Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* **465**: 1079-1083.
- Ibata-Ombetta,S., Idziorek,T., Trinel,P.A., Poulain,D., and Jouault,T. (2003) *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 13086-13093.
- Igarashi,T., Brown,C.R., Endo,Y., Buckler-White,A., Plishka,R., Bischofberger,N. *et al.* (2001) Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 658-663.
- Inoue,S., Wirman,J.A., Alexander,J.W., Trocki,O., and Cardell,R.R. (1988) *Candida albicans* translocation across the gut mucosa following burn injury. *J Surg Res* **44**: 479-492.
- Ip,W.K., and Lau,Y.L. (2004) Role of mannose-binding lectin in the innate defense against *Candida albicans*: enhancement of complement activation, but lack of opsonic function, in phagocytosis by human dendritic cells. *J Infect Dis* **190**: 632-640.
- Ivanov,I.I., Atarashi,K., Manel,N., Brodie,E.L., Shima,T., Karaoz,U. *et al.* (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**: 485-498.
- Iwasaki,H., and Akashi,K. (2007) Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* **26**: 726-740.
- Jakobs,S., Subramaniam,V., Schonle,A., Jovin,T.M., and Hell,S.W. (2000) EFGP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett* **479**: 131-135.
- Janeway,C.A., Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**: 11-16.
- Jawahara,S., and Poulain,D. (2007) *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med Mycol* **45**: 691-700.
- Jiang,L., Whiteway,M., and Shen,S.H. (2001) A novel type 2C protein phosphatase from the human fungal pathogen *Candida albicans*. *FEBS Lett* **509**: 142-144.

- Johansson,M.E., Larsson,J.M., and Hansson,G.C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**: 4659-4665.
- Johansson,M.E., Phillipson,M., Petersson,J., Velcich,A., Holm,L., and Hansson,G.C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15064-15069.
- Johnson,D.A., Yeh,C.K., and Dodds,M.W. (2000) Effect of donor age on the concentrations of histatins in human parotid and submandibular/sublingual saliva. *Arch Oral Biol* **45**: 731-740.
- Jouault,T., El Abed-El,B.M., Martinez-Esparza,M., Breuilh,L., Trinel,P.A., Chamailard,M. *et al.* (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* **177**: 4679-4687.
- Jouault,T., Ibata-Ombetta,S., Takeuchi,O., Trinel,P.A., Sacchetti,P., Lefebvre,P. *et al.* (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* **188**: 165-172.
- Juge,N. (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol* **20**: 30-39.
- Junt,T., Moseman,E.A., Iannacone,M., Massberg,S., Lang,P.A., Boes,M. *et al.* (2007) Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* **450**: 110-114.
- Kamai,Y., Kubota,M., Kamai,Y., Hosokawa,T., Fukuoka,T., and Filler,S.G. (2001) New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3195-3197.
- Kamai,Y., Kubota,M., Kamai,Y., Hosokawa,T., Fukuoka,T., and Filler,S.G. (2002) Contribution of *Candida albicans* *ALS1* to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* **70**: 5256-5258.
- Kanazawa,N. (2007) Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci* **45**: 77-86.
- Kanazawa,N., Tashiro,K., and Miyachi,Y. (2004) Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology* **209**: 179-190.
- Kapteyn,J.C., Hoyer,L.L., Hecht,J.E., Muller,W.H., Andel,A., Verkleij,A.J. *et al.* (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**: 601-611.
- Kapteyn,J.C., Ter Riet,B., Vink,E., Blad,S., De Nobel,H., van den,E.H., and Klis,F.M. (2001) Low external pH induces *HOG1*-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **39**: 469-480.
- Karababa,M., Valentino,E., Pardini,G., Coste,A.T., Bille,J., and Sanglard,D. (2006) CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **59**: 1429-1451.
- Kawai,T., and Akira,S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**: 373-384.
- Kelly,M.T., MacCallum,D.M., Clancy,S.D., Odds,F.C., Brown,A.J., and Butler,G. (2004) The *Candida albicans* *CaACE2* gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol* **53**: 969-983.
- Kennedy,M.J., and Volz,P.A. (1985) Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. *Sabouraudia* **23**: 265-273.
- Kepler-Ross,S., Noffz,C., and Dean,N. (2008) A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics* **179**: 705-710.
- Kimberg,M., and Brown,G.D. (2008) Dectin-1 and its role in antifungal immunity. *Med Mycol* **46**: 631-636.

- Kinneberg,K.M., Bendel,C.M., Jechorek,R.P., Cebelinski,E.A., Gale,C.A., Berman,J.G. *et al.* (1999) Effect of *INT1* gene on *Candida albicans* murine intestinal colonization. *J Surg Res* **87**: 245-251.
- Kirsch,D.R., and Whitney,R.R. (1991) Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun* **59**: 3297-3300.
- Kishore,U., Greenhough,T.J., Waters,P., Shrive,A.K., Ghai,R., Kamran,M.F. *et al.* (2006) Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* **43**: 1293-1315.
- Klippel,N., Cui,S., Groebe,L., and Bilitewski,U. (2010) Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene *CHK1* improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall beta-1,3-glucans. *Microbiol* **156**: 3432-3444.
- Kobayashi,G.S., and Cutler,J.E. (1998) *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role ? *Trends Microbiol* **6**: 92-94.
- Koh,A.Y., Kohler,J.R., Coggshall,K.T., Van,R.N., and Pier,G.B. (2008) Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog* **4**: e35.
- Kohatsu,L., Hsu,D.K., Jegalian,A.G., Liu,F.T., and Baum,L.G. (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* **177**: 4718-4726.
- Köhler,G.A., White,T.C., and Agabian,N. (1997) Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* **179**: 2331-2338.
- Köhler,J., and Fink,G.R. (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13223-13228.
- Koppel,E.A., van Gisbergen,K.P., Geijtenbeek,T.B., and van,K.Y. (2005) Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol* **7**: 157-165.
- Kozel,T.R. (1996) Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* **9**: 34-46.
- Kozel,T.R., MacGill,R.S., Percival,A., and Zhou,Q. (2004) Biological activities of naturally occurring antibodies reactive with *Candida albicans* mannan. *Infect Immun* **72**: 209-218.
- Kumamoto,C.A. (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5576-5581.
- Kumamoto,C.A., and Pierce,J.V. (2011) Immunosensing during colonization by *Candida albicans*: does it take a village to colonize the intestine? *Trends Microbiol* **19**: 263-267.
- Kvaal,C., Lachke,S.A., Srikantha,T., Daniels,K., McCoy,J., and Soll,D.R. (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**: 6652-6662.
- Kvaal,C.A., Srikantha,T., and Soll,D.R. (1997) Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* **65**: 4468-4475.
- Lan,C.Y., Rodarte,G., Murillo,L.A., Jones,T., Davis,R.W., Dungan,J. *et al.* (2004) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **53**: 1451-1469.
- Larsson,E., Tremaroli,V., Lee,Y.S., Koren,O., Nookaew,I., Fricker,A. *et al.* (2012) Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* **61**: 1124-1131.

- Lay, J., Henry, L.K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C.E., and Becker, J.M. (1998) Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**: 5301-5306.
- Leberer, E., Marcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K. *et al.* (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13217-13222.
- Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Marcus, D., Dignard, D., Ash, J. *et al.* (1997) Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol* **7**: 539-546.
- Lee, B.N., and Elion, E.A. (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12679-12684.
- Lee, K.L., Buckley, H.R., and Campbell, C.C. (1975) An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **13**: 148-153.
- Lee, S.J., Zheng, N.Y., Clavijo, M., and Nussenzweig, M.C. (2003) Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun* **71**: 437-445.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V. *et al.* (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* **8**: 630-638.
- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J. *et al.* (1998) Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 26078-26086.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983.
- Lenardon, M.D., Munro, C.A., and Gow, N.A. (2010) Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **13**: 416-423.
- Leuker, C.E., Hahn, A.M., and Ernst, J.F. (1992)  $\beta$ -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mol Gen Genet* **235**: 235-241.
- Li, D., Gurkovska, V., Sheridan, M., Calderone, R., and Chauhan, N. (2004) Studies on the regulation of the two-component histidine kinase gene *CHK1* in *Candida albicans* using the heterologous *lacZ* reporter gene. *Microbiol* **150**: 3305-3313.
- Li, F., and Palecek, S.P. (2003) EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* **2**: 1266-1273.
- Liu, Y., and Filler, S.G. (2011) *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* **10**: 168-173.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Lockhart, S.R., Wu, W., Radke, J.B., Zhao, R., and Soll, D.R. (2005) Increased virulence and competitive advantage of *a/alpha* over *a/a* or *alpha/alpha* offspring conserves the mating system of *Candida albicans*. *Genetics* **169**: 1883-1890.
- Lopez-Ribot, J.L. (2005) *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol* **15**: R453-R455.
- Lorenz, M.C., and Fink, G.R. (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**: 83-86.

- Lorenz, M.C., and Fink, G.R. (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell* **1**: 657-662.
- MacCallum, D.M., and Odds, F.C. (2004) Safety aspects of working with *Candida albicans*-infected mice. *Med Mycol* **42**: 305-309.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* **303**: 1662-1665.
- Magee, B.B., and Magee, P.T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science* **289**: 310-313.
- Magee, P.T., and Magee, B.B. (2004) Through a glass opaquely: the biological significance of mating in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **7**: 661-665.
- Mansour, M.K., and Levitz, S.M. (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* **5**: 359-365.
- Marcil, A., Harcus, D., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2002) *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun* **70**: 6319-6329.
- Marodi, L., Korchak, H.M., and Johnston, R.B., Jr. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **146**: 2783-2789.
- Marr, K.A., Balajee, S.A., Hawn, T.R., Ozinsky, A., Pham, U., Akira, S. *et al.* (2003) Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun* **71**: 5280-5286.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.
- Martinez-Pomares, L., Linehan, S.A., Taylor, P.R., and Gordon, S. (2001) Binding properties of the mannose receptor. *Immunobiology* **204**: 527-535.
- Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C., Terai, I., and Fujita, T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* **165**: 2637-2642.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., and Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol* **17**: 969-973.
- Mavor, A.L., Thewes, S., and Hube, B. (2005) Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* **6**: 863-874.
- McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S. *et al.* (2006) The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiol* **16**: 422-430.
- McGuckin, M.A., Linden, S.K., Sutton, P., and Florin, T.H. (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* **9**: 265-278.
- Means, T.K., Mylonakis, E., Tampakakis, E., Colvin, R.A., Seung, E., Puckett, L. *et al.* (2009) Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med* **206**: 637-653.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Regadera, J., Gonzalez, M., az-Guerra, T.M., and Rodriguez-Tudela, J.L. (2000) Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. *Diagn Microbiol Infect Dis* **38**: 21-28.
- Mempel, T.R., Scimone, M.L., Mora, J.R., and von Andrian, U.H. (2004) In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol* **16**: 406-417.

- Miller, M.G., and Johnson, A.D. (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.
- Miranda, L.N., van, d.H., I, Costa, S.F., Sousa, A.P., Sienna, R.A., Gobara, S. *et al.* (2009) *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* **72**: 9-16.
- Miyake, K. (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* **12**: 186-192.
- Miyake, K. (2007) Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* **19**: 3-10.
- Miyawaki, A. (2002) Green fluorescent protein-like proteins in reef *Anthozoa* animals. *Cell Struct Funct* **27**: 343-347.
- Mochon, A.B., Jin, Y., Kayala, M.A., Wingard, J.R., Clancy, C.J., Nguyen, M.H. *et al.* (2010) Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog* **6**: e1000827.
- Mochon, A.B., and Liu, H. (2008) The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. *PLoS Pathog* **4**: e1000190.
- Montagnoli, C., Bacci, A., Bozza, S., Gaziano, R., Mosci, P., Sharpe, A.H., and Romani, L. (2002) B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol* **169**: 6298-6308.
- Mora-Montes, H.M., Netea, M.G., Ferwerda, G., Lenardon, M.D., Brown, G.D., Mistry, A.R. *et al.* (2011) Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* **79**: 1961-1970.
- Morrow, B., Ramsey, H., and Soll, D.R. (1994) Regulation of phase-specific genes in the more general switching system of *Candida albicans* strain 3153A. *J Med Vet Mycol* **32**: 287-294.
- Morschhäuser, J., Michel, S., and Hacker, J. (1998) Expression of a chromosomally integrated, single-copy GFP gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet* **257**: 412-420.
- Moseman, E.A., Iannacone, M., Bosurgi, L., Tonti, E., Chevrier, N., Tumanov, A. *et al.* (2012) B cell maintenance of subcapsular sinus macrophages protects against a fatal viral infection independent of adaptive immunity. *Immunity* **36**: 415-426.
- Moyes, D.L., Murciano, C., Runglall, M., Islam, A., Thavaraj, S., and Naglik, J.R. (2011) *Candida albicans* yeast and hyphae are discriminated by MAPK signaling in vaginal epithelial cells. *PLoS One* **6**: e26580.
- Moyes, D.L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S. *et al.* (2010) A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe* **8**: 225-235.
- Muhlschlegel, F.A., and Fonzi, W.A. (1997) *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* **17**: 5960-5967.
- Mummidi, S., Catano, G., Lam, L., Hoefle, A., Telles, V., Begum, K. *et al.* (2001) Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem* **276**: 33196-33212.
- Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R.A., and Gallo, R.L. (2002) Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* **81**: 845-850.

Murciano,C., Villamon,E., Gozalbo,D., Roig,P., O'Connor,J.E., and Gil,M.L. (2006) Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med Mycol* **44**: 149-157.

Murciano,C., Yanez,A., Gil,M.L., and Gozalbo,D. (2007) Both viable and killed *Candida albicans* cells induce in vitro production of TNF-alpha and IFN-gamma in murine cells through a TLR2-dependent signalling. *Eur Cytokine Netw* **18**: 38-43.

Myers,K.K., Sypherd,P.S., and Fonzi,W.A. (1995) Use of *URA3* as a reporter of gene expression in *C. albicans*. *Curr Genet* **27**: 243-248.

Mylonakis,E., Casadevall,A., and Ausubel,F.M. (2007) Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog* **3**: e101.

Nagai,Y., Garrett,K.P., Ohta,S., Bahrn,U., Kouro,T., Akira,S. *et al.* (2006) Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* **24**: 801-812.

Naglik,J.R., Fidel,P.L., Jr., and Odds,F.C. (2008) Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol Lett* **283**: 129-139.

Nakayama,H., Mio,T., Nagahashi,S., Kokado,M., Arisawa,M., and Aoki,Y. (2000) Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 6712-6719.

Navarro-García,F., Alonso-Monge,R., Rico,H., Pla,J., Sentandreu,R., and Nombela,C. (1998) A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiol* **144**: 411-424.

Navarro-García,F., Eisman,B., Fiuza,S.M., Nombela,C., and Pla,J. (2005) The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiol* **151**: 2737-2749.

Navarro-García,F., Sanchez,M., Pla,J., and Nombela,C. (1995) Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* **15**: 2197-2206.

Negredo,A., Monteliva,L., Gil,C., Pla,J., and Nombela,C. (1997) Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiol* **143**: 297-302.

Netea,M.G., Blok,W.L., Kullberg,B.J., Bemelmans,M., Vogels,M.T., Buurman,W.A., and Van der Meer,J.W. (1995) Pharmacologic inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. *J Infect Dis* **171**: 393-399.

Netea,M.G., Brown,G.D., Kullberg,B.J., and Gow,N.A. (2008a) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**: 67-78.

Netea,M.G., Gow,N.A., Munro,C.A., Bates,S., Collins,C., Ferwerda,G. *et al.* (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**: 1642-1650.

Netea,M.G., and Marodi,L. (2010) Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol* **31**: 346-353.

Netea,M.G., Suttmuller,R., Hermann,C., Van der Graaf,C.A., Van der Meer,J.W., van Krieken,J.H. *et al.* (2004) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* **172**: 3712-3718.

Netea,M.G., Van der Graaf,C.A., Vonk,A.G., Verschueren,I., Van der Meer,J.W., and Kullberg,B.J. (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **185**: 1483-1489.

- Netea, M.G., van, d., V, Verschueren, I., Van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2008b) Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 118-123.
- Nicholls, S., Straffon, M., Enjalbert, B., Nantel, A., Macaskill, S., Whiteway, M., and Brown, A.J. (2004) Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1111-1123.
- Nitz, M., Ling, C.C., Otter, A., Cutler, J.E., and Bundle, D.R. (2002) The unique solution structure and immunochemistry of the *Candida albicans* beta -1,2-mannopyranan cell wall antigens. *J Biol Chem* **277**: 3440-3446.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A. *et al.* (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**: 454-457.
- Nucci, M., and Anaissie, E. (2001) Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* **33**: 1959-1967.
- Odds, F.C. (1994) *Candida* species and virulence. *ASM News* **60**: 313-318.
- Odds, F.C., Calderone, R., Hube, B., and Nombela, C. (2003) *Candida albicans*: views and suggestions from a peer-group workshop. *ASM News* **69**: 54-55.
- Oh, J., Fung, E., Schlecht, U., Davis, R.W., Giaever, G., St Onge, R.P. *et al.* (2010) Gene annotation and drug target discovery in *Candida albicans* with a tagged transposon mutant collection. *PLoS Pathog* **6**: e1001140.
- Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K., and Nakase, T. (1993) Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nuc Acids Res* **21**: 4039-4045.
- Oliver, B.G., Song, J.L., Choiniere, J.H., and White, T.C. (2007) cis-Acting elements within the *Candida albicans* ERG11 promoter mediate the azole response through transcription factor Upc2p. *Eukaryot Cell* **6**: 2231-2239.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395.
- Parameswaran, N., and Patial, S. (2010) Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **20**: 87-103.
- Paravicini, G., Mendoza, A., Antonsson, B., Cooper, M., Losberger, C., and Payton, M. (1996) The *Candida albicans* PKC1 gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast* **12**: 741-756.
- Park, Y.N., and Morschhauser, J. (2005) Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**: 1328-1342.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153-183.
- Pendrak, M.L., Chao, M.P., Yan, S.S., and Roberts, D.D. (2004) Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to alpha-biliverdin. *J Biol Chem* **279**: 3426-3433.
- Perfect, J.R. (2004) Antifungal resistance: the clinical front. *Oncology (Williston Park)* **18**: 15-22.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H. *et al.* (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* **5**: e64.

- Pierce,J.V., and Kumamoto,C.A. (2012) Variation in *Candida albicans* EFG1 expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. *MBio* **3**: e00117-12.
- Pietrella,D., Rachini,A., Pandey,N., Schild,L., Netea,M., Bistoni,F. *et al.* (2010) The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun* **78**: 4754-4762.
- Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van,H.C., Du,X. *et al.* (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085-2088.
- Pope,L.M., Cole,G.T., Guentzel,M.N., and Berry,L.J. (1979) Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastric challenge. *Infect Immun* **25**: 702-707.
- Poulain,D., and Jouault,T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* **7**: 342-349.
- Poulain,D., Slomianny,C., Jouault,T., Gomez,J.M., and Trinel,P.A. (2002) Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* **70**: 4323-4328.
- Powlesland,A.S., Ward,E.M., Sadhu,S.K., Guo,Y., Taylor,M.E., and Drickamer,K. (2006) Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins. *J Biol Chem* **281**: 20440-20449.
- Presterl,E., Lassnigg,A., Mueller-Urri,P., El-Menyawi,I., and Graninger,W. (1999) Cytokines in sepsis due to *Candida albicans* and in bacterial sepsis. *Eur Cytokine Netw* **10**: 423-430.
- Rahman,D., and Challacombe,S.J. (1995) Oral immunization against mucosal candidiasis in a mouse model. *Adv Exp Med Biol* **371B**: 1663-1666.
- Rahman,D., Mistry,M., Thavaraj,S., Challacombe,S.J., and Naglik,J.R. (2007) Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. *Microbes Infect* **9**: 615-622.
- Rakoff-Nahoum,S., Hao,L., and Medzhitov,R. (2006) Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* **25**: 319-329.
- Ramage,G., Saville,S.P., Thomas,D.P., and Lopez-Ribot,J.L. (2005) *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* **4**: 633-638.
- Ramage,G., Saville,S.P., Wickes,B.L., and Lopez-Ribot,J.L. (2002a) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5459-5463.
- Ramage,G., Vandewalle,K., Lopez-Ribot,J.L., and Wickes,B.L. (2002b) The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **214**: 95-100.
- Ravel,G., and Descotes,J. (2005) Popliteal lymph node assay: facts and perspectives. *J Appl Toxicol* **25**: 451-458.
- Ravetch,J.V. (1997) Fc receptors. *Curr Opin Immunol* **9**: 121-125.
- Ravetch,J.V., and Clynes,R.A. (1998) Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol* **16**: 421-432.
- Reese,T.A., Liang,H.E., Tager,A.M., Luster,A.D., Van,R.N., Voehringer,D., and Locksley,R.M. (2007) Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* **447**: 92-96.
- Reeves,E.P., Lu,H., Jacobs,H.L., Messina,C.G., Bolsover,S., Gabella,G. *et al.* (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature* **416**: 291-297.

- Reid,D.M., Gow,N.A., and Brown,G.D. (2009) Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol* **21**: 30-37.
- Relloso,M., Aragonese-Fenoll,L., Lasarte,S., Bourgeois,C., Romera,G., Kuchler,K. *et al.* (2012) Estradiol impairs the Th17 immune response against *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* **91**: 159-165.
- Rentz,A.M., Halpern,M.T., and Bowden,R. (1998) The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis* **27**: 781-788.
- Richard,M., Iбата-Ombetta,S., Dromer,F., Bordon-Pallier,F., Jouault,T., and Gaillardin,C. (2002) Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol Microbiol* **44**: 841-853.
- Riggle,P.J., Andrutis,K.A., Chen,X., Tzipori,S.R., and Kumamoto,C.A. (1999) Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* **67**: 3649-3652.
- Rock,F.L., Hardiman,G., Timans,J.C., Kastelein,R.A., and Bazan,J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 588-593.
- Roeder,A., Kirschning,C.J., Rupec,R.A., Schaller,M., Weindl,G., and Korting,H.C. (2004) Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* **42**: 485-498.
- Roemer,T., Jiang,B., Davison,J., Ketela,T., Veillette,K., Breton,A. *et al.* (2003) Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Mol Microbiol* **50**: 167-181.
- Rogers,N.C., Slack,E.C., Edwards,A.D., Nolte,M.A., Schulz,O., Schweighoffer,E. *et al.* (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**: 507-517.
- Rognon,B., Kozovska,Z., Coste,A.T., Pardini,G., and Sanglard,D. (2006) Identification of promoter elements responsible for the regulation of *MDR1* from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiol* **152**: 3701-3722.
- Román,E., Alonso-Monge,R., Gong,Q., Li,D., Calderone,R., and Pla,J. (2009a) The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **9**: 942-955.
- Román,E., Arana,D.M., Nombela,C., Alonso-Monge,R., and Pla,J. (2007) MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol* **15**: 181-190.
- Román,E., Cottier,F., Ernst,J.F., and Pla,J. (2009b) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.
- Román,E., Nombela,C., and Pla,J. (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**: 10611-10627.
- Romani,L. (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**: 1-23.
- Romani,L., Bistoni,F., and Puccetti,P. (2003) Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol* **6**: 338-343.
- Romani,L., and Kaufmann,S.H. (1998) Immunity to fungi: editorial overview. *Res Immunol* **149**: 277-281.
- Romani,L., Montagnoli,C., Bozza,S., Perruccio,K., Spreca,A., Allavena,P. *et al.* (2004) The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol* **16**: 149-161.

- Romanowski,K., Zaborin,A., Valuckaite,V., Rolfes,R.J., Babrowski,T., Bethel,C. *et al.* (2012) *Candida albicans* isolates from the gut of critically ill patients respond to phosphate limitation by expressing filaments and a lethal phenotype. *PLoS One* **7**: e30119.
- Rosas,M., Liddiard,K., Kimberg,M., Faro-Trindade,I., McDonald,J.U., Williams,D.L. *et al.* (2008) The induction of inflammation by dectin-1 *in vivo* is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J Immunol* **181**: 3549-3557.
- Rosenberger,C.M., and Finlay,B.B. (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 385-396.
- Rosseau,S., Hammerl,P., Maus,U., Gunther,A., Seeger,W., Grimminger,F., and Lohmeyer,J. (1999) Surfactant protein A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes. *J Immunol* **163**: 4495-4502.
- Rubin-Bejerano,I., Abeijon,C., Magnelli,P., Grisafi,P., and Fink,G.R. (2007) Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* **2**: 55-67.
- Ryley,J.F., and Ryley,N.G. (1990) *Candida albicans* - do mycelia matter? *J Med Vet Mycol* **28**: 225-239.
- Saijo,S., Fujikado,N., Furuta,T., Chung,S.H., Kotaki,H., Seki,K. *et al.* (2007) Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* **8**: 39-46.
- Samaranayake,Y.H., and Samaranayake,L.P. (2001) Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev* **14**: 398-429.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samonis,G., Anaissie,E.J., and Bodey,G.P. (1990) Effects of broad-spectrum antimicrobial agents on yeast colonization of the gastrointestinal tracts of mice. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 2420-2422.
- Sanglard,D., Kuchler,K., Ischer,F., Pagani,J.L., Monod,M., and Bille,J. (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2378-2386.
- Sano,H., Hsu,D.K., Apgar,J.R., Yu,L., Sharma,B.B., Kuwabara,I. *et al.* (2003) Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* **112**: 389-397.
- Sato,K., Yang,X.L., Yudate,T., Chung,J.S., Wu,J., Luby-Phelps,K. *et al.* (2006) 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*.
- Sato,T., Watanabe,T., Mikami,T., and Matsumoto,T. (2004) Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Pharm Bull* **27**: 751-752.
- Savage,D.C., and Dubos,R.J. (1967) Localization of indigenous yeast in the murine stomach. *J Bacteriol* **94**: 1811-1816.
- Saville,S.P., Lazzell,A.L., Chaturvedi,A.K., Monteagudo,C., and Lopez-Ribot,J.L. (2008) Use of a genetically engineered strain to evaluate the pathogenic potential of yeast cell and filamentous forms during *Candida albicans* systemic infection in immunodeficient mice. *Infect Immun* **76**: 97-102.
- Saville,S.P., Lazzell,A.L., Monteagudo,C., and Lopez-Ribot,J.L. (2003) Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* **2**: 1053-1060.
- Schlosser,A., Thomsen,T., Moeller,J.B., Nielsen,O., Tornoe,I., Mollenhauer,J. *et al.* (2009) Characterization of FIBCD1 as an acetyl group-binding receptor that binds chitin. *J Immunol* **183**: 3800-3809.

- Schroppel,K., Sprosser,K., Whiteway,M., Thomas,D.Y., Rollinghoff,M., and Csank,C. (2000) Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect Immun* **68**: 7159-7161.
- Selmecki,A., Bergmann,S., and Berman,J. (2005) Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* **55**: 1553-1565.
- Serbina,N.V., Hohl,T.M., Cherny,M., and Pamer,E.G. (2009) Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection. *J Immunol* **183**: 1900-1910.
- Serrano-Gómez,D., Dominguez-Soto,A., Ancochea,J., Jimenez-Heffernan,J.A., Leal,J.A., and Corbi,A.L. (2004) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol* **173**: 5635-5643.
- Serrano-Gómez,D., Leal,J.A., and Corbi,A.L. (2005) DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophytic fungi by human dendritic cells. *Immunobiology* **210**: 175-183.
- Shaner,N.C., Campbell,R.E., Steinbach,P.A., Giepmans,B.N., Palmer,A.E., and Tsien,R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**: 1567-1572.
- Shaw,M.H., Kamada,N., Kim,Y.G., and Nunez,G. (2012) Microbiota-induced IL-1beta, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med* **209**: 251-258.
- Sherman,F., Fink,G.R., and Hicks,J.B. (1986) Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor.
- Simonetti,N., Strippoli,V., and Cassone,A. (1974) Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature* **250**: 344-346.
- Slack,E.C., Robinson,M.J., Hernanz-Falcon,P., Brown,G.D., Williams,D.L., Schweighoffer,E. et al. (2007) Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol* **37**: 1600-1612.
- Soilleux,E.J., Morris,L.S., Lee,B., Pohlmann,S., Trowsdale,J., Doms,R.W., and Coleman,N. (2001) Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* **195**: 586-592.
- Soilleux,E.J., Morris,L.S., Leslie,G., Chehimi,J., Luo,Q., Levroney,E. et al. (2002) Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations *in situ* and *in vitro*. *J Leukoc Biol* **71**: 445-457.
- Soll,D.R., Morrow,B., and Srikantha,T. (1993) High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet* **9**: 61-65.
- Soll,D.R., Stasi,M., and Bedell,G. (1978) Regulation of nuclear migration and division during pseudo-mycelium outgrowth in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *Experimental Cell Research* **116**: 207-215.
- Sonesson,A., Ringstad,L., Nordahl,E.A., Malmsten,M., Morgelin,M., and Schmidtchen,A. (2007) Antifungal activity of C3a and C3a-derived peptides against *Candida*. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 346-353.
- Sonneborn,A., Bockmuhl,D.P., and Ernst,J.F. (1999) Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**: 5514-5517.
- Srikantha,T., Chandrasekhar,A., and Soll,D.R. (1995) Functional analysis of the promoter of the phase-specific *WH11* gene of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **15**: 1797-1805.
- Srikantha,T., Klapach,A., Lorenz,W.W., Tsai,L.K., Laughlin,L.A., Gorman,J.A., and Soll,D.R. (1996) The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 121-129.

- Staab,J.F., Bradway,S.D., Fidel,P.L., and Sundstrom,P. (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538.
- Stahl,P.D., and Ezekowitz,R.A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**: 50-55.
- Staib,P., Binder,A., Kretschmar,M., Nichterlein,T., Schroppe,K., and Morschhauser,J. (2004) Tec1p-independent activation of a hypha-associated *Candida albicans* virulence gene during infection. *Infect Immun* **72**: 2386-2389.
- Staib,P., and Morschhauser,J. (2007) Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* -an enigmatic developmental programme. *Mycoses* **50**: 1-12.
- Steele,C., Marrero,L., Swain,S., Harmsen,A.G., Zheng,M., Brown,G.D. *et al.* (2003) Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med* **198**: 1677-1688.
- Steele,C., Rapaka,R.R., Metz,A., Pop,S.M., Williams,D.L., Gordon,S. *et al.* (2005) The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* **1**: e42.
- Steinshamn,S., and Waage,A. (1992) Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice. *Infect Immun* **60**: 4003-4008.
- Stoldt,V.R., Sonneborn,A., Leuker,C.E., and Ernst,J.F. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**: 1982-1991.
- Strack,R.L., Strongin,D.E., Mets,L., Glick,B.S., and Keenan,R.J. (2010) Chromophore formation in DsRed occurs by a branched pathway. *J Am Chem Soc* **132**: 8496-8505.
- Stuart,L.M., and Ezekowitz,R.A. (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**: 539-550.
- Sudbery,P., Gow,N., and Berman,J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-324.
- Sundstrom,P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**: 461-469.
- Sung,J.H., Zhang,H., Moseman,E.A., Alvarez,D., Iannacone,M., Henrickson,S.E. *et al.* (2012) Chemokine guidance of central memory T cells is critical for antiviral recall responses in lymph nodes. *Cell* **150**: 1249-1263.
- Suzuki,T., Ueda,T., Ohama,T., Osawa,S., and Watanabe,K. (1993) The gene for serine tRNA having anticodon sequence CAG in a pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Nuc Acids Res* **21**: 356.
- Szafranski-Schneider,E., Swidergall,M., Cottier,F., Tielker,D., Roman,E., Pla,J., and Ernst,J.F. (2012) Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **8**: e1002501.
- Takahara,K., Yashima,Y., Omatsu,Y., Yoshida,H., Kimura,Y., Kang,Y.S. *et al.* (2004) Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int Immunol* **16**: 819-829.
- Takeda,K., and Akira,S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**: 1-14.
- Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376.
- Takesue,Y., Kakehashi,M., Ohge,H., Imamura,Y., Murakami,Y., Sasaki,M. *et al.* (2004) Combined assessment of beta-D-glucan and degree of candida colonization before starting empiric therapy for candidiasis in surgical patients. *World J Surg* **28**: 625-630.
- Tansho,S., Abe,S., Ishibashi,H., Mitsuya,M., Wada,K., Ikeda,T. *et al.* (2004) Production of anti-*Candida* antibodies in mice with gut colonization of *Candida albicans*. *Mediators Inflamm* **13**: 189-193.

- Taylor,B.N., Fichtenbaum,C., Saavedra,M., Slavinsky,I.J., Swoboda,R., Wozniak,K. *et al.* (2000) *In vivo* virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **182**: 955-959.
- Taylor,M.E., Bezouska,K., and Drickamer,K. (1992) Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* **267**: 1719-1726.
- Taylor,P.R., Brown,G.D., Herre,J., Williams,D.L., Willment,J.A., and Gordon,S. (2004) The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* **172**: 1157-1162.
- Taylor,P.R., Brown,G.D., Reid,D.M., Willment,J.A., Martinez-Pomares,L., Gordon,S., and Wong,S.Y. (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* **169**: 3876-3882.
- Taylor,P.R., Gordon,S., and Martinez-Pomares,L. (2005a) The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* **26**: 104-110.
- Taylor,P.R., Reid,D.M., Heinsbroek,S.E., Brown,G.D., Gordon,S., and Wong,S.Y. (2005b) Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited *in vivo*. *Eur J Immunol* **35**: 2163-2174.
- Taylor,P.R., Tsoni,S.V., Willment,J.A., Dennehy,K.M., Rosas,M., Findon,H. *et al.* (2007) Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* **8**: 31-38.
- Thornton,B.P., Vetvicka,V., Pitman,M., Goldman,R.C., and Ross,G.D. (1996) Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **156**: 1235-1246.
- Tilsala-Timisjarvi,A., and Alatossava,T. (1997) Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int J Food Microbiol* **35**: 49-56.
- Toshchakov,V., Jones,B.W., Perera,P.Y., Thomas,K., Cody,M.J., Zhang,S. *et al.* (2002) TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* **3**: 392-398.
- Trinel,P.A., Jouault,T., Cutler,J.E., and Poulain,D. (2002a) Beta-1,2-mannosylation of *Candida albicans* mannoproteins and glycolipids differs with growth temperature and serotype. *Infect Immun* **70**: 5274-5278.
- Trinel,P.A., Maes,E., Zanetta,J.P., Delplace,F., Coddeville,B., Jouault,T. *et al.* (2002b) *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* **277**: 37260-37271.
- Tsien,R.Y. (1999) Rosy dawn for fluorescent proteins. *Nat Biotechnol* **17**: 956-957.
- Turner,M.W., and Hamvas,R.M. (2000) Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* **2**: 305-322.
- Ueda,Y., Kondo,M., and Kelsoe,G. (2005) Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med* **201**: 1771-1780.
- Uhl,M.A., and Johnson,A.D. (2001) Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiol* **147**: 1189-1195.
- Underhill,D.M. (2003) Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* **33**: 1767-1775.
- Underhill,D.M. (2007) Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol Rev* **219**: 75-87.

- Underhill,D.M., and Ozinsky,A. (2002a) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* **20**: 825-852.
- Underhill,D.M., and Ozinsky,A. (2002b) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **14**: 103-110.
- Underhill,D.M., Ozinsky,A., Hajjar,A.M., Stevens,A., Wilson,C.B., Bassetti,M., and Aderem,A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**: 811-815.
- Unkeless,J.C., Shen,Z., Lin,C.W., and DeBeus,E. (1995) Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB. *Semin Immunol* **7**: 37-44.
- Ushinsky,S.C., Harcus,D., Ash,J., Dignard,D., Marcil,A., Morchhauser,J. *et al.* (2002) *CDC42* is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **1**: 95-104.
- van de Veerndonk,F.L., Joosten,L.A., Shaw,P.J., Smeekens,S.P., Malireddi,R.K., Van der Meer,J.W. *et al.* (2011) The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur J Immunol* **41**: 2260-2268.
- van de Veerndonk,F.L., Marijnissen,R.J., Kullberg,B.J., Koenen,H.J., Cheng,S.C., Joosten,I. *et al.* (2009) The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **5**: 329-340.
- van den Bossche,H., Dromer,F., Improvisi,I., Lozano-Chiu,M., Rex,J.H., and Sanglard,D. (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol* **36 Suppl 1:119-28**: 119-128.
- van der Waaij,L.A., Mesander,G., Limburg,P.C., and van der,W.D. (1994) Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. *Cytometry* **16**: 270-279.
- van Kooyk Y., and Geijtenbeek,T.B. (2003) DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* **3**: 697-709.
- van Lent,P.L., Figdor,C.G., Barrera,P., van,G.K., Sloetjes,A., van den Berg,W.B., and Torensma,R. (2003) Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells. *Arthritis Rheum* **48**: 360-369.
- van Rozendaal,B.A., van Spriël,A.B., van De Winkel,J.G., and Haagsman,H.P. (2000) Role of pulmonary surfactant protein D in innate defense against *Candida albicans*. *J Infect Dis* **182**: 917-922.
- van't Hof W., Reijnders,I.M., Helmerhorst,E.J., Walgreen-Weterings,E., Simoons-Smit,I.M., Veerman,E.C., and Amerongen,A.V. (2000) Synergistic effects of low doses of histatin 5 and its analogues on amphotericin B anti-mycotic activity. *Ant Van Leeuw* **78**: 163-169.
- Vautier,S., Drummond,R.A., Redelinghuys,P., Murray,G.I., MacCallum,D.M., and Brown,G.D. (2012) Dectin-1 is not required for controlling *Candida albicans* colonisation of the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun.*
- Vazquez-Torres,A., and Balish,E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 170-192.
- Villamon,E., Gozalbo,D., Roig,P., Murciano,C., O'Connor,J.E., Fradelizi,D., and Gil,M.L. (2004a) Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines. *Eur Cytokine Netw* **15**: 263-271.
- Villamon,E., Gozalbo,D., Roig,P., O'Connor,J.E., Fradelizi,D., and Gil,M.L. (2004b) Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect* **6**: 1-7.

- Villamon,E., Roig,P., Gil,M.L., and Gozalbo,D. (2005) Toll-like receptor 2 mediates prostaglandin E(2) production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*. *Res Microbiol* **156**: 115-118.
- Villiers,C., Chevallet,M., Diemer,H., Couderc,R., Freitas,H., Van,D.A. *et al.* (2009) From secretome analysis to immunology: chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism. *Mol Cell Proteomics* **8**: 1252-1264.
- Vincent,J.L. (2003) Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* **361**: 2068-2077.
- Vincent,J.L., Rello,J., Marshall,J., Silva,E., Anzueto,A., Martin,C.D. *et al.* (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**: 2323-2329.
- Vylkova,S., Jang,W.S., Li,W., Nayyar,N., and Edgerton,M. (2007) Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eukaryot Cell* **6**: 1876-1888.
- Wachtler,B., Wilson,D., Haedicke,K., Dalle,F., and Hube,B. (2011) From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* **6**: e17046.
- Wagner,H. (2001) Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* **14**: 499-502.
- Weindl,G., Wagener,J., and Schaller,M. (2010) Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res* **89**: 666-675.
- Wheeler,R.T., and Fink,G.R. (2006) A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* **2**: e35.
- Wheeler,R.T., Kombe,D., Agarwala,S.D., and Fink,G.R. (2008) Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS Pathog* **4**: e1000227.
- White,S.J., Rosenbach,A., Lephart,P., Nguyen,D., Benjamin,A., Tzipori,S. *et al.* (2007) Self-regulation of *Candida albicans* population size during GI colonization. *PLoS Pathog* **3**: e184.
- Whiteway,M., Dignard,D., and Thomas,D.Y. (1992) Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9410-9414.
- Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180.
- Willment,J.A., and Brown,G.D. (2008) C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol* **16**: 27-32.
- Wisplinghoff,H., Bischoff,T., Tallent,S.M., Seifert,H., Wenzel,R.P., and Edmond,M.B. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**: 309-317.
- Wozniok,I., Hornbach,A., Schmitt,C., Frosch,M., Einsele,H., Hube,B. *et al.* (2008) Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol* **10**: 807-820.
- Wright,S.D., and Silverstein,S.C. (1982) Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* **156**: 1149-1164.
- Wright,S.D., and Silverstein,S.C. (1983) Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* **158**: 2016-2023.

- Wu,W., Lockhart,S.R., Pujol,C., Srikantha,T., and Soll,D.R. (2007) Heterozygosity of genes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence. *Mol Microbiol* **64**: 1587-1604.
- Yamaguchi,N., Sonoyama,K., Kikuchi,H., Nagura,T., Aritsuka,T., and Kawabata,J. (2005) Gastric colonization of *Candida albicans* differs in mice fed commercial and purified diets. *J Nutr* **135**: 109-115.
- Yamamoto,Y., Klein,T.W., and Friedman,H. (1997) Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infect Immun* **65**: 1077-1082.
- Yáñez,A., Flores,A., Murciano,C., O'Connor,J.E., Gozalbo,D., and Gil,M.L. (2010) Signalling through TLR2/MyD88 induces differentiation of murine bone marrow stem and progenitor cells to functional phagocytes in response to *Candida albicans*. *Cell Microbiol* **12**: 114-128.
- Yáñez,A., Megias,J., O'Connor,J.E., Gozalbo,D., and Gil,M.L. (2011) *Candida albicans* induces selective development of macrophages and monocyte derived dendritic cells by a TLR2 dependent signalling. *PLoS One* **6**: e24761.
- Yáñez,A., Murciano,C., O'Connor,J.E., Gozalbo,D., and Gil,M.L. (2009) *Candida albicans* triggers proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells by a MyD88-dependent signaling. *Microbes Infect* **11**: 531-535.
- Yang,Y.L., Lin,Y.H., Tsao,M.Y., Chen,C.G., Shih,H.I., Fan,J.C. *et al.* (2006) Serum repressing efflux pump *CDR1* in *Candida albicans*. *BMC Mol Biol* **7**: 22.
- Yokogawa,T., Suzuki,T., Ueda,T., Mori,M., Ohama,T., Kuchino,Y. *et al.* (1992) Serine tRNA complementary to the nonuniversal serine codon CUG in *Candida cylindracea*: evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7408-7411.
- Zelante,T., De,L.A., Bonifazi,P., Montagnoli,C., Bozza,S., Moretti,S. *et al.* (2007) IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* **37**: 2695-2706.
- Zhang,L., Patel,H.N., Lappe,J.W., and Wachter,R.M. (2006) Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* **128**: 4766-4772.





