

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN *Candida* – SISTEMA INMUNE

(1) Amezcua Hernández Diana Guadalupe, (2) Laura García Carnero, (3) Héctor Manuel Mora Montes

1 [Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [dg.amezcuahernandez@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [laura_cgc@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [hmora@ugto.mx]

Resumen

Candida es un género de hongo, precisamente una levadura causante de micosis denominadas candidiasis en humanos y animales. *Candida auris* es una levadura de reciente aparición como un agente nosocomial de suma importancia, de la cual no se tiene mucho registro. En este artículo se muestran los resultados de la interacción de *Candida albicans* y *Candida auris* con células mononucleares de sangre periférica humana de seis donadores, para el análisis de las citosinas mediante la técnica de "ELISA" (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas') sándwich". Las citosinas evaluadas son las interleucinas 6, 10, 1 β , y TNF α , producidas en la interacción candida-sistema inmune. Con las concentraciones de interleucinas obtenidas se pudieron construir gráficas comparativas entre *C. auris* y *C. albicans*, en las que se revela que en realidad el sistema inmune reconoce de forma muy similar a las dos especies de *Candida*.

Abstract

Candida is a genus of fungus, precisely a yeast that causes mycosis called candidiasis in humans and animals. *Candida auris* is a yeast of recent appearance as a nosocomial agent of great importance, of which there is not much record. In this article, the results of the interaction of *Candida albicans* and *Candida auris* with human peripheral blood mononuclear cells from six donors are shown for the analysis of cytosines by the "ELISA" technique (enzyme-linked immunosorbent assay) sandwich". The cytosines evaluated are the interleukins 6, 10, 1 β , and TNF α , produced in the candida-immune system interaction. With the concentrations of interleukins obtained, comparative graphs could be constructed between *C. auris* and *C. albicans*, in which it is revealed that in reality the immune system recognizes very similarly to the two species of *Candida*.

Palabras Clave

Monocitos; Citocinas; Interleucinas; anticuerpo; antígeno.

INTRODUCCIÓN

Sistema inmunológico humano

El sistema inmune es parte de los mecanismos biológicos destinados a mantener la integridad estructural y funcional de los individuos, además, está genéticamente programado para la neutralización y eliminación tanto de agentes infecciosos, células y moléculas extrañas, como detritus y productos moleculares de células propias envejecidas, transformadas o tumorales.

Los componentes celulares y moleculares del sistema inmune se han separado tradicionalmente en naturales o innatos, y adquiridos o específicos; El primero de estos tipos representa la primera línea de defensa contra las infecciones ya que posee mecanismos de reconocimiento de diversidad limitada codificadas en la línea germinal, la cual está constituida por diversos tipos celulares y moléculas solubles que juegan un rol en el reconocimiento de microorganismos y también en la fase efectora de la respuesta innata; esta línea actúa rápidamente para eliminar a los antígenos a través de mecanismos microbicidas y respuesta inflamatoria, pues al ser sus mecanismos efectores tan potentes y con capacidad de producir daño tisular del huésped, están finamente regulados por diversos mecanismos de control. Esta respuesta innata respuesta tiene la capacidad de alertar y dirigir la respuesta inmune adquirida orientándola hacia una respuesta celular o humoral específica. [1].

Componentes de la inmunidad

La vía principal por la cual el sistema inmunitario se enfrenta a las infecciones y lesión tisular es estimulando la inflamación aguda, es decir, la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y líquidos derivados de la sangre en un tejido dañado. Durante este proceso existen cambios como: aumento de flujo sanguíneo, así como de la adhesividad de leucocitos circulantes al recubrimiento endotelial y de la permeabilidad en los capilares; todo ello inducido por las citocinas. [2].

Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune, estas se clasifican en factores de necrosis tumoral, interferones, quimocinas e interleucinas.

En el caso de las interleucinas, hablamos de un tipo de citocina mediadora del crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. [3], las cuales pueden verse influenciadas por la presencia de infecciones, como en el caso de la candidiasis. La IL-6 actúa como señal en la activación, proliferación y diferenciación de las células T (tipo de glóbulo blanco, protegen al cuerpo de infecciones), La IL-10 afecta de manera directa las células B, T y NK, actuando como supresor de la respuesta inflamatoria. La IL-1B activa los fagocitos y libera otras citocinas inflamatorias. Finalmente, la TNFa produce un estado procoagulante [4]. Por lo tanto, todos estos son algunos de los factores importantes del sistema inmunitario necesarios para defendernos de enfermedades, en este caso, micosis.

Efectos de la candidiasis en el sistema inmunológico humano

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

En la naturaleza, estas levaduras existen en el suelo, agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples; además, son habitantes habituales del aparato digestivo, respiratorio y regiones muco-cutáneas del hombre y animales domésticos.

Por lo mencionado anteriormente, la mayor parte de las infecciones son de origen endógeno a partir de los reservorios muco-cutáneos o cutáneos (introducidos a partir de catéteres u otros dispositivos de uso médico, que interrumpen la barrera cutánea), aunque también pueden ser exógenas, por ejemplo, en los hospitales. Cualquiera que sea la causa, cuando el hongo interacciona con el sistema inmune, las interleucinas se encargan de mediar la respuesta para combatir la infección. [5].

Si bien existen diversos tipos de interleucinas que participan en la respuesta inmune, para los efectos del presente artículo se determinaron únicamente los niveles de cuatro de éstas (TNF α , IL-6, IL-10 e IL-1 β) interaccionándolas con *Candida albicans* y *Candida auris*. Toda vez que, si bien existen reportes de la interacción existente entre las interleucinas anteriormente mencionadas y *C. albicans*, no se tienen reportes alguno de la interacción de aquellas con *C. auris*, por lo tanto, comparar el perfil de citocinas producidas por células mononucleares humanas en contacto con ambas especies de levadura constituirá el objeto de estudio del presente trabajo de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies y tratamientos

Tabla 1: Especies de *Cándida* con la concentración 2×10^6 utilizadas para la interacción y sus diferentes tratamientos.

Especies de <i>Candida</i>	Tratamiento
<i>Candida albicans</i>	Sin tratamiento.
	Inactivadas por calor.
	Betas eliminadas.
	Beta eliminadas e inactivadas por calor.
<i>Candida auris</i>	Sin tratamiento.
	Inactivadas por calor.
	Betas eliminadas.
	Beta eliminadas e inactivadas por calor.

Tratamientos para las células

Para la obtención de las células inactivadas por calor, éstas se dejaron por una hora en termomixer a 56°C.

Para la obtención de las células "Beta eliminadas", estas se dejaron en hidróxido de sodio 0.1M toda la noche en agitación a temperatura ambiente, y al finalizar fueron lavadas con PBS1x tres veces (para eliminar los restos de NaOH).

Para la obtención de las células Beta eliminadas e inactivadas, se llevaron a cabo los dos procesos antes mencionados.

Purificación, extracción de leucocitos humanos de muestra de sangre periférica e interacción con *Cándida*

Para esta investigación se realizaron extracciones y purificaciones de leucocitos humanos de muestras de sangre periférica de seis donadores diferentes; la sangre de cada uno de los donadores se mezcló con PBS1x estéril; enseguida, se adicionó la sangre obtenida a 15mL de ficoll en un tubo falcon, evitando su mezcla, para posteriormente para realizar una centrifugación por 20 min a 1800rpm a fin de lograr la separación del plasma, PBMC, y PMNS, recuperando únicamente la fase con PBMC; resuspendiéndola en RPMI.

Hecho lo anterior, se realizó una dilución 1:20, con 95 μ L de azul de metileno al 1% y 5 μ L de la resuspensión obtenida. De esta dilución obtenida se tomaron 10 μ L para colocarlos en la cámara de Neubauer, y de esta forma contar los monocitos existentes en la muestra y, mediante cálculos, se llevó la resuspensión celular (PBMC con RPMI) a 5×10^6 cel/mL.

Por cada paciente en una placa ELISA de 96 pozos de fondo plano se adicionaron, por duplicado, ocho muestras (16 pozos en total) de 100 μ L de la resuspensión celular obtenida por cada donador (5×10^6 cel/mL), para posteriormente agregar a cada una de estas muestras 100 μ L de células pertenecientes a los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las dos especies de *Candidas* utilizadas.

Finalmente se llevó a cabo la incubación de la placa por 24 horas con 5% de CO $_2$ a 37°C, hecho lo anterior se centrifugó la placa por 10min a 1800 rpm y el sobrenadante se recuperó en tubos eppendorf y se guardó para medir posteriormente su interacción.

Lectura de muestras mediante ELISA sándwich

Una vez terminada la extracción y purificación de monocitos de sangre periférica de los seis donadores, se procedió a sensibilizar ocho nuevas placas ELISA de 96 pozos fondo plano, a fin de leer las muestras

obtenidas. Para ello, en cada pozo de las placas se adicionaron 100 μ L de anticuerpo de captura 0.5 mg/mL (específico para cada interleucina), cubriéndola y dejándola dos horas en incubación a temperatura ambiente, una vez finalizada la incubación todos los pozos fueron lavados con 300 μ L PBS1x tween tres veces, y al finalizar los lavados, se adicionaron 300 μ L de buffer de bloqueo (gelatina de bloqueo), dejando

las placas en incubación por 12 horas a 37°C.

Terminada la incubación se repitieron los lavados de las placas, adicionando a cada una, seis estándares específicos para cada interleucina (TNF α , IL-6, IL-10 y 1 β) de 4ng/mL a cero. asimismo, por cada paciente, se adicionaron dieciséis muestras de 80 μ L de diluyente (PBS1x tween) con 20 μ L del sobrenadante recuperado de las interacciones Candida-monocitos, y se incubó a temperatura ambiente por dos horas.

Nuevamente se repitieron los lavados y, por cada pozo, se adicionaron 100 μ L de anticuerpo de detección 0.5mg/mL (específico para cada interleucina); para posteriormente incubar las placas a temperatura ambiente por dos horas.

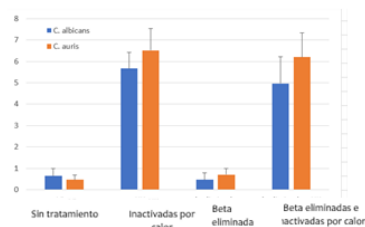
Una vez más, se llevó a cabo el lavado de las placas y por cada pozo se adicionó 100 μ L de avidina-HRP, para incubarse 30 minutos a temperatura ambiente.

Se repitió el proceso de lavado y ahora se adicionaron 100 μ L de sustrato ABTS (1 tableta de TMB con 2 microlitros de peróxido de hidrógeno) a cada pozo parando la reacción de color con 50 μ L de H2S04 2N, Finalmente se leyeron las placas que contienen las muestras correspondientes a todos los donadores a 450nm.

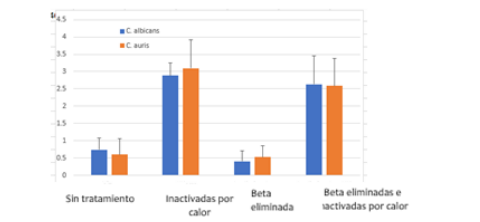
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias a las absorbancias obtenidas de la estimulación de interleucinas de monocitos incubados con las dos especies de levaduras se obtuvieron las siguientes gráficas en una comparativa de las especies de *C. auris* y *C. albicans* frente al sistema inmune humano.

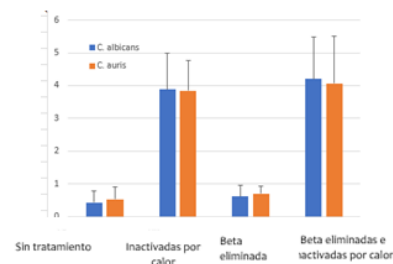
Gráfica 1: Comparación especies de Candida con diferentes tratamientos: interleucina seis (IL-6).



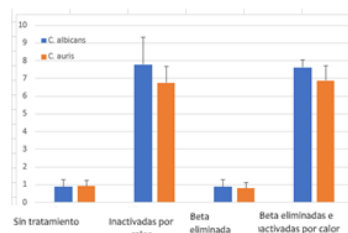
Gráfica 2: Comparación de especies de Candida con diferentes tratamientos: interleucina diez (IL-10)



Gráfica 3: Comparación de especies de Candida con diferentes tratamientos: interleucina (IL-1B).



Gráfica 4: Comparación de especies de Candida con diferentes tratamientos: interleucina (TNF α).



La razón por la cual se les da tratamientos diferentes a las levaduras es porque estos cambios químicos y choques térmicos cambian la estructura de la pared celular de las levaduras, lo que cambia la exposición de los antígenos que detecta el sistema inmune, y por lo tanto el anticuerpo lo reconoce de forma diferente, así pues, evaluamos distintas formas de reconocimiento antígeno anticuerpo. La comparativa de las gráficas se

realizó mediante una curva para cuantificar los niveles de las interleucinas cuando éstas interactúan con las levaduras, posteriormente se obtuvieron los promedios de los niveles de cada interleucina estimulada por *Candida* y sus diferentes tratamientos de todos los donadores, obteniendo las gráficas anteriores. Además se realizó la significancia estadística mediante el valor P de los datos obtenidos de las diferentes especies de *Candida* con sus tratamientos al interactuar con monocitos humanos, y para todos los casos de interleucinas, las especies de *Candida* tratadas con calor y beta eliminadas e inactivadas por calor tienen un valor P significativo, menor a 0.05 y dentro de las cuatro gráficas podemos observar que las especies de *Candida* inactivadas por calor y beta eliminadas e inactivadas por calor, son las que estimulan más interleucinas para todos los casos, sobre lo cual podemos suponer que estos tratamientos realizan un cambio muy significativo en la pared celular de las levaduras, provocando quizá mayor reconocimiento de antígenos y por lo tanto mayor estimulación de interleucinas, constatando nuestro estudio estadístico, demostrando pues, que el sistema inmune e comporta de una forma muy similar frente a *C. albicans* y *C. auris*.

CONCLUSIONES

Como puede apreciarse en las gráficas anteriores, se observa que el sistema inmunológico humano reconoce de forma muy similar a los patógenos *C. auris* y *C. albicans*, demostrando que el nivel de interleucinas (TNF α , IL-6, IL-10 y 1 β) expresadas por los monocitos humanos, y medidas en este experimento son similares entre las dos especies, lo cual puede representar una nueva evidencia de cómo tratar los efectos de *C. auris* como levadura patógena en humanos, permitiendo crear medicamentos efectivos para combatir los efectos de su patogenicidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Héctor Manuel Mora Montes por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Glicobiología de hongos patógenos de humanos, apoyándome y permitiéndome ser un miembro más del equipo en este verano, así mismo a todo el laboratorio de Glicobiología por siempre hacerme sentir en casa a pesar de que estaba tan lejos de ella, son un equipo de trabajo excelente y deseo siempre mi mejor éxito hacia cada uno de ellos. A mis compañeros de verano, ya que en muchas ocasiones fueron partícipes de mi viaje de conocimiento. Finalmente quiero agradecer de una forma muy especial a Laura García Carnero, quien me orientó, ayudó, capacitó y dejó en mi innumerables enseñanzas durante este periodo, su sencillez, capacidad, humildad e inteligencia me ayudaron y motivaron en diversas ocasiones, demostrándome que con esfuerzo las cosas se pueden lograr. Este trabajo fue apoyado por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ref. PDCPN2014-247109, yFC 2015-02-834), Universidad de Guanajuato (ref. 1025/2016; CIIC 95/2018), y red temática Glicociencia en Salud. (CONACYT-México).

“El objeto más noble que puede ocupar el hombre es ilustrar a sus semejantes”. simón Bolívar.

REFERENCIAS

1. Palomo, G, ; Ferreira, A.; Sepúlveda C.; Roseblatt, M.; Vergara C,U. (2009). Inmunidad innata. Palomo G, I Ardiles S, A.; Vergara C,U (Ed), Fundamentos de inmunología básica y clínica (pp 89-93). Talca, Chile; EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA COLECCIÓN E-BOOK.
2. Abbas,A. Litchman, A.; Pillai Shiv. (2012). Inmunidad innata, Inmunología celular y molecular (pp 55-87). Elsevier.
3. Hernández-Urzúa, M,A., Alvarado-Navarro,A, (2001). Interleucinas e inmunidad innata. Revista biomed, (12),272-280.
4. Grenvik, A.; Ayres, S; Hoolbrook, P; Shoemaker W.(2002). Lesión y muerte celular, tratado de medicina crítica y terapia intensiva. (pp 515-516). Philadelphia: Medica panamericana.
5. Biasoli, M. Candidiasis . 3-4. Recuperado de: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/virtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf. Última consulta : 19/06/2018.