

## Artículo original

## Activación de células mononucleares humanas de sangre periférica *in vitro* con *Candida albicans* (levadura) viva o muerta, y péptidos liberados al medio

Alejandro Palma Ramos,<sup>1</sup> Laura Estela Castrillón Rivera,<sup>1</sup> Diana Emma Becerril Parra,<sup>1</sup> José Roberto González Pacheco,<sup>1</sup> Rubén Zamora Alvarado,<sup>1</sup> Carmen Padilla Desgarenes<sup>2</sup>

## RESUMEN

**Antecedentes:** la pared celular de *Candida albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manán, glucán y quitina. El polisacárido manán representa alrededor de 15.2 a 22.9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-glucán  $\beta$ -1-3 y el  $\beta$ -1-6 constituyen entre 47 y 60% del peso seco de la pared celular. Se han reportado otros componentes, como proteínas en cantidades entre 6 y 25%, lípidos entre 1 y 7%, y quitina entre 0.6 y 9% del peso de la pared celular. Especies de *Candida* opsonizada son ingeridas por los monocitos y macrófagos, pero organismos de *Candida* no opsonizada son fagocitados sólo por estos últimos, principalmente a través del enlace para el receptor de manosa. El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), normalmente producido por linfocitos T activados, es uno de los principales factores que aumentan las actividades fagocíticas y la destrucción de *Candida albicans* en macrófagos humanos.

**Objetivo:** demostrar que ocurre estimulación de células mononucleares humanas *in vitro* con *Candida albicans* viva, muerta, o con péptidos liberados al medio, mediante cuantificación de la secreción de la IL-2 y el IFN- $\gamma$ .

**Material y método:** el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 10231) se efectuó en el medio de Sauton durante cinco días, a 37°C, se centrifugó y se separó la biomasa del medio, se ajustó al tubo 2 del nefelómetro de McFarland 600 x 10<sup>6</sup> UFC/mL en solución salina. Se dividió en cuatro fracciones, dos para utilizarlas como *Candida albicans* viva y dos como *Candida albicans* muerta (se trató con calor húmedo a 121°C, a 15 libras de presión, durante 15 minutos). Asimismo, se tomó una fracción de cada una (cepa viva y cepa muerta) para someterlas a opsonización con suero humano normal, incubándolas a 37°C durante una hora. Al sobrenadante se le precipitaron las proteínas con solución saturada de sulfato de amonio, se le llevó hasta 50% de saturación, se centrifugó y se resuspendió el precipitado en 3 mL de agua; se dializó contra agua, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y se ajustó el antígeno a una concentración de 1 mg/mL. Las células mononucleares humanas se purificaron con el método de Boyum y se ajustaron a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> cel/mL.

**Resultados:** con el objetivo de estimular células mononucleares humanas *in vitro*, el uso de levaduras de *Candida albicans* muertas por calor da buenos resultados en la inducción de IFN- $\gamma$  y de IL-2, pero los mejores resultados se obtuvieron al estimular a estas células con péptidos provenientes del microorganismo.

**Conclusión:** es preferible estimular al sistema inmunológico para la inducción del IFN- $\gamma$  con péptidos obtenidos de estos microorganismos, o con *Candida albicans* muerta por calor húmedo.

**Palabras clave:** *Candida albicans*, estimulación de IFN- $\gamma$ , estimulación de IL-2.

## ABSTRACT

**Background:** The cell wall of *C. albicans* is mainly composed of polysaccharides manan, glucan and chitin. Manan polysaccharide represents approximately 15.2% to 22.9% of dry weight and slightly more than 40% of the cell wall of fungus polysaccharides. The D-glucan 1-3 and the D-glucan 1-6- are between 47% and 60% of the dry weight of the cell wall. Other components have been reported, such as protein in quantities ranging between 6% and 25%, lipids between 1% and 7% and chitin between 0.6% and 9% of the weight of the cell wall. Species of *Candida* opsonized are ingested by monocytes and macrophages, but *Candida* organisms not opsonized are phagocytosed only by the latter, mainly through binding to mannose receptor. IFN- $\gamma$ , normally produced by activated T lymphocytes, is one of the main factors that increase activity phagocytic and destruction of *C. albicans* in human macrophages.

**Objective:** To demonstrate that it occurs stimulation of human mononuclear cells *in vitro* with *Candida albicans* alive, dead, or peptides released into the environment, quantifying the IFN- $\gamma$  and IL-2 secretion.

**Material and method:** The growth of *Candida albicans* (ATCC 10231) was carried out in the middle of Sauton, for 5 days at 37°C, centrifugation and broke the biomass of the medium, adjusted to tube the McFarland Nephelometer 600 2 x 10<sup>6</sup> CFU/mL saline. Divided into 4 fractions, 2 for use as *C. albicans* live and 2 as *C. albicans* dead (was treated with moist heat to 249.8°F (121°C) at 15 lbs of pressure for 15 minutes). It takes a fraction of each (strain alive and dead strain) for consideration by opsonization with normal human serum, incubating at 37°C for 1 h. To the supernatant proteins is precipitated with ammonium sulphate saturated solution, bringing it up to 50% saturation, centrifuged and the precipitate was resuspended in 3 mL of water, dialyzed against water, protein concentration was determined by the Lowry method and adjusted antigen at a concentration of 1 mg/mL. Human mononuclear cells are purified by the method of Boyum and adjusted at a concentration of 2 x 10<sup>6</sup> cel/mL.

**Results:** With the purpose of stimulating human mononuclear cells *in vitro*, the use of yeast *Candida albicans* core heat gives good results in both IL-2 as IFN- $\gamma$  obtained to stimulate these cells with peptides from the microorganism.

**Conclusion:** It is preferable to stimulate the immune system for induction of the presence of IFN- $\gamma$  with peptides obtained from the microorganism, or *Candida albicans* dead heat damp.

**Key words:** *Candida albicans*, stimulation of IFN- $\gamma$ , stimulation of IL-2.

**C***andida albicans* es un hongo patógeno oportunista, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos. El delicado equilibrio entre el huésped y este hongo comensal puede tornarse hacia una relación parasitaria que resulta en una infección llamada candidiasis.<sup>1</sup>

Este hongo coloniza superficies mucocutáneas de la cavidad oral, la cavidad vaginal y el aparato gastrointestinal. La naturaleza y la medida del deterioro de las defensas del huésped influyen en la manifestación y severidad de la infección.<sup>2</sup>

De 80 a 90% de la pared celular es de naturaleza polisacárida. Tres constituyentes básicos representan los principales polisacáridos de la pared celular: *a*) polímeros ramificados de glucosa, que contienen enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 ( $\beta$ -glucanos); *b*) polímeros de *N*-acetil-D-glucosamina, que contienen enlaces  $\beta$ -1,4 (quitina), y *c*) polímeros de manosa (mananos), asociados covalentemente con proteínas (glucomanoproteínas). Además, las paredes celulares contienen proteínas (6 a 25%) y pequeñas cantidades de lípidos (1 a 7%).<sup>1</sup>

Se han realizado estudios de los principales componentes manoproteicos de *C. albicans* implicados en la inmunomodulación de las defensas del huésped. En el extracto ácido se encuentra una manoproteína de 65 kDa (MP65), que es el principal blanco sobre el que se monta una respuesta por parte de las células T. La respuesta proliferativa estimulada por este componente fue de na-

turalidad antigénica, más que mitogénica, y la respuesta se dirigió principalmente a los epítopes polipeptídicos. Un constituyente similar se detectó en el material liberado al medio de cultivo por *C. albicans*. El MP65 tiene un punto isoeléctrico de 4.1 y una relación proteína-polisacárido de 1.8:1. La proliferación de células T de células mononucleares de sangre periférica humana apareció con dosis de nanogramos de MP65 purificado.<sup>1,3,4</sup>

La respuesta y la actividad de queratinocitos y leucocitos polimorfonucleares juegan un papel clave en la erradicación de infecciones por *C. albicans*. Los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos son la primera línea de defensa del huésped y constituyen un paso fundamental en el proceso inflamatorio a infecciones micóticas, que lleva a la recuperación de la homeostasia por una subsecuente respuesta inmunitaria mediada por células (TCD4<sup>+</sup>).<sup>5</sup> Los macrófagos humanos responden a *C. albicans* por medio del incremento en la producción de factores de complemento y del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), así como la expresión del receptor de complemento tipo 3, que son regulados por el factor transformador de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ). Los macrófagos también producen factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6), después de la estimulación *in vitro* con aislamientos clínicos de *C. albicans* muerta por calor.<sup>2</sup>

Las especies de *Candida* opsonizadas son fagocitadas por monocitos y macrófagos, pero las especies sin opsonizar son fagocitadas sólo por estos últimos, principalmente vía unión a receptores de manosa. El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), típicamente producido por linfocitos T activados, es el factor principal que aumenta la actividad fagocítica y microbicida de macrófagos humanos; asimismo, aumenta la capacidad de monocitos y de macrófagos de fagocitar y matar levaduras opsonizadas y sin opsonizar.<sup>2</sup>

La estimulación de células mononucleares humanas con los antígenos de *C. albicans* resulta en la producción de diferentes citocinas, como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), que se observa aumentado en 24 a 48 horas, además de la interleucina 2 (IL-2).<sup>6,7</sup> Asimismo, los antígenos de *C. albicans* son incapaces de estimular los genes que codifican hacia la producción de interleucina 4, interleucina 5 o interleucina 10 (IL-4, IL-5 o IL-10), las cuales tienen actividad inmunorreguladora.<sup>8</sup>

Otro factor importante que puede afectar la producción de citocinas es la viabilidad celular, que en el caso de *C.*

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunopotenciadores. Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, DF.

<sup>2</sup> Laboratorio de Micología del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua. Secretaría de Salud, México, DF.

Correspondencia: Dr. Alejandro Palma Ramos. Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, colonia Villa Quietud, CP 04960, México, DF.  
Correo electrónico: alpalma@correo.xoc.uam.mx

Aceptado: mayo, 2013.  
Recibido: julio, 2013.

Este artículo debe citarse como: Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Becerril-Parra DE, González-Pacheco JR y col. Activación de células mononucleares humanas de sangre periférica *in vitro* con *Candida albicans* (levadura) viva o muerta, y péptidos liberados al medio. *Dermatol Rev Mex* 2013;57:319-329.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

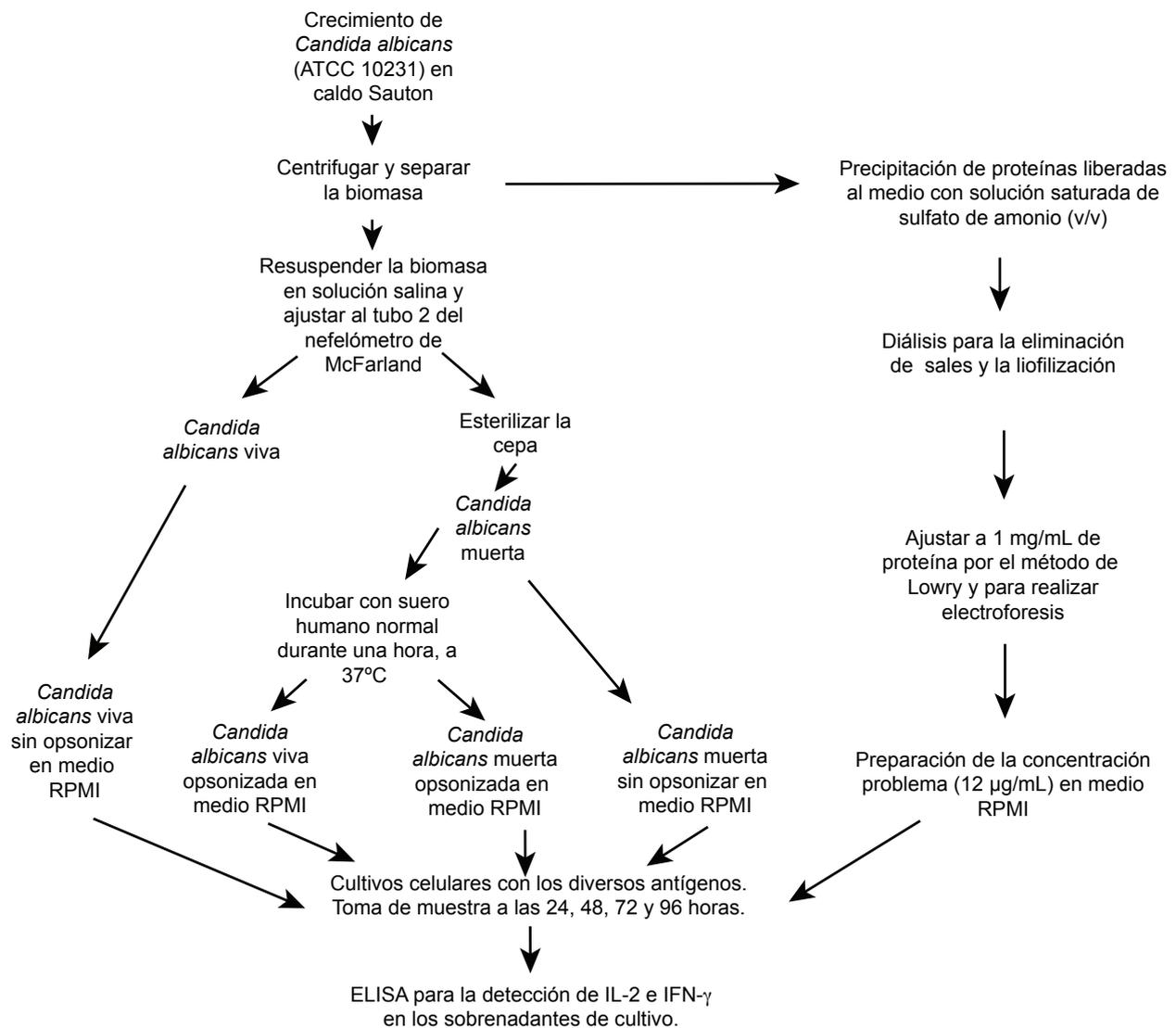
*albicans* puede modificar la capacidad de producción de citocinas. De acuerdo con este análisis, se observó que en el cultivo de células mononucleares vivas, las concentraciones de interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) disminuyen; mientras que las células muertas inducen altas concentraciones de estas mismas citocinas.<sup>9</sup>

Este trabajo realizó la estimulación de células mononucleares humanas de sangre periférica *in vitro* con *Candida albicans* viva, muerta y con péptidos liberados al medio, y cuantificó el IFN- $\gamma$  y la IL-2.

El objetivo de este artículo es demostrar que ocurre estimulación de células mononucleares humanas, *in vitro*, con *Candida albicans* viva, muerta, o con péptidos liberados al medio.

## MATERIAL Y MÉTODO

La descripción general de la metodología experimental se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Descripción metodológica.  
IL-2: interleucina 2; IFN- $\gamma$ : interferón gamma.

### **Crecimiento de *C. albicans***

Se efectuó en el medio de Sauton, durante cinco días, a 37°C, se centrifugó y se separó la biomasa del medio; se ajustó al tubo 2 del nefelómetro de McFarland  $600 \times 10^6$  UFC/mL en solución salina. Se dividió en cuatro fracciones, dos para utilizarlas como *C. albicans* viva y dos como *C. albicans* muerta (se trató con calor húmedo, a 121°C, con 15 libras de presión durante 15 minutos). Asimismo, se tomó una fracción de cada una (cepa viva y cepa muerta) para someterlas a opsonización con suero humano normal, incubándolas a 37°C durante una hora. De esta manera se obtuvieron los antígenos para utilizar en la estimulación de células mononucleares humanas, quedando: a) *C. albicans* viva, b) *C. albicans* viva opsonizada, c) *C. albicans* muerta, d) *C. albicans* muerta opsonizada, ajustada cada una a  $20 \times 10^6$  levaduras/mL.

### **Purificación de proteínas**

El crecimiento de *Candida albicans* se efectuó en el medio de Sauton, durante cinco días, a 37°C, se centrifugó y se separó la biomasa del medio; al sobrenadante se le precipitaron las proteínas con solución saturada de sulfato de amonio, se diluyó con la muestra hasta 50% de saturación, se mantuvo por 24 horas, se centrifugó y se resuspendió el precipitado en 3 mL de agua; se dializó contra agua durante 48 horas y se congeló en un ultracongelador por 24 horas, y posteriormente se liofilizó durante 24 horas. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y se ajustó el antígeno a una concentración de 1 mg/mL.

### **Western blot<sup>10</sup>**

Se realizó la técnica y como antígeno se usaron las proteínas del extracto total de *Candida albicans* (anteriormente descrito), contra sueros de humano normal (anticuerpo primario); como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG humano hecho en cabra y conjugado con la enzima.

### **Obtención de células mononucleares humanas de sangre periférica**

El siguiente procedimiento es de las muchas variantes del método original descrito por Boyum (1968).<sup>11</sup> Transferir 3 mL de solución de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) a un tubo de centrifugado de 15 mL. Mezclar 2 mL de sangre

heparinizada o desfibrinada de individuos sanos con 2 mL de solución fisiológica, colocar cuidadosamente la sangre diluida sobre los 3 mL del Lymphoprep a temperatura ambiente, en un tubo de 15 mL, y se crea así una interfase entre la sangre y el medio. Centrifugar el tubo a  $400 \times g$  a temperatura ambiente, de 15 a 30 minutos. Las células mononucleares humanas forman una banda que queda en la interfase del medio de separación. Retirar la capa de plasma hasta aproximadamente 2 o 3 mL antes de la capa de células mononucleares humanas. Quitar la capa de células mononucleares humanas junto con la mitad de volumen del medio de separación restante y transferirlo a un tubo de centrifugado, adicionar un volumen igual de amortiguador de fosfatos a la capa de células mononucleares humanas, centrifugar a 2,000 rpm durante 10 min, a temperatura ambiente, y transferir a medio de RPMI ajustando a  $2 \times 10^6$  cel/mL.

### **Cultivo de células mononucleares humanas, condiciones y concentraciones finales de los antígenos**

La incubación de células mononucleares humanas con el antígeno (*C. albicans*) se realiza en un medio de RPMI enriquecido con suero de ternera al 10% y mezcla de antibióticos (5,000 unidades de penicilina y 5 mg de estreptomycin en cloruro de sodio al 0.9%) al 0.1% en una atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> al 5%, a temperatura de 37°C, y se toman 200 mL de sobrenadante de cultivo a las 24, 48, 72 y 96 horas.

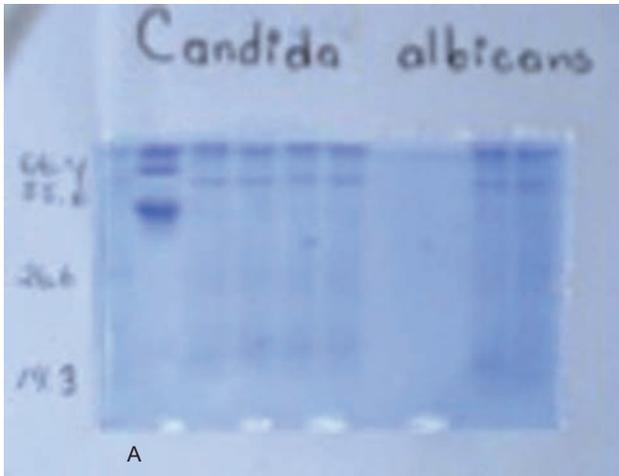
Se colocaron 0.5 mL de la suspensión de células mononucleares ( $1 \times 10^6$  células/mL) en una placa de cultivo celular de 24 pozos. Después se agregaron 0.5 mL de la suspensión de levaduras de *C. albicans* ajustadas a  $20 \times 10^6$  levaduras/mL: *C. albicans* viva opsonizada, sin opsonizar, *C. albicans* muerta opsonizada y sin opsonizar (se colocó una concentración final de  $10 \times 10^6$  levaduras/mL). Como testigo negativo se utilizaron células solas sin estimular y como testigo positivo se usaron células estimuladas con 10 mg/mL de fitohemaglutinina.

### **Técnica de ELISA**

Se realizó la técnica con el paquete de R&D Systems Quantikine® Human IFN- $\gamma$ , número de catálogo DIF50, para cuantificar al IFN- $\gamma$ . Y el paquete de R&D Systems Quantikine® Human IL-2, número de catálogo D2050, para cuantificar a la IL-2.

## RESULTADOS

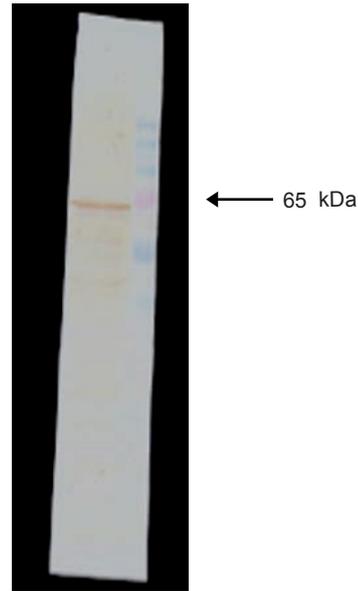
El estudio electroforético del péptido secretado al medio de cultivo (Sauton) de *Candida albicans* mostró varios péptidos, entre los que destaca uno de 60 a 65 kDa, aproximadamente, al que se le atribuye la estimulación de la respuesta inmunitaria tipo Th1, y que es esencial en la defensa contra infecciones causadas por este microorganismo<sup>10</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Péptidos obtenidos del medio de cultivo (Sauton) de *Candida albicans*. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. Se usaron como estándares de peso molecular Protein Marker Broad Range P7702S, en el carril A. En los siguientes carriles se colocaron las proteínas liberadas al medio Sauton por *Candida albicans*, en donde resalta un péptido de 65 kDa.

Al realizar la electrotransferencia e inmunodetección (técnica de Western-blot) se observó que los anticuerpos IgG, provenientes de los sueros humanos normales, reconocen al péptido de 65 kDa, lo que habla de la importancia de su participación en la activación de la respuesta inmunológica (Figura 3).

En los estudios de la activación de células mononucleares humanas con proteínas de secreción al medio de cultivo de *C. albicans* se cuantificaron las concentraciones de IFN- $\gamma$  y de IL-2 en el sobrenadante de los cultivos de células. Como testigo negativo se utilizaron células solas sin estimular, y como testigo positivo se usaron células estimuladas con fitohemaglutinina. Los resultados se explican en la Figura 4. La línea indica el valor de corte y valores superiores a éste se consideraron estimulatorios.



**Figura 3.** Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot), que usó el extracto total de *Candida albicans*, en el que se muestra que el péptido de 65 kDa (P65) es reconocido por los anticuerpos IgG del suero humano normal.

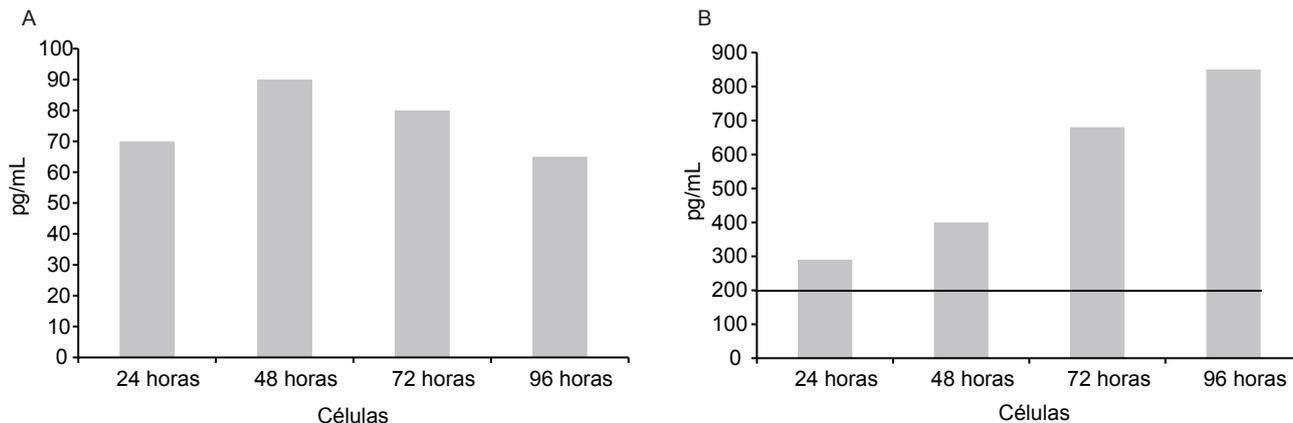
Al estimular células mononucleares humanas con péptidos purificados del medio de crecimiento de *Candida albicans* (Sauton), a una concentración de 12 mg/mL, se observaron concentraciones altas de IFN- $\gamma$  en los medios de cultivo, con un máximo a las 96 horas de 600 pg/mL y un mínimo de 460 pg/mL a las 72 horas, con buenas concentraciones a las 24 (565 pg/mL) y 48 (515 pg/mL) horas de estimulación (Figura 5).

Células mononucleares sin estimular sirvieron como grupo testigo, y valores con el doble (200 pg/mL) o más se tomaron como representativos.

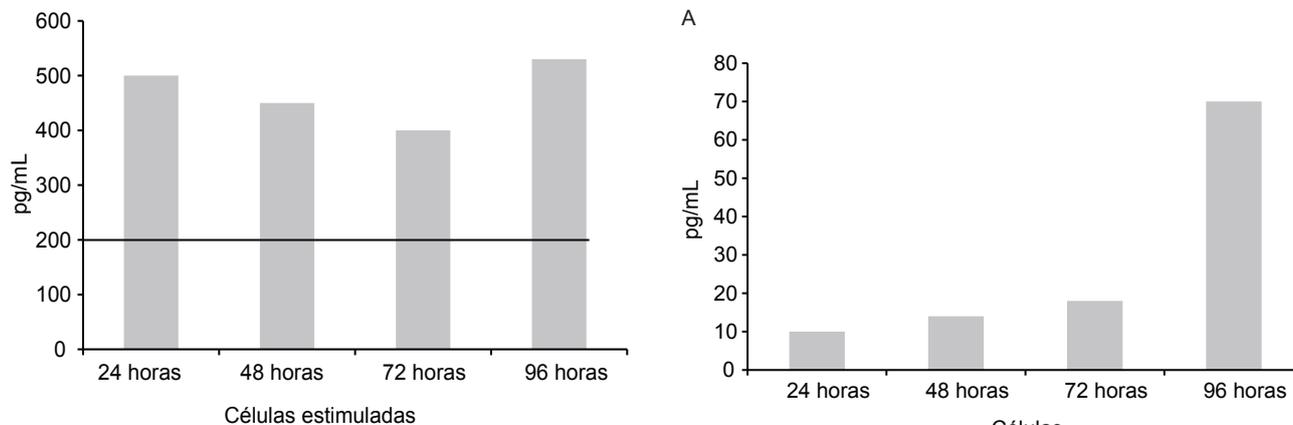
Se probaron células mononucleares humanas con levaduras vivas opsonizadas con suero humano normal y levaduras vivas sin opsonizar para valorar la eficiencia de la opsonización por la IgG y los factores de complemento provenientes de C3 (Figura 6).

Se observó que las células mononucleares humanas estimuladas con levaduras vivas de *Candida albicans* opsonizadas dan una muy buena estimulación con valores representativos y similares al testigo positivo a las 96 horas.

Al realizar el estudio con levaduras de *Candida albicans* muertas, opsonizadas y sin opsonizar con suero humano normal se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 7.



**Figura 4.** Concentraciones de INF- $\gamma$  en cultivos de células mononucleares humanas sin estimular (testigo negativo, A) y estimuladas con fitohemaglutinina (testigo positivo, B).

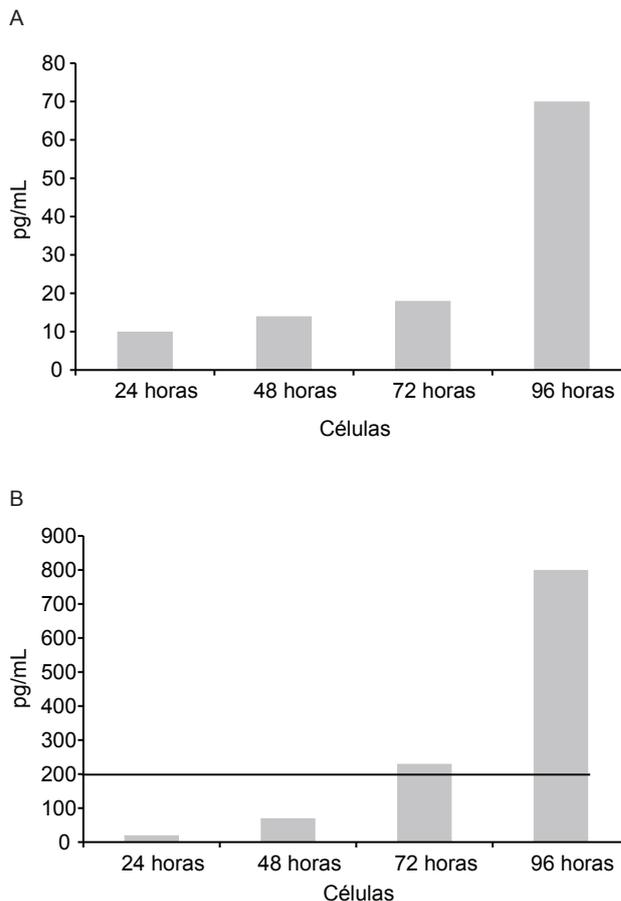


**Figura 5.** Concentración de IFN- $\gamma$  en sobrenadante de células mononucleares humanas estimuladas con péptidos purificados de medio de cultivo a una concentración de 12  $\mu$ g/mL.

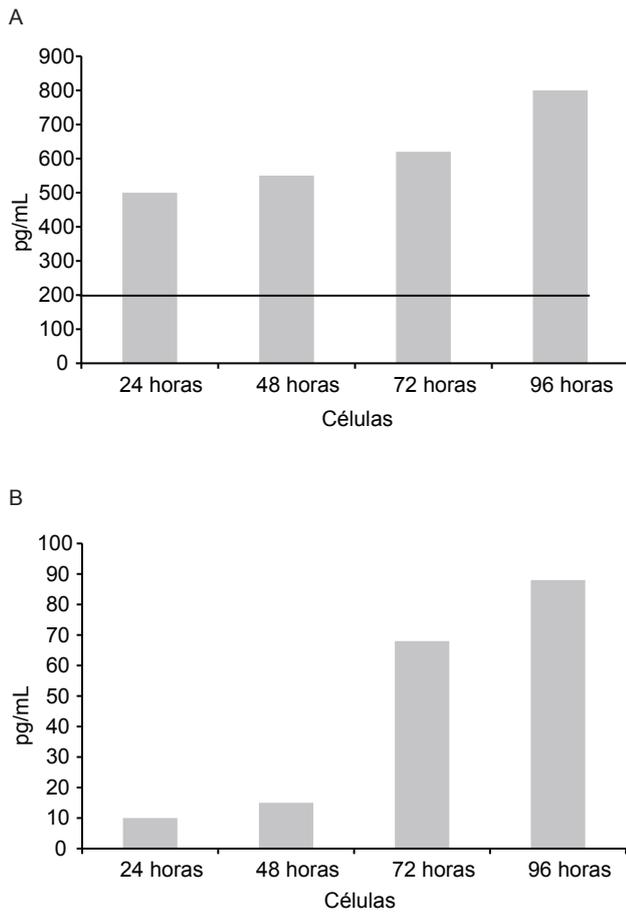
Se encontró que las células mononucleares humanas estimuladas con levaduras muertas de *Candida albicans* sin opsonizar dan buena estimulación con valores representativos a partir de las 24 horas, y con aumento gradual hasta un máximo similar al encontrado con el testigo positivo a las 96 horas. Sin embargo, las levaduras muertas opsonizadas no dieron resultados representativos.

La mejor estimulación para la obtención de IFN- $\gamma$  a partir de células mononucleares humanas con *Candida albicans* se encontró al utilizar levaduras vivas opsonizadas, y aún mejor, con levaduras muertas sin opsonizar.

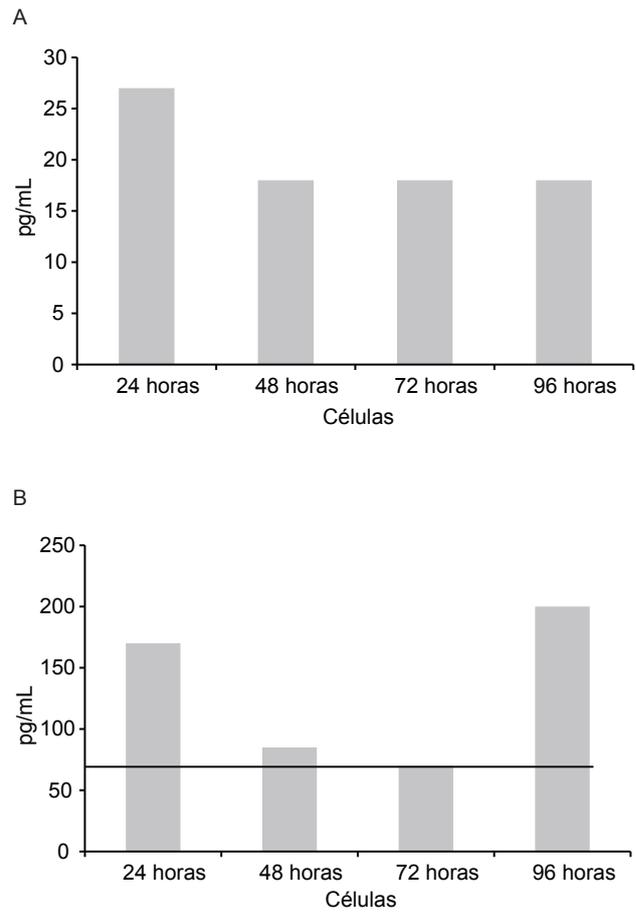
Al cuantificar la IL-2 en estos cultivos se encontró que en los estudios de estimulación de células mononucleares



**Figura 6.** Concentraciones de INF- $\gamma$  en cultivos de células mononucleares humanas activadas con levaduras de *Candida albicans* vivas sin opsonizar (A) y opsonizadas (B).



**Figura 7.** Concentraciones de IFN- $\gamma$  en cultivos de células mononucleares humanas estimuladas con levaduras de *Candida albicans* muertas sin opsonizar (A) y opsonizadas (B).



**Figura 8.** Concentraciones de IL-2 en cultivos de células mononucleares humanas sin estimular (testigo negativo, A) y estimuladas con fitohemaglutinina (testigo positivo, B).

humanas con proteínas de secreción al medio de cultivo de *C. albicans* se cuantificaron las concentraciones de IL-2 en el sobrenadante de los cultivos de células. Como testigo negativo se utilizaron células solas sin estimular y como testigo positivo se usaron células estimuladas con fitohemaglutinina. Los resultados se exponen en la Figura 8.

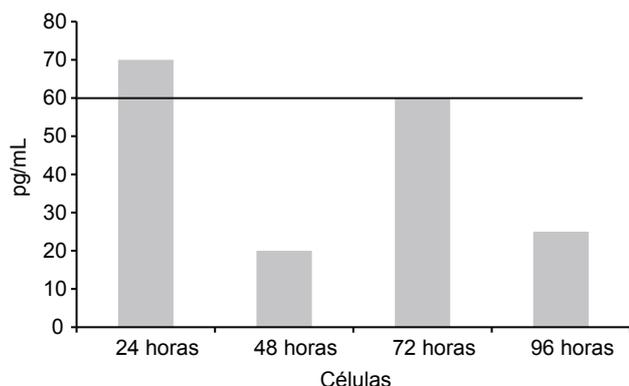
Las células sin estimular mostraron un valor máximo de 30 pg/mL a las 24 horas, por lo que el doble de este valor se considera representativo (60 pg/mL); y al observar el testigo positivo (fitohemaglutinina) se observaron valores de, incluso, 200 pg/mL a las 24 horas.

Al activar células mononucleares humanas con el péptido purificado del medio de cultivo del crecimiento de *Candida albicans* se encontró una buena estimulación para la producción de IL-2 (Figura 9).

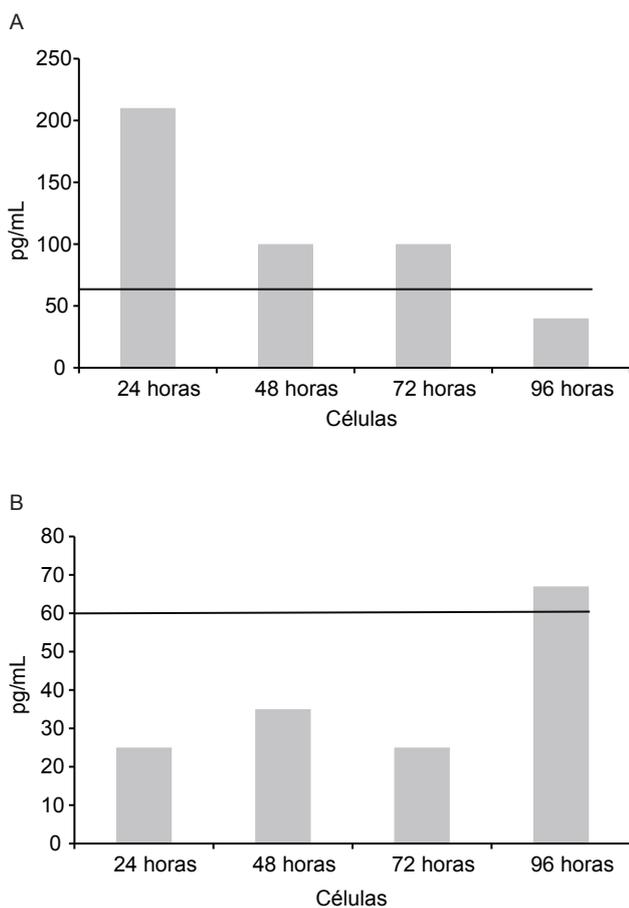
Se observó la IL-2 con una concentración significativa (78 pg/mL) a las 24 horas de activación de las células mononucleares humanas, con péptidos purificados del medio de crecimiento de *Candida albicans*.

Cuando se activaron las células mononucleares humanas con levaduras de *Candida albicans* vivas, opsonizadas y sin opsonizar, se encontró producción de IL-2 a las 24 horas de activación con levaduras vivas sin opsonizar; mientras que al utilizar las levaduras vivas opsonizadas no hubo estimulación en la producción de la citocina (Figura 10).

Al activar células mononucleares humanas con levaduras de *Candida albicans* muertas sin opsonizar, se encontró la producción de IL-2 a las 72 y 96 horas, con títulos superiores al valor que se considera representativo

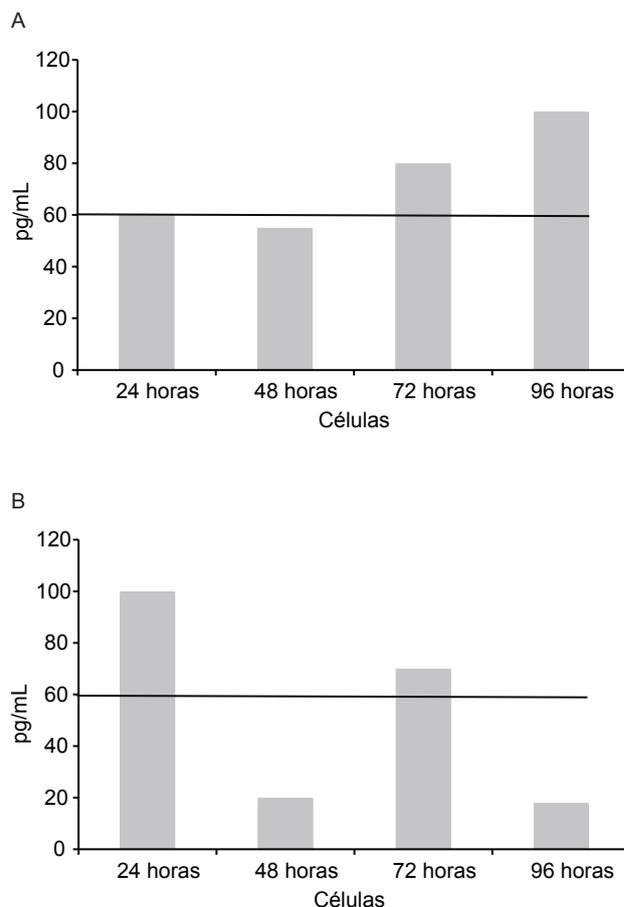


**Figura 9.** Concentración de IL-2 en cultivos de células mononucleares humanas activadas con proteínas purificadas del medio de cultivo (12 µg/mL).



**Figura 10.** Concentraciones de IL-2 en cultivos de células mononucleares humanas activadas con levaduras de *Candida albicans* vivas sin opsonizar (A) y opsonizadas (B).

(60 pg/mL): 87 y 110 pg/mL, respectivamente, pero cuando se activó con levaduras muertas opsonizadas hubo una buena concentración de IL-2 (108 pg/mL) a las 24 horas (Figura 11).



**Figura 11.** Concentraciones de IL-2 en cultivos de células mononucleares humanas estimuladas con levaduras de *Candida albicans* muertas sin opsonizar (A) y opsonizadas (B).

## DISCUSIÓN

Estudios iniciales, centrados en la caracterización de patrones de antígeno para la clasificación serológica o identificación de especies de *Candida* médicamente importantes, demostraron que los mananos de la pared celular son los antígenos principales de *Candida*, responsables de la especificidad de las diferentes reacciones serológicas. Los mananos no existen como tales en la estructura de la pared, pero están asociados con proteínas (manoproteínas).

En consecuencia, se ha hecho un esfuerzo considerable para determinar la estructura química específica de los mananos y definir los epítomos en este componente de la pared, que puede utilizarse para seroespecificidad. Sin embargo, el término “manano” también se usa para referirse al componente principal inmunodominante soluble en la capa exterior de la pared celular de *C. albicans*. Este componente, también llamado complejo fosfomanoproteína, o fosfopeptidomanano, contiene homopolímeros de fosfato de 1 a 2%, D-manosa (como el componente principal) y proteínas de 3 a 5%.<sup>1</sup>

La resistencia del huésped a infecciones por *Candida albicans* se basa en la activación de neutrófilos y macrófagos, que genera especies reactivas de oxígeno y liberación de proteasas que promueven la muerte del hongo. Estas funciones, además de las citocinas y quimiocinas producidas por las células de la inmunidad innata y adaptativa, mantienen a las infecciones micóticas bajo control. El reconocimiento de *Candida albicans* por neutrófilos se atribuye a los receptores de reconocimiento de patrón dectin-1, receptores *Toll-like* y la integrina CD18 Mac-1.<sup>12</sup> La dectin-1 se une a los  $\beta$ 1,3-glucanos y forma el polisacárido más abundante en hongos patógenos, que es necesario para la resistencia micótica en ratones<sup>13,14</sup> y en humanos.<sup>15</sup> El Mac-1 (CD11b/CD18, CR 3 de la familia de las integrinas), en neutrófilos, macrófagos y otros leucocitos, enlaza y estimula la fagocitosis de objetivos opsonizados por complemento; también enlaza las estructuras de  $\beta$ -glucano y manosa.<sup>16,17</sup>

Cassone y colaboradores<sup>4,18</sup> estudiaron los principales componentes de la manoproteína de 65 kDa de *C. albicans* (MP65), implicada en la inmunomodulación de defensa del huésped, ya que es el objetivo principal de la respuesta de células T humanas.<sup>18</sup> La respuesta proliferativa estimulada por este componente se dirigió principalmente a epítomos de polipéptido. La proteína MP65 se purificó mediante cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos contra epítomos de ésta y se encontró que tiene un punto isoeléctrico de 4.1 y una proporción de proteínas en relación con su polisacárido de 1.8:1.<sup>1</sup>

Otras proteínas con respuesta inmunológica específica a *Candida albicans* en la candidiasis humana incluyen una proteína de 47 kDa, una proteína de 90 kDa de choque térmico (HSP 90) y una enolasa de 48 kDa. Estas proteínas son antígenos inmunodominantes de *C. albicans*, analizados por Western blott (immunoblott).<sup>19</sup>

Asimismo, una de las funciones del monocito en las células mononucleares humanas, junto con los linfocitos, es la fagocitosis de partículas rodeadas de IgG y de factores del complemento, donde se observa la expresión de los receptores de la molécula del complemento CR3 que activan la fagocitosis mediada por C3; posteriormente actúan como célula presentadora de antígeno, ya que expresa MHC-II.

A nivel local, las citocinas dependen, en gran medida, del reconocimiento específico del antígeno por los linfocitos T. Se han descrito dos subconjuntos diferentes de linfocitos T (Th1 y Th2) y se demostró que desempeñan papeles antagónicos. Th1 se asocia principalmente con la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, y Th2 con IL-4, IL-5 e IL-10. Th1 corresponde a lo que durante mucho tiempo se designó como inmunidad celular; mientras que Th2 controla preferentemente la respuesta humoral.

Por medio de modelos experimentales murinos se demostró que la protección contra la candidiasis mucocutánea se asocia con una respuesta Th1; en cambio, la enfermedad estaba vinculada con la inactividad de Th2.

En este trabajo se estudió la capacidad de las células mononucleares humanas de ser activadas con levaduras vivas y muertas, así como opsonizadas y sin opsonizar de *Candida albicans* y la eficiencia de antígenos de este microorganismo para la activación de linfocitos Th1 y la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, ya que el monocito también actúa como célula de antígeno y expresa MHC-II (complejo principal de histocompatibilidad de tipo II). La actividad de los monocitos como células de antígeno se regula mediante citocinas: la IL-4 y el IFN- $\gamma$  estimulan la expresión de MHC-II; mientras que la IL-10, la inhibe. En el proceso de la inflamación, los macrófagos activados sintetizan y liberan moléculas que atraen a los monocitos a la zona, al aumentar la expresión de las moléculas de adhesión en éstos y en células endoteliales de vasos sanguíneos para su extravasación a tejidos. Estas moléculas se conocen como quimiocinas. Algunos ejemplos de quimiocinas son la proteína MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*: proteína quimiotáctica de monocitos 1), la proteína RANTES (*regulated on activation, normal T expressed and secreted*) y la MIP (*macrophage infectivity potentiator*: proteína inflamatoria de los macrófagos). Los macrófagos activos también pueden sintetizar otras citocinas, como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ .<sup>20,21</sup>

En este trabajo, *Candida albicans* viva en los cultivos de células mononucleares mostró la necesidad de estar opsonizada, en este caso con factores del complemento,

como iC3b, que se unen con los receptores del monocito Mac-1 o CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) y los factores C3b, C4b, que se unen con CR1 (CD35) y que inducen la fagocitosis y estimulan a los antígenos para activar y diferenciar a los linfocitos T en el cultivo, formación y secreción de IFN- $\gamma$  que en los tejidos sirve para activar macrófagos; los títulos buenos se encontraron a partir de las 72 y 96 horas de activación. En el caso de los péptidos secretados al medio, la inducción de IFN- $\gamma$  es muy buena a partir de 24 horas y hasta 96 horas, con buenas concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-2 en el medio.

Cuando se probó la estimulación de células mononucleares con *Candida albicans* muerta por calor y presión (121°C y 15 libras), se reportaron buenos títulos de IFN- $\gamma$  al estar sin opsonizar, ya que es posible que no active al complemento y otra sea la molécula receptora del monocito; por ejemplo, por medio del receptor a manosa,<sup>2</sup> o la dectin-1 junto con el receptor *Toll-like 2* (TLR-2), que reconocen al  $\beta$ 1-3 glucano<sup>22,23</sup> en la pared del microorganismo.<sup>24</sup>

El tratamiento con IFN- $\gamma$  aumenta la capacidad de los monocitos y macrófagos derivados de monocitos a ingerir y matar levaduras de *Candida* opsonizadas o sin opsonizar.<sup>2</sup>

La IL-2 está en la mayor parte de los ensayos y da una idea de la activación de los linfocitos por estos antígenos, ya que es la mejor citocina que estimula la proliferación de estas células.

## CONCLUSIÓN

Es preferible estimular al sistema inmunológico para la inducción del IFN- $\gamma$  con péptidos obtenidos de estos microorganismos o, bien, con *Candida albicans* muerta por calor húmedo.

## REFERENCIAS

- Chaffin, WL, López Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:130-180.
- Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev* 1995;59:646-672.
- Torosantucci A, Bromuro C, Gómez MJ, Ausiello CM, et al. Identification of a 65-kDa mannoprotein as a main target of human cell-mediated immune response to *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1993;168:427-435.
- La Valle R, Sandini S, Gómez MJ, Mondello F, et al. Generation of a recombinant 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of cell-mediated immune response to *Candida albicans*. *Infection Immunity* 2000;68:6777-6784.
- Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, et al. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an *in vitro* model of oral candidosis. *Microbiology* 2004;150:2807-2813.
- Henderson DC, Ripplin JJ. Stimulus-dependent production of cytokines and pterins by peripheral blood mononuclear cells. *Immunology Letters* 1995;45:29-34.
- Nakayama T. Immune-specific production of gamma interferon in human lymphocyte cultures in response to mumps virus. *Infection Immunity* 1983;40:486-492.
- Ausiello CM, Urbani F, Gessani S, Spagnoli GC, et al. Cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by mannoprotein constituents from *Candida albicans*. *Infection Immunity* 1993;61:4105-4111.
- Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, et al. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infection Immunity* 2000;68:2464-2469.
- Palma RA, Fabila AAN, Castrillón RL, Casillas PG, et al. Búsqueda de reacción cruzada entre un antígeno de 65 kDa de *Candida albicans* con sueros de pacientes con lepra lepromatosa nodular y lepra tuberculoide. *Dermatología Rev Mex* 2009;53:113-118.
- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;97:7.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:67-78.
- Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 2007;8:39-46.
- Taylor PR, Tsoni, SV, Willment JA, Dennehy KM, et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 2007;8:31-38.
- Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* 2009;361:1760-1767.
- Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, et al. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the betaglucon-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 1996;156:1235-1246.
- Xun L, Ahmad U, Cullere X, Myunghwan MC, et al. The beta-glucan receptor dectin-1 activates the integrin mac-1 in neutrophils via vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell Host Microbe* 2011;10:603-615.
- Gómez MJ, Torosantucci A, Arancia S, Maras B, et al. Purification and biochemical characterization of a 65-kilodalton mannoprotein (MP65), a main target of anti-*Candida*. *Infection Immunity* 1996; 64:2577-2584.
- Constantino P J, Kathleen M, Franklyn NFG, Warmington JR. Production of antibodies to antigens of *Candida albicans* in CBA/H mice. *Infection Immunity* 1994;62:1400-1405.
- Kosonen J, Luhtala M, Viander M, Kalimo K, et al. *Candida albicans*-specific lymphoproliferative and cytokine (IL-4 and IFN-gamma) responses in atopic eczema dermatitis syndrome. Evidence of CD4/CD8 and CD3/CD16+CD56 ratio elevations *in vitro*. *Exp Dermatol* 2005;14:551-558.

21. Torosantucci A, Chiani P, Cassone A. Differential chemokine response of human monocytes to yeast and hyphal forms of *Candida albicans* and its relation to the  $\beta$ -1,6 glucan of the fungal cell wall. *J Leukocyte Biol* 2000;68:923-932.
22. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* 2000;275:20157-20167.
23. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 2002;196:407-412.
24. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:78-82.

### Curso Universitario de Especialización en Dermatopatología

Servicio de Dermatopatología, Hospital General de México

Requisitos para presentar la solicitud como candidato al curso universitario de especialización y residencia en Dermatopatología:

1. Ser dermatólogo con reconocimiento universitario o estar cursando el último año de la especialidad de Dermatología.
2. Presentar solicitud por escrito dirigida a la Dra. Patricia Mercadillo Pérez, profesora titular del Curso Universitario de la Especialidad en Dermatopatología, Jefa del Servicio de Dermatopatología, Hospital General de México OD. Tel.-fax: 5004-3845 y 5543-3794.
3. Anexar a la solicitud *Curriculum Vitae*.
4. Entrevista con el profesor titular del curso. La documentación debe entregarse en el periodo del 1 de septiembre al 30 de octubre de 2013.
5. Se seleccionarán dos candidatos.
6. El curso tendrá una duración de dos años, iniciando el primero de marzo y concluyendo el último día de febrero. El curso es de tiempo completo con una duración diaria de ocho horas.
7. Se extenderá diploma Universitario de la Especialización en Dermatopatología por la Universidad Nacional Autónoma de México.