

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)
Y EFECTO DE LA INMUNOSENESCENCIA EN LA
RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A CANDIDA
ALBICANS

CELIA MURCIANO CAMPS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de juny de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Thierry Jouault
- Dr. Julián Naglik
- Dr. Enrique Herrero Perpiñán
- Dr. Carlos Muñoz Collado
- Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Va ser dirigida per:

Dra. M^a Luisa Gil Herrero

Dr. Daniel Gozalbo Flor

©Copyright: Servei de Publicacions
Celia Murciano Camps

Dipòsit legal: V-844-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7573-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

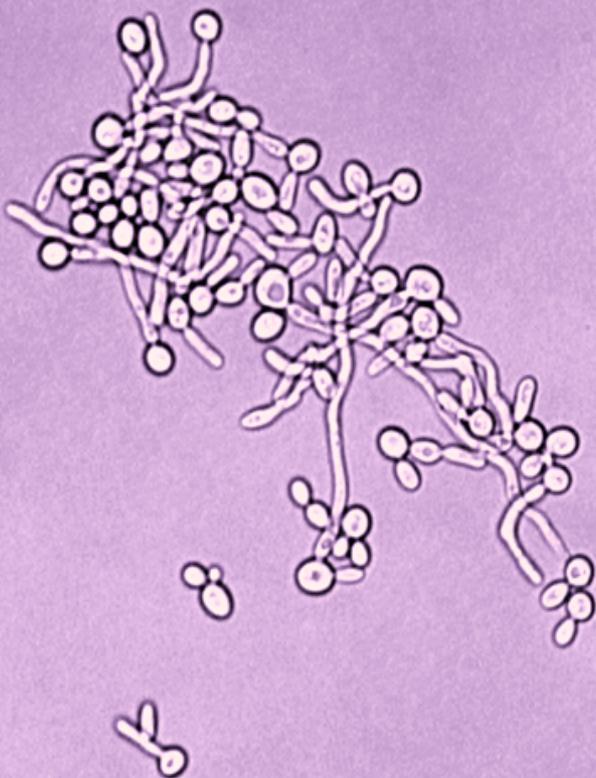
Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

[Logo] Facultat de Ciències Biològiques

**PARTICIPACIÓN DE LOS
RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)
Y EFECTO DE LA INMUNOSENESCENCIA
EN LA RESPUESTA INMUNITARIA
FRENTE A *Candida albicans***



TESIS DOCTORAL
Celia Murciano Camps
Valencia, 2009



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

**Participación de los receptores tipo Toll (TLRs)
y efecto de la inmunosenescencia
en la respuesta inmunitaria frente a *Candida albicans***

Trabajo presentado por Dña. CELIA MURCIANO CAMPS para optar al grado de doctor por la Universitat de València.

Valencia, 2009



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Don Daniel Gozalbo Flor y Dña. M^a Luisa Gil Herrero, profesores titulares de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo presentado por la Lda. Celia Murciano Camps, titulado “Participación de los receptores tipo Toll (TLRs) y efecto de la inmunosenescencia en la respuesta inmunitaria frente a *Candida albicans*” ha sido realizado en el Departamento de Microbiología y Ecología de la Universitat de València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Valencia, febrero de 2009

D. Daniel Gozalbo Flor

Dña. M^a Luisa Gil Herrero

La realización de la presente tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de la siguiente ayuda:

- ❖ Beca de Formación de Profesorado Universitario concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación

El trabajo aquí descrito ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

- ❖ Proyecto PI030647, del Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo. “Participación de los receptores TLR2 y TLR4 en la respuesta inmune frente a las infecciones fúngicas”.
- ❖ Proyecto PI041472, del Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo. “Estudio de la expresión y función de los receptores TLR durante el envejecimiento: influencia en la respuesta inmune frente a *Candida albicans*”.
- ❖ Proyecto ACOMP06/051, de la Generalitat Valenciana. “Participación de los receptores TLR2 y TLR4 en la respuesta frente a las infecciones fúngicas”.
- ❖ Proyecto ACOMP06/043, de la Generalitat Valenciana. “Estudio de la expresión y función de los receptores Toll-Like (TLR) durante el envejecimiento: influencia en la respuesta inmune frente a *Candida albicans*”.
- ❖ Proyecto ACOMP07/073, de la Generalitat Valenciana. “Estudio de la expresión y función de los receptores Toll-Like (TLR) durante el envejecimiento: influencia en la respuesta inmune frente a *Candida albicans*”.

*A mis padres,
Toni y M^a José*

Han sido muchas las personas que, directa o indirectamente, han hecho que esta tesis sea posible. A todas ellas me gustaría expresarles mi más sincero agradecimiento:

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Marisa Gil y Daniel Gozalbo. Gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo y formar parte del grupo, y sobre todo por toda vuestra ayuda, por estar siempre dispuestos a revisar resultados, planear experimentos y dar soluciones rápidas en momentos de “crisis”. Sin vuestro apoyo incondicional y confianza no hubiera llegado hasta aquí. También quiero agradecer vuestra amistad y buen humor; los buenos ratos durante las comidas, las reuniones, los congresos, etc., hacen que haya sido tremendamente fácil trabajar con vosotros.

Al Dr. Julian Naglik, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Tanto él como las personas que formaban su grupo, Dave, Ayesha y Mano, hicieron que mi estancia con ellos fuera muy positiva en todos los aspectos. Gracias por vuestra amistad y ayuda en todo momento.

Al Dr. José Enrique O’Connor, por su asesoramiento y colaboración durante el desarrollo de esta tesis, especialmente en todo lo relacionado con la citometría de flujo. Gracias también por confiar en mí para participar en el curso de doctorado que dirige, dándome la oportunidad de mejorar mi formación.

Por supuesto, tengo muchísimo que agradecer a mis compañeros de laboratorio, Eva y Alberto, quienes son una parte vital de este trabajo. Eva, gracias por enseñarme a trabajar en un laboratorio, por todos los buenos momentos que hemos pasado en el y sobre todo por ser una buena amiga a quien siempre puedo recurrir. Y Alberto, que ha estado conmigo durante toda la tesis, sin tu ayuda, apoyo y amistad no habría sido lo mismo. Y aunque el tiempo compartido con ellos ha sido breve, quiero agradecer a Patricia, M^a Carmen, Armêl y Rafa su ayuda y el haber hecho que las largas horas en el laboratorio fueran mucho más divertidas.

No puedo olvidarme de Ana Flores, quien para mí es mucho más que la persona que consigue que todo funcione bien en Cultivos Celulares. Con su buen humor, su apoyo, su amistad y nuestras conversaciones delante del citómetro, ha conseguido que Cultivos sea más que un lugar de trabajo.

Gracias también a José Miguel y Miguel, del Departamento de Farmacología y usuarios de Cultivos Celulares. Gracias por todos los buenos momentos que he pasado con vosotros, por estar siempre dispuestos a escuchar, a dar buenos consejos de todo tipo y a hablar de ciencia, incluso en un barco.

Por supuesto tengo que dar las gracias a toda la gente del Departamento de Microbiología y Ecología, en especial a los becarios del 2º piso; Mariola, Javi, Sonia, Paco, Amparo..., quienes siempre están dispuestos a ayudar y con quienes he compartido tantos buenos ratos, especialmente durante los congresos.

A mis amigos; Raúl, Irene, Miguel, Ana, Mar, Fran, Miguel, Pablo... Porque siempre habéis estado a mi lado y con vosotros he compartido algunos de los mejores momentos de mi vida. Y a Víctor. Gracias por tu ayuda, cariño, apoyo y comprensión durante este último año. Ya sois parte de mí.

Tampoco puedo olvidarme de mi familia, quienes me han dado su apoyo y cariño siempre. En especial, quiero recordar a mis tías, Blanca, M^a Carmen y Toñi; os echo de menos.

Por último, y sobre todo, tengo que dar las gracias a mis padres, Toni y M^a José. Gracias por confiar en mí, por apoyar mis decisiones, por estar siempre a mi lado tanto en los momentos buenos como en los momentos difíciles, y especialmente por ser como sois. Habéis hecho de mí la persona que soy hoy. Esta tesis es tanto mía como vuestra, porque sin vosotros habría sido infinitamente más difícil haber llegado hasta aquí. Os quiero.

Abreviaturas

BCR	“B Cell Receptor”; Receptor de células B
CARD	“Caspase Activation and Recruitment Domain”
Células NK	Células Natural Killer
Células Treg	Células T reguladoras
DCs	“Dendritic Cells”; Células dendríticas
DC-SIGN	“DC-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin”
DO	Densidad óptica
ELISA	“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”
FITC	Isocianato de fluoresceína
HSP	“Heat Shock Proteins”; Proteínas de choque térmico
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
JNK	“c-Jun N-terminal Kinase”
KDa	KiloDalton
KO	“Knockout”
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
MHC	“Major Histocompatibility Complex”; Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP-2	“Macrophage Inflammatory Protein-2”
MR	“Mannose Receptor”; Receptor de manosa
MyD88	“Myeloid Differentiation Factor 88”
NF- κ B	“Nuclear Factor- κ B”
Nod	“Nucleotide Oligomerization Domain”

PAMPs	“Pathogen-Associated Molecular Patterns”
PBS	“Phosphate Buffered Saline”; Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PRRs	“Pathogen Recognition Receptors”
Sap	“Secreted Aspartyl Proteases”
TCR	“T Cell Receptor”; Receptor de células T
Th	“T helper”; T auxiliar
TIR	“Toll/IL-1 receptor”
TLRs	“Toll Like Receptors”; Receptores tipo Toll
TNF- α	“Tumor Necrosis Factor- α ”; Factor de necrosis tumoral- α
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Candida albicans</i>: Generalidades	1
1.1. Pared celular	2
1.2. <i>C. albicans</i> como agente patógeno	5
Factores de virulencia	7
A) Dimorfismo	8
B) Adhesión	9
C) Proteínas de secreción: enzimas hidrolíticas y otras proteínas ...	12
D) Cambio fenotípico o "switching"	14
E) Formación de biopelículas	16
2. Respuesta inmunitaria frente a <i>Candida albicans</i>	18
2.1. Inmunidad innata	20
Activación del complemento	20
Fagocitosis	21
Inflamación inducida por complemento, eicosanoides y citocinas ...	24
Activación de células "Natural Killer"	28
2.2. Inmunidad específica	31
Inmunidad mediada por células	31
Linfocitos B: anticuerpos	35
3. "Toll-like receptors" (TLRs)	40
3.1. Participación de los TLRs en la respuesta inmunitaria	41
3.2. Ligandos de los TLRs	43
3.3. Vías de transducción de señal de los TLRs	50
Transducción de señal dependiente de MyD88	51
Transducción de señal independiente de MyD88	52
Reguladores negativos de las vías de señalización de los TLRs	54

3.4. Colaboración de TLRs con otros receptores	54
Proteínas Nod y TLRs	55
Lectinas y TLRs	55
3.5. Distribución y localización subcelular de los TLRs	58
3.6. TLRs y <i>Candida albicans</i>	61
4. Inmunosenescencia	62
4.1. Inmunosenescencia del sistema inmunitario adquirido	63
4.2. Inmunosenescencia del sistema inmunitario innato	66
Neutrófilos	66
Macrófagos	67
Células NK	69
4.3. Inmunosenescencia y TLRs	69
II. OBJETIVOS	71
III. MATERIAL Y MÉTODOS	73
1. Cepas fúngicas utilizadas	73
2. Cepas de ratón utilizadas	73
3. Sangre humana: donantes	74
4. Medios de cultivo para cepas fúngicas	75
5. Medios de cultivo para células de ratón y humanas	76
6. Preparación de estímulos fúngicos para ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	77
7. Citómetro de flujo	79
8. Modelo de infección invasiva experimental en ratón; curvas de supervivencia y modelo de vacunación	79
9. Determinación del crecimiento fúngico en riñón tras una infección experimental	80
10. Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales residentes	81

11. Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de esplenocitos	82
12. Reclutamiento a la cavidad peritoneal de macrófagos y neutrófilos	83
13. Purificación mediante selección inmunomagnética y cultivo <i>in vitro</i> de distintos tipos celulares	84
14. Determinación de la capacidad fungicida de distintos tipos celulares de ratón y de células sanguíneas humanas	86
15. Cultivo y estimulación de sangre humana completa: determinación de la producción <i>in vitro</i> de citocinas mediante CBA	88
16. Determinación mediante ELISA de la producción <i>in vitro</i> de citocinas, quimiocinas y prostaglandinas por distintos tipos celulares	90
17. Determinación mediante citometría de flujo del porcentaje de linfocitos T CD4 ⁺ productores de IFN- γ	91
18. Determinación de la proliferación celular	92
19. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie y de receptores Toll en células de ratón	92
20. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de receptores Toll en células sanguíneas humanas	94
21. Determinación semi-cuantitativa mediante ELISA de los niveles de anticuerpos específicos frente a <i>C. albicans</i> en plasma de donantes humanos	94
22. Determinación semi-cuantitativa mediante citometría de flujo de los niveles de anticuerpos específicos frente a <i>C. albicans</i> en plasma de donantes humanos	95
23. Análisis mediante “Western Immunoblotting” de los anticuerpos específicos frente a <i>C. albicans</i> presentes en el suero de ratones infectados	96
24. Análisis estadístico de los resultados	97
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
 <u>Capítulo I: Estudio de la participación de los receptores TLR4 y TLR2 y de las células Natural Killer en la respuesta inmunitaria frente a <i>Candida albicans</i></u>	99

1. Participación de TLR4 en la respuesta inmunitaria frente a <i>C. albicans</i>.....	100
1.1. Susceptibilidad <i>in vivo</i> de ratones deficientes en TLR4 a una infección sistémica experimental por <i>C. albicans</i>	100
1.2. Implicación de TLR4 en el reclutamiento de neutrófilos	102
1.3. Participación de TLR4 en la producción <i>in vitro</i> de TNF- α por macrófagos	103
1.4. Producción <i>in vitro</i> de citocinas por esplenocitos de ratones deficientes en TLR4	104
1.5. Implicación de TLR4 en el desarrollo de una respuesta Th1 frente a <i>C. albicans</i>	108
2. Participación de TLR2 y TLR4 en la respuesta frente a distintos estímulos fúngicos: efecto del método de inactivación del hongo	110
2.1. Producción <i>in vitro</i> de TNF- α por macrófagos de ratones deficientes en TLR2 o TLR4 en respuesta a diferentes estímulos de <i>C. albicans</i>	110
2.2. Producción <i>in vitro</i> de IFN- γ por esplenocitos de ratones deficientes en TLR2 o TLR4 en respuesta a diferentes estímulos de <i>C. albicans</i>	114
3. Participación de las células Natural Killer en la respuesta inmunitaria frente a <i>C. albicans</i>	116
3.1. Producción <i>in vitro</i> de IFN- γ por células NK de ratón en respuesta a <i>C. albicans</i>	116
3.2. Producción <i>in vitro</i> de IFN- γ por células NK de ratón en respuesta a <i>C. albicans</i> y en presencia de citocinas	118
3.3. Producción de IFN- γ por células NK de ratón en respuesta a distintos estímulos fúngicos en presencia de IL-2 y zimosán	120
3.4. Producción de IFN- γ por células NK de ratón de ratones TLR2-/- y ratones DBA2/J	121
4. Discusión	123

Capítulo II: Estudio de la expresión y función de los receptores TLR durante el envejecimiento: influencia en la respuesta inmunitaria frente a <i>Candida albicans</i>	135
1. Modelo murino	136
1.1. Susceptibilidad <i>in vivo</i> de ratones ancianos a la infección sistémica experimental por <i>C. albicans</i>	136
1.2. Efecto del envejecimiento en la producción <i>in vitro</i> de TNF- α por macrófagos	139
1.3. Producción <i>in vitro</i> de citocinas y quimiocinas por macrófagos purificados	140
1.4. Reclutamiento de células fagocíticas a la cavidad peritoneal	143
1.5. Actividad fungicida de células fagocíticas	145
1.6. Expresión de TLR2 en la superficie de macrófagos	146
1.7. Producción <i>in vitro</i> de citocinas por esplenocitos	148
1.8. Efecto del envejecimiento en el desarrollo de una respuesta Th1 frente a <i>C. albicans</i>	150
1.9. Respuesta humoral frente a <i>C. albicans</i> en ratones ancianos vacunados	152
2. Modelo humano: sangre humana completa	155
2.1. Análisis por citometría de flujo de la expresión de distintos TLRs en la superficie de células sanguíneas	155
2.2. Producción <i>in vitro</i> de citocinas y prostaglandina E ₂ por cultivos de sangre completa en respuesta a <i>C. albicans</i>	157
2.3. Actividad fungicida de células sanguíneas	159
2.4. Presencia de anticuerpos específicos anti- <i>C. albicans</i> en plasma	160
3. Discusión	162

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	173
VI. RESUMEN / SUMMARY	177
VII. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN	181
VIII. BIBLIOGRAFÍA	183

Introducción

1. *Candida albicans*: Generalidades

El género *Candida* ha sido clasificado en el orden *Cryptococcales*, perteneciente al grupo de los *Deuteromycetes* u hongos imperfectos. Dicho grupo comprende un importante conjunto de hongos en los que no se ha descrito fase sexual, reproduciéndose de modo asexual mediante la formación de conidios (Carile y Watkinson, 1994). El género *Candida* engloba a unas 200 especies de levaduras, que difieren por su capacidad de asimilar distintos compuestos, por la composición de polisacáridos de la pared celular y por la capacidad de presentar diferentes morfologías (Kirsch *et al.*, 1990; Barnett *et al.*, 2000)

C. albicans es un hongo unicelular diploide dimórfico que normalmente crece como levadura (blastospora o blastoconidio), pero que bajo determinadas condiciones ambientales puede formar tubos germinales o hifas (fase de micelio). Además, también se han detectado otras dos morfologías fúngicas (pseudohifa o pseudomicelio y clamidosporas), por lo que esta especie debe ser considerada como un hongo polimórfico (Fig. 1). La pseudohifa o pseudomicelio se diferencia del micelio en el grosor y en la presencia de una constricción en las uniones septales, originándose células alargadas por gemación a partir de blastosporas o de otra pseudohifa, que permanecen unidas a la célula parental, pudiendo llegar a parecer un verdadero micelio. Las clamidosporas, esporas asexuales, presentan forma redondeada y son formas de resistencia generadas a partir del micelio bajo determinadas condiciones desfavorables (Odds, 1988; Kerridge *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 2000).

C. albicans se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, hallándose frecuentemente como comensal inocuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal, y en el tracto gastrointestinal del hombre y otros mamíferos. En individuos sanos suele encontrarse en forma saprófita, pero en determinadas condiciones puede invadir cualquier tejido del cuerpo desde su hábitat normal y manifestar carácter patógeno, por lo que es considerada como un patógeno oportunista (Calderone, 2002; Pfaller y Diekema, 2007).

Aunque los *Deuteromycetes* carecen de ciclo sexual, recientemente se han encontrado evidencias genéticas y fisiológicas que indican que *C. albicans* puede experimentar bajo ciertas condiciones el proceso de conjugación, generando variantes genéticas que podrían favorecer la supervivencia del hongo durante el proceso de infección en el hospedador (Tzung *et al.*, 2001; Lockhart *et al.*, 2003; Forche *et al.*, 2008).

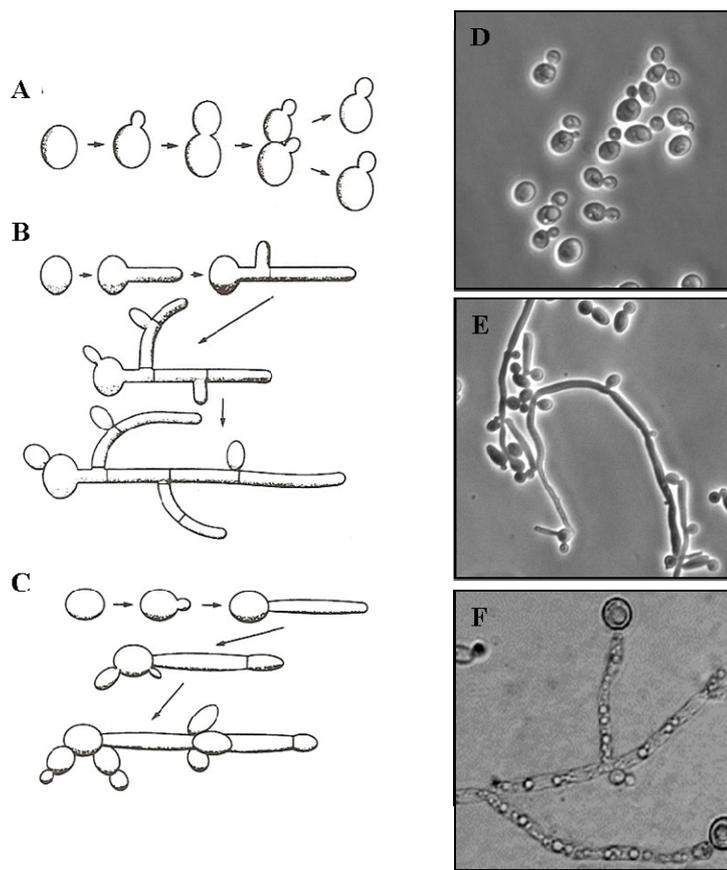


Fig. 1. Morfología celular de *C. albicans*: levadura (A), micelio (B) y pseudomicelio (C) (Calderone, 2002).
Imágenes de microscopía de las formas de levadura (D) micelio (E) y clamidosporas terminales (F).

1.1. Pared celular

La pared celular de *C. albicans* es una estructura dinámica y compleja que protege a la célula de la presión osmótica en medios hipotónicos y le confiere su forma característica. Además de su función en la morfogénesis, por ser la estructura celular más externa, la pared celular tiene una función esencial en las interacciones con el hospedador, tales como la adhesión y la modulación de la respuesta inmunitaria (Chaffin *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

La pared celular está formada mayoritariamente por carbohidratos (80-90% del peso seco de la pared), mientras que las proteínas representan el 20% y los lípidos son un componente minoritario (1-7%). Los principales polisacáridos de la pared son de 3 tipos: (i) β -glucanos, que son polímeros de glucosa con uniones β -(1,3) y β -(1,6), (ii) quitina, que es un polímero lineal de N-acetil-D-glucosamina con enlaces β -(1,4) y (iii) manano,

conjunto de polímeros de manosa unidos covalentemente a proteínas (manoproteínas) (Fig. 2) (Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

Glucanos y quitina forman un esqueleto que da forma y aporta rigidez a la pared celular. Los β -glucanos son el principal polisacárido de la pared, aproximadamente el 60% del peso seco de la misma, mientras que la quitina es un componente minoritario (0,6-9%).

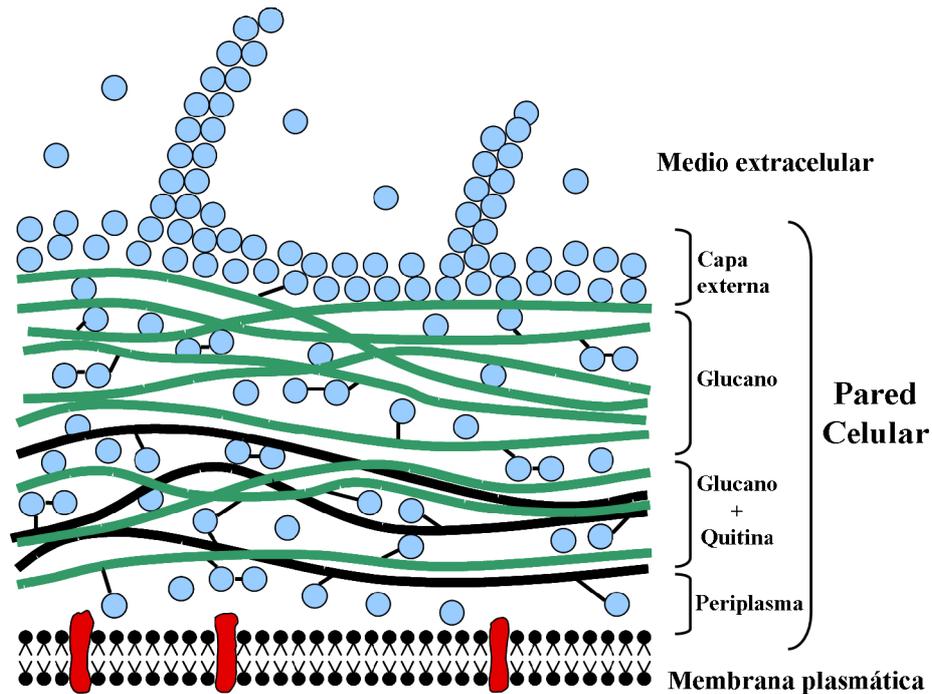


Fig. 2. Diagrama esquemático de la estructura de la pared celular de *C. albicans*. Los polisacáridos microfibrilares, glucanos (líneas verdes) y quitina (líneas negras) están unidos covalentemente y constituyen el esqueleto de la pared celular. Las manoproteínas (círculos azules) se sitúan desde el periplasma hasta la capa externa, y algunas pueden ser secretadas al medio extracelular. Diferentes uniones covalentes (barritas negras), formadas entre algunas manoproteínas y cadenas de polisacáridos y entre diferentes manoproteínas, contribuyen a la organización de la pared celular. Se puede observar la distribución heterogénea de los distintos componentes de la pared celular: proteínas y manoproteínas son predominantes en la capa externa; los polisacáridos microfibrilares, el glucano y la quitina se distribuyen en capas internas, con la quitina localizada cerca de la membrana plasmática. (Modificado de Gozalbo *et al.*, 2004).

El manano permanece unido covalentemente a proteínas (manoproteínas) y puede representar hasta el 40% de los polisacáridos de la pared celular. Los polímeros de manosa se unen a residuos de asparagina a través un enlace N-glicosídico mediante dos moléculas N-acetilglucosaminas, o bien se unen a residuos de treonina o serina por un enlace O-glicosídico (Chaffin *et al.*, 1998; Gow *et al.*, 1999). Las manoproteínas se encuentran asociadas a la pared celular de diferentes formas: algunas permanecen débilmente unidas a otros componentes de la pared y pueden ser solubilizadas por agentes caotrópicos o con detergentes; otras están unidas covalentemente a polímeros estructurales y sólo pueden ser solubilizadas tras tratamientos enzimáticos con β -glucanasas y/o quitinasas; por último, un tercer grupo se extrae con agentes reductores, indicando su unión a otras manoproteínas de la pared celular mediante puentes disulfuro (Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

Las distintas interacciones entre estos componentes (glucano, quitina y manoproteínas) son las responsables de la arquitectura final de la pared celular. Los glucanos forman una red tridimensional que constituye el soporte para otros componentes celulares, la quitina se une covalentemente al glucano y se encuentra en capas internas, y las manoproteínas se distribuyen a lo largo de toda la estructura de la pared y son el componente mayoritario en capas externas, pudiendo formar extensiones filamentosas denominadas fimbrias. Por lo tanto, estas interacciones determinan la morfología celular, habiéndose descrito diferencias significativas en la composición y en la organización de la pared celular entre las formas de levadura y las hifas de *C. albicans*, siendo las manoproteínas un componente esencial en el proceso de transición morfológica (Klis *et al.*, 2001; Gozalbo *et al.*, 2004; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

Los lípidos están presentes formando parte del complejo fosfolipomanano (PLM), formado por oligomanósidos asociados a moléculas lipídicas. El PLM es un derivado de inositol fosfoceramida, originado por la adición de manosas fosfato, que dan lugar a un glicoesfingolípido altamente glicosilado, cuyo carácter hidrofílico permite su difusión a través de la pared celular (Poulain *et al.*, 2002; Trinel *et al.*, 2002).

1.2. *C. albicans* como agente patógeno

C. albicans como patógeno oportunista puede producir distintos tipos de infecciones denominadas genéricamente candidiasis. El término candidiasis se refiere a cualquier infección causada por especies del género *Candida*, y aunque la especie *C. albicans* sigue siendo la más frecuentemente aislada en las infecciones nosocomiales, en los últimos años ha aumentado el aislamiento de otras especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. rugosa*, etc. (Gutiérrez *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2002; Pfaller *et al.*, 2006).

Las infecciones producidas por *C. albicans* pueden dividirse en dos categorías: superficiales y sistémicas. En las candidiasis superficiales se ven afectadas las mucosas del tracto gastrointestinal, oral o vaginal, por infecciones que en ocasiones presentan un carácter crónico y que, en la mayoría de los casos, suelen resolverse tras un tratamiento antifúngico. Sin embargo, las candidiasis sistémicas o invasivas se diagnostican cuando se encuentran microorganismos del género *Candida* en sangre, afectando o no a los tejidos, o cuando la infección se ha extendido y afecta a uno o varios órganos internos; estas infecciones aparecen fundamentalmente en pacientes inmunocomprometidos por diferentes causas.

En la mayoría de los casos, la infección sistémica o invasiva por especies del género *Candida* tiene un origen endógeno, ya que el agente etiológico son levaduras que forman parte de la microbiota autóctona del paciente. En tales casos, el tracto digestivo representa la principal puerta de entrada del microorganismo al torrente sanguíneo. En pacientes neutropénicos se producen lesiones de la mucosa intestinal que favorecen el paso de las levaduras a sangre. En pacientes no neutropénicos la invasión sanguínea es normalmente precedida por la colonización del tracto digestivo y posterior translocación de las levaduras a través de la pared intestinal, por lo que la colonización del tracto digestivo condiciona el desarrollo de la candidiasis invasiva (Nucci y Anaissie, 2001; Galvan y Mariscal, 2006). Sin embargo, en un número significativo de casos, el origen de la infección es exógeno, tras la colonización de catéteres y dispositivos intravasculares por la levadura (Peman *et al.*, 2002; 2005; Galvan y Mariscal, 2006). En estos casos puede darse la transmisión cruzada por las manos del personal sanitario, ya que se ha demostrado que las especies de *Candida* pueden persistir hasta 45 min en las manos del personal sanitario, y un estudio multicéntrico realizado en 13 Unidades de Cuidados Intensivos durante 18 meses,

empleando técnicas moleculares de tipificación de cepas, demostró la transmisión cruzada de levaduras a través de las manos del personal sanitario (Pfaller *et al.*, 1998; Blumberg *et al.*, 2001). La incidencia de las candidiasis sistémicas ha aumentado notablemente en las últimas décadas debido a la concurrencia de una serie de factores, como la terapia masiva con antibióticos antibacterianos de amplio espectro, la utilización de pautas inmunosupresoras intensivas en pacientes neoplásicos y trasplantados, la nutrición parenteral, el empleo de prácticas quirúrgicas y técnicas terapéuticas y diagnósticas agresivas, etc. (Dixon *et al.*, 1996; Garber, 2001; Tortorano *et al.*, 2004; Peman *et al.*, 2005; Pfaller y Diekema., 2007).

Las infecciones fúngicas invasivas representan una de las principales causas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos debido, al menos en parte, a que tanto el diagnóstico como el tratamiento son complicados (Richardson y Carlson, 2002; Sanglard y Odds, 2002.; Pfaller y Diekema., 2007). Las candidiasis sistémicas son difíciles de diagnosticar, ya que la mayoría de los pacientes no muestran signos clínicos específicos que indiquen la existencia de una infección fúngica. El método de diagnóstico clásico consistía en aislar al microorganismo por hemocultivo, pero esto es problemático por su baja sensibilidad y porque la presencia del microorganismo en sangre es transitoria; además era necesaria la identificación del mismo mediante varios métodos, como el test de germinación en suero y tests bioquímicos de asimilación de azúcares (Bodey, 1993; Richardson y Carlson, 2002). Alternativamente, los test serológicos pueden ser útiles para el diagnóstico cuando los hemocultivos son negativos, y en los últimos años se han producido importantes avances en este área, principalmente en el campo de la detección de anticuerpos y de β -(1,3)-D-glucano. Se ha comercializado la prueba “*Candida albicans* IFA IgG”, basada en la detección de anticuerpos específicos frente a *C. albicans* y con una sensibilidad del 84,4% y una especificidad del 94,7%. También existen pruebas diagnósticas para candidiasis basadas en la detección de anticuerpos frente a los antígenos recombinantes Hwp1 y enolasa. La detección de β -(1,3)-D-glucano también se confirma como un buen marcador para el diagnóstico de la candidiasis invasiva (Pontón y del Palacio, 2007). Por otro lado, el creciente conocimiento de la genética molecular de *C. albicans* y la necesidad de un método rápido de diagnóstico, han potenciado el desarrollo de técnicas de biología molecular para identificar especies del género *Candida*. Las técnicas de PCR han sido ampliamente utilizadas para detectar e identificar diferentes especies del género, empleando distintos genes como dianas para la amplificación (Donnelly

et al., 1999; Maneu *et al.*, 2000; Kanbe *et al.*, 2002; Sullivan y Coleman, 2002; Arancia *et al.*, 2004). La detección de DNA utilizando la técnica de la PCR en tiempo real es probablemente el mayor avance que se ha producido en este campo en los últimos años. Sin embargo, aun no existe ninguna prueba ampliamente evaluada que sea utilizada universalmente. Los estudios más recientes sugieren que será necesaria la combinación de al menos dos técnicas que detecten antígeno, anticuerpos, β -(1,3)-D-glucano y/o DNA para optimizar el diagnóstico de las infecciones sistémicas por levaduras, ya que una técnica puede suplir las deficiencias de la otra (Pontón y del Palacio, 2007).

El tratamiento de las micosis sistémicas, incluyendo las candidiasis, se ha basado fundamentalmente en el empleo de tres clases de fármacos: antibióticos poliénicos (anfotericina B), flucitosina y azoles (ketoconazol y fluconazol). No obstante, estos compuestos tienen inconvenientes, tales como la toxicidad o la inducción de aparición de resistencias y por lo tanto, es necesario la utilización de nuevas drogas antifúngicas (Sanglard y Odds, 2002; Odds *et al.*, 2003). Recientemente, han aparecido nuevos antifúngicos de aplicación clínica: triazoles de nueva generación (posaconazol, ravuconazol, voriconazol), y nuevos antibióticos del grupo de las equinocandinas (casporfungina, anidulafungina, micafungina). Estas nuevas equinocandinas representan los únicos antifúngicos de interés clínico que actúan sobre una nueva diana (inhibición de la biosíntesis de glucano) tras varias décadas de investigación (Odds *et al.*, 2003; Gozalbo *et al.*, 2004; Chen y Sorrell, 2007).

Factores de virulencia

La virulencia de *C. albicans* está determinada por un conjunto de factores que incluyen tanto la capacidad del hongo para provocar una infección, como la respuesta del hospedador ante la invasión fúngica. Las infecciones por *Candida* aparecen tras varias etapas secuenciales. La adhesión a la superficie de los epitelios inicia el proceso y la colonización de ésta es la segunda etapa. Los factores fúngicos y del hospedador implicados en estas etapas probablemente no son los mismos que los requeridos para la penetración de las superficies epiteliales. Esta penetración marca, en muchos casos, el límite del proceso infeccioso (dando como resultado infecciones superficiales), ya que *C.*

albicans normalmente no es capaz de proseguir el proceso invasivo en hospedadores inmunológicamente sanos. No obstante, en situaciones en las que el hongo es capaz de alcanzar la sangre, debe necesariamente expresar factores que lo protejan contra las defensas del hospedador. Para causar una infección diseminada, las células fúngicas deben expresar los factores necesarios para atravesar los endotelios e invadir los tejidos (Hostetter, 1994; Weig *et al.*, 1998; Calderone, 2002).

La patogenicidad de *C. albicans* depende de diferentes factores de virulencia del hongo, entre los cuales están el dimorfismo, la adhesión a mucosas y a tejidos del hospedador, la hidrofobicidad de la superficie celular, la producción de exoenzimas hidrolíticas, el cambio fenotípico y la capacidad de crecer formando biopelículas, así como la modulación de la respuesta inmunitaria.

A) Dimorfismo

Uno de los factores de virulencia más estudiados en *C. albicans* es el dimorfismo. La transición morfológica levadura-micelio depende de factores ambientales como el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la hemina, etc., y se inicia mediante la formación del tubo germinativo a partir de levaduras (Casanova *et al.*, 1997; van Burik y Magee, 2001).

Dicha transición morfológica se ha considerado tradicionalmente como un factor de virulencia, puesto que cuando *C. albicans* crece como saprófito sólo se encuentran formas levaduriformes, mientras que en tejidos infectados pueden encontrarse tanto levaduras como micelios y pseudomicelios (Calderone, 2002), sugiriéndose que la forma micelial podría estar mejor adaptada que las levaduras para la adhesión y penetración de la capas epiteliales (Calderone, 1993; Gow *et al.*, 1994; Kretschmar *et al.*, 1999), aunque no existe una demostración inequívoca. Mutantes monomórficos incapaces de miceliar son menos virulentos o avirulentos, lo que apoyaría la idea de la implicación de la transición levadura-micelio en la virulencia (Lo *et al.*, 1997; Baillie y Douglas, 1999; Ramage *et al.*, 2002; Romani *et al.*, 2003). También se ha observado que las levaduras y el micelio pueden inducir una diferente respuesta inmunitaria, tal como se detalla en el punto 2.2 de este apartado de Introducción.

La transición levadura-micelio implica una respuesta celular a ciertos estímulos ambientales que desencadenan un cambio de patrón de crecimiento y de las características de la pared celular. Un estímulo estándar es la adición de suero a un medio de cultivo rico

y el aumento de temperatura a 37° C, aunque medios pobres en nutrientes como el medio de Lee junto con un aumento en la temperatura a 37° C, también son condiciones adecuadas para la inducción de la forma micelial (Whiteway y Bachewich, 2007). Estos cambios le confieren particularidades propias a la forma micelial que afectan a la adhesión, la hidrofobicidad, la expresión de antígenos y podrían estar implicados en una mayor virulencia (Kirsch *et al.*, 1990; Gozalbo *et al.*, 2004; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Por lo tanto el dimorfismo no sólo representa un factor de virulencia “per se”, sino también por estar corregulado junto a otros factores de virulencia asociados a la morfología celular (Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000).

La base genética de dichos cambios morfológicos está siendo muy estudiada. Se conoce que en la transición morfológica están implicadas varias rutas de transducción de señal que incluyen factores de transcripción específicos. Así, determinados factores ambientales activan, a través de proteínas sensoras, diferentes rutas de transducción de señal. Estas rutas pueden converger en factores de transcripción distintos o idénticos (Tup1, Efg1, etc.) que regulan la expresión de genes diana responsables de la transición morfológica (Braun y Johnson, 2000; Ernst, 2000; Liu, 2001; Whiteway y Bachewich, 2007). La proteína Efg1p tiene una función central en el control de la morfogénesis. Además, la vía de transducción que implica a Efg1p está conectada con el metabolismo de cAMP; células defectivas en la adenilil ciclasa Cdc35p pueden crecer como levaduras pero son incapaces de desarrollar micelio bajo condiciones inductoras estándar. Otras vías que pueden estar implicadas en la transición morfológica son la vías de señalización de MAPK (“Mitogen-Activated Protein Kinase”) y una vía que detecta los cambios de pH externo (Whiteway y Bachewich, 2007).

B) Adhesión

Las interacciones entre las células de *C. albicans* y las células del hospedador están mediadas por moléculas de la pared celular del hongo, por ser la estructura más externa del microorganismo. La función de estas interacciones en patogénesis es compleja, ya que existen una gran variedad de factores de adhesión cuya participación en virulencia depende de la cepa del hongo, del tejido del hospedador infectado y del estado del paciente. Aunque componentes de la pared celular como quitina, glucanos o moléculas lipídicas participan parcialmente en la adhesión de *C. albicans* al hospedador, las proteínas y manoproteínas

son las principales responsables de tal proceso (Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).

C. albicans tiene capacidad para adherirse a células epiteliales y endoteliales, a proteínas séricas, a la matriz extracelular y a ciertos materiales inertes como prótesis, catéteres, etc. Los constituyentes de la pared celular implicados en esta unión han sido genéricamente designados con el término "adhesinas" (Calderone y Fonzi, 2001), y su heterogeneidad podría ser un reflejo de la variedad de tejidos que puede invadir *C. albicans* en el hospedador (Calderone y Braun, 1991; Hostetter, 1994; Fukazawa y Kagaya, 1997; Douglas, 2003).

La adhesión del microorganismo al hospedador implica distintos tipos de interacciones moleculares:

- **Moléculas tipo lectina.** Las adhesinas de *C. albicans* pueden interaccionar con receptores glicosídicos (glicoproteínas o glicolípidos) de una forma similar a la descrita para las lectinas en diferentes mecanismos de adhesión bacterianos. Este tipo de adhesión ha resultado ser el más utilizado en la interacción con células epiteliales. En *C. albicans* se han descrito una gran variedad de moléculas tipo lectina, las cuales reconocen diferentes grupos antígenicos, como glicósidos que contienen L-fucosa o N-acetilgalactosamina, que pueden servir de ligandos del microorganismo en células epiteliales. Los receptores tipo lectina de *C. albicans* también reconocen proteínas de saliva, como mucinas, o complejos bacterianos polisacáridicos, mediando la interacción con especies del género *Streptococcus*, lo que contribuye a la colonización oral por el hongo (Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004).
- **Proteínas que reconocen ligandos que presentan la secuencia arginina-glicina-aspártico (RGD).** Muchos de los ligandos reconocidos por receptores fúngicos contienen el motivo con la secuencia RGD. Así, las adhesinas de *C. albicans* presentan ciertas similitudes en cuanto a su estructura y función con las integrinas de mamífero: las secuencias RGD se encuentran en proteínas de la matriz extracelular, en el fragmento C3 del complemento y en el fibrinógeno, y son capaces de interaccionar con integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ de mamífero. *C. albicans* presenta una importante afinidad por diferentes proteínas de la matriz extracelular, como laminina y fibronectina, y estas interacciones están mediadas por receptores fúngicos tipo integrina que facilitan la

colonización por el hongo de las superficies endoteliales y epiteliales (Hostetter, 1994; Chaffin *et al.*, 1998; Hostetter, 1999; Gozalbo *et al.*, 2004).

- **Otras proteínas de unión.** Varias manoproteínas de la superficie celular de *C. albicans* interactúan con fibrinógeno, y también con laminina y C3d, lo que sugirió su relación inicial con integrinas de mamíferos. (Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Hostetter, 1999). El receptor de fibrinógeno mejor caracterizado es una manoproteína de 58 Kilodalton (KDa) que interactúa con el fibrinógeno a través de su porción O-glicosídica. Las proteínas de la coagulación sanguínea (fibrinógeno/fibrina) parecen actuar como receptores de las células fúngicas, permitiendo su unión a los coágulos sanguíneos *in vivo*, por lo que una coagulación intravascular diseminada puede desencadenar una septicemia por *C. albicans*. Se han descrito varias proteínas de *C. albicans* capaces de unirse a plasminógeno, y dicha interacción no está mediada por manano sino por residuos de lisina C-terminales (Gozalbo *et al.*, 2004). La familia de proteínas Als (codificadas por las secuencias ALS “Agglutinin-Like Sequences”) está formada por glicoproteínas implicadas en la adhesión a superficies del hospedador (Sundstrom, 2002; Alberti-Segui *et al.*, 2004). Las proteínas Als son capaces de interactuar con distintos ligandos del hospedador como laminina, fibronectina y colágeno, probablemente al reconocer determinados grupos de aminoácidos (treonina, serina o alanina). Hwp1, una proteína relacionada estructuralmente con las Als, es un sustrato de la transglutaminasa epitelial, lo que favorece la adhesión del hongo a la superficie epitelial a través de enlaces covalentes (Staab *et al.*, 1999). Algunas de estas adhesinas, además de su implicación en virulencia, juegan un papel importante en la fisiología de *C. albicans*, participando en la transición levadura-micelio y en la conjugación (Sundstrom, 2002; Alberti-Segui *et al.*, 2004).
- **Proteínas que se unen al plástico.** La capacidad que presenta *C. albicans* para adherirse a materiales plásticos usados en la práctica clínica (catéteres, prótesis, etc.) contribuye a la aparición de muchas infecciones nosocomiales. Tras la adhesión, el microorganismo puede formar biopelículas que favorecen o inician la aparición de infecciones diseminadas (Douglas, 2003). Se han descrito numerosas especies proteicas y manoproteicas implicadas en la adhesión a material plástico, cuya expresión depende de múltiples factores ambientales (Chaffin *et al.*, 1998; Chandra *et al.*, 2001). La adherencia al plástico parece estar relacionada con la hidrofobicidad del

hongo, ya que se producen interacciones hidrofóbicas entre la superficie del plástico y la parte peptídica de manoproteínas, lo que facilita la colonización por el hongo (Gozalbo *et al.*, 2004).

- **Mananos y otros polisacáridos.** La porción de manano de las manoproteínas de la superficie de *C. albicans* también está implicada en la interacción hongo-hospedador, ya que numerosos estudios demuestran que el manano interviene en la adhesión del hongo a la superficie de células epiteliales o endoteliales (Hostetter, 1994; Fukazawa y Kagaya, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 2004). El manano es capaz de unirse a los glóbulos rojos humanos lo que provoca la hemólisis, hecho que está relacionado con la capacidad de utilización de hierro y hemoglobina (Tavares *et al.*, 1993). El manano participa también en la adhesión a componentes salivares y en la interacción del hongo con distintas especies bacterianas, en las que deben participar moléculas bacterianas tipo lectina que interaccionan con carbohidratos de la superficie del hongo (Gozalbo *et al.*, 2004).
- **Hidrofobicidad.** La hidrofobicidad de la superficie celular de *C. albicans* está implicada en una gran variedad de interacciones del hongo con el hospedador, así como en diferentes funciones fúngicas (la adherencia a las superficies endoteliales y epiteliales, a las proteínas de la matriz extracelular y al plástico, la evasión de *C. albicans* de la acción de las células fagocíticas y la captación de algunas sustancias del medio). La hidrofobicidad depende de la expresión combinada de una serie de proteínas hidrofóbicas en la superficie fúngica y de cambios en la glicosilación de las proteínas de la capa más externa, afectando a la ultraestructura de la superficie celular del hongo y a su fenotipo (Masuoka y Hazen, 1999; Singleton *et al.*, 2001; Gozalbo *et al.*, 2004).

C) Proteínas de secreción: enzimas hidrolíticas y otras proteínas

Determinadas enzimas son secretadas al exterior de la célula fúngica, donde se encuentran sus sustratos. Cuando la acción de estas enzimas afecta a la función y viabilidad del hospedador, las enzimas se consideran factores de virulencia, ya que contribuyen al establecimiento de la infección (Chaffin *et al.*, 1998; Calderone, 2002).

La actividad proteolítica extracelular en *C. albicans* se debe a la acción de una familia de enzimas denominadas aspartil-proteasas (Sap: "Secreted Aspartyl Proteases"),

cuya secreción aumenta la capacidad del hongo para penetrar y colonizar los tejidos del hospedador, permitiéndole además evadir la respuesta inmunitaria (De Bernardis *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1990; van Burik y Magee, 2001; Naglik *et al.*, 2003). La expresión de Saps depende tanto de la cepa fúngica como de las condiciones ambientales. Estas enzimas tienen una gran variedad de sustratos dependiendo del órgano infectado o colonizado. Varias observaciones sugieren una función importante de las proteínas Sap en la patogénesis de las candidiasis: (i) son secretadas *in vivo* por cepas de *Candida* durante la infección, y existe una correlación entre virulencia y producción de proteasa, tanto en aislados clínicos de *C. albicans* como en cepas de laboratorio; (ii) pueden degradar proteínas relacionadas con el sistema inmunitario del hospedador como inmunoglobulinas y complemento, y además son capaces de hidrolizar mucina, lo que facilita al hongo la penetración a través de la mucosa gastrointestinal; y (iii) se han clonado y caracterizado diez genes *SAP* en *C. albicans*, y se ha demostrado que mutantes nulos para alguno de estos genes presentan una menor virulencia en modelos animales de candidiasis diseminada (Naglik *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2005).

Las fosfolipasas son enzimas hidrolíticas implicadas en la patogénesis de *C. albicans*, ya que están asociadas con daño en las membranas celulares del hospedador, adherencia y penetración. Existe una correlación entre la producción de fosfolipasas por aislados de *C. albicans*, la adhesión a células epiteliales y la virulencia en un modelo de candidiasis en ratón (Ibrahim *et al.*, 1995; Chaffin *et al.*, 1998; van Burik y Magee, 2001; Schaller *et al.*, 2005).

Por último, se ha sugerido la implicación de otras enzimas hidrolíticas (lipasas, esterasas, glucoamilasas, fosfatasa ácida, factor hemolítico, hialuronidasa, condroitin sulfatasa, metalopeptidasa, etc.) en la virulencia de *C. albicans*, aunque la participación de estas enzimas en virulencia no está tan bien caracterizada como en el caso de las Sap o las fosfolipasas (Calderone, 2002; Gozalbo *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 2005).

Además, algunas proteínas cuya localización primaria es el citosol, también se han detectado en la pared celular, por ejemplo proteínas glicolíticas (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, aldehído deshidrogenasa, enolasa) y miembros de la familia de proteínas de choque térmico (“Heat Shock Proteins”; HSP70, HSP90 y otros). Estas proteínas no son incorporadas a la pared celular mediante la vía secretora clásica, ya que carecen de péptido señal en su extremo N-terminal. Existen evidencias de que, al menos algunas de estas proteínas, como por ejemplo la gliceraldehido-3-fosfato

deshidrogenasa, pueden ser secretadas a la pared celular mediante una vía alternativa (Delgado *et al.*, 2003). Algunas de estas proteínas podrían tener funciones relevantes en patogénesis, bien como adhesinas o como moduladores de la respuesta inmunitaria (Klis *et al.*, 2001; Gozalbo *et al.*, 2004; Nombela *et al.*, 2006).

D) Cambio fenotípico o "switching"

Se denomina cambio fenotípico a la capacidad de muchas cepas de *C. albicans* de cambiar de forma espontánea, reversible y con alta frecuencia, entre diferentes fenotipos o estados morfológicos y fisiológicos, distinguibles fácilmente por su morfología colonial. Estos cambios pueden derivarse de factores ambientales y pueden tener un profundo efecto en la virulencia del hongo. La frecuencia de cambio entre una forma colonial y otra puede aumentar por radiación y temperatura (Soll *et al.*, 1993; Calderone, 2002). El "switching" en *C. albicans* es pleiotrópico, afectando a diferentes parámetros morfológicos y fisiológicos, tales como la antigenicidad, la morfología y tamaño celular, la adhesión, la secreción de proteasa ácida, la sensibilidad a las drogas, etc., lo que puede proporcionar a las células una variabilidad análoga a la recombinación en una población que posea ciclo sexual (Soll, 1992; Soll *et al.*, 1993). Una misma cepa puede llegar a presentar más de ocho morfologías coloniales diferentes, interconvertibles entre sí a lo largo del tiempo. Como consecuencia del "switching" se altera, directa o indirectamente, la expresión de muchos genes, tales como reguladores transcripcionales, TUP1, EFG1, etc., y algunos implicados en virulencia (Sap, resistencia a drogas, etc.).

Este cambio fenotípico no puede explicarse por recombinación meiótica, pues *C. albicans*, siendo diploide, carece de ciclo sexual clásico conocido. Además, la existencia de múltiples fenotipos y la naturaleza reversible del cambio son incompatibles con mecanismos normales de mutación (Soll, 1992; Gow y Gadd, 1994). Así pues, deben existir unos mecanismos genéticos que le confieran a la célula un nivel de variación fenotípica elevado (Kirsch *et al.*, 1990). Se han sugerido varias hipótesis, la más reciente indica que el "switching" en *C. albicans* podría estar controlado de manera similar a los genes que controlan el tipo sexual en *S. cerevisiae*, de manera que los genes que controlan la morfología colonial y celular estarían localizados en posiciones cromosómicas que pueden existir en dos estados alternativos: estado silencioso y estado activo, dependiendo de la estructura de la cromatina. La transición entre ambos estados parece depender de los

genes *sir* (“silent information regulators”) necesarios para establecer el estado silencioso (Loo y Rine, 1994; Ramsey *et al.*, 1994). Se ha descrito que mutantes nulos para el gen *sir2* presentan niveles anormalmente elevados de variación morfológica colonial y de cambios de cariotipo, lo que indica que la frecuencia de “switching” en *C. albicans* y la estabilidad cromosómica, están bajo el control de dicho gen (Pérez-Martín *et al.*, 1999). Nuestro grupo ha descrito que el sistema de la ubiquitina está implicado en el control del “switching” (Roig y Gozalbo, 2003) (véase Fig. 3) probablemente mediante la ubiquitinación de histonas a través de enzimas conjugadoras de ubiquitina como Rad6 (Robzyk *et al.*, 2006) y/o mediante el control de la activación del complejo de proteínas SIR a través de la acción de una enzima desubiquitinadora (Moazed y Johnson, 1996).

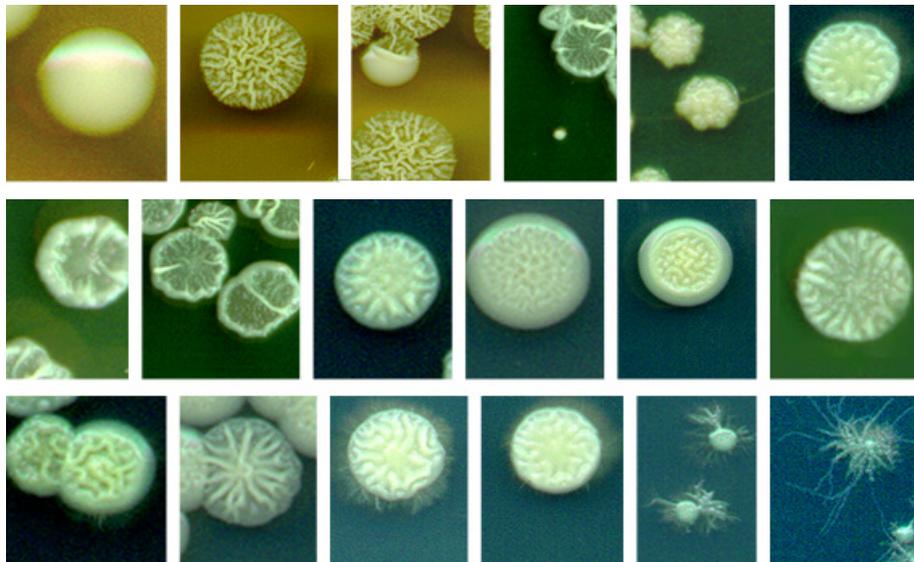


Fig. 3. “Switching” colonial. Repertorio de morfologías coloniales de una misma cepa de *C. albicans* deficiente en poliubiquitina. (Roig y Gozalbo, 2003)

Uno de los sistemas de “switching” más estudiado en *C. albicans* es la transición entre colonias blancas (W) y opacas (O). Las células O son más grandes, alargadas y tienen una superficie granulosa, mientras que las células W son levaduras ovoides normales, y ambos tipos difieren en muchas propiedades bioquímicas. El “switching” entre colonias blancas y opacas que presenta *C. albicans* está controlado por MTL (“mating type locus”), homólogo al locus MAT (“mating type”) de *S. cerevisiae*, encargado del control de los genes implicados en la conjugación. La mayoría de cepas del hongo son heterocigotas para el locus MTL y en ellas no se da “switching” WO, mientras que si son homocigotas, son

capaces de experimentar este fenómeno que se ha relacionado con la patogénesis. Durante el proceso infeccioso una parte de la población de células W, que son más resistentes, cambia al tipo O, que es capaz de experimentar el proceso de conjugación para generar variantes genéticas mejor adaptadas a la supervivencia en el hospedador (Lockhart *et al.*, 2002; Soll, 2004).

E) Formación de biopelículas

Las biopelículas están implicadas en una proporción significativa de infecciones nosocomiales humanas, y *C. albicans* es la especie fúngica más frecuentemente asociada a la formación de biopelículas. La capacidad de este hongo de crecer formando biopelículas tiene importantes repercusiones clínicas debido a la mayor resistencia de las biopelículas a antifúngicos, su capacidad para resistir las defensas inmunitarias del hospedador y su potencial para causar infecciones asociadas a implantes médicos como catéteres o prótesis (Lopez-Ribot, 2005).

Estudios *in vitro* de formación de biopelículas de *C. albicans* indican que su formación sucede a través de varias fases de desarrollo, que incluyen (i) un anclaje inicial y colonización, mediados por factores inespecíficos (hidrofobicidad de la superficie celular fúngica y fuerzas electrostáticas) y por adhesinas específicas de la superficie fúngica, seguido de (ii) la división celular, (iii) proliferación y (iv) maduración de la biopelícula. Tras el anclaje inicial, la formación de micelios comienza de 3 a 6 horas después, y tras 24-48 horas se ha formado la biopelícula de *C. albicans* madura, la cual muestra una arquitectura tridimensional compleja y presenta una gran heterogeneidad espacial consistente en una densa red de levaduras, micelios y pseudomicelios embebida en una matriz de exopolímeros (Fig. 4) (Lopez-Ribot, 2005; Ramage *et al.*, 2005).

Existen evidencias de que la filamentación de *C. albicans* es un paso crucial en el desarrollo de biopelículas maduras y bien estructuradas. En primer lugar, Baillie y Douglas (1999) mostraron que los micelios son elementos esenciales que aportan integridad estructural a las biopelículas totalmente desarrolladas. También se ha descrito que el mutante *efg1Δ/efg1Δ*, que es incapaz de miceliar, no desarrolla biopelículas, lo que indica que el factor de transcripción Efg1 es una proteína clave en el desarrollo de biopelículas maduras por *C. albicans* (Ramage *et al.*, 2002). Por último, se ha demostrado que el

farnesol, una molécula que bloquea la filamentación, también inhibe la formación de biopelículas (Lopez-Ribot, 2005; Ramage *et al.*, 2005).

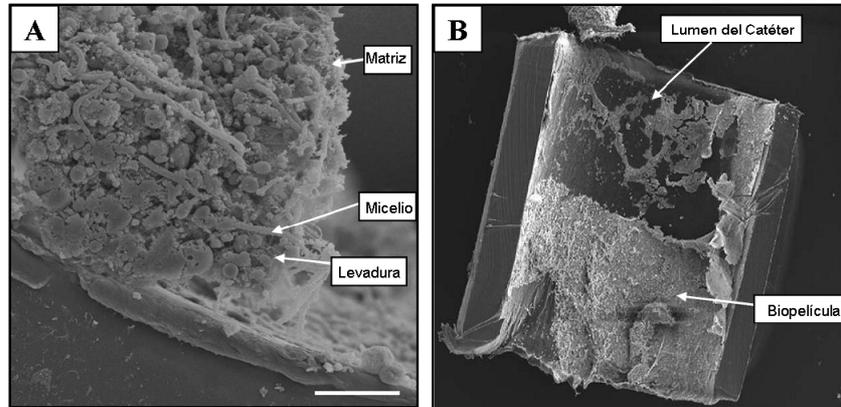


Fig. 4. Biopelícula formada por *C. albicans*. (A) Micrografía electrónica de barrido (aumentada 1000 veces) de una sección transversal de una biopelícula de *C. albicans* formada en el interior de un catéter intravenoso. Levaduras y micelios están embebidos en la matriz. La profundidad del biofilm en la imagen es mayor de 200 μm . (B) Imagen (aumentada 50 veces) de una sección del catéter intravenoso. La mayor parte del catéter está cubierto por la biopelícula. (Modificado de Nett y Andes, 2006).

Una de las implicaciones más importantes de la capacidad de *C. albicans* de crecer formando biopelículas es su mayor resistencia a los antifúngicos comúnmente empleados en la práctica clínica, lo que dificulta aún más el tratamiento de la infección. Parece que no existe un solo factor responsable de esta mayor resistencia, sino que parece ser un complejo fenómeno multifactorial. Algunos de los mecanismos implicados son los siguientes: (i) la mayor densidad celular en la biopelícula; (ii) los efectos de la matriz de la biopelícula, que puede actuar como barrera para la difusión de los antifúngicos; y (iii) la expresión de genes de resistencia, en concreto aquellos que codifican para bombas de exclusión (Ramage *et al.*, 2005).

2. Respuesta inmunitaria frente a *Candida albicans*

Los diferentes factores de virulencia que posee *C. albicans* no son los únicos determinantes para que este hongo oportunista provoque infección en el hospedador. En realidad, la patogenicidad de *C. albicans* depende del equilibrio entre el estado inmunológico del hospedador y de los factores de virulencia expresados por el hongo. De esta forma, durante una infección se establecen complejas relaciones entre el sistema inmunitario del hospedador y *C. albicans*, que van a determinar el desarrollo de la infección. Tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida están implicadas en la resistencia frente a *C. albicans*, siendo necesaria, en primer lugar, la intervención de la respuesta innata para que posteriormente se desencadene la respuesta específica (Calderone, 2002; Romani, 2004).

En el hospedador existe una primera línea de defensa frente a la invasión microbiana, constituida por barreras físicas, bioquímicas y microbiológicas. La superficie del cuerpo está protegida por epitelios que constituyen una barrera física entre el medio interno y los agentes patógenos del exterior. Los epitelios abarcan la piel y los revestimientos de las estructuras tubulares del cuerpo, como el tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. La principal línea de defensa ante una infección microbiana es la piel, que es impermeable a la mayoría de los agentes infecciosos cuando está intacta. La superficie de la piel no es un lugar donde el desarrollo de los hongos está favorecido, ya que está expuesta a la luz ultravioleta, no presenta un alto grado de humedad y tiene su propia microbiota con la que la especie fúngica debe competir. La mayoría de microorganismos no son capaces de sobrevivir durante mucho tiempo sobre la piel, debido a los efectos inhibitorios directos del ácido láctico, los ácidos grasos del sudor y las secreciones sebáceas, así como al bajo pH que se crea (Calderone, 2002; Roitt *et al.*, 2008). En la epidermis se han descrito diferentes tipos de esfingosinas activas frente a *C. albicans*, y se han aislado varias proteínas con acción antifúngica, que pueden tener un papel importante en la defensa frente a infecciones fúngicas cutáneas (Calderone, 2002).

Las mucosas epiteliales secretan un fluido viscoso (mucus) que contiene glucoproteínas denominadas mucinas. Los microorganismos envueltos por el mucus no pueden adherirse al epitelio, y así pueden ser expulsados con el flujo de mucus conducido por el movimiento de los cilios epiteliales (Janeway *et al.*, 2003).

En el tracto intestinal las células de Paneth sintetizan péptidos bactericidas y fungicidas denominados criptidinas o α -defensinas. Otros epitelios, principalmente la piel y el tracto respiratorio, producen péptidos antimicrobianos relacionados con las criptidinas denominadas β -defensinas. Las defensinas, en general, son capaces de suprimir el crecimiento de bacterias y de hongos a través de distintos mecanismos (Janeway *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2005). Se ha descrito que *C. albicans* es capaz de inducir la expresión de β -defensinas, tanto en epitelios humanos (Meyer *et al.*, 2004) como en tejidos de ratón (Schofield *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que las β -defensinas tienen un efecto fungicida directo sobre *C. albicans* (Vylkova *et al.*, 2007). Las defensinas también realizan otras funciones relacionadas con la defensa del hospedador frente a los microorganismos patógenos, como inducir la quimiotaxis para diferentes tipos celulares, opsonización, interacción con el complemento, provocar la secreción de histamina, etc. (Lehrer, 2004).

Por último, es importante destacar que la mayoría de las superficies epiteliales están asociadas a una microbiota normal de microorganismos no patógenos con los que el microorganismo patógeno debe competir por los nutrientes y los sitios de unión a las células. La microbiota normal puede producir sustancias antimicrobianas que previenen la colonización por otros microorganismos patógenos (Janeway *et al.*, 2003). Está demostrado que la colonización por *C. albicans* y por otros hongos está incrementada en animales a los que se les ha alterado la microbiota normal con antibióticos y en humanos tratados con antibióticos de amplio espectro (Calderone, 2002; Tortorano *et al.*, 2004; Pemán *et al.*, 2005).

2.1. Inmunidad innata

La inmunidad innata frente a *C. albicans* está mediada por diferentes tipos celulares como neutrófilos, macrófagos y células “Natural Killer” (NK), así como por distintas moléculas solubles como opsoninas, defensinas y citocinas.

Activación del complemento

El sistema del complemento está formado por un gran número de proteínas plasmáticas que reaccionan unas con otras para opsonizar agentes patógenos e inducir una serie de respuestas inflamatorias que ayudan a luchar contra la infección. Cierta número de proteínas del complemento son proteasas que se activan a sí mismas por rotura proteolítica (zimógenos). El sistema se caracteriza por producir una respuesta rápida frente a un estímulo desencadenante, mediada por un fenómeno de amplificación en cascada (Janeway *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 2008). El componente principal y más abundante es C3 y la ruptura de esta molécula constituye el centro de todos los fenómenos mediados por el complemento. Existen tres vías por las que el complemento puede activarse en la superficie de los agentes patógenos [vía clásica, vía alternativa y vía MBL (“Mannan-Binding Lectin”)]; estas vías dependen de moléculas diferentes para su iniciación, pero convergen para generar el mismo conjunto de moléculas efectoras. Existen varios modos por los que el sistema del complemento protege frente a la infección: opsonización de los microorganismos, quimiotaxis de fagocitos, inflamación y citólisis directa de los microorganismos (Roitt *et al.*, 2008).

Estudios *in vivo* han demostrado que el complemento es un componente importante en la resistencia frente a hongos, actuando a través de la opsonización e inducción de una respuesta inflamatoria (Kozel, 1998). Estudios de inmunofluorescencia han permitido demostrar que *C. albicans* activa el complemento *in vivo*, lo que conlleva a la deposición de C3b y de iC3b (fragmentos de degradación de C3) en la superficie celular fúngica. Esta deposición se ve acelerada a través de la activación de la vía clásica del complemento por anticuerpos anti-manano del suero del hospedador. Además de activarse la vía alternativa y la clásica en presencia de *C. albicans*, el manano presente en la superficie celular del hongo puede tener un papel importante en la activación del complemento vía MBL (Kozel, 1996; Meri *et al.*, 2002; Poulain y Jouault, 2004). Un trabajo más reciente (Sonesson *et al.*,

2007) ha descrito que también la anafilotoxina C3a (otro producto de degradación de C3) y péptidos derivados de C3a ejercen efectos antimicrobianos contra levaduras de *C. albicans*; mediante análisis por microscopía de fluorescencia y electrónica se ha demostrado que péptidos derivados de C3a se unen a la superficie celular del hongo induciendo perturbaciones de membrana, por lo que los autores sugieren que estos péptidos podrían ser utilizados como modelos en el desarrollo de terapias antifúngicas (Sonesson *et al.*, 2007).

Fagocitosis

Las células encargadas de fagocitar y destruir a los microorganismos, opsonizados o no, son los neutrófilos y los macrófagos principalmente (Janeway *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 2008).

Los neutrófilos representan la población fagocítica más abundante en la sangre, pero no están presentes en tejidos sanos normales. En su superficie expresan receptores de quimiocinas que al interactuar con éstas inducen el reclutamiento de los neutrófilos al lugar de la infección. Se ha descrito que los neutrófilos representan la primera línea de defensa frente a las candidiasis. En general, la neutropenia o defectos congénitos en la función de los neutrófilos se han asociado con una mayor susceptibilidad a las candidiasis (Vázquez-Torres y Balish, 1997; Tortorano *et al.*, 2004; Pemán *et al.*, 2005; Urban *et al.*, 2006a; Pfaller y Diekema, 2007). Tras el contacto, los neutrófilos internalizan al microorganismo mediante una vacuola fagocítica llamada fagosoma. A continuación gránulos intracelulares se fusionan con el fagosoma y liberan su contenido en él formando el fagolisosoma. La fagocitosis de levaduras de *C. albicans* por los neutrófilos puede producirse en ausencia de opsoninas en el suero, pero éstas son necesarias para la óptima muerte intracelular del hongo. En los fagolisosomas se combinan mecanismos oxidativos y no oxidativos para eliminar al microorganismo (Urban *et al.*, 2006a). Los mecanismos oxidativos implican la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), como peróxido de hidrógeno o anión superóxido, y del nitrógeno (RNS), principalmente óxido nítrico y peroxinitrito. Esta producción de especies oxidantes como consecuencia de la fagocitosis se denomina estallido respiratorio (Urban *et al.*, 2006a; Roitt *et al.*, 2008). Estos radicales producen, entre otros efectos, modificaciones en las proteínas del hongo y rompen ácidos nucleicos (Mansour y Levitz, 2002). Los mecanismos no oxidativos que presentan los neutrófilos para matar a los agentes patógenos implican la acción de diversas enzimas

contenidas en los fagosomas, las cuales se activan por el cambio de pH tras la generación de los radicales O_2^- (Reeves *et al.*, 2002; Roitt *et al.*, 2008). Algunas de estas enzimas son la catepsina G, la lisozima y la lactoferrina. Además, otro mecanismo no oxidativo importante en neutrófilos es la activación de defensinas, que constituyen una familia de péptidos antimicrobianos. Las defensinas humanas poseen una importante actividad anti-*Candida*, sin embargo los neutrófilos de ratón carecen de defensinas (Eisenhauer y Lehrer, 1992). Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo fungicida de los neutrófilos sin necesidad de fagocitosis previa, denominado “Neutrophil Extracellular Traps” (NETs). Los NETs son redes extracelulares de fibras de cromatina que contienen componentes tóxicos de los gránulos, de forma que el microorganismo atrapado en las NETs se encuentra en un entorno altamente tóxico (Nicola *et al.*, 2008). Se ha descrito que *C. albicans* induce la formación de NETs que son capaces de inactivar al hongo, tanto la forma levaduriforme como micelial (Urban *et al.*, 2006b).

Los macrófagos derivan de promonocitos originados en la médula ósea que, tras diferenciarse a monocitos sanguíneos, se asientan en los tejidos como macrófagos maduros (Roitt *et al.*, 2008). La fagocitosis de levaduras de *C. albicans* por los macrófagos puede darse sin necesidad de que la célula esté opsonizada, pero la opsonización favorece la muerte del hongo (Calderone, 2002). Los mecanismos microbicidas que presentan los macrófagos para eliminar a los microorganismos fagocitados son análogos a los descritos para los neutrófilos, combinándose también mecanismos oxidativos y no oxidativos en el interior de los fagolisosomas (Roitt *et al.*, 2008).

Las células dendríticas (DCs) también son capaces de fagocitar células de *C. albicans* (Romani *et al.*, 2004), aunque su función principal no es la de eliminar al patógeno, sino la de inducir una respuesta inmunitaria específica, actuando como células presentadoras de antígenos (Roitt *et al.*, 2008). Las DCs destruyen a las células de *C. albicans* fagocitadas mediante mecanismos no oxidativos similares a los utilizados por macrófagos y neutrófilos, no siendo importante en estas células la formación de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno en el interior del fagolisosoma (Mansour y Levitz, 2002).

La fagocitosis es un proceso activo que se inicia tras la unión del agente patógeno a receptores de membrana de células fagocíticas. La fagocitosis de *C. albicans* tras su opsonización se lleva a cabo a través de los receptores del complemento y de los receptores Fc de las células fagocíticas. En la fagocitosis del hongo no opsonizado están implicados

los llamados PRRs (“Pattern Recognition Receptors”), capaces de reconocer moléculas muy conservadas de los microorganismos (PAMPs; “Pathogen-Associated Molecular Patterns”) y que no están presentes en las células de mamífero (Lee *et al.*, 2003).

Entre los receptores del complemento está CR3, molécula heterodimérica (CD11b/CD18) que pertenece a la familia de las β -integrinas, con capacidad para reconocer diferentes ligandos como iC3b (derivado inactivo del C3b que está unido al agente patógeno) o β -glucano (Lee *et al.*, 1997; Calderone, 2002).

Los receptores Fc pertenecen a una familia de moléculas que unen la porción Fc de las inmunoglobulinas. La unión del receptor Fc a la superficie del agente patógeno cubierto por anticuerpos activa la fagocitosis, la producción de agentes oxidantes fungicidas y promueve la producción de citocinas y quimiocinas (Calderone, 2002).

El primer PRR que se describió fue el receptor de manosa (MR) que reconoce glicanos específicos del hongo (Vázquez-Torres y Balish, 1997). En principio, se describió en macrófagos, pero se ha demostrado que se encuentra en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células dendríticas (Tarnowski *et al.*, 1988; Shepherd *et al.*, 1991; Sallusto *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1998; Linehan *et al.*, 1999). Estudios *in vitro* implicaron a MR en la fagocitosis de *C. albicans* y en la activación de los macrófagos (Karbassi *et al.*, 1987; Marodi *et al.*, 1991). Sin embargo, estudios más recientes sugieren que el MR participa en la primera unión del hongo a la superficie celular pero no en su internalización, y que necesitaría de la cooperación de otros receptores, presentes en células fagocíticas profesionales, para fagocitar al hongo (Le Cabec *et al.*, 2005; Willment y Brown, 2008).

Otro PRR implicado en la fagocitosis del hongo es el receptor dectina-1 (“DC-Associated C-type Lectin-1”). La dectina-1 es una lectina tipo C que reconoce β -glucano, y que se expresa en células mieloides incluyendo macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Actualmente se sabe que la dectina-1 es el principal receptor implicado en la fagocitosis de la levadura (Gantner *et al.*, 2005). Sin embargo, la importancia de la dectina-1 en la defensa del hospedador frente a *C. albicans* es controvertida. Dos trabajos que utilizan ratones KO para la dectina-1 mostraron resultados contrarios respecto a la susceptibilidad frente a *C. albicans* (Saijo *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007). La dectina-1 reconoce principalmente β -(1,3)-glucano, presente en la pared celular del hongo. Se ha comprobado que la dectina-1 se une específicamente a zonas concretas de la levadura que

está gemando, donde el glucano queda expuesto, que corresponden a las cicatrices de gemación (Gantner *et al.*, 2005). Sin embargo, la dectina-1 no reconoce la forma micelial de *C. albicans*, ya que en esta forma del hongo el β -glucano no queda expuesto. Estas observaciones sugieren que la evasión del reconocimiento por dectina-1 puede representar una ventaja de la forma micelial de *C. albicans* para establecer el proceso infeccioso (Underhill, 2007). A diferencia de la dectina-1, el receptor dectina-2, una lectina que reconoce residuos de manosa/fucosa, interacciona preferentemente con la forma micelial de *C. albicans* e induce respuestas inmunitarias innatas a través del receptor Fc γ R, ya que la dectina-2 carece de dominio intracelular capaz de transmitir señales de activación (Sato *et al.*, 2006).

Se han descrito otros receptores implicados en la fagocitosis de *C. albicans*, como el receptor DC-SIGN (“DC-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin”), presente fundamentalmente en células dendríticas, que reconoce diferentes formas de manano y permite internalizar antígenos mediante endocitosis (Willment y Brown, 2008), por lo que podría estar implicado en la unión del hongo a la superficie celular y en su internalización (Cambi *et al.*, 2003).

Inflamación inducida por complemento, eicosanoides y citocinas

La inflamación puede originarse como respuesta a un daño tisular o al reconocimiento de un microorganismo patógeno. La respuesta inflamatoria desempeña varias funciones esenciales para combatir la infección: reclutar células efectoras al foco de infección para aumentar la destrucción de los microorganismos invasores, proporcionar una barrera física que impida la extensión de la infección y promover la reparación del tejido dañado. La inflamación en el sitio de la infección se inicia fundamentalmente por la respuesta de los macrófagos a los agentes patógenos. Los cuatro signos que caracterizan la inflamación son: dolor, enrojecimiento, calor e hinchazón, causados por cambios en los vasos sanguíneos locales. Se produce un aumento del diámetro y de la permeabilidad vascular que conlleva la salida de fluido y proteínas de la sangre y su acumulación en el tejido. Además, en las células endoteliales que delimitan el vaso sanguíneo se activa la expresión de moléculas de adhesión que promueven la unión de los leucocitos circulantes y su posterior extravasación y migración a los tejidos (Janeway *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 2008).

Todos estos cambios son inducidos por diferentes mediadores inflamatorios que se liberan como consecuencia del reconocimiento del agente patógeno: factor activador de plaquetas (PAF), péptidos del complemento (C3a y C5a), eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), citocinas y quimiocinas.

Modelos de candidiasis experimental en ratón han demostrado que la capacidad endógena para generar PAF en respuesta a *C. albicans* es un mecanismo clave en la activación temprana del factor de transcripción NF-κB (“Nuclear Factor-κB”), proceso importante en la protección de los tejidos frente al hongo, ya que induce la producción de citocinas proinflamatorias (como TNF-α, “Tumor Necrosis Factor-α”) y también la producción de óxido nítrico, que es capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans* y está implicado en la actividad fungicida de macrófagos. Esta activación temprana de NF-κB inducida por PAF no tiene lugar en órganos susceptibles como el riñón (Choi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008).

Los péptidos C3a y C5a producen la desgranulación de mastocitos y la contracción del músculo liso, y además C5a aumenta la permeabilidad vascular y actúa como un poderoso quimioatrayente para neutrófilos y monocitos, activando a los neutrófilos (Janeway *et al.*, 2003). En modelos de candidiasis experimental en ratón se ha demostrado que la deficiencia en C5 produce un fenotipo complejo caracterizado por una rápida proliferación fúngica en los órganos diana, incapacidad para movilizar granulocitos y desarrollo de una respuesta alérgica letal, es decir, incapacidad para desarrollar una respuesta inflamatoria protectora (Mullick *et al.*, 2004).

La prostaglandina E₂ (PGE₂) es un mediador celular que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos, además de en la respuesta inflamatoria (Peters-Golden, 1997; Narumiya *et al.*, 1999). A pesar de poseer acciones proinflamatorias, la PGE₂ presenta otras acciones antagónicas, como la inhibición de la producción de quimiocinas o citocinas (como TNF-α) y la inhibición de la respuesta Th1 y de la proliferación linfocitaria (Kunkel *et al.*, 1988; Betz y Fox, 1991; Standiford *et al.*, 1992; Strassmann *et al.*, 1994; Sergeeva *et al.*, 1997; Vassiliou *et al.*, 2003). *C. albicans* induce la producción de PGE₂ en células endoteliales, epiteliales y en células mononucleares de sangre periférica (Witkin *et al.*, 1991; Filler *et al.*, 1994; Deva *et al.*, 2003), y además se ha descrito que la PGE₂ estimula la formación de micelio en *C. albicans* (Kalo-Klein y Witkin, 1990). Por lo tanto, la producción de prostaglandinas en el lugar de la infección podría favorecer la colonización por el hongo. Esto podría explicar el efecto beneficioso

que el tratamiento con el fármaco antiinflamatorio aspirina tiene sobre la candidiasis vulvovaginal (Deva *et al.*, 2001). Nuestro grupo ha demostrado que un nuevo antiinflamatorio no esteroideo (LAAE-14), que causa una inhibición *in vitro* de la producción de PGE₂ por macrófagos peritoneales de ratón estimulados con *C. albicans*, incrementa *in vivo* la resistencia de los ratones a una candidiasis diseminada (Lucas *et al.*, 2003; 2004). En un trabajo posterior, nuestro grupo demostró que TLR2 es el principal receptor implicado en la producción de PGE₂ en respuesta a *C. albicans*, probablemente induciendo la expresión de la ciclooxigenasa 2 (Cox2) (Villamón *et al.*, 2005). Es importante destacar que las propias células fúngicas son capaces de producir ciertos eicosanoides, como algunas prostaglandinas (Noverr *et al.*, 2003; Alem y Douglas, 2004), y que *C. albicans* es capaz de sintetizar PGE₂ a partir de ácido araquidónico por una vía independiente de Cox2, ya que en el genoma del hongo no existe un homólogo de esta enzima (Erb-Downward y Noverr, 2007). Esta síntesis de eicosanoides por hongos podría representar un factor de virulencia adicional.

Las citocinas son pequeñas proteínas sintetizadas por todos los tipos celulares, especialmente por macrófagos y linfocitos T cuando se activan en respuesta a distintos estímulos (patógenos, toxinas...). Estas citocinas se unen a receptores específicos en las células diana, caracterizados por tener una gran afinidad por su ligando. La unión de la citocina a su receptor provoca una cascada de reacciones bioquímicas en el interior celular, que dan como resultado la regulación de la actividad de la célula diana, activando o inhibiendo su función. Las citocinas actúan como verdaderas hormonas del sistema inmunitario y están implicadas en la elaboración de la respuesta inmunitaria, tanto innata (inflamación, quimiotaxis), a través de la activación de macrófagos y linfocitos NK, como específica (humoral o celular) actuando sobre los linfocitos T y B, y sirven de conexión entre los dos tipos de respuesta. Además, las citocinas tienen una función muy importante en la regulación de la hematopoyesis (Roitt *et al.*, 2008).

Entre las citocinas producidas durante el curso de las candidiasis cabe destacar las siguientes:

TNF- α , Interleucina (IL)-1 β , IL-18 e IL-6 son citocinas proinflamatorias producidas rápidamente por los fagocitos tras su interacción con células de *C. albicans* y se han detectado en sepsis causadas por el hongo (Presterl *et al.*, 1999).

El TNF- α es esencial en el control de las candidiasis sistémicas, ya que la neutralización del TNF- α endógeno con anticuerpos específicos o con determinados agentes farmacológicos como clorpromacina, favorece el desarrollo de la enfermedad (Steinshamn y Waage, 1992; Netea *et al.*, 1995). Además, ratones deficientes en TNF- α o en sus receptores, son más susceptibles a las candidiasis (Netea *et al.*, 1995; Steinshamn *et al.*, 1996; Mencacci *et al.*, 1998b). Esta citocina regula el reclutamiento de células fagocíticas, activa el estallido respiratorio e induce la expresión de moléculas coestimuladoras (Calderone, 2002; Roitt *et al.*, 2008).

La IL-6 y la IL-1 β también participan en la respuesta innata frente al hongo, aunque en menor medida que el TNF- α . La administración de IL-1 β recombinante protege a los ratones frente a la infección por *Candida*, aunque la deficiencia de IL-1 no aumenta la susceptibilidad a la infección, y dicha susceptibilidad aumenta ante la deficiencia de IL-6 (Mencacci *et al.*, 1998a; van Enckevort *et al.*, 1999; Roitt *et al.*, 2008).

Otros trabajos han demostrado también que la IL-18 endógena es necesaria para la defensa del hospedador frente a la candidiasis; el tratamiento de ratones con IL-18 recombinante reduce la mortalidad y disminuye la presencia de levaduras en el riñón, aumentando los niveles de interferón- γ (IFN- γ) (Stuyt *et al.*, 2002; 2004; Tardif *et al.*, 2004).

El IFN- γ es la principal citocina producida por los linfocitos Th1 activados, aunque también es producida por células NK, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$. Su función principal es la de activar a macrófagos y neutrófilos para la destrucción de los microorganismos fagocitados, aumentando también la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase II (Janeway *et al.*, 2003; Gozalbo y Gil, en prensa).

El IFN- γ tiene una función crítica en la defensa frente a las candidiasis; los ratones deficientes en IFN- γ son mucho más susceptibles a las candidiasis y la administración de anticuerpos anti-IFN- γ induce una respuesta Th2 no protectora (Romani *et al.*, 1992a; Kaposzta *et al.*, 1998).

La IL-12 es una citocina proinflamatoria y reguladora, puesto que controla la respuesta inmunitaria adquirida a través del desarrollo de linfocitos T específicos (Trinchieri, 2003). La IL-12 es esencial en la inducción de linfocitos T secretores de IFN- γ , lo que se ha asociado con una respuesta protectora (Th1) frente a las candidiasis (Romani, 2004). La IL-12 es producida por los monocitos/macrófagos y células dendríticas en

respuesta fundamentalmente a levaduras de *C. albicans* (Chiani *et al.*, 2000; d'Ostiani *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Además, cepas virulentas del hongo son capaces de inhibir la producción de IL-12 mediante la secreción de un factor que estimula la vía de transducción de señal ERK-MAPK (“Extracellular Signal Regulated Kinase-Mitogen Activated Protein Kinases”), lo que produce una atenuación de la respuesta inmunitaria (Tang *et al.*, 2004).

Otra citocina reguladora es la IL-10, que es producida tras la fagocitosis del hongo y juega un papel crucial en la determinación de la susceptibilidad a la infección (Mencacci *et al.*, 1998a; d'Ostiani *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2000). La IL-10 actúa disminuyendo la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-12) e inhibiendo el desarrollo de una respuesta celular protectora (Mencacci *et al.*, 1998a; Roilides *et al.*, 2000). Además, la IL-10 es producida fundamentalmente en respuesta a la forma micelial del hongo, lo que puede contribuir a su mayor virulencia (d'Ostiani *et al.*, 2000; Bozza *et al.*, 2004).

La IL-4, al igual que la IL-10, también es un factor importante en la determinación de la susceptibilidad a la candidiasis sistémica (Mencacci *et al.*, 1998a). Es una citocina que inhibe la capacidad fungicida de los fagocitos y participa en la generación de una respuesta Th2. Además, se ha descrito que las células dendríticas producen IL-4 tras la fagocitosis de micelios, pero no de levaduras, de *C. albicans* (d'Ostiani *et al.*, 2000), lo que podría estar implicado en la mayor virulencia de la forma micelial. Sin embargo, los niveles de esta citocina no siempre están incrementados en pacientes con candidiasis mucocutánea, por lo que la susceptibilidad a la candidiasis no siempre se puede asociar con una sobreproducción de IL-4 (Fidel y Huffnagle, 2005).

Activación de células “Natural Killer”

Las células “Natural Killer” (NK) son una población de linfocitos. Proviene de la médula ósea y se encuentran en la sangre y tejidos linfáticos, especialmente en el bazo. Se caracterizan morfológicamente por ser linfocitos grandes con gránulos citoplasmáticos citotóxicos. No presentan los receptores específicos de antígeno de linfocitos T y B, TCR (“T Cell Receptor”) y BCR (“B Cell Receptor”) respectivamente. Existe una subpoblación de linfocitos T, que es conocida como células NKT, que posee algunos marcadores comunes a las NK (como NK 1.1), pero también poseen receptor específico de antígeno (TCR), lo que las distingue de las NK. Las células NK son una subpoblación altamente

heterogénea, cuyas principales funciones son (i) la citotoxicidad, que permite la eliminación de células infectadas por virus y células tumorales, y (ii) la secreción de citocinas, fundamentalmente IFN de tipo I, IFN- α e IFN- β , que activan el potencial citolítico de las propias células NK, e IFN- γ , que como se ha detallado anteriormente activa la función microbicida de los macrófagos al estimular la síntesis de intermediarios reactivos del oxígeno y óxido nítrico (Janeway *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 2008).

Las células NK poseen un amplio repertorio de receptores celulares que controlan su citotoxicidad. Existen dos tipos de receptores de superficie: receptores activadores e inhibidores. Los receptores activadores, como CD94/NKG2C y CD94/NKG2D en ratón o el receptor NKG2D humano, se asocian con proteínas adaptadoras que poseen motivos de activación (motivos ITAM; “Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif”) y desencadenan la lisis por células NK. Los receptores inhibidores, como CD94/NKG2A de ratón, poseen motivos de inhibición (motivos ITIM; Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif”). Los receptores inhibidores de las células NK se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I), que se expresan en la mayor parte de células normales, mientras que los ligandos de los receptores activadores no están bien definidos todavía. Cuando ambos receptores, activadores e inhibidores, están ocupados por su ligando, domina la influencia de los receptores inhibidores y la célula NK no se activa. Este mecanismo evita la destrucción de células normales del hospedador. La infección de las células del huésped, especialmente por algunos virus, provoca a menudo una inhibición de la expresión de MHC I y, por tanto, la pérdida de los ligandos de los receptores inhibidores de las NK. El resultado es que las NK salen de su estado normal de inhibición, se activan y destruyen las células infectadas (Lanier, 2003; Bottino *et al.*, 2005).

Las células NK actúan como mediadores importantes en la respuesta innata frente a infecciones virales y células transformadas, y cada vez existen más evidencias de su participación en las primeras etapas de infecciones bacterianas y fúngicas. Numerosos estudios demuestran que el TNF- α y el IFN- γ secretados por células NK activadas favorece la actividad fungicida de las células fagocíticas y además, la producción de IL-15 por monocitos en respuesta a *C. albicans* aumenta el poder citotóxico de las células NK (Ferrante, 1989; Marodi *et al.*, 1993; Arancia *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2003). Sin embargo, su participación *in vivo* en la protección frente a las candidiasis es controvertida, encontrándose resultados contradictorios en la bibliografía (Greenfield *et al.*, 1993;

Romani *et al.*, 1993b; Algarra *et al.*, 2000; Ortega *et al.*, 2000; Balish *et al.*, 2001; Gaforio *et al.*, 2002).

Recientemente se ha descrito que las células NK expresan TLRs funcionales. Mediante RT-PCR se ha demostrado que células NK humanas purificadas expresan constitutivamente mRNA de TLR1-8, siendo TLR2 y TLR3 los más expresados (Hornung *et al.*, 2002). Además, también se ha descrito que estas células son capaces de responder a ligandos de diferentes receptores tipo Toll: (1) ligandos de TLR2 como KpOmpA, una proteína extracelular de *Klebsiella pneumoniae*, y lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*, aumentan la producción de IFN- γ ; (2) el ligando de TLR3 poli I:C (ácido poli-inosínico/policitidílico) y la flagelina, agonista del receptor TLR5, regulan la producción de IFN- γ ; (3) R848, agonista de TLR7 y TLR8, activa la citotoxicidad de las células NK y regula la producción de IFN- γ ; y (4) el motivo CpG DNA, reconocido a través de TLR9, induce la expresión en la superficie celular de marcadores de activación, como CD69 y CD25 (Becker *et al.*, 2003; Chalifour *et al.*, 2004; Sivori *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2005). Estos resultados indican que las células NK pueden participar en el reconocimiento y respuesta directa frente a microorganismos a través de los TLRs, lo que representa una nueva función de las células NK en la respuesta inmunitaria innata.

Por último, es importante destacar que en los últimos años se han documentado ampliamente las interacciones entre células dendríticas y células NK, demostrando una compleja interacción bidireccional entre los dos tipos celulares. La interacción entre ambos tipos celulares puede desencadenar (i) la activación y/o proliferación de las células NK mediada por DCs, a través de contactos celulares y factores solubles como citocinas, (ii) la activación de DCs mediada por citocinas, TNF- α e IFN- γ principalmente, sintetizadas por células NK, y (iii) la eliminación de células dendríticas inmaduras por células NK a través de contactos celulares. La interacción celular entre DCs y NKs parece que ocurre en los sitios de infección, aunque los nódulos linfáticos son otro importante sitio de interacción. Hay cada vez más evidencias de que esta interacción depende del estímulo inicial: las interacciones más efectivas implican a DCs que han sido activadas a través de los TLRs. Además, la estimulación simultánea de NKs y DCs a través del mismo TLR podría ser suficiente para iniciar una serie de eventos característicos de las etapas tempranas de las respuestas inmunitarias innatas (Raulet, 2004; Degli-Esposti *et al.*, 2005; Della-Chiesa *et al.*, 2005).

2.2. Inmunidad específica

En mamíferos, la respuesta inmunitaria innata generada en los tejidos periféricos suele ser insuficiente para destruir por completo al agente infeccioso, por lo que es necesaria la activación de la respuesta específica en los tejidos linfoides.

Inmunidad mediada por células

Linfocitos T CD4⁺

Datos experimentales y evidencias clínicas indican que tanto la respuesta innata como la adquirida regulan el control y la resistencia frente a las candidiasis, siendo esencial la coordinación entre ambos tipos de inmunidad. La activación de células T CD4⁺ o CD8⁺, o de ambos tipos celulares, es un arma muy importante en la defensa frente a las infecciones fúngicas. Las células T CD4⁺ auxiliares (Th) de tipo 1 o 2 se desarrollan a partir un precursor común T CD4⁺ inmaduro, y varios parámetros están implicados en la diferenciación de estos precursores. Está descrito que en la respuesta inmunitaria frente a diferentes hongos una respuesta Th1, caracterizada por la producción de IL-12, IFN- γ , TNF- α y/o GM-CSF (“Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor”), está relacionada con la resistencia a la infección, mientras que una respuesta Th2, caracterizada por la producción de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, se relaciona con una mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas (Huffnagle y Deepe, 2003). Las citocinas producidas por las células Th1 activan a las células fagocíticas favoreciendo la eliminación de *C. albicans*, mientras que las citocinas que provienen de células Th2 inhiben el desarrollo de una respuesta Th1 y por lo tanto desactivan las células encargadas de la fagocitosis (Romani, 2004).

Modelos de candidiasis experimental en ratón han demostrado que la infección primaria con una cepa poco virulenta de *C. albicans* (PCA2) induce una importante respuesta Th1 protectora, de forma que los animales quedan protegidos frente a una segunda infección con una cepa virulenta del hongo (Romani *et al.*, 1991; Romani *et al.*, 1992b; Romani *et al.*, 1993a).

Por otro lado, se ha descrito que además de una adecuada respuesta Th1/Th2 es necesaria la aparición de células T CD4⁺ CD25⁺ reguladoras (Treg). Estas células Treg

actuarían regulando negativamente la respuesta Th1, para evitar una exacerbada respuesta inflamatoria (Romani *et al.*, 2002). Las células Treg CD4⁺CD25⁺ pueden ejercer su acción supresora mediante la liberación de ciertas citocinas o mediante contactos célula-célula a través de moléculas coestimuladoras (O'Garra y Vieira, 2004). En ratones infectados con *C. albicans*, las células Treg productoras de IL-10 y TGF- β ("Transforming-Growth Factor-beta") previenen la eliminación completa del hongo del tracto gastrointestinal, permitiendo la persistencia del hongo y por lo tanto el desarrollo de una inmunidad de memoria. La inducción de las células Treg durante la candidiasis requiere la secreción de IL-10 por células dendríticas en respuesta a micelios del hongo, e implica la participación de los TLRs y de la molécula B7 (Montagnoli *et al.*, 2002; Netea *et al.*, 2004a; Romani y Puccetti, 2006).

La dicotomía Th1/Th2 ha dominado la biología de las células Th durante muchos años. Sin embargo, recientemente otra población de células T, el linaje Th17 que secreta IL-17, está adquiriendo importancia (Palm y Medzhitov, 2007; Romani y Puccetti, 2007). El desarrollo de las células Th17 ocurre en presencia de TGF- β e IL-6, es inhibido por citocinas Th1 y se mantiene en presencia de IL-23, citocina producida por las células dendríticas en respuesta a una elevada carga fúngica. La IL-17 induce la producción de quimiocinas en los sitios de infección y provoca el reclutamiento de neutrófilos. Se ha comprobado que ratones deficientes en el receptor de la IL-17 son más susceptibles que los ratones control a la candidiasis sistémica, lo que puede atribuirse a una menor llegada de neutrófilos a los órganos infectados (Huang *et al.*, 2004). Recientemente, se ha descrito que la vía Th17 se desarrolla en respuesta a *C. albicans* (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007) y que la IL-23 y la vía Th17 actúan como reguladores negativos de la resistencia inmunitaria Th1 frente a *C. albicans* (Zelante *et al.*, 2007). Acosta-Rodriguez y colaboradores (2007) han mostrado en un ensayo de estimulación *in vitro* de células T auxiliares que las levaduras de *C. albicans* inducen más IL-12 que IL-23 y una fuerte respuesta de tipo Th1, mientras que el micelio induce solo IL-23 y una fuerte respuesta Th17. En este contexto, y debido a que el micelio, y no la levadura, estimula a través del receptor dectina-2 (Sato *et al.*, 2006), Palm y Medzhitov (2007) han sugerido que este PRR puede promover la secreción de IL-23 y una respuesta Th17. También se ha sugerido que la dectina-1, que reconoce levaduras y realiza la señalización a través de la quinasas Syk y la molécula adaptadora CARD9 ("Caspase Activation and Recruitment Domain 9"), induce la secreción de IL-23 y el desarrollo de la respuesta Th17

(LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007). La señalización a través de MyD88 (“Myeloid Differentiation Factor 88”) mediada por los receptores TLR2 y TLR4 también ha sido implicada en la secreción de IL-23 y el desarrollo de la vía Th17 en respuesta a *C. albicans* (Zelante *et al.*, 2007). En este trabajo, la neutralización de IL-17 aumenta la eliminación del hongo, mejora la patología inflamatoria y restaura la respuesta Th1 antifúngica protectora. Por tanto, la vía Th17 puede promover la inflamación y alterar la inmunidad antifúngica, actuando como regulador negativo de la respuesta Th1 frente a *C. albicans*. Además, la vía Th17 puede ser la responsable de respuestas inflamatorias previamente atribuidas a respuestas Th1 exacerbadas (Romani y Puccetti, 2007; Zelante *et al.*, 2007). Estos nuevos hallazgos representan un importante avance en la comprensión de las relaciones entre la interacción de PAMPs y PRRs y la inducción de respuestas inmunitarias adaptativas.

Células Dendríticas

Las células dendríticas son capaces de discriminar entre las distintas morfologías de *C. albicans* en términos de maduración, producción de citocinas e inducción de una determinada respuesta Th, tanto *in vivo* como *in vitro* (Romani *et al.*, 2004). Mediante diferentes estudios *in vitro* se ha observado que las DCs de ratón y humanas son capaces de fagocitar levaduras y micelios de *C. albicans*, aunque el proceso de fagocitosis no es exactamente igual en ambos casos. Un gran número de levaduras se encuentran parcialmente degradadas en el interior de los fagosomas 2-4 horas tras la fagocitosis, mientras que tras 1 hora la forma micelial del hongo parece haber escapado del interior del fagosoma, encontrándose libre en el citoplasma (Romani *et al.*, 2002; Bozza *et al.*, 2004). Numerosos receptores están implicados en la fagocitosis del hongo por las células dendríticas, entre los que se encuentran PRRs (MR, dectina-1 y DC-SIGN), receptores Fc y receptores de diferentes componentes del complemento. La forma levaduriforme del hongo es fagocitada por las células dendríticas a través de los PRRs y la forma micelial requiere una opsonización previa (Bozza *et al.*, 2004). Estudios *in vivo* han demostrado que la fagocitosis del hongo opsonizado genera citocinas relacionadas con una respuesta Th2, mientras que la fagocitosis a través del MR conlleva una respuesta Th1 (Montagnoli *et al.*, 2002; Romani *et al.*, 2002). La fagocitosis de levaduras de *C. albicans* induce la producción de IL-12 por las células dendríticas, mientras que micelios del hongo inhiben la producción de dicha citocina e inducen la producción de IL-4 (d’Ostiani *et al.*, 2000; Bacci

et al., 2002; Torosantucci *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que células dendríticas tratadas con levaduras de *C. albicans* o transfectadas con RNA de levadura, (pero no las tratadas con micelio o transfectadas con RNA de micelio), al ser inoculadas en ratones susceptibles a las candidiasis, son capaces de estimular una respuesta específica Th1, que confiere resistencia antifúngica. Estos resultados plantean la posible utilización de las células dendríticas para el desarrollo de terapias alternativas frente a las infecciones fúngicas (d'Ostiani *et al.*, 2000; Bacci *et al.*, 2002; Montagnoli *et al.*, 2002; Bozza *et al.*, 2004).

Estudios *in vitro* han demostrado que la diferenciación de monocitos humanos en células dendríticas se ve profundamente alterada por la fagocitosis de levaduras o micelios de *C. albicans*. Cada tipo morfológico produce diferentes modificaciones en el proceso de diferenciación, lo que puede ser explotado por la forma micelial de *C. albicans* para evadir la vigilancia del sistema inmunitario (Torosantucci *et al.*, 2004).

Linfocitos T CD8⁺

La mayoría de los linfocitos CD8⁺ efectores cumplen una función de eliminación de parásitos intracelulares mediante la lisis de las células infectadas. Para realizar la función citolítica, la célula CD8⁺ efectora necesita una fuerte señal coestimuladora, procedente de la célula que le presenta el antígeno o bien gracias a la colaboración de ciertos linfocitos CD4⁺. Los linfocitos T CD8⁺ efectores utilizan dos mecanismos diferentes de lisis: (i) inducción de la muerte celular programada (apoptosis) en las células diana a través de moléculas de membrana especializadas, o (ii) destrucción de las células mediante la formación de canales en la membrana gracias a la acción de perforinas y granzimas (Janeway *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 2008).

Las células T CD8⁺ participan en la defensa frente a las infecciones fúngicas por un mecanismo que todavía no está muy claro. Está descrito que las células CD8⁺ tienen un efecto antifúngico frente al micelio de *C. albicans* (Deepe, 1997). Estudios *in vivo* en modelo murino, indican una posible participación de las células T CD8⁺ en la protección tanto frente a la candidiasis vaginal como a la sistémica: tras una infección vaginal se observa un aumento considerable y persistente del número de linfocitos T CD8⁺ (Ghaleb *et al.*, 2003), y la eliminación de dichos linfocitos produce un aumento en la gravedad de las lesiones tisulares tras una candidiasis sistémica (Ashman *et al.*, 1999). Probablemente la

protección frente a las candidiasis que desempeñan los linfocitos T CD8⁺ está mediada por la producción de IFN- γ . Nuestro grupo ha descrito que los ratones KO para MyD88 presentan una frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ significativamente menor que los ratones control, lo que se corresponde con una producción de IL-12 y una respuesta Th1 disminuidas en estos ratones KO, que son muy susceptibles a la infección sistémica por *C. albicans* (Villamón *et al.*, 2004a).

Linfocitos B: anticuerpos

Observaciones clínicas y modelos animales de diferentes micosis, incluyendo las candidiasis, indican que, aunque la inmunidad celular es importante en la prevención de las infecciones fúngicas, la protección frente a las micosis diseminadas también depende de la inmunidad humoral (Casadevall *et al.*, 1998; Romani, 2004). Aunque hay datos controvertidos sobre la importancia de los anticuerpos anti-*Candida* como herramienta efectiva contra las infecciones (en el suero inmune hay una mezcla de anticuerpos protectores, no protectores y deletéreos), cada vez hay más evidencias que indican que algunos anticuerpos específicos pueden ser inmunoprotectores frente a la infección (Casadevall *et al.*, 1998; Bromuro *et al.*, 2002; Fernández-Arenas *et al.*, 2004). Los anticuerpos pueden ejercer su efecto protector por diferentes mecanismos (opsonización, inhibición de la adhesión, inhibición de la transición levadura-micelio, neutralización de factores de virulencia, actividad fungicida directa, etc.) que son difíciles de evaluar, aunque algunas de estas actividades biológicas se han demostrado para algunos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de *C. albicans* (Martínez *et al.*, 1998; Moragues *et al.*, 2003; Gozalbo *et al.*, 2004; Sevilla *et al.*, 2006).

Utilizando un modelo de candidiasis experimental en ratones deficientes en linfocitos B, Montagnoli y colaboradores (2003) han sugerido que los anticuerpos participan en el desarrollo de una inmunidad a largo plazo frente al hongo (inmunidad de memoria). Los ratones deficientes en células B son capaces de controlar el crecimiento del hongo tras una infección primaria, pero son más susceptibles frente a una reinfección por *C. albicans*; en estos ratones no se forman linfocitos T reguladores, lo que se asocia a una menor producción de IL-10 por las células dendríticas, desencadenándose una respuesta Th1 exacerbada. Además, la administración de anticuerpos opsonizantes en estos ratones

restaura la producción de IL-10 por las células dendríticas y la aparición de niveles normales de linfocitos T reguladores (Montagnoli *et al.*, 2003).

Existen numerosos estudios acerca de los componentes antigénicos de *C. albicans*. Pitarch y colaboradores (2001) utilizando una aproximación proteómica han descrito que el suero de ratones, obtenido tras diferentes días postinfección, inmunodetecta 31 proteínas fúngicas, entre las que se encuentran enzimas glicolíticas (fructosa bifosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, enolasa y piruvato quinasa), otras enzimas metabólicas (metionina sintasa, alcohol deshidrogenasa, etc.) y miembros de la familia HSP70 (Ssa1, Ssb1). También mediante una aproximación proteómica, empleando suero de ratones vacunados y no vacunados, se han identificado varios anticuerpos protectores del subtipo IgG_{2a} (Inmunoglobulina G_{2a}) que reconocen determinados antígenos fúngicos en el suero de ratones vacunados, sugiriéndose que algunos de estos antígenos pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas frente a las candidiasis (Fernández-Arenas *et al.*, 2004).

Diferentes trabajos que han estudiado la respuesta humoral frente a *C. albicans* en pacientes infectados y en modelos animales han demostrado la presencia de antígenos inmunodominantes con pesos moleculares de 45 a 52 KDa (Matthews *et al.*, 2003). Uno de los antígenos inmunodominantes de *C. albicans* es la enolasa, con la que se ha desarrollado un test de diagnóstico de la enfermedad (Walsh *et al.*, 1991). Aunque la inmunización con enolasa recombinante tiene un ligero efecto protector en la candidiasis sistémica en ratón, dicho efecto no se puede atribuir a los anticuerpos anti-enolasa, puesto que el mismo efecto se encuentra en ratones deficientes en linfocitos B (Montagnoli *et al.*, 2004).

El suero de pacientes que se han recuperado de una candidiasis sistémica contiene anticuerpos frente a un antígeno de 47 KDa, que se identificó como un fragmento termoestable procedente de la degradación proteolítica de la HSP90 de *C. albicans*. Un anticuerpo monoclonal de ratón, desarrollado frente a un epítipo de este fragmento, es capaz de disminuir la mortalidad en modelos de candidiasis sistémica en ratón (Matthews *et al.*, 1991; Matthews y Burnie, 1992). Un posible mecanismo de protección podría ser la inhibición de la unión de la HSP90 del hongo a las proteínas séricas, provocando un efecto beneficioso para el hospedador. El posible efecto protector de un anticuerpo recombinante humano frente a este epítipo (Mycograb) se ha ensayado en modelos invasivos de candidiasis aguda y crónica en ratón, obteniéndose un resultado satisfactorio (Matthews *et al.*, 1995; Matthews y Burnie, 2001). Mycograb muestra actividad frente a un amplio rango

de especies de levaduras, produce una mejora significativa en la candidiasis murina, y cuando se combina con anfotericina B, produce una completa curación de la infección. Esto ha llevado a iniciar pruebas clínicas en pacientes humanos con candidiasis sistémica usando Mycograb solo o en combinación con anfotericina B. Se ha demostrado que el tratamiento combinado produce una mejora clínica significativa, confirmada por cultivo, en el estado de pacientes con candidiasis invasiva (Matthews *et al.*, 2003; Pahl *et al.*, 2006). Recientemente ensayos preclínicos han demostrado que la asociación de este anticuerpo con el antifúngico caspofungina también tiene efectos sinérgicos (Hodgetts *et al.*, 2008).

El suero de personas adultas sanas contiene anticuerpos capaces de reconocer el manano de *C. albicans* y los niveles encontrados varían mucho entre unas personas y otras. La clase de inmunoglobulina que se encuentra principalmente es IgG, siendo mucho más bajos los niveles de IgM (Martínez *et al.*, 1998). Está demostrado que los anticuerpos frente a epítomos del manano juegan un papel importante frente a las infecciones por *C. albicans*. La inmunización de ratones con una fracción de manano implicada en la adhesión de las células fúngicas al hospedador resultó en la inducción de una respuesta humoral protectora. Además, un anticuerpo monoclonal frente a un epítomo de manano que participa en la adhesión, protege a los ratones frente a las candidiasis diseminadas (Han y Cutler, 1995; Martínez *et al.*, 1998). El mecanismo a través del cual estos anticuerpos ejercen la protección no está claro, pero puede deberse a que favorecen la fagocitosis y/o alteran la adherencia del hongo *in vivo*. Dos anticuerpos monoclonales del isotipo IgM e IgG específicos de un epítomo de la superficie de *C. albicans* [β -(1,2)-manotriosa] protegen al ratón frente a las candidiasis, mientras que un anticuerpo monoclonal del isotipo IgM que reconoce un epítomo distinto de manano es incapaz de conferir protección. Por lo tanto, la especificidad del epítomo y la activación del complemento están relacionadas con la capacidad de estos anticuerpos para proteger frente a las candidiasis, y el mecanismo de protección parece estar asociado con un incremento de la fagocitosis y muerte de las células fúngicas (Han *et al.*, 2000; 2001). En un trabajo más reciente Zhang y colaboradores (2006), utilizando un anticuerpo recombinante humano IgG₁ anti-manano (M1g1), muestran el papel protector de este anticuerpo en un modelo murino de candidiasis diseminada, su capacidad para estimular la fagocitosis y de eliminar levaduras de *C. albicans* y para mediar en la opsonización por complemento de la levadura. Existen evidencias de que anticuerpos anti-manano reducen *in vitro* la adherencia de *C. albicans* al

poliestireno y a componentes de la matriz extracelular del hospedador (San Millan *et al.*, 2000; Rodier *et al.*, 2003). Otros estudios demuestran que los niveles de IgG antimanano en sueros normales influyen en la cinética de activación y unión de C3, y que los anticuerpos antimanano encontrados en donantes sanos pueden funcionar también directamente como opsoninas sin precisar de complemento (Kozel *et al.*, 2004).

También se ha descrito un anticuerpo monoclonal frente a una manoproteína de alto peso molecular que se expresa en la superficie del micelio, y que presenta tres actividades anti-*Candida*: inhibición de la adherencia del hongo a las células epiteliales bucales, inhibición de la transición levadura-micelio y acción fungicida directa (Moragues *et al.*, 2003; Sevilla *et al.*, 2006).

Durante el curso de las candidiasis sistémicas y vaginales se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-Sap, proteínas implicadas en la virulencia del hongo (Naglik *et al.*, 2003). Aunque se ha demostrado en modelos experimentales de vaginitis en rata que la inmunización con Sap2, la administración de un anticuerpo monoclonal anti-Sap2 o de anticuerpos anti-Sap2 de fluidos vaginales protegen parcialmente frente a la infección (De Bernardis *et al.*, 1997; Vilanova *et al.*, 2004), el posible efecto protector de los anticuerpos anti-Sap frente a las infecciones sistémicas y de mucosas por *Candida* no está claro (Naglik *et al.*, 2003).

Torosantucci y colaboradores (2005) han descrito una vacuna conjugada que es capaz de inmunizar y proteger eficientemente a ratones frente a *C. albicans* por mecanismos basados en las propiedades antifúngicas directas de los anticuerpos anti- β -glucano. Estos autores conjugan laminarina (Lam), una preparación de β -glucano soluble procedente del alga *Laminaria digitata* poco inmunogénica por si sola, con el toxoide de la difteria CRM197, una proteína “carrier” utilizada en algunas vacunas bacterianas. Este conjugado demostró ser inmunogénico y protector frente a infecciones por *C. albicans* tanto sistémicas como vaginales. La protección está mediada probablemente por los anticuerpos anti- β -glucano, ya que estos anticuerpos se unen a micelios de *C. albicans* e inhiben su crecimiento *in vitro* en ausencia de células efectoras. Además, los ratones vacunados con este conjugado también se protegen de una infección letal con conidios de *Aspergillus fumigatus*, y su suero también une e inhibe el crecimiento de micelios de este hongo (Torosantucci *et al.*, 2005).

En el esquema mostrado en la figura 5 se resumen los mecanismos, tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida y sus interacciones, que participan en la defensa frente a las infecciones fúngicas, y que se han descrito en este apartado de Introducción.

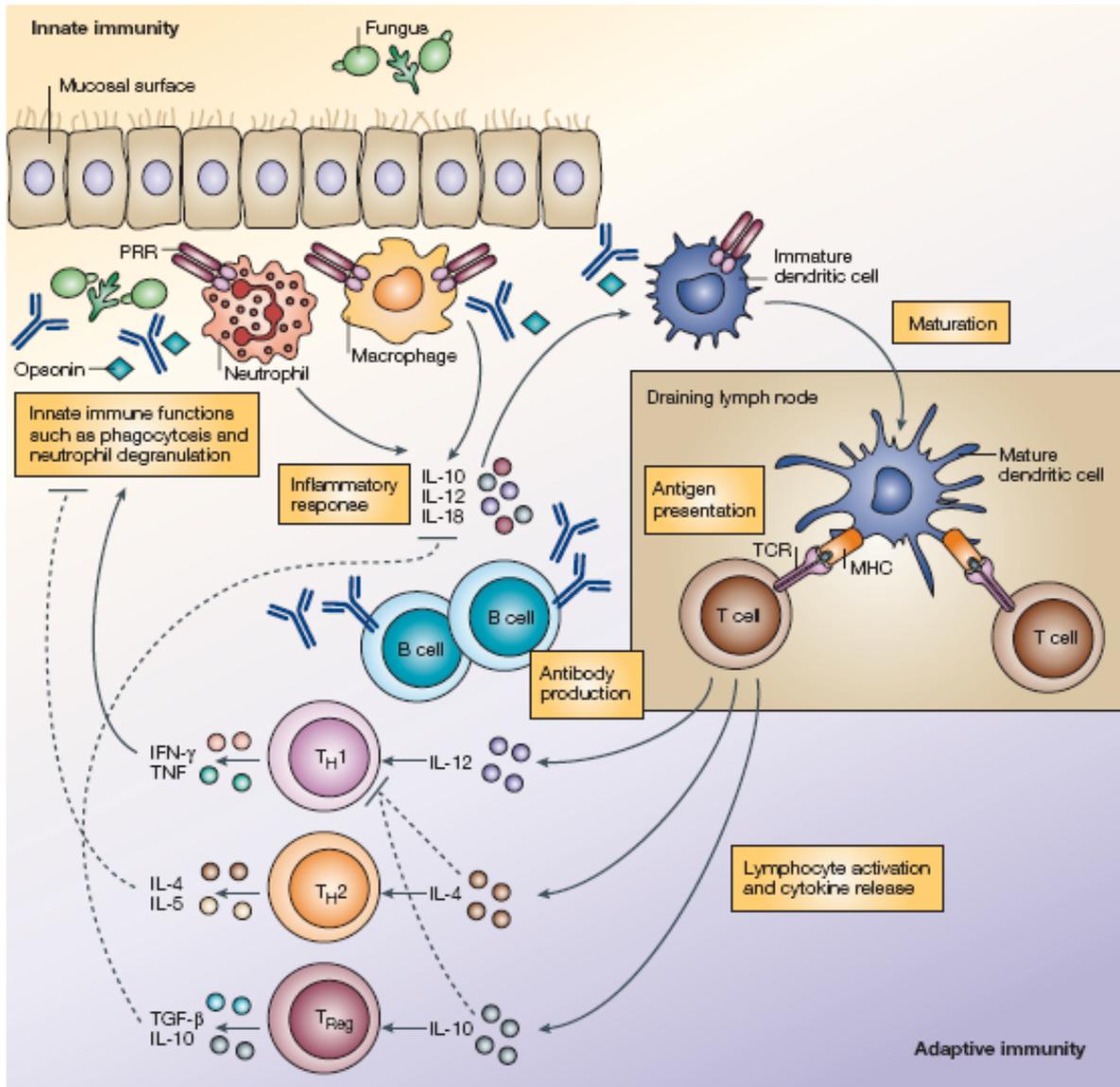


Fig. 5. Inmunidad innata y adquirida en las infecciones fúngicas (Romani, 2004)

3. “Toll-like receptors” (TLRs)

La proteína Toll, un receptor transmembranal, fue identificada originalmente en *Drosophila* como una molécula esencial en la determinación de la polaridad dorso-ventral durante la embriogénesis de la mosca (Hashimoto *et al.*, 1988). Posteriormente se describió la función de Toll en la respuesta inmunitaria en *Drosophila*, organismo que, sin presentar respuesta inmunitaria adquirida, es muy resistente a las infecciones microbianas debido a la capacidad de síntesis de péptidos antimicrobianos muy potentes. La delección de Toll provoca un fenotipo inmunodeficiente caracterizado por la falta de expresión de diversos genes inmunitarios, incluyendo el gen que codifica para el péptido antifúngico drosomicina, y por una marcada susceptibilidad a infecciones por hongos y bacterias grampositivas. Posteriormente se ha descrito que el genoma de *Drosophila* codifica otras 8 proteínas más de la familia Toll, cuyas funciones no están claras, pero se relacionan todas ellas con la resistencia frente a diferentes patógenos (Lemaitre y Hoffmann, 2007; Bauer y Hartmann, 2008).

En 1990 se descubrió la primera proteína humana relacionada con los receptores Toll de *Drosophila*, a la que se denominó TLR1 (Taguchi *et al.*, 1996). El descubrimiento de proteínas homólogas a la proteína Toll en mamífero planteó el estudio de su posible función en la respuesta inmunitaria innata (Medzhitov y Janeway, 1997). En 1997 se caracterizó otra proteína de la familia TLR en humanos (TLR4), a la que se implicó en la respuesta inmunitaria innata, ya que causaba la inducción de genes relacionados con citocinas y otras moléculas coestimuladoras (Medzhitov *et al.*, 1997). Posteriormente se implicó al receptor TLR4 en la respuesta frente al lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas. Durante años se había considerado a la molécula CD14 como el receptor responsable de los efectos del LPS en macrófagos, monocitos y neutrófilos, aunque dicho papel no estaba claro, ya que esta molécula no presenta dominios intracelulares responsables de la transducción de señal. Numerosos estudios sugerían que el CD14 debía actuar asociado con otras proteínas transmembrana capaces de llevar a cabo la transducción de señal tras el reconocimiento del ligando. Empleando ratones C3H/HeJ y C57BL/10ScCr se determinó que el receptor TLR4 está implicado en la transducción de señal en respuesta al LPS (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999). Los ratones C3H/HeJ presentan una mutación puntual en la que un residuo de prolina de la región intracitoplasmática del gen *tlr4* se sustituye por uno de histidina, con la consiguiente

pérdida de funcionalidad, ya que la prolina es esencial para que se produzca la transducción de señal. Los ratones C57BL/10ScCr contienen de manera natural una delección cromosomal en el locus *tlr4*. La función de TLR4 en el reconocimiento del LPS quedó confirmada posteriormente al obtener y analizar ratones “Knockout” (KO) para dicho receptor (Hoshino *et al.*, 1999).

El descubrimiento de los TLRs marcó el comienzo de una nueva etapa en el estudio de la regulación de la respuesta inmunitaria frente a microorganismos patógenos. En la actualidad se han descrito 13 receptores TLR en ratón y 10 en humanos, aunque no todos funcionales. Estos TLRs participan en el reconocimiento de diferentes patógenos y en la inducción de una respuesta inmunitaria innata frente a ellos, aunque también se les ha implicado en el desarrollo de la respuesta específica y en otras funciones no relacionadas con la respuesta frente a microorganismos patógenos, como enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Barton y Medzhitov, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Kumagai *et al.*, 2008).

3.1. Participación de los TLRs en la respuesta inmunitaria

Los TLRs son una familia de proteínas muy conservadas que se caracterizan por presentar un dominio extracelular rico en residuos de leucina (LRR; “Leucine Rich Repeat domain”), responsable del reconocimiento de los ligandos (Bell *et al.*, 2003), y una región intracitoplasmática denominada TIR (“Toll/Interleukin-1 Receptor), homóloga a la región intracitoplasmática del receptor de la IL-1, capaz de transmitir señales de activación (Takeda y Akira, 2004a).

Para que se genere una respuesta inmunitaria es necesario un previo reconocimiento del patógeno. Los TLRs están implicados en este primer paso. Los distintos patógenos poseen una gran variedad de moléculas muy conservadas, que no se encuentran en el hospedador, denominadas PAMPs (Medzhitov y Janeway, 1997). Durante la infección microbiana estos componentes son reconocidos por una gran variedad de células (neutrófilos, monocitos, macrófagos, NK, mastocitos, células epiteliales, etc.) a través de los TLRs, lo que produce la activación de estas células, induciendo la expresión de citocinas, moléculas coestimuladoras y otras moléculas antimicrobianas. Así, los TLRs

participan activamente en el desarrollo de la respuesta innata, encaminada a eliminar al microorganismo en los primeros estadios de la enfermedad.

En cuanto a la implicación de los TLRs en la fagocitosis, se sabe que este proceso viene acompañado de una respuesta inflamatoria originada por el reconocimiento de ligandos de los microorganismos por los TLRs y/o por otros receptores tipo lectina. De hecho, se ha demostrado que algunos TLRs son reclutados al fagosoma, donde detectan el contenido de este e inician la respuesta inflamatoria. Los datos actuales muestran que los TLRs no funcionan directamente como receptores fagocíticos, pero que sí pueden afectar a la maduración del fagosoma y regular la expresión de genes cuyos productos participan directamente en la fagocitosis (Underhill y Gantner, 2004).

El descubrimiento de que los TLRs también se expresan en células dendríticas inmaduras sugirió que estos receptores podrían estar implicados en la generación de una respuesta inmunitaria adquirida. Varios estudios han mostrado que la interacción de diferentes ligandos microbianos con los TLRs presentes en las células dendríticas desencadena (i) un aumento de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase II, que presentan los péptidos antigénicos a los linfocitos T, (ii) un aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras, importantes para la expansión clonal de las células T y (iii) secreción de citocinas inmunomoduladoras, que dirigen la diferenciación de los linfocitos T en células efectoras (Barton y Medzhitov, 2002; Takeda *et al.*, 2003; Reis e Sousa, 2004). Un trabajo de Blander y Medzhitov (2006) atribuye una nueva función a los TLRs en la respuesta adquirida; los autores muestran que la eficiencia en la presentación de antígenos de las partículas fagocitadas por las células dendríticas es dependiente de la presencia de ligandos de TLRs dentro del fagosoma. Cada fagosoma trabajaría de forma autónoma, de manera que únicamente los fagosomas que contuvieran ligandos de TLRs presentarían los péptidos antigénicos unidos a moléculas de histocompatibilidad de clase II. Por tanto los TLRs participarían en la generación de los complejos péptido-MHC II, controlando así la selección de antígenos que serían presentados a los linfocitos T, y permitiendo la discriminación entre antígenos propios y no propios.

Varios trabajos han mostrado que diferentes poblaciones de linfocitos T expresan selectivamente TLRs funcionales, capaces de responder a sus ligandos. Se ha demostrado que linfocitos T CD4, T CD8, T reguladores, linfocitos NK y linfocitos T $\gamma\delta$ expresan receptores tipo Toll. La estimulación a través de los TLRs en estas células modularía la

activación y funciones de los linfocitos T, actuando los TLRs como receptores coestimuladores, aunque necesitando siempre de la señal activadora a través del receptor TCR (Kabelitz, 2007).

Los TLRs también desempeñan una función en la respuesta humoral. Se ha demostrado que los linfocitos B expresan TLRs funcionales que pueden reconocer y responder a sus ligandos. Algunos trabajos muestran que la activación a través de TLR en linfocitos B, junto con la estimulación del receptor BCR y la cooperación de los linfocitos T auxiliares, sería necesaria para la proliferación, el cambio isotípico y la diferenciación de estos linfocitos a células secretoras de anticuerpos (Pasare y Medzhitov, 2005; Ruprecht y Lanzavecchia, 2006). Sin embargo otro trabajo indica que la señalización a través de los TLRs sería coestimuladora, pero no imprescindible para la síntesis de anticuerpos (Nemazee *et al.*, 2006).

Por último, se ha implicado a los TLRs en aspectos no relacionados con la infección, como son el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004) o su participación en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como pueden ser el lupus eritematoso sistémico, la aterosclerosis o la artritis reumatoide (Takeda y Akira, 2005).

3.2. Ligandos de los TLRs

Hasta este momento se han descrito 13 TLRs en mamíferos, 10 en humanos y 13 en ratón. TLR1-9 están presentes en humanos y ratones (Zhang *et al.*, 2004; Takeda y Akira, 2005). TLR10 es probablemente funcional en humanos, sin embargo el extremo C-terminal del gen *Tlr10* en ratón presenta una secuencia no relacionada, lo que indica que el TLR10 de ratón no es funcional. De la misma manera, TLR11 de ratón es funcional, pero el gen del receptor TLR11 humano presenta un codón de “stop” en la región codificante de la proteína, lo que provoca que el receptor no se exprese. Mediante comparación de las secuencias peptídicas y de la estructura de los genes, los TLRs pueden clasificarse filogenéticamente en diversas subfamilias (Fig. 6). Actualmente se han caracterizado TLRs no únicamente en mamíferos, sino que se han clonado TLRs en otros vertebrados, como

peces agnatos, y varios invertebrados como la ascidia, el erizo de mar, el cangrejo de mar o el camarón (Kumagai *et al.*, 2008).

Aunque durante los últimos años se han caracterizado diferentes ligandos para los distintos TLRs, todavía no se conocen los ligandos fisiológicos para algunos TLRs y con gran probabilidad se seguirán descubriendo ligandos adicionales a los ya descritos. La gran mayoría de los ligandos caracterizados corresponden a estructuras microbianas conservadas (PAMPs), presentes en bacterias, hongos y virus. También se ha descrito que ligandos endógenos, procedentes del hospedador, son reconocidos por algún TLR, especialmente por el TLR4. Por último, también se ha descrito que algunos compuestos sintéticos (drogas antivíricas) pueden interactuar como ligandos con ciertos TLRs, aunque obviamente no pueden considerarse ligandos fisiológicos (véase fig. 7 al final de este apartado) (Takeda y Akira, 2005; Bauer y Hartmann, 2008; Kumagai *et al.*, 2008).

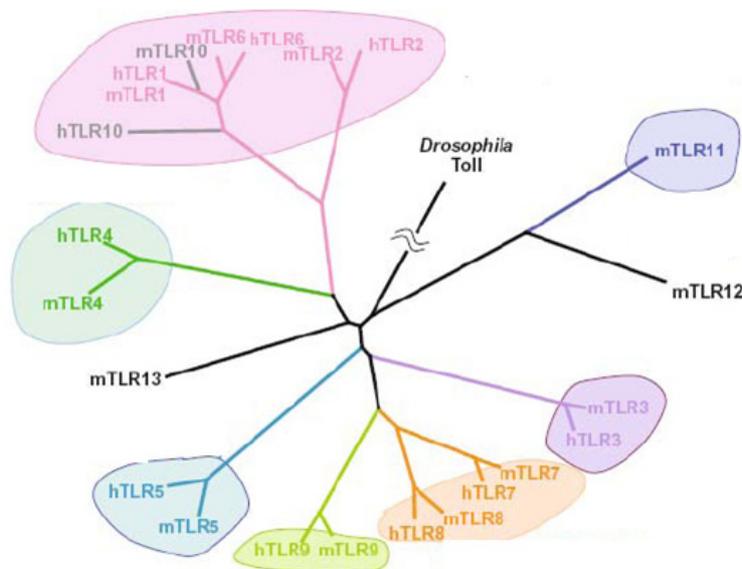


Fig. 6. Clasificación filogenética de los receptores tipo Toll (TLRs) humanos (h) y murinos (m). (Modificado de Kumagai *et al.*, 2008).

TLR1, TLR2 y TLR6

TLR2 reconoce una amplia variedad de componentes microbianos. Estos incluyen lipoproteínas y lipopéptidos de bacterias gramnegativas, micoplasmas y espiroquetas, peptidoglicano y ácido lipoteicoico de bacterias grampositivas, lipoarabinomanano de micobacterias, glicoinositol fosfolípidos de *Trypanosoma cruzi*, porinas de *Neisseria sp.* una modulina de *Staphylococcus epidermidis*, una hemaglutinina del virus del sarampión,

zimosán (ligando fúngico) y glicolípidos de *Treponema maltophilum*. Además, TLR2 también reconoce varios tipos de LPS atípicos de *Leptospira interrogans*, *Helicobacter pylori* y *Porphyromonas gingivalis*, a diferencia de TLR4, que reconoce LPS de enterobacterias. Estos tres tipos de LPS atípico difieren del LPS de enterobacterias en el número de cadenas aciladas en el lípido A, lo que probablemente confiere un reconocimiento diferencial. Sin embargo, un estudio reciente indica que las preparaciones de LPS procedente de *P. gingivalis* suelen estar contaminadas con lipoproteínas que activan a TLR2, y que este LPS solo activa a TLR2 muy débilmente. Por tanto, son necesarios más estudios para comprobar si algunos LPS son reconocidos por TLR2, y no por TLR4 (Takeda y Akira, 2005).

El hecho de que el receptor TLR2 sea capaz de reconocer esta gran variedad de ligandos puede deberse a su capacidad de asociación con TLR1 y TLR6, formando heterodímeros, lo que le confiere la posibilidad de discriminar entre diferentes componentes microbianos. La interacción TLR2/TLR6 es necesaria para el reconocimiento de diacil-lipopéptidos, mientras que la cooperación entre TLR2 y TLR1 participa en el reconocimiento de triacil-lipopéptidos. Por lo tanto, TLR1 y TLR6 cooperan funcionalmente con TLR2 discriminando diferencias estructurales en lipopéptidos (Takeda y Akira, 2004a; Wetzler, 2003). Además, el receptor CD14 puede actuar aumentando la eficiencia en el reconocimiento por TLR2 de algunos de sus ligandos (Wetzler, 2003).

El zimosán, una partícula compleja formada por glucanos, manano, proteínas, quitina y glicolípidos, obtenida a partir de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, fue descrito como ligando del receptor TLR2 en el año 1999 (Underhill *et al.*, 1999). Actualmente se sabe que el zimosán induce la señalización a través del heterodímero TLR2/TLR6. Aunque no se ha caracterizado el componente del zimosán responsable de la interacción con el receptor, parece ser que dicha interacción no está mediada por el glucano, ya que al eliminar del zimosán los demás componentes mediante hidrólisis alcalina, pierde la capacidad de activar por TLR2 (Underhill, 2003a). En cambio, el glucano del zimosán es el componente reconocido por el receptor dectina-1, que activa la fagocitosis de las partículas de zimosán. Aunque la dectina-1 y el TLR2 reconocen diferentes moléculas del zimosán, y parece que no existe interacción entre ambos receptores, la activación a través de dectina-1 es capaz de producir un aumento en la respuesta inflamatoria mediada por TLR2, probablemente por solapamiento en las vías de transducción de señal (Gantner *et al.*, 2003; Underhill, 2003b; Bauer y Hartmann, 2008).

TLR3

TLR3 está implicado en el reconocimiento de RNA de doble cadena (dsRNA) vírico; la expresión del receptor TLR3 humano en la línea celular 293, que constitutivamente no responde al dsRNA, provoca un aumento en la activación de NF- κ B en respuesta a este ligando. Además, ratones deficientes para TLR3 presentan una respuesta disminuida en respuesta a dsRNA. El dsRNA es producido por muchos virus durante su replicación e induce la síntesis de interferones de tipo I (IFN- α/β), los cuales ejercen actividad antiviral e inmunoestimuladora. TLR3 también es el receptor de la molécula poli(I:C) (ácido poliinosínico/policitidílico), un análogo sintético del dsRNA.

Existen mecanismos de reconocimiento de dsRNA viral independientes de TLR3. Este reconocimiento está mediado por los PRRs citoplasmáticos RIG-I y MDA5, expresados en múltiples tipos celulares, como fibroblastos y células dendríticas. Sin embargo, las células dendríticas plasmacitoides utilizan exclusivamente la señalización a través de TLR3 para la producción de interferones de tipo I en respuesta a RNA viral y poli(I:C) (Takeda y Akira, 2005; West *et al.*, 2006).

TLR4

El lipopolisacárido (LPS) bacteriano es el ligando de TLR más ampliamente estudiado. El LPS, un compuesto glicolipídico de la membrana externa de bacterias gramnegativas, posee la capacidad inmunoestimuladora más potente entre todos los ligandos de TLRs conocidos; cantidades traza de LPS activan el sistema inmunitario innato vía TLR4, induciendo la producción de numerosos mediadores proinflamatorios como las citocinas TNF- α , IL-1 y IL-6. Sin embargo, el reconocimiento del LPS requiere de otras proteínas que forman con TLR4 el receptor funcional. El LPS se une a una proteína presente en el suero, la “LPS-binding protein”, y este complejo que forman es reconocido por el CD14, receptor unido a la membrana por un anclaje glicosilfosfatidilinositol, que a su vez interacciona con el TLR4. Además, la funcionalidad del receptor del LPS requiere la presencia de la proteína MD-2, que participa en la secreción de TLR4 a la membrana y donde interacciona con el dominio extracelular de TLR4 (Takeda *et al.*, 2003; Miyake, 2004).

El receptor TLR4 está también implicado en el reconocimiento del taxol, un diterpeno purificado de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia*) y en el reconocimiento de algunas proteínas de la envuelta del virus respiratorio sincitial (VRS) y del virus del tumor mamario murino (MMTV). Además, se ha descrito que el receptor TLR4 reconoce ligandos endógenos, como componentes de la matriz extracelular (fibronectina, ácido hialurónico, heparán sulfato) y otros ligandos del hospedador, como fibrinógeno y proteínas de choque térmico (HSP60 y HSP70), aunque se requiere una alta concentración de estos ligandos endógenos para activar a TLR4. Muchos de estos compuestos se liberan en procesos inflamatorios con daño tisular, aún en ausencia de infección, por lo que se ha sugerido que los TLRs, además de reconocer microorganismos, estarían implicados en detectar daño tisular. Sin embargo, no puede descartarse que el efecto observado en algunos casos se deba a la presencia de LPS contaminante en la preparación purificada de los ligandos endógenos (Takeda y Akira, 2004a; Takeda y Akira, 2005).

TLR5

La flagelina, un componente proteico del flagelo de bacterias gramnegativas es el ligando fisiológico del receptor TLR5. Este receptor reconoce una estructura central, muy conservada, de la flagelina que es esencial para el ensamblaje del protofilamento y la motilidad bacteriana. Se ha descrito que la flagelina activa células epiteliales de pulmón induciendo la producción de citocinas proinflamatorias, y que TLR5 se expresa en células endoteliales del intestino, lo que indica la importancia de TLR5 en el reconocimiento bacteriano en la superficie de mucosas (Takeda y Akira, 2005; West *et al.*, 2006).

TLR7 y TLR8

TLR7 y TLR8 son proteínas estructuralmente muy conservadas, y reconocen el mismo ligando en algunos casos. Estudios con ratones deficientes en TLR7 revelaron inicialmente que este receptor reconoce compuestos sintéticos como las imidazoquinolinas, que se utilizan en clínica para el tratamiento de verrugas genitales asociadas con infección viral, y loxoribina, que tiene actividad antiviral y antitumoral. TLR7 y 8 humanos, pero no TLR8 murino, también reconocen imidazoquinolinas. Ambos compuestos sintéticos están relacionados estructuralmente con el nucleósido guanósina, por lo que era probable que TLR7 y TLR8 humanos reconocieran ácidos nucleicos de virus. Esto se confirmó

posteriormente por el descubrimiento de que estos receptores reconocen RNA de simple cadena (ssRNA), enriquecidos en guanosina o uridina, presentes en virus como el VIH humano o el virus de la gripe (Takeda y Akira, 2005; Bauer y Hartmann, 2008).

Curiosamente, el RNA de mamífero, que también contiene muchos nucleósidos modificados, estimula vía TLR7 y TLR8 significativamente menos que otros RNA microbianos, lo que sugiere que en mamíferos las modificaciones de nucleósidos sirven como forma de distinguir entre RNA endógeno y RNA de patógenos. Al igual que en la señalización a través de TLR3, la activación de estos receptores provoca la producción de interferones de tipo I, necesarios para el desarrollo de una respuesta inmunitaria innata antiviral (West *et al.*, 2006).

TLR9

TLR9 reconoce DNA bacteriano con motivos CpG no metilados. Además, en células dendríticas plasmacitoides, TLR9 reconoce secuencias CpG víricas induciendo la producción de IFN- α . La baja frecuencia y la alta tasa de metilación de los motivos CpG en DNA de mamíferos previenen de su reconocimiento por el receptor TLR9 en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en ciertas enfermedades autoinmunes, complejos IgG_{2a}/cromatina que contienen motivos CpG pueden unirse al receptor BCR de células B y a TLR9 provocando la síntesis de factor reumatoide y otras moléculas autoreactivas. La expresión exclusivamente intracelular de TLR9 en el endosoma es muy importante para la discriminación entre DNA propio y ajeno, ya que, al contrario que el DNA microbiano, el DNA del hospedador no aparece usualmente en el compartimento endosomal (Takeda y Akira, 2005; West *et al.*, 2006; Bauer y Hartmann, 2008)

Posteriormente se ha descrito que este receptor también reconoce un ligando llamado hemozoina, un pigmento insoluble derivado de la protoporfirina IX producido por los parásitos de la malaria, que es capaz de digerir la hemoglobina del hospedador (Takeda y Akira, 2005).

TLR11

El TLR11 es el TLR descrito más recientemente, tanto en ratón como en humano, aunque en este último no es funcional. Se ha descrito que TLR11 participa en la resistencia a la infección por bacterias uropatógenas en ratón, ya que ratones deficientes en TLR11 son mucho más susceptibles a estas infecciones (Zhang *et al.*, 2004). A pesar de que el ligando bacteriano de TLR11 no es conocido, se ha descrito que la capacidad estimuladora de las bacterias uropatógenas desaparece tras el tratamiento de éstas con proteinasa K, lo que sugiere que TLR11 reconoce un ligando proteico (West *et al.*, 2006). Además, este receptor también es capaz de reconocer moléculas “profilin-like” del parásito *Toxoplasma gondii* (Kawai y Akira, 2007a).

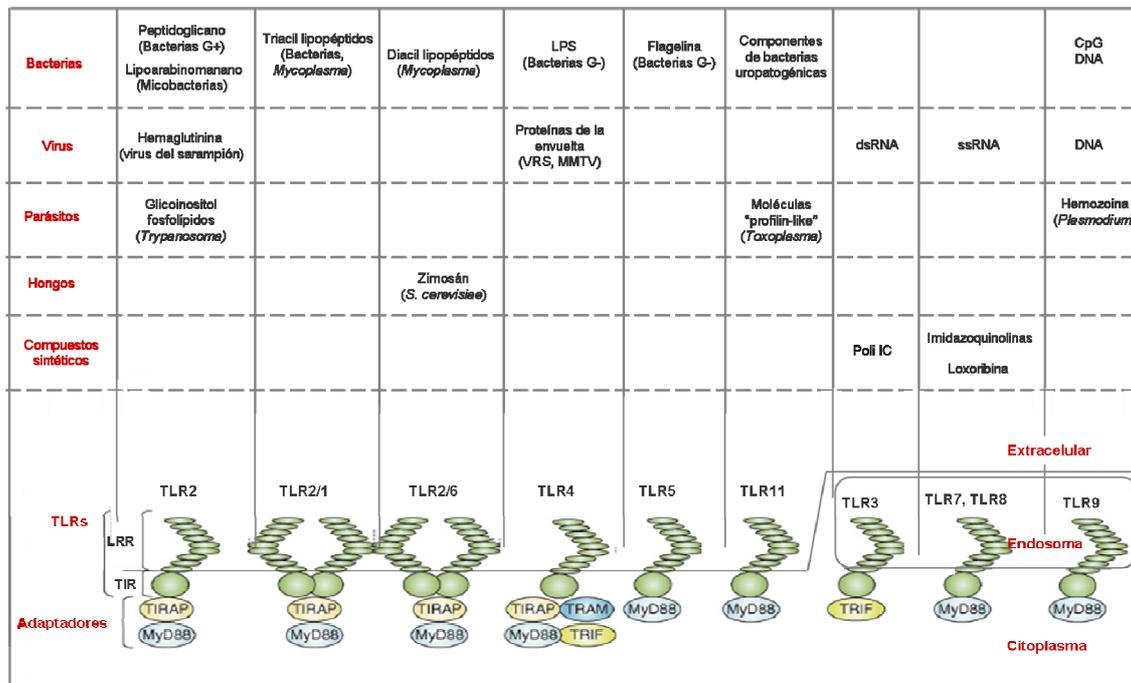


Fig. 7. Ligandos de TLRs y proteínas adaptadoras de transducción de señal. (Modificado de Kawai y Akira, 2007a)

Es importante destacar que un mismo microorganismo puede ser reconocido por varios TLRs y que se han descrito efectos sinérgicos por coactivación de varios TLRs simultáneamente. Por ejemplo, la coactivación TLR2-TLR4 conduce a una mayor producción de TNF- α , IL-6 y MIP-1 α ("Macrophage Inflammatory Protein 1 α ") por macrófagos murinos y monocitos humanos que la producción de estas moléculas por cada receptor independientemente. Estudiando una amplia variedad de agonistas de TLRs se ha determinado que estos efectos sinérgicos se observan principalmente cuando la estimulación simultánea es a través de un TLR que utiliza la vía de transducción de señal dependiente de MyD88 y otro que es capaz de utilizar una vía independiente de esta molécula (véase apartado siguiente) (Underhill, 2007).

3.3. Vías de transducción de señal de los TLRs

Tras el reconocimiento de los ligandos, los TLRs activan mecanismos de transducción de señal que provocan, en último término, la inducción de genes que codifican para citocinas inflamatorias, moléculas coestimuladoras o interferones de tipo I.

El reconocimiento de los distintos PAMPs por los TLRs provoca el reclutamiento de moléculas adaptadoras intracelulares que contienen un dominio TIR, como son MyD88, TIRAP, TRIF (también conocido como TICAM1) y TRAM (llamado también TICAM2), que interaccionan con el dominio TIR de los receptores Toll (Fig. 8).

La primera molécula adaptadora que se describió fue MyD88 y posteriormente se demostró que existían dos vías de transducción de señal: (i) una vía de transducción de señal dependiente de MyD88, común a todos los TLRs, excepto TLR3, y esencial para la inducción de citocinas inflamatorias, y (ii) una vía independiente de MyD88, específica para TLR3 y TLR4 y que utiliza la molécula adaptadora TRIF. TIRAP participa en la vía dependiente de MyD88, mientras que TRAM participa en la vía dependiente de TRIF. Más recientemente se ha demostrado que otra molécula adaptadora, SARM, es capaz de inhibir la vía dependiente de TRIF en líneas celulares humanas, aunque la función fisiológica de SARM en ratón aún no se conoce.

En general, cada TLR recluta una combinación específica de adaptadores para activar diferentes factores de transcripción, consiguiendo así una respuesta adecuada y efectiva frente a los distintos patógenos (Kawai y Akira, 2007b).

Transducción de señal dependiente de MyD88

MyD88 contiene en su extremo N-terminal un dominio de aproximadamente 90 aminoácidos denominado “Death domain” (DD). El DD fue identificado en proteínas inductoras de apoptosis, aunque se ha demostrado que muchas proteínas con DD no presentan claras funciones apoptóticas, sino que participan en interacciones proteína-proteína. En 1994 se describió que en su extremo C-terminal MyD88 presenta una secuencia de unos 200 aminoácidos, similar a las regiones intracelulares del receptor Toll de *Drosophila* y del receptor de la IL-1 de mamíferos, denominándose dominio TIR (“Toll/IL-1 Receptor”). A través de estos dos dominios (TIR y DD), MyD88 actúa como una molécula adaptadora entre los miembros de la familia TLR/IL-1R y otras proteínas implicadas en la transducción de señal como IRAK (“IL-1 Receptor-Associated Kinase”) (Janssens y Beyaert, 2002).

Una vez el ligando interacciona con el TLR correspondiente, el dominio TIR de MyD88 se une con el dominio TIR del TLR. En ese momento, MyD88 recluta e interacciona a través de su DD con miembros de la familia IRAK, incluyendo a IRAK-4, IRAK-1 e IRAK-M. En particular, IRAK-4 es indispensable para la activación de la vía de transducción de señal dependiente de MyD88. Una vez fosforiladas, las proteínas IRAK se disocian de MyD88 e interaccionan con TRAF6 (“TNF-Receptor-Associated Factor 6”). TRAF6 forma entonces un complejo con Ubc13 y Uev1A, que produce la activación de TAK1 (“Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1”). TAK1, en combinación con TAB1, TAB2 y TAB3 (“TAK1 Binding Proteins”), activa dos vías de transducción distintas, que implican al complejo IKK (“IkappaB Kinases”) y a la familia MAPK respectivamente.

El complejo IKK cataliza la fosforilación de las proteínas I κ B, lo que provoca su degradación y la subsecuente translocación al núcleo del factor NF- κ B, que controla la expresión de varios genes de citocinas inflamatorias y otros genes implicados en el control de la proliferación celular e inmunidad. Los miembros de la familia MAPK fosforilan y activan al factor transcripcional AP-1 (“Activator Protein 1”) que regula la expresión de

genes implicados en apoptosis y en la producción de citocinas inflamatorias (Kawai y Akira, 2007b; Takeda y Akira, 2004b).

Estudios más recientes utilizando ratones KO para los distintos componentes de esta vía de transducción de señal han permitido averiguar más detalles sobre la misma. Así, Ubc13 participa más activamente en la activación de la vía de las MAPK que en la activación de la vía de NF- κ B, y que la activación de distintas MAPKKKs, diferentes a TAK1, podrían determinar la naturaleza y la magnitud de las respuestas inflamatorias mediadas por TLR4 (Kawai y Akira, 2007b). Sin embargo, aún se desconocen algunos componentes de esta vía de señalización, como son los sustratos de TAK1 responsables de la activación del complejo IKK y MAPK.

Otra molécula con dominio TIR es la molécula TIRAP (“TIR Domain Adaptor Protein”), también denominada inicialmente como Mal (“MyD88-Adaptor-Like”). Esta molécula adaptadora es esencial en la vía de transducción de señal dependiente de MyD88 mediada únicamente por los receptores TLR2 y TLR4.

Transducción de señal independiente de MyD88

Se había descrito que macrófagos deficientes en MyD88 no presentan activación de NF- κ B en respuesta a ligandos de los receptores TLR2, TLR7 y TLR9, pero que la estimulación con LPS, ligando del TLR4, produce la activación de NF- κ B, aunque dicha activación se encuentra retardada al compararse con macrófagos control, lo que sugería la existencia de una vía de activación independiente de MyD88 (Kawai *et al.*, 1999). Posteriormente se demostró que la molécula TRIF (“TIR-Domain-Containing Adaptor Inducing-IFN- β ”), una molécula con dominio TIR, es el adaptador implicado en esta vía (Yamamoto *et al.*, 2002). TRIF es reclutada únicamente por los receptores TLR3 y TLR4, y provoca la activación de IRF3 (“Interferon Regulatory Factor 3”) y NF- κ B, induciendo la expresión de IFN- β , que a su vez activa a distintos genes implicados en la respuesta a virus (Kawai y Akira, 2007b).

Una cuarta molécula adaptadora con dominio TIR es la molécula TRAM (“TRIF Related Adaptor Molecule”), que participa específicamente en la vía de transducción de señal independiente de MyD88 a través de TLR4 (Takeda y Akira, 2004b).

La vía de transducción de señal independiente de MyD88 es importante en la respuesta frente a infecciones víricas puesto que induce la producción de IFN- β y se activa a través del TLR3 y TLR4, receptores que pueden reconocer ligandos procedentes de virus.

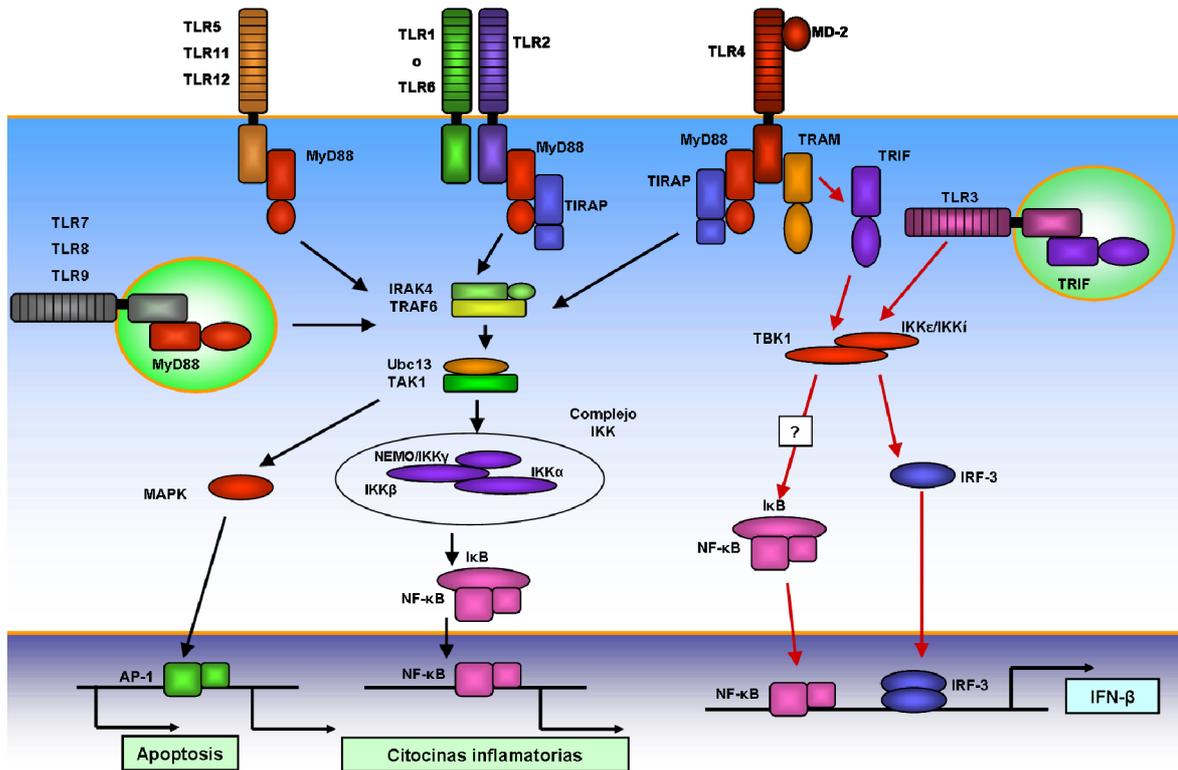


Fig. 8. Vías de transducción de señal a través de TLRs. (Modificado de: Takeda y Akira, 2004b; Kawai y Akira, 2007b).

Reguladores negativos de las vías de señalización de los TLRs

La regulación de la señalización por TLRs es esencial para limitar la inflamación, y actualmente se han identificado varias moléculas que actúan como reguladores negativos de estas vías de señalización. Algunas de estas moléculas hacen que disminuya la expresión de TLRs, mientras que otras regulan la señalización mediante (i) el secuestro de moléculas que participan en las vías, (ii) impidiendo su reclutamiento a la membrana, (iii) degradando proteínas diana o (iv) inhibiendo su transcripción. Además muchas de estas moléculas son inducibles, lo que sugiere una regulación por retroalimentación negativa de las respuestas inmunitarias inducidas por los TLRs (Kawai y Akira, 2007b).

RP105 se asocia con MD-1 para formar un complejo en la superficie celular que interacciona con el complejo TLR4-MD-2 bloqueando su unión al LPS (Divanovic *et al.*, 2005). ST2L secuestra a MyD88 y a TIRAP para impedir el reclutamiento de estos adaptadores a TLR4 (Brint *et al.*, 2004). SIGIRR interacciona con IRAKs y TRAF6 para inhibir la señalización (Wald *et al.*, 2003). Triad3A, una proteína-ligasa del sistema de la ubiquitina causa la degradación de TLR4 y TLR9, disminuyendo sus niveles (Chuang y Ulevitch, 2004). Mientras que TRAF6 participa en la señalización, TRAF1 y TRAF4 actúan como reguladores negativos de la transducción de señal. TRAF4 podría funcionar como antagonista de TRAF6 evitando el reclutamiento de TRAF6 al complejo que forma con las proteínas IRAK. Además de estas moléculas también se han descrito que algunas proteínas de la familia IRAK y algunos factores de transcripción como ATF3 o IRF4 pueden funcionar como reguladores negativos en algunos casos (Kawai y Akira, 2007b).

3.4. Colaboración de TLRs con otros receptores

Los microorganismos son complejos y presentan una amplia variedad de antígenos de superficie y otros componentes intracelulares que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario innato y, como normal general, no es un único receptor el que actúa como mediador de la activación de la respuesta inmunitaria frente a un determinado patógeno. La colaboración entre receptores no solo define si una célula es activada o no, sino que también determina la cantidad y los tipos de citocinas y quimiocinas producidas y el tipo de respuesta adaptativa desarrollada. Los tres tipos de receptores inmunitarios innatos más importantes son los TLRs, las proteínas Nod (“Nucleotide Oligomerization Domain”) y las

lectinas de tipo C. Estos receptores pueden interactuar entre sí, y además también pueden colaborar con otros receptores como por ejemplo el receptor BCR de linfocitos B o con el receptor de inmunoglobulinas FcR (Underhill, 2003b).

Proteínas Nod y TLRs

Los receptores Nod, que incluyen las proteínas Nod1, Nod2 e IPAF (“ICE Protease-Activating Factor”), son receptores citoplasmáticos que reconocen productos microbianos. Estos receptores son capaces de detectar ligandos microbianos transportados al citoplasma por procesos como la fagocitosis. Estas proteínas contienen un dominio C-terminal rico en residuos de leucina que, al igual que en los TLRs, está implicado en el reconocimiento de los ligandos. También contiene un dominio NACHT, responsable de la oligomerización de las proteínas Nod, y al menos un dominio N-terminal CARD, que media las interacciones CARD-CARD con otras proteínas. Estos receptores activan al factor NF- κ B y las MAPKs p38 y JNK (“c-Jun N-terminal kinase”).

Se ha demostrado que MDP, una estructura conservada de peptidoglicano llamada muramil dipéptido y ligando específico de Nod2, activa muy levemente la producción de citocinas por macrófagos, pero que es capaz de aumentar significativamente la producción de citocinas inducida por LPS. También se ha descrito que agonistas de TLR2 y TLR3 sinergizan con MDP para inducir la síntesis de TNF- α , IL-10 e IL-1 β por monocitos humanos (Underhill, 2007).

Lectinas y TLRs

El receptor dectina-1 es una lectina de tipo-C que reconoce β -glucano. Tal como se ha descrito en el apartado 2.1 se ha demostrado que la dectina-1 es el principal receptor implicado en la fagocitosis de *C. albicans*. En respuesta a β -glucano, la dectina-1 induce una señalización intracelular a través de su dominio citoplasmático (ITAM-like). Esta señalización desencadena varias respuestas celulares, como el estallido respiratorio, la activación y regulación de ciclooxigenasa 2 (COX2), la endocitosis y fagocitosis del ligando y la producción de diversas citocinas y quimiocinas, incluyendo TNF- α , MIP-2 (“Macrophage Inflammatory Protein-2”), IL-2, IL-10, IL-6 e IL-23 (Willment y Brown, 2008).

El reconocimiento del hongo por los TLRs no es suficiente para activar la fagocitosis, pero existen importantes evidencias de que la señalización a través de TLRs modifica la expresión de genes implicados en fagocitosis. Por tanto, la pre-exposición a agonistas de TLRs puede afectar a la fagocitosis, proceso que, como se ha descrito previamente, implica al receptor dectina-1 en el caso de *C. albicans*. Sin embargo, macrófagos obtenidos a partir de ratones MyD88^{-/-} y TLR2^{-/-} no presentan defectos en la capacidad de unión e internalización de zimosán, lo que sugiere que la señalización por TLRs no participa directamente en la fagocitosis de hongos mediada por dectina-1 (Underhill, 2007).

La señalización a través de TLRs por si misma no desencadena, o lo hace a niveles muy bajos, la producción de radicales libres del oxígeno en macrófagos, pero está descrito que una exposición previa a LPS provoca un estallido respiratorio aumentado en macrófagos. También se ha descrito que la preexposición a agonistas de TLR2 aumenta en los macrófagos el estallido respiratorio inducido por dectina-1. Sin embargo, la producción de radicales libres del oxígeno inducida por zimosán no está afectada en ratones MyD88^{-/-} y TLR2^{-/-}. Por tanto, al igual que en el caso de la fagocitosis, los TLRs provocarían un aumento en la producción de radicales libres del oxígeno, pero no colaborarían directamente con la dectina-1 (Underhill, 2007; Bauer y Hartmann, 2008).

En la regulación de genes inflamatorios parece existir una cooperación entre TLRs y dectina-1. En macrófagos se ha comprobado que la inducción de TNF- α e IL-12 por zimosán requiere de TLR2, y que la dectina-1 también participa en esta inducción, ya que la sobreexpresión de este receptor en una línea celular de macrófagos murinos, la línea RAW264.7, aumenta la producción de estas citocinas (Underhill, 2007). Esta observación quedó confirmada con los resultados de Taylor y colaboradores (2007), que muestran que la inducción de TNF- α por zimosán está fuertemente disminuida en ratones dectina-1^{-/-}. La producción de otras citocinas inducida por levaduras o zimosán opsonizados con factores del complemento es también defectiva en estos ratones, lo que indica que el receptor es importante en la coordinación de la inducción de citocinas y no únicamente en el reconocimiento del ligando. Por último se ha visto que la dectina-1 está implicada en la regulación de la inducción de IL-10 por zimosán en células dendríticas, aunque la contribución de la señalización por TLRs en la inducción de esta citocina por zimosán es más controvertida (Underhill, 2007). Todas estas observaciones indican que ambos tipos

de receptores colaboran en la generación de una respuesta inflamatoria frente a hongos en macrófagos y células dendríticas.

Otra lectina de tipo-C es el receptor DC-SIGN, que reconoce diferentes formas de manano. Este receptor, expresado fundamentalmente en células dendríticas, parece estar implicado en la fagocitosis de *C. albicans*. DC-SIGN puede inducir la señalización intracelular a través de la vía de Raf-quinasas, vía que puede modular las respuestas mediadas por TLRs e inducir la producción de altos niveles de la citocina IL-10 (Gringhuis *et al.*, 2007). Se ha propuesto que esta producción de IL-10 podría ser utilizada por los patógenos para suprimir la respuesta inmunitaria (van Kooyk y Geijtenbeek, 2003).

Recientemente se ha descrito que otra lectina, la galectina-3, reconoce específicamente a *C. albicans* y que necesita a TLR2 para la señalización (Jouault *et al.*, 2006). Este receptor reconoce β -1,2 manosidos, un tipo especial de glicanos que se expresan en *C. albicans*, y no en *S. cerevisiae*, y que se asocian con manano y fosfolipomanano. Se ha sugerido que el receptor galectina-3 podría asociarse con TLR2 tras la interacción con las levaduras, y que el reconocimiento simultáneo de *C. albicans* por los dos receptores induce una mayor producción de TNF- α (Jouault *et al.*, 2006). También se ha demostrado que la galectina-3 es capaz de inducir directamente la muerte de células de *C. albicans* (Kohatsu *et al.*, 2006).

También se ha descrito otra lectina de tipo-C, el receptor Mincle (“Macrophage-Inducible C-Type Lectin”), que se expresa fundamentalmente en macrófagos, donde ejerce una función importante en las respuestas inmunitarias innatas generadas frente a *C. albicans* (Matsumoto *et al.*, 1999). En ausencia de este receptor, la producción de TNF- α por macrófagos se reduce, tanto *in vivo* como *in vitro*, y además ratones deficientes en Mincle presentan una mayor susceptibilidad a la candidiasis sistémica. Sin embargo Mincle parece no ser esencial para la fagocitosis del hongo (Wells *et al.*, 2008). La relación de este receptor con los TLRs aún debe ser determinada.

3.5. Distribución y localización subcelular de los TLRs

La expresión de los TLRs en diferentes células es un área de investigación en curso y posiblemente los tipos celulares en los que se ha descrito la expresión de uno o varios TLRs siga aumentando en los próximos años. Además, la expresión de los TLRs está modulada por una variedad de factores tales como la invasión microbiana, componentes microbianos, estimulación celular por citocinas y/o quimiocinas, estado de maduración celular, etc. (Takeda *et al.*, 2003).

Todos los receptores, excepto TLR3, se expresan en monocitos, macrófagos y neutrófilos (Hayashi *et al.*, 2003). También los eosinófilos expresan TLR1, 2, 4, 6, 7 y 9, y aunque, en general, los niveles de estos receptores son menores que en neutrófilos, hay que destacar que expresan un alto nivel de TLR7 y responden bien a los ligandos de este receptor, lo que sugiere su participación en la respuesta frente a las infecciones víricas. Los basófilos expresan TLR2 y TLR4 pero no CD14. Los mastocitos, importantes en la respuesta inmunitaria innata, expresan mRNA de TLR1, 2 y 6, pero no de TLR4 (Sandor y Buc, 2005).

Las células NK son muy importantes en la respuesta inmunitaria antiviral y se ha comprobado que expresan mRNA de los receptores TLR1-8 de forma constitutiva, siendo mayores los niveles de TLR2 y TLR3 (Hornung *et al.*, 2002). Además se ha descrito que las células NK son capaces de reconocer y responder directamente a ligandos de los TLRs, tal como se ha detallado en el punto 2.1. de este apartado de Introducción.

En células dendríticas, la expresión de los TLRs depende del tipo de célula dendrítica y de su estado de maduración. En humanos, existen dos tipos de células dendríticas, las mieloides y las plasmacitoides. Las primeras expresan TLR1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8, mientras que las segundas expresan TLR7 y 9, aunque algunos autores indican que TLR7 también se expresa en las células dendríticas mieloides. Las células dendríticas inmaduras comienzan su proceso de maduración cuando son estimuladas por distintos componentes microbianos y muestran distintos patrones de expresión de TLRs durante este proceso; la expresión de TLR1, 2, 4 y 5 disminuye con la maduración de la célula, pero TLR3 es únicamente expresado en células maduras (Sandor y Buc, 2005).

La expresión de los TLRs también es generalizada entre los linfocitos. La estimulación de los TLRs expresados en los linfocitos B genera funciones efectoras, tales

como la producción de anticuerpos, y representa una conexión directa entre inmunidad innata y específica. Se ha descrito que las células B expresan niveles altos de TLR1, 6 y 9 y niveles más bajos de TLR2, 4 y 7, que TLR2 se expresa en la superficie de células T activadas y de memoria, donde podría funcionar como receptor coestimulador para la activación de células T y para el mantenimiento de células de memoria. El análisis de la expresión de los TLRs en diferentes subpoblaciones de linfocitos T ha mostrado que los Treg expresan selectivamente TLR4, 5, 7 y 8 (Sandor y Buc, 2005).

Además de expresarse en todas estas células, los TLRs se expresan en otros tipos celulares como plaquetas y keratinocitos. Estos últimos expresan constitutivamente TLR1, 2, 3, 4 y 5, pero no TLR6, 7 y 8. También se ha descrito la expresión de estos receptores en células epiteliales y endoteliales, contribuyendo así al reconocimiento de los microorganismos y a la generación de respuestas inflamatorias (Sandor y Buc, 2005). Las células epiteliales intestinales expresan bajos niveles de TLR4, lo que podría explicar que el LPS no produzca procesos inflamatorios importantes a este nivel. La expresión y regulación de los TLRs en el epitelio intestinal está estrictamente regulada para evitar una respuesta inflamatoria inducida por la flora bacteriana comensal. Además, la activación de los TLRs por la microbiota comensal está implicada en la protección contra el daño intestinal y su mortalidad asociada, lo que revela una nueva función de los TLRs en el mantenimiento de la homeostasis epitelial intestinal (Takeda *et al.*, 2003; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Algunos TLRs, como el TLR2 y el TLR4, se expresan en células epiteliales renales tras la inducción por IFN- γ y TNF- α , lo que contribuye a la detección de la infección bacteriana en el lumen de los túbulos y a la inducción de la respuesta inflamatoria (Wolfs *et al.*, 2002).

Tres publicaciones recientes han documentado la expresión de TLRs funcionales en células madre. En la primera se muestra que oligodeoxinucleótidos CpG, reconocidos por TLR9, son capaces de inducir la expresión de IL-8 en células CD34⁺ por una vía dependiente de MAPK (Kim *et al.*, 2005). Posteriormente Nagai y colaboradores (2006) muestran que células madre hematopoyéticas pluripotenciales expresan TLRs, y que entran en ciclo celular tras la activación a través de los receptores tipo Toll. Además los precursores hematopoyéticos tempranos también expresan TLRs y la señalización a través de MyD88 provoca una diferenciación mayoritaria hacia linaje mieloide, obviando algunos requerimientos necesarios para el crecimiento y diferenciación de estas células, y también conduce a una diferenciación de los precursores linfoides a células dendríticas. Por último

otros autores muestran que las células madre mesenquimales adultas expresan TLRs funcionales, y que los TLRs y sus ligandos pueden participar como reguladores en la diferenciación y proliferación de estas células, pudiendo estar implicados en el mantenimiento de la multipotencia de las células madre mesenquimales. Las células progenitoras de leucocitos serían por tanto sensores directos de la infección y responderían consecuentemente incrementando la producción de células mieloides para controlar el proceso infeccioso (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007). La relación entre los TLRs y la inmunidad, a la luz de estos novedosos resultados, se extiende desde los tejidos linfoides secundarios hasta los sitios primarios de leucopoyesis, ya que los ligandos de los TLRs son importantes para la proliferación y diferenciación de células madre.

Localización subcelular

En cuanto a la localización subcelular de los receptores tipo Toll, hay que indicar que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se expresan en la superficie celular, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan en compartimentos intracelulares como los endosomas. Esta localización se correlaciona con la naturaleza de los ligandos, ya que los receptores implicados en reconocimiento de ácidos nucleicos microbianos se expresan en compartimentos intracelulares, evitando así, posiblemente, el reconocimiento de los ácidos nucleicos del hospedador (Takeda y Akira, 2005).

Los receptores TLR3, 7 y 9 requieren la maduración del endosoma para el reconocimiento de sus ligandos. El DNA con motivos CpG, liberado tras la degradación de la bacteria fagocitada, interacciona con el TLR9 reclutado a la membrana de los endosomas. Lo mismo ocurriría con otros ligandos víricos de los TLRs, ya que algunas partículas víricas pueden ser degradadas en los endosomas permitiendo así la exposición de dsDNA o ssRNA. También se ha demostrado que el TLR2, que se expresa en la superficie celular, tras reconocer al zimosán es reclutado al compartimento fagosomal de los macrófagos, donde podría también transducir las señales de activación (Takeda y Akira, 2005).

3.6. TLRs y *Candida albicans*

Desde que en el año 2002 aparecieran los primeros trabajos sobre la interacción entre los TLRs y *C. albicans*, numerosas publicaciones han abordado este tema. El reconocimiento de *C. albicans* por TLRs de células fagocíticas activa las vías de señalización intracelular que inducen la producción de citocinas proinflamatorias e inmunomoduladoras que son críticas para la defensa inmunitaria innata del hospedador y para dirigir la respuesta adaptativa. La respuesta de las células T auxiliares juega un papel central en la regulación de la respuesta inmunitaria frente al hongo: la respuesta Th1 favorece el control de la infección fúngica, aunque esta respuesta proinflamatoria necesita ser contrarrestada a través de una respuesta Th2 y células Treg para asegurar una respuesta protectora óptima. Recientemente se ha descrito que una nueva subpoblación de células Th, las células Th17, juegan un papel importante en la inmunidad antifúngica, y los TLRs pueden también contribuir a la polarización hacia una respuesta proinflamatoria Th17 (Gil y Gozalbo, en prensa).

La interacción de *C. albicans* con los TLRs es un proceso complejo, ya que hay que tener en cuenta que (i) la expresión de ligandos fúngicos en la superficie celular depende de numerosos factores, como el morfotipo (levaduras o micelios), la cepa fúngica empleada, las condiciones de cultivo, etc, que influyen en el tipo de respuesta inmunitaria inducida en el hospedador, y (ii) los distintos TLRs pueden colaborar entre si y/o con otros PRRs en el reconocimiento de los ligandos fúngicos y/o en las vías de transducción de señal.

Aunque cada vez se dispone de más información sobre la interacción TLR-hongo, siguen habiendo datos parcialmente contradictorios, tanto sobre los ligandos fúngicos reconocidos como sobre los receptores que participan en este reconocimiento, y las consecuencias del mismo en el desarrollo de la respuesta inmunitaria frente a la candidiasis. Los resultados sobre este tema publicados antes, después y en paralelo a los resultados de esta tesis doctoral serán discutidos en conjunto en la sección de Resultados y Discusión.

4. Inmunosenescencia

En los últimos años han empezado a conocerse los cambios asociados al proceso de envejecimiento que sufren los individuos ancianos en su sistema inmunitario, proceso conocido como inmunosenescencia. Existen cada vez más evidencias de que el sistema inmunitario se deteriora con la edad, provocando que este sistema en individuos ancianos sea menos eficaz en el desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada frente a una infección. Cuando se comenzó a estudiar el fenómeno de inmunosenescencia, muchos autores lo atribuyeron fundamentalmente a las disfunciones del sistema inmunitario adaptativo. Sin embargo, trabajos más recientes han demostrado que células del sistema inmunitario innato también presentan defectos y alteraciones en individuos de avanzada edad, lo que pone de manifiesto que tanto alteraciones del sistema inmunitario innato como adaptativo son importantes para explicar los cambios que sufren las personas ancianas en su inmunidad (Linton y Dorshkind, 2004; Plackett *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2005).

Diferentes observaciones clínicas indican que las personas ancianas son más propensas a sufrir enfermedades infecciosas severas, e incluso letales, por diversos patógenos, como infecciones del tracto respiratorio y urinario, endocarditis, septicemia y tuberculosis (Ginaldi *et al.*, 2001). También se ha descrito que existe una respuesta disminuida a ciertas vacunas y una mayor reactivación de virus latentes asociados a la edad (Effros, 2001). Además, en personas ancianas son más frecuentes manifestaciones clínicas atípicas de estas infecciones, así como una peor respuesta a los tratamientos antimicrobianos y una mortalidad más elevada (Ginaldi *et al.*, 2001).

La frecuencia de las infecciones por hongos oportunistas, como *C. albicans*, ha aumentado significativamente en los últimos años, especialmente en individuos ancianos. Algunas de las razones que pueden explicar este aumento, también válidas para otros tipos de infecciones, son que, como consecuencia de los avances médicos, cada vez más ancianos son sometidos a trasplantes de órganos y a otros procedimientos quirúrgicos, reciben quimioterapia anticancerosa o fármacos inmunosupresores para enfermedades no cancerosas, son sometidos a tratamientos masivos con antibióticos de amplio espectro, se les implantan catéteres intravenosos centrales y/o reciben nutrición parenteral total (posibles focos de infección) y en general sufren frecuentes y prolongadas estancias en hospitales (Kauffman, 2001), representando todas estas prácticas factores de riesgo para las

candidiasis. Además, es importante considerar que la población a nivel mundial evoluciona de forma que la proporción de ancianos aumenta progresivamente, por lo que dicho colectivo representa un porcentaje cada vez mayor.

A pesar de que las manifestaciones clínicas de las infecciones fúngicas en pacientes jóvenes y ancianos son muy similares, hay aspectos de algunas infecciones como las histoplasmosis, aspergilosis y criptococosis que son únicas en pacientes ancianos. También el tratamiento de las infecciones fúngicas es más problemático en ancianos debido fundamentalmente a otras patologías asociadas. El tratamiento de personas ancianas con anfotericina B, un antifúngico muy utilizado en clínica, es complicado debido a su nefrotoxicidad intrínseca. A pesar de que los azoles son menos tóxicos, deben ser empleados con precaución en personas de avanzada edad (Kauffman, 2001).

Las infecciones por distintas especies de *Candida* también han aumentado progresivamente en los últimos años entre la población anciana, habiendo importantes cambios en las especies de *Candida* que causan infecciones nosocomiales. A pesar de que *C. albicans* sigue siendo la principal especie causante de infecciones sistémicas, se ha documentado que otras especies del género *Candida* también causan estas fungemias. En algunos hospitales la proporción de fungemias debidas a *C. glabrata* es significativamente mayor entre pacientes de más de 60 años de edad. La edad avanzada está asociada con un aumento de la tasa de mortalidad entre los pacientes que sufren candidemias: en pacientes ancianos con diversas patologías y estancias hospitalarias prolongadas, las candidemias constituyen infecciones con mal pronóstico (Kauffman, 2001).

4.1. Inmunosenescencia del sistema inmunitario adquirido

La involución del timo y la disminución en el número de linfocitos T son los cambios más característicos que ocurren en el sistema inmunitario adquirido asociados con la avanzada edad. Sin embargo, cada vez existen más evidencias de que los efectos del envejecimiento son globales, implicando desde células madre hematopoyéticas y precursores linfoides hasta linfocitos maduros de órganos linfoides secundarios.

Hay evidencias de que la capacidad replicativa de las células madre hematopoyéticas disminuye con la edad, y también de que la edad afecta al potencial de diferenciación de estas células (Geiger y Van Zant, 2002). Diversos trabajos han demostrado que médula ósea completa o células madre hematopoyéticas purificadas a partir de ratones ancianos no generan eficazmente progenie linfoide. Estos datos se correlacionan con un número disminuido de progenitores linfoides en la médula ósea en ratones de más de 7 meses de edad, lo que sugiere que con la edad disminuye el potencial de las células madre hematopoyéticas de generar células diferenciadas hacia el linaje linfoide, aunque también es posible que sean los precursores linfoides los que tengan defectos en su capacidad proliferativa (Linton y Dorshkind, 2004).

Al igual que con los precursores linfoides, algunos trabajos muestran que el número de células pro-B (las células precursoras del linaje B más inmaduras) también está muy disminuido en ratones ancianos (aproximadamente un 90% de reducción en ratones de más de 20 meses de edad), aunque otros estudios muestran que no todos los ratones ancianos presentan esta disminución severa en la linfopoyesis de células B. Estas alteraciones podrían ser debidas a cambios en el microambiente que rodea a estas células hematopoyéticas, como por ejemplo una ineficiente secreción por células estromales de IL-7, una citocina necesaria para la diferenciación a célula B (Linton y Dorshkind, 2004). Como consecuencia de estas alteraciones en la linfopoyesis de células B, y posiblemente también de alteraciones en la respuesta de linfocitos B inmaduros a estímulos que provocan su salida de la médula ósea, se produce un cambio en la composición del repertorio de células B periféricas de ratones ancianos: la mayoría de células B de bazo son células B de memoria, cuando en ratones jóvenes la mayoría de linfocitos B presentan un estado inmaduro en este órgano. Esto tiene consecuencias en el desarrollo de la inmunidad humoral; por ejemplo, la duración de la respuesta humoral en individuos ancianos es relativamente más corta que en jóvenes, y las inmunoglobulinas producidas son menos protectoras porque se producen en menor medida y tienen menor afinidad (McGlauchlen y Vogel, 2003; Linton y Dorshkind, 2004).

Muchos de estos efectos en la inmunidad humoral pueden ser también consecuencia de defectos funcionales de las células B, como una menor expresión de moléculas coestimuladoras o defectos en la señalización a través del receptor BCR, o bien pueden ser debidos también a cambios asociados a la edad en células T CD4, ya que estas células son responsables de la activación de los linfocitos B.

El timo no contiene células madre endógenas capaces de autorenovarse ilimitadamente, por lo que periódicamente llegan precursores linfoides, e incluso células madre hematopoyéticas, desde la médula ósea para diferenciarse a linfocitos T CD4 y CD8 maduros. La involución del timo comienza en la pubertad y en individuos de mediana edad la mayoría del tejido parenquimal del timo ha sido reemplazado por tejido adiposo, aunque algo de tejido tímico funcional permanece hasta la sexta década de vida (Hsu *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el número de precursores intratímicos más inmaduros procedentes de la médula ósea no está disminuido en ratones ancianos y que conservan su potencial de diferenciación, pero que su maduración está bloqueada por defectos en el microambiente del timo, por lo que tanto en ratón como en humanos se producen y exportan menos linfocitos T a los órganos linfoides secundarios durante el envejecimiento, lo que tiene consecuencias negativas para el mantenimiento del repertorio de linfocitos T “naive” periféricos (Thoman, 1995). Unido a esta disminución en el número de linfocitos T “naive”, se produce un aumento del número de células T de memoria, causado por la exposición acumulativa a patógenos y a otros antígenos durante el envejecimiento, cuyo potencial de activación está además disminuido, lo que constituye una de las razones de la disminución de la inmunidad celular adquirida con la edad (Linton y Dorshkind, 2004).

Además, durante el envejecimiento se produce una disminución considerable en las respuestas mediadas por linfocitos T CD4 y CD8. Las células T CD4 “naive” de individuos ancianos secretan menos IL-2, lo que provoca una menor expresión de CD25 (IL-2R α) y por tanto, una menor proliferación y una diferenciación incompleta a células Th1 o Th2. Por otro lado, las células T CD4 de memoria producidas a partir de precursores linfoides de individuos ancianos producen menos citocinas que las de individuos jóvenes. La magnitud y la cinética de la respuesta citolítica de las células T CD8 están reducidas en individuos ancianos, lo que provoca una eliminación viral más retardada. Esto parece ser debido a un menor porcentaje de células T CD8 específicas de virus durante el pico de la infección primaria, ya que la actividad citolítica de las células parece estar conservada. A pesar del menor número de estas células T CD8 de memoria durante la infección primaria, se ha demostrado que la frecuencia de las células de memoria generadas se mantiene en el tiempo y su población se expande en respuesta a una infección secundaria, lo que indica que el mantenimiento y la reestimulación de células T CD8 de memoria es normal en individuos ancianos (Linton y Dorshkind, 2004).

4.2. Inmunosenescencia del sistema inmunitario innato

Aunque los cambios asociados a la edad en el sistema inmunitario adaptativo han sido ampliamente estudiados, actualmente también se empiezan a conocer en profundidad los cambios y alteraciones que produce el proceso de envejecimiento sobre células del sistema inmunitario innato. Se han descrito alteraciones en muchas de las funciones de los neutrófilos y de los macrófagos, alteraciones en el número y en las funciones de los eosinófilos y mastocitos y también en las células NK. Así, diferencias en el número y la función de múltiples tipos celulares, como también defectos en algunas vías de transducción de señal, contribuyen a una respuesta inmunitaria innata defectiva en individuos de avanzada edad. A continuación se detallarán las alteraciones más significativas asociadas al proceso de envejecimiento descritas en neutrófilos, macrófagos y células NK.

Neutrófilos

La gran mayoría de estudios sobre los efectos de la inmunosenescencia en neutrófilos se han realizado utilizando leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos purificados a partir de sangre de individuos jóvenes y ancianos, y concluyen que no existen diferencias asociadas a la edad en el número total de neutrófilos circulantes (Gomez *et al.*, 2008).

Algunos trabajos han demostrado que la quimiotaxis hacia el sitio de infección en neutrófilos procedentes de individuos ancianos esta reducida respecto a la de neutrófilos de individuos jóvenes (Fulop *et al.*, 2004), aunque diferentes ensayos *in vivo* con ratones muestran una mayor infiltración de neutrófilos, así como una mayor inflamación en el sitio de infección, en ratones ancianos (Gomez *et al.*, 2008). En individuos ancianos también se han descrito defectos en la activación de vías de transducción de señal implicadas en el rescate de los neutrófilos de la apoptosis espontánea, lo que provoca una mayor susceptibilidad de los neutrófilos ancianos a la apoptosis. Esto posiblemente puede ser una de las causas de las alteraciones en las respuestas inflamatorias durante el envejecimiento (Gomez *et al.*, 2008).

Los neutrófilos de individuos ancianos tienen una capacidad fagocítica disminuida respecto a la de neutrófilos de individuos jóvenes, y además el estallido respiratorio

también está alterado, aunque los resultados concretos varían según las condiciones experimentales, como el tiempo usado en cada análisis o el tipo de estímulo empleado (Fulop *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2008).

Estas alteraciones en la función de los neutrófilos de individuos ancianos podrían deberse a una disminución en la señalización intracelular, causada por una menor cantidad de Ca^{2+} intracelular, una reducción en la polimerización de la actina o una menor fosforilación de componentes de la vía de MAPK (Gomez *et al.*, 2008).

Macrófagos

Los macrófagos de individuos ancianos tienen afectadas muchas de sus funciones biológicas. El número de monocitos sanguíneos en individuos ancianos y jóvenes parece ser muy similar; sin embargo existe una importante disminución en el número de precursores de macrófagos y en el de macrófagos en la médula ósea de individuos de avanzada edad. Por el contrario, en ratón parece haber un incremento de la población de macrófagos en la médula ósea (Plowden *et al.*, 2004).

Mientras que algunos autores han encontrado deficiencias en la quimiotaxis y la capacidad fagocítica de macrófagos procedentes de personas y ratones ancianos, otros trabajos muestran resultados opuestos empleando macrófagos de ratas ancianas o incluso no han encontrado ninguna alteración asociada a la edad en estos procesos (Gomez *et al.*, 2008). Estas discrepancias pueden ser debidas al empleo de macrófagos de diferentes orígenes, con diferente estado de activación o, posiblemente, a las diferentes condiciones experimentales (Plowden *et al.*, 2004).

Se ha descrito que los macrófagos procedentes de ratones ancianos tienen disminuida la capacidad de presentación antigénica al compararla con la de macrófagos de ratones jóvenes, lo que puede estar asociado con una expresión disminuida de moléculas MHC II (Plowden *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2008).

Diversos estudios *in vitro* con macrófagos de ratones ancianos muestran una disminución significativa en la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 en respuesta al LPS (Renshaw *et al.*, 2002; Boehmer *et al.*, 2004; 2005; Chelvarajan *et al.*, 2005). Sin embargo, trabajos realizados con monocitos humanos presentaron resultados contradictorios: los niveles de las citocinas TNF- α , IL-6 y de las quimiocinas IL-8,

RANTES y MIP-2 eran superiores en monocitos de sangre periférica obtenidos de personas ancianas al compararlos con los obtenidos de donantes jóvenes, tras su estimulación *in vitro* con LPS (Gomez *et al.*, 2008). Además, estudios *in vivo* muestran que los individuos ancianos sanos presentan un estado inflamatorio basal (“inflamm-aging”) y también una respuesta inflamatoria más elevada que individuos jóvenes, tras una lesión o estímulo infeccioso, tanto en humanos como en modelos animales (Gomez *et al.*, 2008).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en humanos el proceso de selección de individuos ancianos es muy complejo, lo que podría explicar en parte las diferencias encontradas entre el modelo animal y los resultados con humanos. El protocolo SENIEUR (“Senior Europeans”) (Ligthart *et al.*, 1984) surgió como respuesta a los problemas de investigadores europeos para clasificar a individuos ancianos y la consiguiente comparación de resultados entre laboratorios. Los problemas surgían del hecho de que la mayoría de los pacientes de más de 65 años de edad sufren diferentes patologías, con el consiguiente tratamiento, lo que podía alterar al sistema inmunitario. Además, en los estudios inmunogeriátricos es necesario que únicamente se incluyan aquellos individuos cuyas enfermedades no alteren el “envejecimiento fisiológico” del sistema inmunitario. El protocolo SENIEUR establece criterios de admisión empleando una gran variedad de parámetros que definen un estado saludable, para así poder eliminar del estudio a individuos ancianos que no estén completamente sanos. Sin embargo, incluso con estos criterios es fácil pasar por alto, por ejemplo, síntomas iniciales de enfermedad. La naturaleza arbitraria y posiblemente insuficiente de algunos de los criterios de selección deberán ser analizados más en profundidad. En este contexto, Beharka y colaboradores (2001), utilizando individuos ancianos seleccionados según criterios más estrictos, no encuentran niveles superiores de IL-6 circulante en la sangre de estos individuos, al contrario que los resultados observados en trabajos que utilizan el protocolo SENIEUR. Por lo tanto, el estado inflamatorio ampliamente descrito en individuos ancianos podría ser consecuencia de enfermedades subyacentes a nivel sub-clínico (Gomez *et al.*, 2005; Trzonkowski *et al.*, 2008).

Células NK

Varios trabajos han estudiado los efectos del envejecimiento sobre el número y función de células NK en roedores y humanos, aunque los resultados son, en algunos casos, contradictorios. Sin embargo, en aquellos trabajos que aplican un criterio estricto de selección de donantes ancianos, se describe un incremento asociado a la edad en el número de células NK circulantes, pero también un ligero descenso en la capacidad citotóxica de estas células. Otros trabajos han descrito que las células NK de individuos ancianos presentan una ligera disminución de la capacidad de producción de IFN- γ y de proliferar en respuesta a IL-2 (Gomez *et al.*, 2008).

4.3. Inmunosenescencia y TLRs

Cuando se comenzó esta parte del trabajo de tesis doctoral, existía un número muy limitado de publicaciones que abordaban el posible efecto de la inmunosenescencia sobre la función y/o expresión de los receptores tipo Toll. Además, estos trabajos son en parte contradictorios, ya que no llegan a las mismas conclusiones en algunos aspectos.

Utilizando un modelo murino para evaluar la expresión de los TLRs asociados al envejecimiento, Renshaw y colaboradores (2002) estudiaron la expresión de distintos TLRs mediante RT-PCR en macrófagos obtenidos de ratones jóvenes y ancianos. Observaron que, en general, la expresión de todos los TLRs ensayados (TLR1-9) está disminuida en los ratones ancianos. Además también observaron que la expresión de TLR4 en la superficie de macrófagos de ratones ancianos está disminuida cuando se analiza por citometría de flujo. Esta menor expresión de TLRs en macrófagos de ratones ancianos se correlaciona con una menor producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en respuesta a diferentes ligandos de estos receptores, al compararlos con la de ratones jóvenes.

Sin embargo, en un trabajo posterior no se detectó una disminución en la expresión de TLR4 en la superficie de macrófagos procedentes de ratones ancianos (determinada por citometría de flujo), pero sí un defecto en la producción de IL-6 y TNF- α por macrófagos de ratones ancianos en respuesta a LPS, relacionado con una menor expresión de las

MAPKs p38 y JNK, implicadas en la vía de transducción de señal de TLR4 en respuesta a LPS (Boehmer *et al.*, 2004).

Posteriormente han sido publicados más trabajos que han abordado este tema, utilizando modelos murinos así como también células humanas, que han contribuido a tener una perspectiva más amplia acerca de cuales son los cambios, asociados al envejecimiento del sistema inmunitario, que afectan a la expresión y función de los receptores tipo Toll. Todos estos trabajos, junto con los obtenidos en esta parte de la presente tesis doctoral, serán comentados en conjunto en el Capítulo II de Resultados y Discusión.

Objetivos

De acuerdo con los antecedentes expuestos en la Introducción, los objetivos generales de esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Estudio de la implicación de los receptores TLR2 y TLR4 en el desarrollo de la respuesta inmunitaria del hospedador frente al hongo patógeno oportunista *Candida albicans*.

- 1.1. Análisis de la participación del receptor TLR4 en el desarrollo de la respuesta inmunitaria innata y adquirida frente a *C. albicans*.
- 1.2. Estudio de la implicación de los receptores TLR2 y TLR4 en la producción *in vitro* de citocinas frente a distintos estímulos fúngicos: análisis del efecto del método de inactivación del hongo.
- 1.3. Estudio de la participación de TLR2 y TLR4 de las células NK en la defensa del hospedador frente a las candidiasis.

2. Estudio de la expresión y función de los receptores TLR durante el envejecimiento: influencia en la respuesta inmunitaria frente a *Candida albicans*.

- 2.1. Análisis en modelo murino del efecto de la inmunosenescencia en el desarrollo de la respuesta inmunitaria innata y adquirida frente a *C. albicans*: participación de los receptores TLR.
- 2.2. Análisis del efecto de la inmunosenescencia humana en el desarrollo de la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans*: estudio de la expresión y función de los receptores TLR en células sanguíneas.

Material y Métodos

1. Cepas fúngicas utilizadas

Para la realización de este trabajo se han utilizado las siguientes cepas de *C. albicans*; la cepa *C. albicans* ATCC 26555, una cepa virulenta muy empleada en estudios con este hongo, y la cepa *C. albicans* PCA2, una cepa agerminativa de virulencia atenuada (De Bernardis *et al.*, 1993), cedida por el Dr. Cassone (Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia). También se han utilizado dos cepas de la especie *S. cerevisiae*; la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 (Emr *et al.*, 1983) y la cepa *S. cerevisiae* 1403.

2. Cepas de ratón utilizadas

En la presente tesis doctoral se han empleado las siguientes cepas consanguíneas de ratones: la cepa C57BL/6, la cepa C3H/HeJ, y su correspondiente cepa control C3H/HeN, y la cepa DBA/2J. Los ratones C57BL/6, C3H/HeN y C3H/HeJ fueron adquiridos en Harlan Ibérica (Barcelona, España), mientras que los ratones DBA/2J fueron adquiridos en Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Los ratones C3H/HeJ presentan una mutación espontánea en el gen que codifica para el receptor TLR4. Esta mutación provoca la transversión de una base (C→A) en el exón 3 del gen, causando la sustitución de una prolina por una histidina en el residuo 712 de la proteína. Esta sustitución causa la modificación del dominio citoplasmático del receptor TLR4, afectando negativamente a la transducción de señal, y provocando que el receptor no sea funcional en estos ratones. Los ratones DBA/2J tienen una delección de 2,4 kb en el extremo 3' del gen *Klr1l*, que codifica para la proteína CD94 en las células NK. Esta delección no impide la transcripción del gen, pero si la expresión en la superficie celular de la proteína, por lo que estos ratones son deficientes en el receptor CD94/NKG2A.

Se han utilizado ratones KO para dos receptores de tipo Toll: ratones TLR4^{-/-} y TLR2^{-/-}. Estos ratones fueron cedidos por el Dr. Akira (Universidad de Osaka, Osaka, Japón), y mantenidos en las instalaciones del Servicio de Producción Animal del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València.

También se han empleado ratones C57BL/6 ancianos, de entre 18 y 20 meses de edad. Estos ratones fueron adquiridos con 6 meses de edad en Harlan Ibérica y mantenidos en las instalaciones del Servicio de Producción Animal del SCSIE de la Universitat de València hasta que alcanzaron la edad adecuada para su uso.

Excepto en el caso de los ratones ancianos, se han utilizado ratones de 2-3 meses de edad para todos los experimentos. Todos los ensayos que incluían el manejo de ratones fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universitat de València.

3. Sangre humana: donantes

Se ha utilizado sangre completa de donantes sanos, jóvenes y ancianos. El grupo de donantes jóvenes incluyó voluntarios de edades comprendidas entre los 15 y 42 años, y el grupo de ancianos, donantes de entre 70 y 95 años. Los donantes fueron seleccionados de entre los pacientes de un ambulatorio (Centro de Atención Primaria Pintor Stolz, Conselleria de Sanitat, Valencia, España) y del colectivo de personal docente e investigador (PDI) y estudiantes de la Universitat de València. Todos los donantes dieron su consentimiento informado para su inclusión en el estudio. Únicamente se utilizó sangre de donantes sanos, para lo cual se tuvo en cuenta un criterio médico antes de incluir a un donante en el estudio; no se utilizó sangre de donantes con medicación antiinflamatoria o inmunosupresiva prescrita, que padecieran diabetes mellitus o alguna enfermedad inflamatoria crónica y/o que presentaran síntomas de una infección reciente. El médico encargado de seleccionar a los donantes y de recoger las muestras fue el Doctor José Murciano.

La sangre fue recogida por punción venosa utilizando jeringas tratadas con el anticoagulante heparina de litio (Sarstedt, Barcelona, España). En ambos grupos el número de muestras recogidas y analizadas fue de 50.

4. Medios de cultivo para cepas fúngicas

Medio YPD

Extracto de levadura	10 g
Triptona (Digerido pancreático de caseína)	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro
pH 6-7	
Agar bacteriológico (para medio sólido)	15 g

Medio sintético de Lee simplificado (Lee *et al.*, 1975)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
HK ₂ PO ₄ anhidro	2,5 g
NaCl	5 g
Glucosa	12,5 g
Prolina	0,5 g
Biotina	0,5 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro
pH 6,8 - 7	

Medio Agar Dextrosa Sabouraud

Dextrosa	40 g
Peptona de caseína	5 g
Digerido pancreático de tejido animal	5g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada c.s.p.	1 litro
pH 5,4 – 5,8	

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121° C durante 20 minutos. Además, en los casos en los que fue necesario, los medios fueron tratados para eliminar la endotoxina bacteriana (Lipopolisacárido o LPS). Para ello los medios fueron tratados con “Detoxi-Gel Endotoxin Removal Gel” (Pierce, Illinois, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho gel contiene Polimixina B inmovilizada que une el LPS, eliminándolo así de las soluciones. Además los medios fueron preparados en recipientes de plástico libre de endotoxina, utilizando agua estéril y libre de endotoxina

(Gibco, Barcelona, España). La ausencia de endotoxina fue comprobada utilizando el ensayo “E-toxate” (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

5. Medios de cultivo para células de ratón y humanas

Medio RPMI completo para macrófagos

RPMI 1640 con GlutaMAX™ I. (Gibco)	
Suero bovino fetal inactivado (FBS) (Gibco)	5%
Penicilina / Estreptomicina (Gibco)	100 U/ml / 100 µg/ml

Medio RPMI completo para esplenocitos

RPMI 1640 con GlutaMAX™ I. (Gibco)	
Suero bovino fetal inactivado (FBS) (Gibco)	10%
Penicilina / Estreptomicina (Gibco)	100 U/ml / 100 µg/ml

Medio RPMI completo para células NK

RPMI 1640 con GlutaMAX™ I. (Gibco)	
Suero bovino fetal inactivado (FBS) (Gibco)	10%
Penicilina / Estreptomicina (Gibco)	100 U/ml / 100 µg/ml

En algunos casos, indicados en el texto, se utilizó este mismo medio suplementado con alguna de las siguientes citocinas, todas adquiridas en Peprotech (Rocky Hill, New Jersey, USA):

Interleucina-2 (IL-2)	200U/ml
Interleucina-12 (IL-12)	5 ng/ml
Interleucina-15 (IL-15)	5 ng/ml

Medio RPMI completo para sangre humana

RPMI 1640 con GlutaMAX™ I. (Gibco)	
Penicilina / Estreptomicina (Gibco)	100 U/ml / 100 µg/ml
Heparina de sodio (Sigma-Aldrich)	2,5 U/ml

Todos los componentes de los distintos medios están libres de endotoxina y los medios completos fueron filtrados tras su preparación utilizando el sistema “Stericup-GP Filter Unit” (Millipore Ibérica, Madrid, España).

6. Preparación de estímulos fúngicos para ensayos *in vitro* e *in vivo*

Para la obtención de levaduras (*C. albicans* y *S. cerevisiae*) viables para ensayos *in vitro*, las células fueron cultivadas en medio YPD líquido libre de endotoxina, a 28° C con agitación hasta fase exponencial tardía de crecimiento (DO_{600nm} 0,6-0,8). El crecimiento celular se valoró midiendo la densidad óptica (DO) a 600nm en un espectrofotómetro Heλios (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Tras el cultivo, las células fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en el mismo volumen de agua libre de endotoxina y mantenidas durante 3 horas a 28° C con agitación (ayuno metabólico o estrés nutricional) y a continuación a 4° C en reposo durante 24 - 48 horas. Tras este tiempo las células fueron lavadas con agua libre de endotoxina y resuspendidas a la concentración adecuada en el medio de cultivo utilizado en cada ensayo. De esta misma manera se prepararon levaduras de las cepas de *C. albicans* ATCC 26555 y PCA2 para utilizarlas en los experimentos *in vivo* de candidiasis invasiva experimental y en los modelos de vacunación. En este caso, las células fueron resuspendidas para su inyección en tampón fosfato salino (PBS) (Gibco) a la concentración adecuada para cada experimento.

En los ensayos de estimulación *in vitro* de células de mamífero se utilizaron levaduras y micelios de la cepa *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por distintos tratamientos. La transición levadura micelio se realizó mediante un método utilizado habitualmente en nuestro laboratorio (Casanova *et al.*, 1989). En primer lugar se crecieron levaduras hasta fase exponencial tardía de crecimiento en medio YPD líquido libre de endotoxina a 28° C con agitación. Tras el cultivo, las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas con PBS, resuspendidas en el mismo volumen de agua libre de endotoxina y mantenidas durante 3 horas a 28° C con agitación (periodo de ayuno metabólico) y a continuación durante 48 horas a 4° C en reposo. Posteriormente, estas células se recogieron por centrifugación y se inocularon en medio de Lee (en un volumen 5 veces superior al utilizado en la incubación con agua) libre de endotoxina precalentado a

28° C o a 37° C. Los cultivos fueron incubados durante 3 horas con agitación a 28° C, para obtener levaduras, o a 37° C, para obtener micelios (aproximadamente el 90% de las células forman tubo germinativo después de 3 horas de inducción a 37° C). Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se determinó el número de células para realizar los tratamientos de inactivación. Las levaduras y micelios fueron inactivados por tres métodos distintos: por calor, por fijación química y por tratamiento con un antifúngico. Para la inactivación por calor las células se resuspendieron en PBS a una concentración de 20×10^6 células/ml y se mantuvieron en un baño termostático a 100° C durante 1 hora. En el caso de inactivación por fijación las células se resuspendieron a una concentración de 20×10^6 células/ml en tampón de fijación ("IC Fixation Buffer", eBioscience, San Diego, USA), que contiene paraformaldehído al 4%, y se mantuvieron en oscuridad y agitación durante 30 minutos. Por último para la inactivación por tratamiento con antifúngico, las células se resuspendieron en PBS a una concentración de 20×10^6 células/ml en presencia de 3 µg/ml de Anfotericina B (Gibco) durante 72 horas a temperatura ambiente y con agitación. La inactivación fue comprobada incubando 2×10^6 células de las distintas muestras en placas de medio Agar Dextrosa Sabouraud durante 48 horas a 28° C y verificando la ausencia de crecimiento colonial. En todos los casos, tras el tratamiento de inactivación, las células fueron lavadas dos veces con PBS, para eliminar el agente inactivante, se determinó la concentración celular mediante recuento microscópico (utilizando un microscopio Nikon ECLIPSE E800) y se guardaron en alícuotas en forma de sedimento seco a -80° C hasta su utilización.

Para determinados ensayos también se utilizaron levaduras inactivadas por calor de la cepa *C. albicans* PCA2 y de las cepas SEY2101 y 1403 de *S. cerevisiae*. En este caso las células fueron cultivadas, sometidas al periodo de reposo metabólico e inactivadas por calor de la forma previamente descrita.

Como controles, en los estudios de estimulación de células de mamífero *in vitro* se han utilizado LPS, agonista del receptor TLR4, y zimosán, agonista del receptor TLR2. El LPS utilizado fue lipopolisacárido de *Escherichia coli* O111:B4, adquirido en Sigma-Aldrich. El zimosán, partícula obtenida a partir de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae*, fue adquirido en Molecular Probes (Invitrogen, Barcelona, España).

7. Citómetro de flujo

El citómetro de flujo utilizado fue el modelo EPICS XL•MCL (Beckman Coulter, California, USA). Este citómetro está equipado con un laser de Argón, de 488 nm y 15 mW de potencia, y permite el análisis de seis parámetros distintos, gracias a los siguientes detectores:

1. Dos detectores de dispersión:

- Dispersión frontal (“Forward Scatter” o FS). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.
- Dispersión lateral (“Side Scatter” o SS). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.

2. Cuatro detectores de fluorescencia:

- FL1: permite la detección de la emisión de fluorescencia entre 505 nm y 545 nm.
- FL2: permite la detección de la emisión de fluorescencia entre 560 nm y 590 nm.
- FL3: permite la detección de la emisión de fluorescencia entre 605 nm y 635 nm.
- FL4: permite la detección de la emisión de fluorescencia entre 660 nm y 700 nm.

8. Modelo de infección invasiva experimental en ratón; curvas de supervivencia y modelo de vacunación

Para el estudio de la candidiasis sistémica se puso a punto un modelo de infección invasiva experimental en ratón. En todos los casos los ratones fueron infectados con levaduras viables por vía intravenosa (i.v.) a través del plexo retroorbital, utilizando agujas de un diámetro de 29G (0.33mm x 12.7mm), e inyectando las levaduras en un volumen de 0,2 ml de PBS. El estado de los ratones fue controlado diariamente, y las curvas de supervivencia fueron seguidas durante 21 días.

En el estudio de la candidiasis invasiva en ratones deficientes para el receptor TLR4 (TLR4^{-/-} y C3H/HeJ) se inyectaron 1×10^6 levaduras de la cepa *C. albicans* ATCC 26555 por ratón. En el caso de ratones TLR4^{-/-} y sus ratones control C57BL/6 se utilizaron 14

ratones por grupo, mientras que en el caso de los ratones C3H/HeJ y sus ratones control C3H/HeN se utilizaron lotes de 10 ratones.

En los estudios del efecto de la inmunosenescencia en el desarrollo de una candidiasis invasiva experimental, se infectaron ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos con $0,8 \times 10^6$ levaduras de la cepa *C. albicans* ATCC 26555 por ratón. El número de animales utilizados fue de 18 ratones por lote.

Los ensayos de vacunación de ratones ancianos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Romani y colaboradores (1991). Ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos fueron infectados con 1×10^6 levaduras de la cepa *C. albicans* PCA2. 15 días después de esta infección primaria ambos lotes de ratones fueron re infectados con 1×10^6 levaduras de la cepa virulenta *C. albicans* ATCC 26555 (infección secundaria). Como control se infectaron ratones jóvenes y ancianos, no vacunados previamente, con 1×10^6 levaduras de la cepa ATCC 26555. En todos los casos se utilizaron 10 ratones por lote.

9. Determinación del crecimiento fúngico en riñón tras una infección experimental

Debido a que el riñón es el órgano principalmente afectado en el modelo de candidiasis sistémica utilizado, se determinó el crecimiento de levaduras en este órgano tras la infección experimental con *C. albicans* ATCC 26555 en ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos. Para ello, se infectaron ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos con $0,8 \times 10^6$ levaduras por ratón, de manera idéntica a la realizada en las curvas de supervivencia. Tres y cinco días después de la infección se sacrificó, mediante dislocación cervical, un número adecuado de ratones de cada tipo (especificado en cada ensayo en el apartado de Resultados) y se extrajo uno de los riñones de cada animal. La manipulación se realizó asépticamente en el interior de una cabina de flujo laminar y utilizando material quirúrgico estéril. Tras determinar el peso del órgano, este se disgregó mecánicamente obteniéndose un homogenado del órgano en PBS, del que se realizaron diluciones seriadas en agua. A continuación, y por duplicado, se inoculó un volumen de 0,1 ml de cada dilución en placas de Agar Dextrosa Sabouraud y estas se incubaron durante 24 horas a 37° C para permitir el crecimiento fúngico. Tras este tiempo se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en cada placa y se calculó el número de UFC por gramo de riñón.

10. Aislamiento y cultivo *in vitro* de macrófagos peritoneales residentes

La obtención de macrófagos peritoneales residentes se realizó a partir de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, C3H/HeN y C3H/HeJ. El sacrificio del animal se realizó mediante dislocación cervical y toda la manipulación se realizó en condiciones de esterilidad, dentro de una cabina de flujo laminar y utilizando material quirúrgico estéril. El animal, previamente bañado con alcohol de 70°, se colocó sobre una tabla de disección y se inyectaron 10 ml de medio RPMI completo en la cavidad peritoneal (imagen 1). A continuación se masajeó el abdomen del ratón para distribuir bien el medio de cultivo y se realizó un corte longitudinal superficial de la piel de la zona ventral del animal (imagen 2) separándose la piel para obtener una bolsa estéril (imagen 3). Una vez separada la piel del peritoneo con unas pinzas estériles, se realizó un pequeño corte en el peritoneo del animal para recuperar el medio inyectado previamente. El medio retenido en la bolsa estéril de piel, que contenía las células peritoneales, fue recogido con una jeringa de 10 ml estéril sin emplear aguja (imagen 4), se trasvasó a un tubo falcon estéril de 15 ml y se centrifugó a 450 g y 4° C durante 10 minutos. Las células obtenidas se cuantificaron por recuento microscópico y se resuspendieron a la concentración adecuada en medio RPMI completo. Para evitar la adhesión de las células al plástico todo el proceso se realizó en frío, utilizando medio de cultivo a 4° C y manteniendo las células en hielo o a 4° C. Esta forma de obtener las células peritoneales permite obtener los macrófagos totalmente en reposo, ya que no se somete a las células a ningún tipo de estrés; las células se recuperan en medio de cultivo con suero y no se someten al paso a presión a través de agujas de bajo calibre.

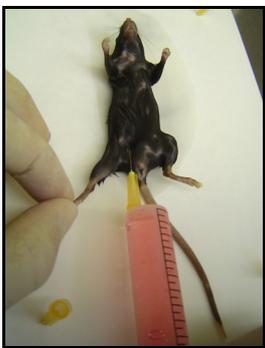


Imagen 1



Imagen 2



Imagen 3

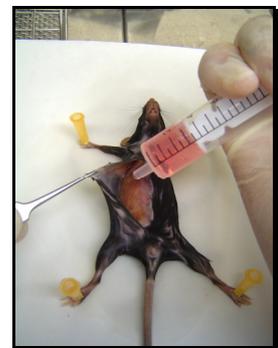


Imagen 4

Para los ensayos de producción *in vitro* de citocinas, los macrófagos fueron incubados durante 72 horas a 37° C y con una atmósfera al 5% CO₂, a una concentración de 0,23 x 10⁶ células en 0,2 ml de medio de cultivo por pocillo, en placas de cultivo de 96 pocillos. Tras las primeras 24 horas de incubación se cambió el medio de cultivo, y tras las 72 horas se cambió el medio de cultivo de nuevo y se añadieron los estímulos correspondientes durante 24 horas más. Los estímulos empleados en cada ensayo, así como las concentraciones utilizadas, se detallarán posteriormente en el apartado de Resultados y Discusión.

En todos los casos, tras la estimulación de las células, se recogió el medio de cultivo de cada muestra y se centrifugó a 16000 g durante 5 minutos para eliminar cualquier resto celular. Estos sobrenadantes libres de células se mantuvieron a -80° C hasta su análisis. En el caso de ser necesario su análisis en varios días se realizaron distintas alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación.

11. Aislamiento y cultivo *in vitro* de esplenocitos

Las células totales presentes en el bazo de ratón (esplenocitos) fueron obtenidos a partir de ratones sin infectar, de ratones infectados con 0,4 x 10⁶ levaduras de la cepa de *C. albicans* PCA2 o de ratones infectados con 0,4 x 10⁶ levaduras de la cepa de *C. albicans* ATCC 26555, a distintos días post-infección.

Para obtener los esplenocitos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y el bazo fue obtenido asépticamente en el interior de una cabina de flujo laminar y utilizando instrumental quirúrgico estéril. Una vez obtenido el órgano, éste fue disgregado utilizando Colagenasa D (“Collagenase D from *Clostridium histolyticum*”, Roche Applied Science, Barcelona, España). Para ello el bazo se colocó en un pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos, se cubrió con 5 ml de un tampón que contenía la enzima (véase la composición más abajo) y se inyectó este tampón en el órgano utilizando una aguja de 25G (0.5mm x 16mm) de diámetro. A continuación se cortó el órgano en fragmentos pequeños, que se machacaron utilizando el embolo de una jeringa estéril, y la placa se incubó a 37° C y 5% de CO₂ durante 15 minutos. Tras este tiempo el material fue recogido y filtrado a través de una gasa estéril para eliminar los restos de tejido y se

recogieron las células por centrifugación del filtrado. A continuación, las células fueron lavadas con PBS, cuantificadas por recuento microscópico y resuspendidas en medio RPMI completo a la concentración adecuada. Todo este proceso fue realizado en frío, utilizando tampones a 4° C y manteniendo las células a 4° C o en hielo. Los esplenocitos fueron cultivados durante 48 horas a 37° C y 5% de CO₂ en medio RPMI completo a una concentración de 10 x 10⁶ células en 1 ml por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos. En el caso de esplenocitos obtenidos a partir de ratones previamente infectados, al medio se añadieron 2,5 µg/ml de Anfotericina B, para evitar el crecimiento fúngico en el medio de cultivo. Los estímulos utilizados en cada caso (véase el apartado de Resultados y Discusión) fueron añadidos a tiempo 0.

Tampón utilizado para el tratamiento con Colagenasa:

10mM Hepes	
150 mM NaCl	
5 mM KCl	
1 mM MgCl ₂	
1,8 mM CaCl ₂	
Suero bovino fetal	5%
Colagenasa D	0,5 mg/ml
pH 7,4	

Tras su preparación el tampón fue filtrado y tratado para eliminar la endotoxina bacteriana como se ha descrito previamente (véase punto 4).

12. Reclutamiento a la cavidad peritoneal de macrófagos y neutrófilos

El reclutamiento de células fagocíticas a la cavidad peritoneal fue estudiado como se detalla a continuación. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 10 x 10⁶ levaduras de la cepa *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor. A distintos tiempos tras la inyección se recogieron las células de la cavidad peritoneal como se ha descrito en el punto 10.

Para obtener neutrófilos las células fueron recogidas 4 horas tras la inyección, ya que a este tiempo se produce la máxima llegada de estas células a la cavidad peritoneal. Los

neutrófilos fueron utilizados en ensayos de determinación de su capacidad fungicida. Para obtener macrófagos reclutados las células se recogieron 72 horas después de la inyección y se utilizaron en ensayos de cuantificación de su capacidad fungicida. El número total de células reclutadas fue determinado por recuento microscópico y el porcentaje de neutrófilos y de macrófagos reclutados obtenidos se determinó por citometría de flujo utilizando los anticuerpos monoclonales que se detallarán más adelante (véase página. 93; Tabla 1).

13. Purificación mediante selección inmunomagnética y cultivo *in vitro* de distintos tipos celulares

La purificación de distintos tipos celulares se realizó mediante selección inmunomagnética, utilizando en todos los casos productos de la casa comercial Miltenyi Biotec (Madrid, España). El fundamento de esta técnica es la utilización de anticuerpos monoclonales específicos de distintos tipos celulares que tienen unidas microesferas magnéticas (MicroBeads). Las células marcadas magnéticamente se separan en una columna situada en un imán que genera un campo magnético muy potente; las células marcadas son retenidas en la columna mientras que las células no marcadas pasan a través de ella. Las células retenidas pueden ser posteriormente eluidas de la columna tras separar ésta del imán. En cada caso se siguieron las instrucciones del fabricante y se utilizaron en cada purificación las columnas de selección y/o depleción adecuadas según la concentración celular.

La purificación de células NK se realizó a partir de bazo de ratones C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} y DBA2/J. En primer lugar, una vez obtenidos los esplenocitos, tal como se ha descrito en el punto 11, se realizó una depleción de células T, ya que una pequeña subpoblación de estas células (CD4⁺CD3⁺ TCR α/β ⁺) expresa el marcador CD49b de células NK, empleado en la purificación de estas células. Para esta depleción se utilizó el anticuerpo CD90.2 (Th1.2) conjugado con MicroBeads. Tras la depleción se realizó una selección positiva utilizando el anticuerpo CD49b (DX5) conjugado con MicroBeads. Tras el proceso se comprobó mediante citometría de flujo la pureza de las células CD90⁻ DX5⁺ obtenidas utilizando simultáneamente dos anticuerpos monoclonales, un anticuerpo anti-

NK1.1 y un anti-CD3, cuyas características se detallarán posteriormente (Tabla 1). Este método permitió comprobar que se había purificado una población homogénea, donde no se detectan linfocitos T y el porcentaje de células NK viables era superior al 80%. A continuación estas células fueron puestas en cultivo en medio RPMI completo, a una concentración de $1,2 \times 10^6$ células/ml utilizando 0,2 ml por pocillo y placas de cultivo de 96 pocillos, durante 48 horas a 37°C y 5% CO_2 . Al medio de cultivo se añadieron previamente las distintas citocinas en los casos en que se requería, y a tiempo 0 se añadieron los distintos estímulos.

La purificación de macrófagos de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos se realizó a partir de células peritoneales residentes y células reclutadas a la cavidad peritoneal, obtenidas como se ha descrito previamente. Estas células se purificaron mediante un único paso de selección positiva utilizando el anticuerpo CD11b (Mac-1) conjugado con MicroBeads. La pureza de las células obtenidas fue comprobada por citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD11b (véase Tabla 1). Los macrófagos purificados fueron puestos en cultivo en las condiciones descritas anteriormente para ensayos de producción *in vitro* de citocinas, o fueron utilizados para analizar su capacidad fungicida.

Neutrófilos de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos fueron purificados a partir de células reclutadas a la cavidad peritoneal, y también a partir de células de médula ósea. La médula ósea se obtuvo lavando con PBS las tibias y fémures, utilizando agujas de un diámetro de 25G (0.5mm x 16mm). La purificación se realizó mediante selección positiva utilizando los anticuerpos anti-Ly-6G-Biotina y anti-Biotina conjugado con Microbeads y se comprobó la calidad de la purificación mediante citometría de flujo empleando el anticuerpo monoclonal anti-Ly6G (véase Tabla 1). Tras la purificación estas células fueron utilizadas en ensayos de cuantificación de su capacidad fungicida.

14. Determinación de la capacidad fungicida de distintos tipos celulares de ratón y de células sanguíneas humanas

El análisis de la capacidad fungicida de fagocitos procedentes de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos se realizó en las siguientes poblaciones celulares:

- Neutrófilos Ly6G⁺ purificados a partir de médula ósea.
- Células totales reclutadas a la cavidad peritoneal 4 horas post-inyección (mayoritariamente neutrófilos).
- Neutrófilos Ly6G⁺ purificados a partir de células reclutadas a la cavidad peritoneal 4 horas post-inyección.
- Células totales reclutadas a la cavidad peritoneal 72 horas post-inyección (mayoritariamente macrófagos).
- Macrófagos CD11b⁺ purificados a partir de células reclutadas a la cavidad peritoneal 72 horas post-inyección.
- Macrófagos CD11b⁺ purificados a partir de células residentes de la cavidad peritoneal.
- Células residentes de la cavidad peritoneal deplecionadas en macrófagos CD11b⁺.

Una vez obtenidos los distintos tipos celulares 1×10^6 células de cada una de estas poblaciones fueron cocultivadas con $0,5 \times 10^6$ levaduras de la cepa *C. albicans* PCA2 en un volumen total de 0,2 ml de medio de cultivo RPMI completo a 37° C y 5% de CO₂. El tiempo de cocultivo fue de 2 horas en el caso de neutrófilos y de 4 horas en el caso de macrófagos. Como control, para monitorizar el crecimiento del hongo, se inocularon $0,5 \times 10^6$ levaduras en 0,2 ml de medio de cultivo sin fagocitos. Tras el cocultivo, las muestras fueron diluidas en agua estéril para lisar las células de mamífero, se realizaron diluciones seriadas y 0,1 ml de cada dilución fueron sembrados por duplicado en placas de Agar Dextrosa Sabouraud. Estas placas se incubaron durante 24 horas a 37° C y tras este tiempo se realizó el recuento de UFC en cada placa. El porcentaje de muerte de levaduras por fagocitos se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ muerte} = [1 - ((\text{UFC de la muestra (t=2 o 4 h)} / (\text{UFC del control (t = 2 o 4 h)}))] \times 100$$

Se eligió la cepa de *C. albicans* PCA2 ya que las cepas germinativas desarrollan la forma micelial durante el cocultivo con las células de mamífero, lo que dificultaba y falseaba el posterior recuento de UFC en placa.

Para el estudio de la capacidad fungicida de células sanguíneas humanas, 0,1 ml de sangre completa de cada donante se cocultivaron durante 1 hora, a 37° C y 5% CO₂, con 0,5 x 10⁶ levaduras de la cepa *C. albicans* ATCC 26555. Este número de levaduras corresponde, en individuos con un recuento leucocitario normal, a una ratio 1:1 (levadura : leucocito). Además también se realizó el mismo cocultivo utilizando 0,1 ml de plasma de cada donante para monitorizar el crecimiento del hongo en presencia de anticuerpos, factores del complemento y otros factores presentes en el plasma. El plasma se obtuvo centrifugando la sangre durante 5 minutos a 3000 g. A tiempo 0 y a tiempo 1 hora, se tomó una alícuota de cada muestra, se diluyó en agua y se inocularon, por duplicado, 0,1 ml de cada una de las distintas diluciones seriadas de cada muestra en placas de Agar Dextrosa Sabouraud. Tras incubar durante 24 horas a 37° C se determinó el número de UFC en cada placa. El porcentaje de supervivencia del hongo en presencia de células sanguíneas y el porcentaje de muerte de levaduras por las células sanguíneas se determinó de la siguiente manera:

$$\underline{\% \text{ UFC en sangre} = [\text{UFC en sangre (1 h)} / \text{UFC en sangre (0h)}] \times 100}$$

$$\underline{\% \text{ UFC en plasma} = [\text{UFC en plasma (1 h)} / \text{UFC en plasma (0h)}] \times 100}$$

$$\underline{\% \text{ supervivencia} = (\% \text{ UFC en sangre} / \% \text{ UFC en plasma}) \times 100}$$

$$\underline{\% \text{ muerte} = 100 - \% \text{ supervivencia}}$$

15. Cultivo y estimulación de sangre humana completa: determinación de la producción *in vitro* de citocinas mediante CBA

La sangre completa de cada donante fue diluida 1:5 (sangre : medio de cultivo) en medio RPMI completo (punto 5) hasta un volumen final de 0,2 ml por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron los distintos estímulos a las muestras y estas fueron incubadas durante 24 horas a 37° C y 5% de CO₂.

Tras la estimulación de las células sanguíneas, se determinó la producción de distintas citocinas en los sobrenadantes libres de células de los cultivos por citometría de flujo mediante la técnica CBA “Cytometric Bead Array” (BD Biosciences, San Diego, USA), utilizando el “kit” “Human Inflammation Kit”, que permite la determinación de las siguientes citocinas: IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12p70. El ensayo y el análisis de los datos obtenidos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El fundamento de esta técnica es la utilización de seis poblaciones de microesferas idénticas entre si en cuanto a tamaño y complejidad, pero cada una con distinta intensidad de fluorescencia cuando se resuelven en el canal FL4 del citómetro de flujo y tapizadas con anticuerpos de captura específicos para IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α o IL-12p70. Todos los componentes del ensayo [las esferas de captura, estándares recombinantes de las citocinas o las muestras a analizar y anticuerpos de detección específicos para las distintas citocinas marcados con ficoeritrina (PE)] son incubados conjuntamente para formar complejos sándwich. La cantidad de cada citocina presente en la muestra se determina midiendo la intensidad de fluorescencia de la PE del anticuerpo de detección, medido en el canal FL2, e interpolando posteriormente en las curvas patrón obtenidas para cada citocina. En la figura 1 se muestran histogramas típicos del análisis por citometría:

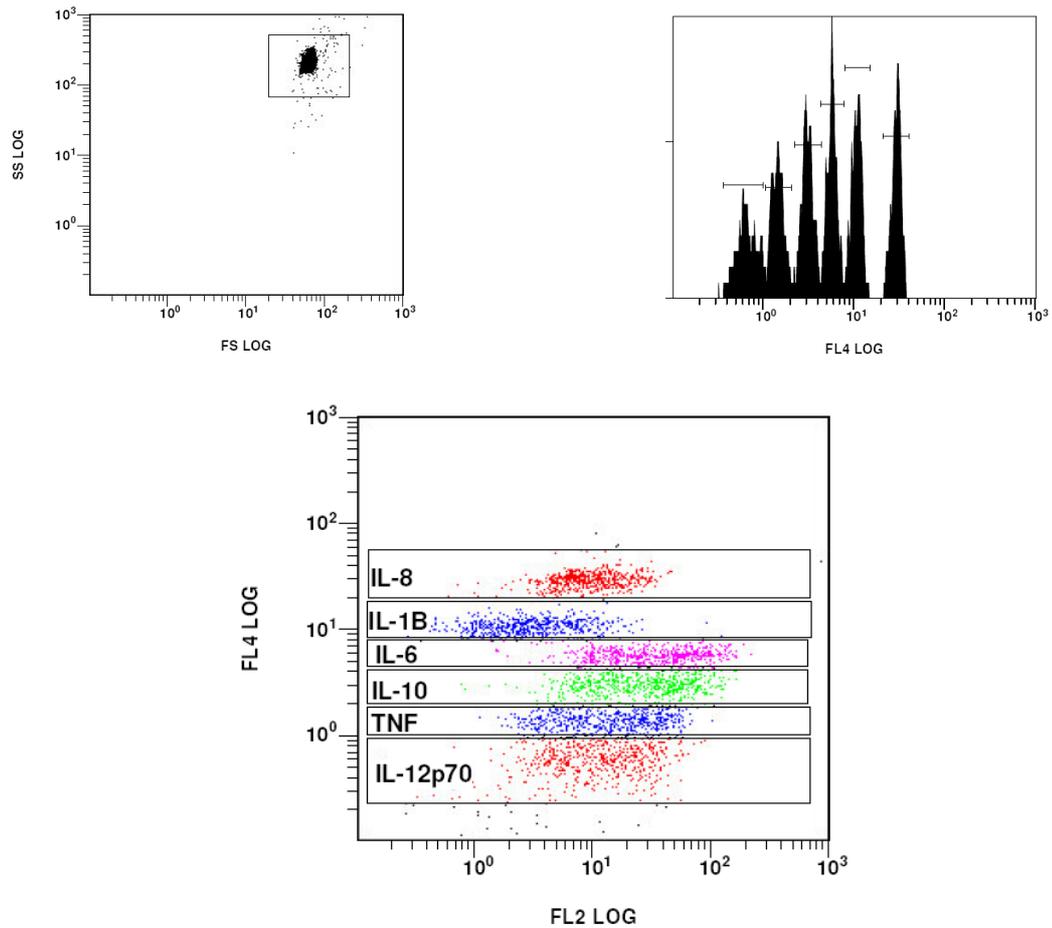


Fig 1. Histogramas obtenidos en el análisis por citometría de flujo de muestras procesadas mediante la técnica CBA. En el histograma superior izquierdo se muestra el análisis por tamaño y complejidad (“Forward” y “Side scatter”) de las microesferas. En el histograma superior derecho se analiza la fluorescencia de las distintas poblaciones de esferas en el canal FL4. En el histograma biparamétrico de la parte inferior podemos ver la fluorescencia de las poblaciones de esferas en el canal FL4 (eje y) y la intensidad del anticuerpo de detección marcado con PE medido en el canal FL2 (eje x).

16. Determinación mediante ELISA de la producción *in vitro* de citocinas, quimiocinas y prostaglandinas por distintos tipos celulares

Se determinaron mediante la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) los niveles de la citocina proinflamatoria TNF- α en los sobrenadantes libres de células de los cultivos de (i) macrófagos residentes peritoneales de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, C3H/HeN y C3H/HeJ, (ii) de macrófagos residentes peritoneales purificados (CD11b⁺) de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos, (iii) de esplenocitos de ratones C57BL/6, TLR4^{-/-}, C3H/HeN y C3H/HeJ y (iv) en los homogenados de riñón de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos. Los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β , de la citocina antiinflamatoria IL-10 y de la quimiocina MIP-2, se determinaron en los sobrenadantes libres de células de los cultivos de macrófagos residentes peritoneales purificados (CD11b⁺) de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos. También se determinaron los niveles de la citocina IFN- γ en los sobrenadantes libres de células de los cultivos de esplenocitos de ratones, infectados con *C. albicans*, C57BL/6 jóvenes y ancianos, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, C3H/HeN y C3H/HeJ, y en los sobrenadantes libres de células de los cultivos de células NK purificadas a partir de ratones C57BL/6, DBA/2J, TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-}. Los niveles de la citocina proinflamatoria IL-12p70 fueron determinados en sobrenadantes libres de células de cultivos de esplenocitos de ratones C57BL/6 y TLR4^{-/-} infectados con *C. albicans*. En los sobrenadantes libres de células de los cultivos de sangre humana completa se determinaron los niveles de la prostaglandina E₂ (PGE₂).

La medida por ELISA de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IFN- γ e IL-12p70 se realizó utilizando “kits” comerciales de eBioscience. El “kit” utilizado para la medida de MIP-2 fue de la casa comercial Peprotech y el utilizado para la medida de PGE₂ fue de la casa comercial Assay Designs (Michigan, USA). En todos los casos los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

17. Determinación mediante citometría de flujo del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ

Para la determinación del porcentaje de linfocitos TCD4⁺ productores de la citocina IFN- γ se utilizó el “kit” comercial “Mouse IFN- γ secretion assay detection kit” (Miltenyi Biotec), cuya metodología se detalla a continuación.

En primer lugar se obtuvieron esplenocitos de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos, TLR4-/-, C3H/HeN y C3H/HeJ infectados durante diferentes días con la cepa *C. albicans* ATCC 26555 o con la cepa *C. albicans* PCA2. Una vez obtenidas, las células fueron puestas en cultivo, como se ha descrito previamente, y reestimuladas *in vitro* durante 18 horas con levaduras y micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor. Como control, se utilizó una muestra de esplenocitos sin reestimar. Tras este tiempo se eliminó el sobrenadante, para eliminar el IFN- γ secretado al medio, y las células fueron recogidas y lavadas varias veces con PBS para eliminar totalmente los restos de IFN- γ . A continuación, las células fueron incubadas con un reactivo bifuncional, que por un lado se une a la superficie celular y por otro lado es capaz de captar el IFN- γ a medida que las células lo van secretando. Una vez que las células tuvieron unido este reactivo, se incubaron en agitación con medio de cultivo RPMI completo durante 45 minutos a 37° C y 5% CO₂. De esta manera comienza la producción de IFN- γ por las células capaces de hacerlo, y la citocina se une al reactivo bifuncional unido a la célula que la está secretando. Tras la incubación se realizaron varios lavados con PBS para eliminar cualquier resto de citocina libre y se realizó el marcaje con el anticuerpo de detección anti-IFN- γ conjugado con PE. Además se realizó el marcaje con dos anticuerpos monoclonales, anti-CD3-PE-Cy5 y anti-CD4-FITC (anti-CD4-fluoresceína), para poder seleccionar los linfocitos TCD4⁺ en el citómetro de flujo. Todo el proceso, excepto la incubación de 45 minutos a 37° C, se realizó utilizando PBS frío y manteniendo las células en hielo o a 4° C para evitar la secreción de IFN- γ de manera continua.

Tras el lavado de las células con PBS se procedió a su análisis por citometría de flujo. En primer lugar se seleccionaron las células CD3⁺ (PE-Cy5⁺), y de las células CD3⁺ se seleccionaron las células CD4⁺ (FITC⁺). En estas células doble positivas se determinó el porcentaje de células productoras de IFN- γ (células PE⁺) respecto al total.

18. Determinación de la proliferación celular

Para monitorizar la proliferación de las células NK durante el cocultivo de éstas con los estímulos fúngicos se utilizó el “kit” comercial “BrdU labeling and detection kit III” (Roche Applied Science). Las células NK purificadas a partir de ratones C57BL/6 fueron puestas en cultivo durante 48 horas a 37° C y 5% CO₂, a una concentración de 0,2 x 10⁶ células en 0,2 ml de medio RPMI completo, en presencia de IL-2 y los correspondientes estímulos. Tras el cultivo se realizó un pulso de BrdU (5-bromo-2'-deoxi-uridina) durante 16 horas más. Tras este tiempo las células fueron lavadas, fijadas, permeabilizadas y tratadas con endonucleasas para digerir el DNA y que la BrdU incorporada pudiera quedar expuesta, y se realizó el marcaje con un anticuerpo específico de BrdU conjugado con peroxidasa, todo realizado según las instrucciones del fabricante. El revelado se realizó utilizando un sustrato de la peroxidasa, cuyo producto es coloreado, y midiendo la DO de las muestras a 405nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific). La proliferación se determinó comparando la DO a 405nm de las muestras de células estimuladas frente a la DO a 405nm de muestras control sin estimular.

19. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie y de receptores Toll en células de ratón

Para medir los niveles de expresión de diferentes marcadores de superficie en distintos tipos celulares de ratón, se marcaron las células con anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo. Previamente al marcaje, las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4° C con suero de ratón (Sigma-Aldrich) al 10% en PBS para saturar los sitios de unión a los receptores Fc de las inmunoglobulinas. Tras lavar las células con 1 ml de PBS, se realizó el marcaje utilizando 0,2 x 10⁶ células en 0,1 ml de PBS y la concentración de anticuerpo recomendada por el fabricante. Tras 20 minutos a 4° C y oscuridad, las células fueron lavadas y resuspendidas en 0,4 ml de PBS para la determinación por citometría de flujo del porcentaje de células positivas y/o la intensidad de fluorescencia. En todos los marcajes, para cada anticuerpo utilizado, se realizó el marcaje con su correspondiente isotipo control.

A continuación se detallan las principales características de los distintos anticuerpos utilizados en este trabajo (Tabla 1).

Tabla 1

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial	Células que reconoce	Ensayo
F4/80	FITC y PE	BM8	eBioscience (San Diego, USA)	Macrófago maduro	Reclutamiento y marcaje de células peritoneales
CD11b	PE	M1/70	eBioscience	Macrófagos, células NK, granulocitos y linfocitos T activados	Control de purificación de macrófagos
Ly6G (Gr1)	FITC y PE	RB6-8C5	eBioscience	Neutrófilo maduro	Reclutamiento, marcaje de células peritoneales y control de purificación de neutrófilos
NK1.1	FITC	PK136	BD Pharmingen (San Diego, USA)	Células NK	Control de purificación de células NK
CD3	PE-Cy5	145-2C11	BD Pharmingen	Linfocitos T	Control de purificación de células NK y ensayo de producción de IFN- γ
CD4	FITC	RM4-5	BD Pharmingen	Linfocitos T	Ensayo de producción de IFN- γ
MHC II	FITC	M5/114.15.2	eBioscience	Linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas.	Marcaje de células peritoneales
TLR2	PE	6C2	eBioscience	Distintos tipos celulares	Marcaje de macrófagos peritoneales

20. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de receptores Toll en células sanguíneas humanas

Para la determinación de los niveles de distintos receptores Toll en la superficie de células sanguíneas humanas, 0,1 ml de sangre de cada donante fueron incubados con 5 μ l de los siguientes anticuerpos: anti-TLR2-FITC (clon TL2.1; Immunok, AMS Biotechnology Ltd, UK), anti-TLR4-FITC (clon HTA 125; Immunok), anti-TLR6-FITC (clon 86B1153.2; Immunok) o sus respectivos anticuerpos isotipo control (Immunok). Tras una incubación de 20 minutos a 4° C y en oscuridad, las muestras fueron tratadas con dos tampones consecutivos para la lisis de eritrocitos y la fijación de las células (“ImmunoPrep Reagent System”, Beckman Coulter) utilizando el sistema automatizado “Epics Immunology Workstation” (Beckman Coulter).

Para el análisis de las muestras por citometría de flujo se seleccionaron las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos por sus características de dispersión frontal y lateral de luz (“forward y side scatter”) y se determinó la intensidad de fluorescencia de cada muestra en cada una de las poblaciones. Se utilizaron “Flow-Set Fluorospheres” (Beckman Coulter) para estandarizar la intensidad de fluorescencia, y así evitar las variaciones día-día.

21. Determinación semi-cuantitativa mediante ELISA de los niveles de anticuerpos específicos frente a *C. albicans* en plasma de donantes humanos

En primer lugar, para obtener extractos fúngicos, se prepararon levaduras y micelios de la cepa ATCC 26555 como se ha descrito anteriormente (punto 6), y a continuación las células (aproximadamente 2×10^9 células) se resuspendieron en 4 ml de PBS suplementado con 1% de DTT (Ditiotreitol, Sigma-Aldrich) y 1% de SDS (dodecilsulfato sódico, Sigma-Aldrich) y se incubaron en un baño termostático a 100° C durante 5 minutos. Tras el tratamiento térmico se centrifugaron las suspensiones a 16000 g durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se filtraron a través de un filtro estéril de 0,22 μ m. La cantidad de proteína en el filtrado se cuantificó por el método de Bradford.

Para la determinación de los niveles de anticuerpos frente a *C. albicans* en el plasma de donantes, se tapizaron placas ELISA (Nunc, Thermo Fisher Scientific) con 5 µg de extracto soluble de levadura o de extracto soluble de micelio por pocillo, en 50 µl de tampón carbonato (Carbonato de sodio 60 mM, pH 9,6) y se incubaron toda la noche a 4° C. Tras la incubación, los pocillos fueron lavados con PBS suplementado con 0,05% de Tween 20 (tampón de lavado) y se añadieron 100 µl por pocillo de PBS suplementado con 1% BSA (seroalbúmina bovina, Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente (etapa de bloqueo). A continuación, tras tres lavados de los pocillos, se añadieron 50 µl/pocillo de distintas diluciones del plasma de cada donante en PBS suplementado con 0,01% de Tween 20 y 0,1% de BSA, incubándose a 37° C durante 2 h. Posteriormente, tras otros tres lavados, se añadieron 50 µl/pocillo de una dilución 1/10000 (en PBS + 0,01% Tween 20 + 0,1% de BSA) del anticuerpo de detección anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron a continuación 7 lavados y se determinó la absorbancia a 450nm tras la adición del sustrato de la peroxidasa TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina, eBioscience) utilizando un lector de placas Multiskan EX.

22. Determinación semi-cuantitativa mediante citometría de flujo de los niveles de anticuerpos específicos frente a *C. albicans* en plasma de donantes humanos

La determinación de los niveles de anticuerpos específicos frente a antígenos superficiales de *C. albicans* en el plasma de los donantes se determinó por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y análisis por citometría de flujo.

Para ello se incubaron, durante 1 hora a 37° C, 1×10^6 levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por fijación con una dilución 1:100 del plasma de cada donante en un volumen final de 0,1 ml de PBS. Tras la incubación, las células fueron lavadas tres veces con PBS, se incubaron con 0,1 ml de una dilución 1:100 en PBS del anticuerpo específico anti-IgG humana conjugada con FITC (Sigma), durante 1 hora a 37° C. Las células fueron entonces lavadas tres veces con PBS y se determinó por citometría de flujo el porcentaje de levaduras marcadas y la intensidad de fluorescencia en cada muestra.

23. Análisis mediante “Western Immunoblotting” de los anticuerpos específicos frente a *C. albicans* presentes en el suero de ratones infectados

Ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos se inmunizaron con la cepa de *C. albicans* PCA2 y se re infectaron con la cepa ATCC 26555, como se ha descrito previamente (punto 8). 14 días tras la infección secundaria se extrajo sangre de estos ratones por punción intracardiaca utilizando agujas de un diámetro de 21G (0.8mm x 25mm) y jeringas estériles. Tras la coagulación de la sangre se recuperó el suero por centrifugación. De la misma manera se obtuvo suero preinmune control de ratones no infectados.

El análisis de los anticuerpos específicos frente a *C. albicans* en el suero se realizó mediante “Western Immunoblotting”. Los extractos antigénicos de levaduras y micelios de *C. albicans* ATCC 26555, obtenidos como se ha descrito previamente, se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando geles de una concentración de poliacrilamida del 10%. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de PVDF (“Hydrophobic polyvinylidene difluoride”) adquiridas en Amersham Biosciences (New Jersey, USA); tanto la electroforesis como la transferencia se realizaron utilizando cubetas y fuentes de alimentación de la casa comercial Bio-Rad (Madrid, España) y empleando los tampones recomendados por el fabricante. A continuación las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con PBS suplementado con 3% de BSA. Tras tres lavados con PBS suplementado con 0,05% de Tween 20, las membranas fueron incubadas, toda la noche a temperatura ambiente y con agitación, con una dilución 1:10 del suero de los ratones en PBS + 0,01% Tween 20 + 0,1% de BSA. Por último, tras tres lavados más, se añadió una dilución 1:1000 (en PBS + 0,01% Tween 20 + 0,1% de BSA) del anticuerpo de detección anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. El revelado de bandas reactivas se realizó utilizando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el sustrato de la peroxidasa 4-cloro-1-naftol.

24. Análisis estadístico de los resultados

En los estudios de candidiasis experimental en ratón, la comparación de la supervivencia de los distintos tipos de ratones frente a la infección se realizó utilizando el método de análisis de la supervivencia de Kaplan-Meyer.

El análisis estadístico de la producción de citocinas y quimiocinas, el reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal, los porcentajes de neutrófilos y macrófagos en la cavidad peritoneal, el porcentaje de muerte de *C. albicans* por células fagocíticas y el número de UFC en riñón se realizó utilizando el test t-Student de dos colas. Los datos mostrados en las gráficas están expresados como la media \pm la desviación estándar de la muestra. Los niveles de significación utilizados fueron; * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$.

Para el trabajo con sangre humana los donantes se agruparon en cuatro categorías de edad: dos grupos de donantes jóvenes (de 15 a 25 años y de 26 a 42 años) y dos grupos dentro de los donantes ancianos (de 70 a 79 años y de 80 a 95 años). Para comparar la expresión de TLRs en células sanguíneas, la producción de citocinas y de PGE_2 , la capacidad fungicida de células sanguíneas y los niveles de anticuerpos específicos anti-*C. albicans* presentes en el plasma de los donantes, se utilizó el test t-Student de dos colas. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar, y el nivel de significación utilizado fue * $P \leq 0.05$.

Resultados y Discusión

Capítulo I

Estudio de la participación
de los receptores TLR4 y TLR2 y de las
células Natural Killer en la respuesta
inmunitaria frente a *Candida albicans*

La resistencia a las candidiasis requiere la acción coordinada de la respuesta inmunitaria innata y adquirida. El reconocimiento de ligandos fúngicos por receptores de células del sistema inmunitario innato (PRRs) es el primer paso para una rápida activación de la respuesta inmunitaria. Los receptores tipo Toll constituyen una familia de PRRs que median el reconocimiento de microorganismos a través de PAMPs, induciendo respuestas inflamatorias y también regulan respuestas adaptativas.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que ratones KO para la molécula de transducción de señal MyD88 son extremadamente susceptibles a la candidiasis sistémica, y que además esta molécula está implicada en la producción de citocinas inducida por el hongo (Villamón *et al.*, 2004a), lo que demostraba la implicación de los receptores tipo Toll en la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans*. A continuación nuestro grupo también ha descrito que TLR2 es esencial en la resistencia del hospedador frente a una candidiasis sistémica y que induce la producción de citocinas proinflamatorias frente al hongo (Villamón *et al.*, 2004c). Otros autores habían descrito la implicación de TLR2 y TLR4 en la resistencia del ratón y la producción *in vitro* de citocinas frente a *C. albicans* (Netea *et al.*, 2002; Bellocchio *et al.*, 2004; Van der Graaf *et al.*, 2005). Por lo tanto, la primera parte del trabajo de la presente tesis doctoral se centró en el estudio de la participación de TLR4 en la respuesta inmunitaria innata y adquirida frente a *C. albicans*. También se estudió la función de ambos receptores, TLR2 y TLR4, en la respuesta frente a distintos estímulos fúngicos, tales como células de *C. albicans* y *S. cerevisiae* viables e inactivadas por distintos tratamientos, para determinar el efecto del método de inactivación en la exposición superficial de diferentes ligandos fúngicos y su interacción con los receptores tipo Toll.

Además, se ha descrito que las células NK expresan TLRs, y diferentes datos indican que estas células pueden reconocer y responder directamente a componentes microbianos a través de estos receptores (Hornung *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2003; Chalifour *et al.*, 2004; Sivori *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2005). Por lo tanto, para completar esta parte del trabajo, se planteó el estudio de la implicación de los receptores tipo Toll en la producción de IFN- γ por células NK en respuesta a *C. albicans*.

1. Participación de TLR4 en la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans*

Para investigar la posible implicación de TLR4 en la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans*, se han utilizado dos tipos de ratón deficientes en TLR4: ratones KO TLR4^{-/-} y ratones C3H/HeJ, que, como se ha descrito previamente, poseen una mutación puntual en el gen que codifica para el receptor provocando que este no sea funcional. En estos ratones se ha estudiado: (i) la susceptibilidad *in vivo* a la candidiasis invasiva experimental, (ii) el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, (iii) la producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos peritoneales en respuesta a *C. albicans*, (iv) la producción de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-12p70) por esplenocitos y (v) el desarrollo de una respuesta Th1 específica.

1.1. Susceptibilidad *in vivo* de ratones deficientes en TLR4 a una infección sistémica experimental por *C. albicans*.

En primer lugar, para estudiar la participación de TLR4 en la protección del hospedador frente a *C. albicans*, se utilizó un modelo de candidiasis sistémica experimental, empleándose la cepa virulenta *C. albicans* ATCC 26555 y los dos tipos de ratón deficientes para TLR4 (KO TLR4^{-/-} y C3H/HeJ). En la curva de supervivencia de los ratones TLR4^{-/-} se utilizaron como control ratones de la cepa silvestre C57BL/6 y también ratones TLR2^{-/-}, ya que nuestro grupo ha descrito previamente que estos ratones KO para TLR2 son altamente susceptibles a la infección sistémica por *C. albicans* (Villamón *et al.*, 2004c). En el caso de ratones C3H/HeJ se utilizaron como controles ratones de su correspondiente cepa silvestre (C3H/HeN).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad de los ratones TLR4^{-/-} y los ratones C57BL/6 ($P = 0.52$) y, tal como se había descrito, los ratones TLR2^{-/-} presentaron una mortalidad significativamente mayor que los ratones control ($P = 0.0039$) (Fig. 1A). Todos los ratones TLR2^{-/-} murieron dentro de los primeros 8 días postinfección, mientras que a día 20 postinfección solo habían muerto el 78,57% de los ratones control y el 71,43% de los ratones TLR4^{-/-}. Tal como se muestra en la figura 1B,

tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones C3H/HeN y C3H/HeJ ($P = 0.27$). En este caso, el 90% de ambos tipos de ratón había muerto a día 5 postinfección, no registrándose más muertes hasta día 10. Además, estos resultados indican que la cepa C3H/HeN es más susceptible a la candidiasis invasiva ($P = 0.0487$) que la cepa C57BL/6, cepa descrita como bastante resistente a la infección.

Con estos resultados se concluyó que, a pesar de que los ratones deficientes en TLR4 tienden a presentar una ligera tendencia a una mayor supervivencia, estas diferencias no son estadísticamente significativas, y que la resistencia global del hospedador a una candidiasis sistémica en ratones deficientes en TLR4 no es diferente a la de ratones control.

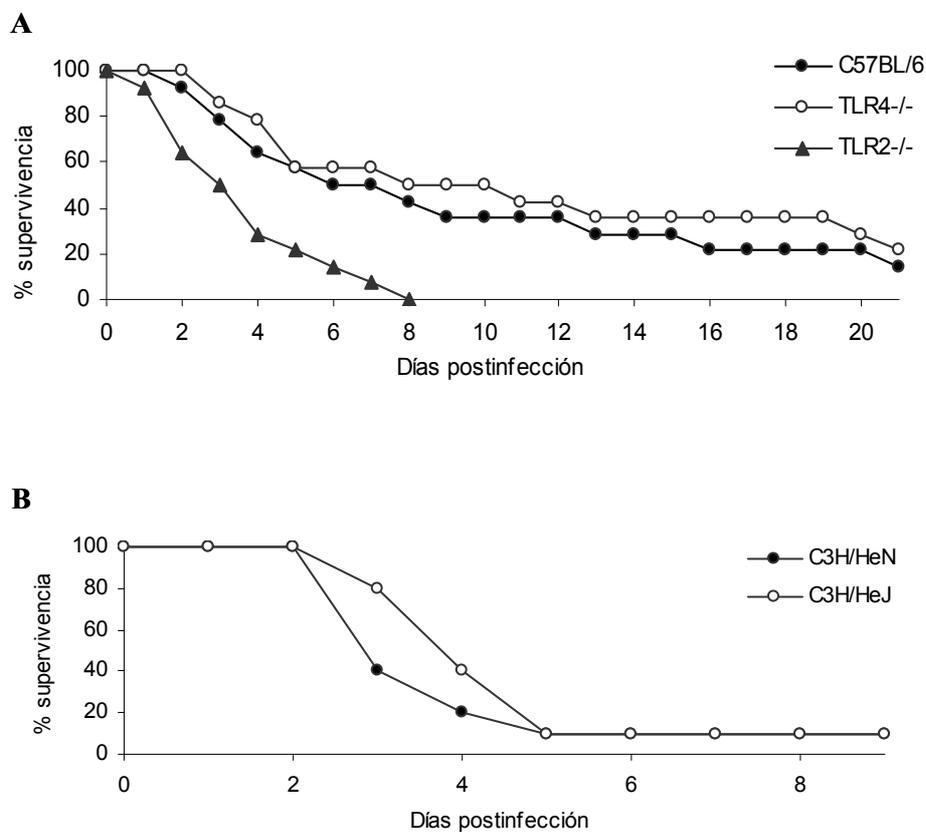


Fig. 1. Supervivencia de ratones deficientes en TLR4 a la candidiasis invasiva experimental. Ratones C57BL/6, TLR4-/- y TLR2-/- (A) o ratones C3H/HeN y C3H/HeJ (B) fueron infectados por vía intravenosa con 1×10^6 levaduras de la cepa *C. albicans* ATCC 26555 y su estado fue controlado diariamente. Las gráficas muestran los datos de un experimento representativo de tres (A) y de dos (B).

1.2. Implicación de TLR4 en el reclutamiento de neutrófilos.

A continuación se estudió la posible función de TLR4 en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Estas células son la primera línea de defensa frente a una candidiasis ya que son las primeras en llegar al foco infeccioso y facilitan la eliminación del patógeno. Los ratones deficientes en TLR4 (TLR4^{-/-} y C3H/HeJ) y sus respectivos ratones control fueron inyectados intraperitonealmente con levaduras de *C. albicans* inactivadas por calor, y 4 horas tras la inyección se recogieron las células totales de la cavidad peritoneal. El porcentaje de neutrófilos se determinó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce a la molécula Ly6G (Gr1), expresada en neutrófilos maduros.

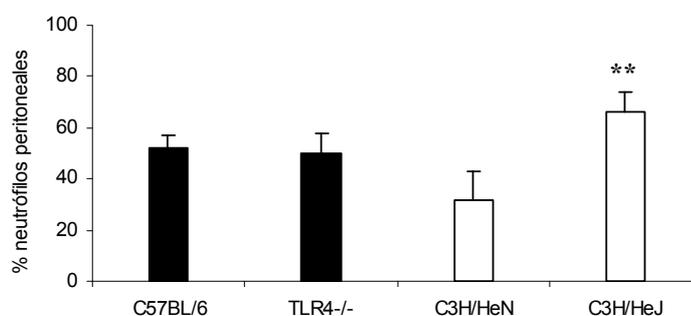


Fig. 2. Reclutamiento de neutrófilos en respuesta a *C. albicans*. Ratones control y ratones deficientes en TLR4 fueron inyectados i.p. con 10×10^6 levaduras inactivadas por calor. 4 horas después se cuantificó el porcentaje de neutrófilos atraídos al sitio de infección mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Ly6G conjugado con FITC. Los datos representan la media \pm desviación estándar de un experimento representativo de dos en el caso de los ratones TLR4^{-/-} y sus controles, y de los datos de un experimento en el caso de los ratones C3H/HeJ y sus controles. En todos los experimentos se utilizaron 3 ratones por lote. ** $P \leq 0,01$

Como se muestra en la figura 2, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos reclutados a la cavidad peritoneal entre ratones TLR4^{-/-} ($50\% \pm 8$) y ratones C57BL/6 ($52\% \pm 5$). Sin embargo, los ratones C3H/HeJ reclutaron un porcentaje de neutrófilos significativamente mayor ($66\% \pm 8$) que sus ratones control C3H/HeN ($32\% \pm 11$, $P = 0.000069$). Un resultado similar se obtuvo al comparar el número total de neutrófilos reclutados (dato no mostrado).

Estos resultados indican que la ausencia de señalización a través de TLR4 no produciría ningún efecto inhibitorio en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección en respuesta a *C. albicans*.

1.3. Participación de TLR4 en la producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos.

Como se ha descrito en el apartado de Introducción, el TNF- α es una citocina clave en la defensa frente a las candidiasis. Para estudiar la implicación de TLR4 en la producción de esta citocina proinflamatoria por macrófagos en respuesta a *C. albicans*, macrófagos peritoneales residentes obtenidos a partir de ratones C57BL6, TLR4^{-/-}, C3H/HeN y C3H/HeJ fueron estimulados *in vitro* con levaduras y micelios de *C. albicans*. Como control se utilizaron células sin estimular y LPS como agonista de TLR4.

Como se puede observar en la figura 3 la producción de TNF- α en respuesta a LPS por macrófagos de ambos tipos de ratones deficientes para TLR4 (TLR4^{-/-} y C3H/HeJ) fue significativamente menor (73% y 86% de inhibición en los ratones TLR4^{-/-} y C3H/HeJ, respectivamente) que la producción de la citocina por ratones control. En los macrófagos de los ratones TLR4^{-/-} la producción de TNF- α en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans* fue ligeramente menor que la producción de la citocina por macrófagos de ratones C57BL/6, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 3A). En el caso de macrófagos de ratones C3H/HeJ (Fig. 3B) la producción de TNF- α en respuesta a levaduras fue similar a la de los controles, mientras que la producción de la citocina en respuesta al micelio fue significativamente mayor en los ratones deficientes en TLR4 ($P = 0,026$).

Según estos resultados, TLR4 no estaría implicado de manera significativa en la producción de la citocina TNF- α por macrófagos peritoneales residentes en respuesta a *C. albicans*.

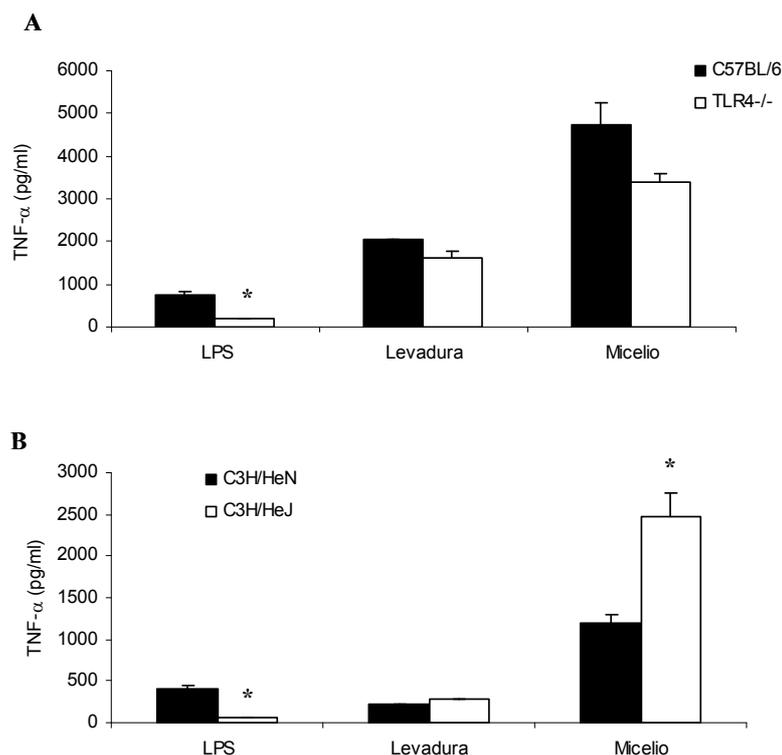


Fig. 3. Producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos en respuesta a *C. albicans*. Macrófagos peritoneales residentes de ratones C57BL/6 y TLR4^{-/-} (A) o ratones C3H/HeN y C3H/HeJ (B) fueron estimulados durante 24 horas con LPS (250 ng/ml), levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor (150 μ g [peso seco] células/ml) o micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor (150 μ g [peso seco] células/ml). La concentración de TNF- α se determinó por ELISA en los sobrenadantes libres de células de los cultivos. Los datos representan la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. * $P \leq 0,05$

1.4. Producción *in vitro* de citocinas por esplenocitos de ratones deficientes en TLR4.

A continuación se abordó el estudio de la participación de TLR4 en la producción de citocinas (proinflamatorias y Th1) en respuesta a *C. albicans*. Para ello, se infectaron ratones TLR4^{-/-} y ratones C3H/HeJ, y sus respectivos controles, con la cepa de baja virulencia PCA2 de *C. albicans*. La dosis utilizada ($0,4 \times 10^6$ células por ratón) no provoca mortalidad ni síntomas de enfermedad en ningún tipo de ratón, y es capaz de inducir una respuesta

adquirida de tipo Th1 y la consiguiente protección frente a la reinfección con una cepa virulenta de *C. albicans* (Romani *et al.*, 1991; Villamón *et al.*, 2004b). Por tanto, este es un modelo experimental adecuado para estudiar la presencia en el bazo de células productoras de IFN- γ generadas específicamente en respuesta a *C. albicans*. Las células totales del bazo de estos ratones (esplenocitos) obtenidas a los días indicados tras la infección, fueron reestimuladas *in vitro* durante 48 horas con levaduras y micelios inactivados de *C. albicans*, y se determinaron mediante ELISA los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-12p70 en los sobrenadantes de los cultivos. Se utilizaron células sin estimular y estimuladas con LPS como controles.

La producción de las tres citocinas en respuesta a LPS, como era de esperar, estaba fuertemente inhibida en ratones TLR4^{-/-} con respecto a los ratones C57BL/6 (Fig. 4). La producción de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-12p70) en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans* fue similar en ratones control y en ratones TLR4^{-/-}, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. Como se había descrito previamente (Villamón *et al.*, 2004a; 2004b) la producción de IL-12p70 por ratones C57BL/6 fue mayor en respuesta a levaduras que en respuesta a micelios de *C. albicans*. Este resultado está de acuerdo con resultados previos de otros grupos que muestran que la producción de IL-12 por monocitos purificados de sangre humana y por células dendríticas humanas y de ratón ocurre básicamente en respuesta a la forma de levadura de *C. albicans* (d'Ostiani *et al.*, 2000; Chiani *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Romani *et al.*, 2004). Además, la baja producción de IL-12p70 en respuesta al micelio se correlaciona con la baja producción de IFN- γ en respuesta a este morfotipo.

La síntesis de TNF- α en respuesta al micelio fue significativamente mayor en esplenocitos de ratones TLR4^{-/-} comparado con esplenocitos de ratones C57BL/6 ($P = 0,0024$). Sin embargo, la diferencia en la síntesis de TNF- α en respuesta a la levadura en ambos tipos de ratones no fue estadísticamente significativa (Fig. 4A). Cuando se analizaron los niveles de citocinas producidas por ratones C3H/HeJ se observó que los niveles de IFN- γ en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans* era similar en ratones C3H/HeJ y sus controles, los ratones C3H/HeN (Fig. 5B). La producción de TNF- α también fue similar en respuesta a la levadura, aunque la producción de la citocina en respuesta al micelio fue superior en los ratones deficientes en TLR4 que en los ratones control ($P = 0,0028$; Fig. 5A). Al igual que en los esplenocitos de ratones TLR4^{-/-}, la producción de ambas citocinas en respuesta al LPS estaba muy inhibida en ratones C3H/HeJ en comparación con la producción por ratones C3H/HeN.

Estos resultados indican que la ausencia de señalización a través de TLR4 no provoca una disminución en la producción de citocinas de tipo Th1 en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans*.

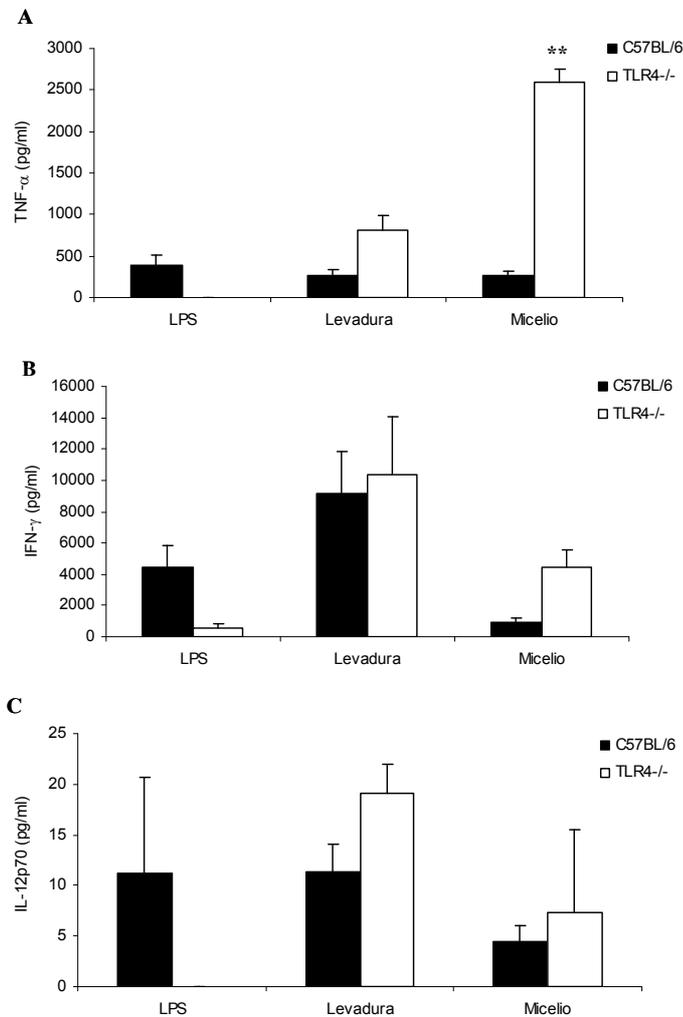


Fig. 4. Producción de TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-12p70 (C) por esplenocitos en respuesta a *C. albicans*. Ratones C57BL/6 y TLR4^{-/-} fueron infectados por vía i.v. con $0,4 \times 10^6$ levaduras de la cepa *C. albicans* PCA2. 21 días después se obtuvieron los esplenocitos y fueron reestimulados *in vitro* durante 48 horas con LPS (2 μ g/ml), levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor (30 μ g [peso seco] células/ml) o micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor (30 μ g [peso seco] células/ml). La concentración de TNF- α , IFN- γ e IL12p70 se determinó por ELISA en los sobrenadantes libres de células de los cultivos. Los datos representan la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. ** $P \leq 0,01$

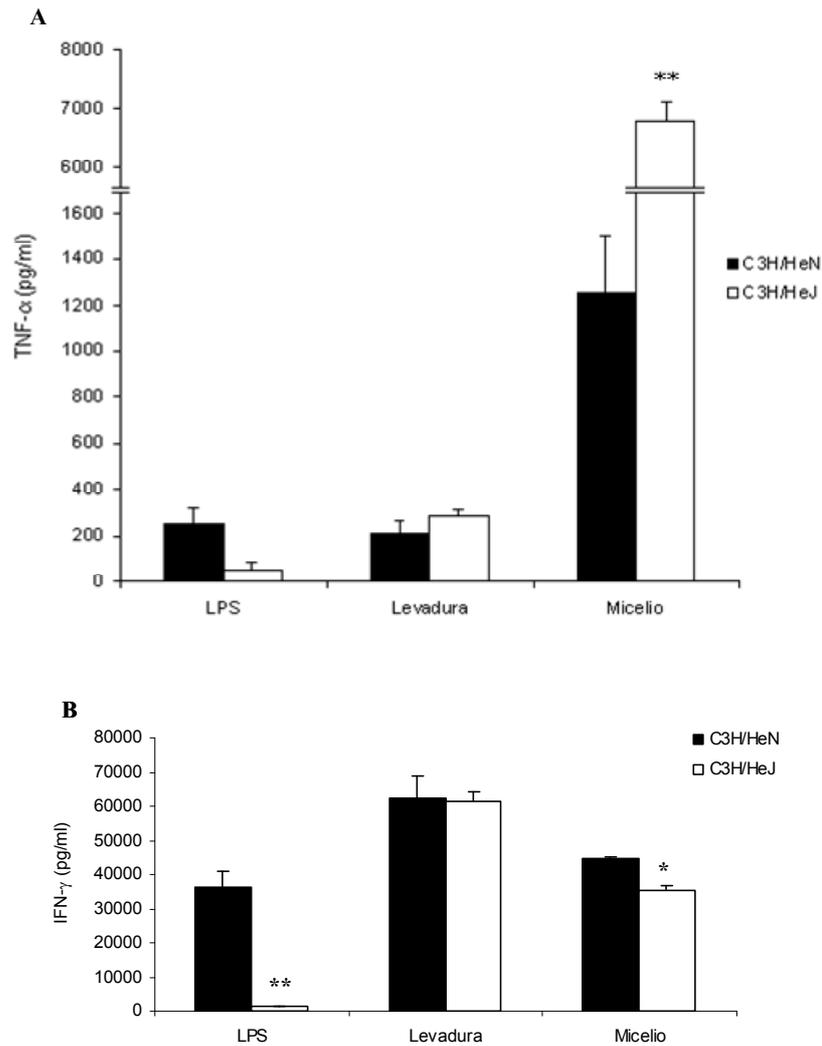


Fig. 5. Producción de TNF- α (A) e IFN- γ (B) por esplenocitos en respuesta a *C. albicans*. Ratones C3H/HeN y C3H/HeJ fueron infectados por vía i.v. con $0,4 \times 10^6$ levaduras de la cepa *C. albicans* PCA2. 13 días después se obtuvieron los esplenocitos y fueron reestimulados *in vitro* durante 48 horas con LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor (30 μg [peso seco] células/ml) o micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor (30 μg [peso seco] células/ml). La concentración de TNF- α e IFN- γ se determinó por ELISA en los sobrenadantes libres de células de los cultivos. Los datos representan la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

1.5. Implicación de TLR4 en el desarrollo de una respuesta Th1 frente a *C. albicans*.

Por último, para estudiar la posible participación de TLR4 en el desarrollo de una respuesta adquirida específica Th1 frente a *C. albicans*, se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ en ratones infectados con la cepa *C. albicans* PCA2. Varios días tras la infección se obtuvieron los esplenocitos de ratones deficientes en TLR4 y sus correspondientes ratones control, y estos fueron reestimulados *in vitro* con levaduras y micelios de la cepa *C. albicans* ATCC 26555 durante 18 horas. Se utilizaron células sin estimular como control. Tras la reestimulación *in vitro* se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ utilizando un “kit” comercial, como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. Además se realizó un marcaje simultáneo con dos anticuerpos monoclonales para seleccionar los linfocitos T CD4⁺: un anticuerpo anti-CD3 conjugado con PE-Cy5 y un anticuerpo anti-CD4 conjugado con FITC.

Como se muestra en la figura 6A, la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ presentes en el bazo de ratones infectados 21 días después de la infección fue similar en ratones C57BL/6 y en ratones TLR4^{-/-}, tanto en respuesta a levaduras como a micelios de *C. albicans*. Este resultado está de acuerdo con la producción *in vitro* de IFN- γ por esplenocitos de ratones infectados, tal como se ha descrito previamente (Fig. 4B). También en este caso la producción de la citocina en respuesta a levadura fue mayor que en respuesta a micelio.

Se obtuvieron resultados similares utilizando esplenocitos procedentes de ratones C3H/HeJ y C3H/HeN obtenidos a día 13 postinfección; el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ fue similar en ambos tipos de ratón.

Además se realizó el mismo experimento con las cuatro cepas de ratón, esta vez infectados durante 3 días con la cepa PCA2 de *C. albicans*. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon ratones deficientes en TLR4 y ratones control. En este caso, la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ era superior a día 3 en ratones C57BL/6 que en ratones C3H/HeN (dato no mostrado), lo que se correlaciona con la susceptibilidad a la infección de ambos tipos de ratones.

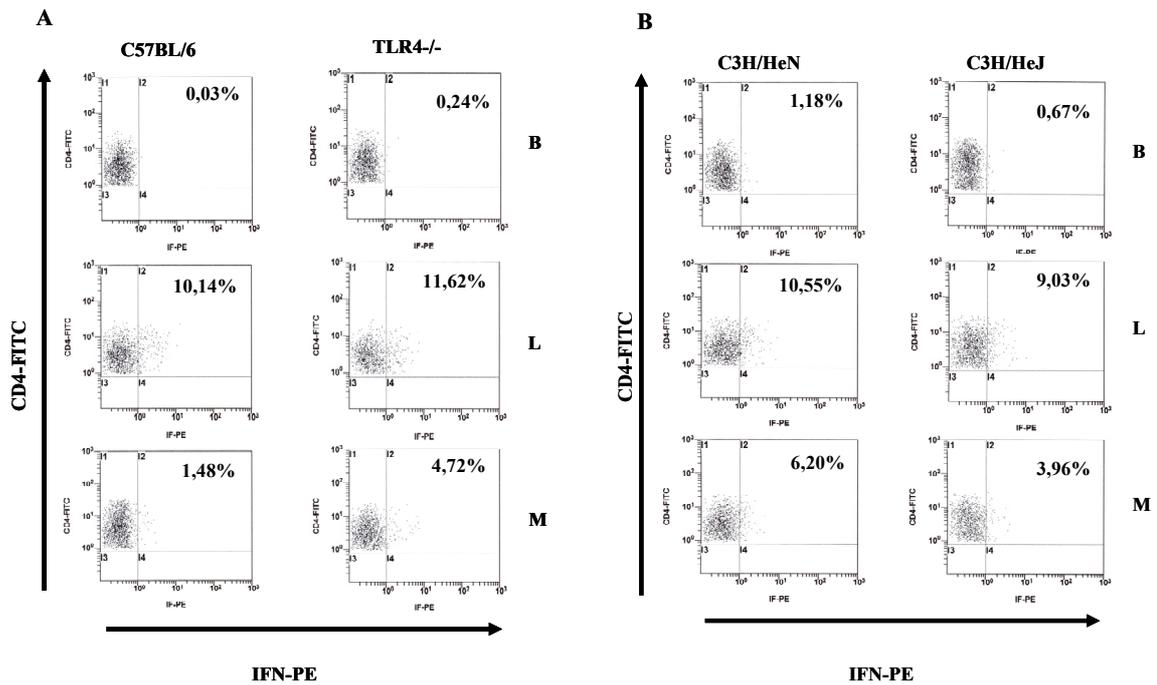


Fig. 6. Determinación cuantitativa de las células T CD4⁺ productoras de IFN-γ en respuesta a *C. albicans*. Ratones TLR4^{-/-} y C57BL/6 (A) y ratones C3H/HeJ y C3H/HeN (B) fueron infectados por vía i.v. con $0,4 \times 10^6$ levaduras de la cepa *C. albicans* PCA2. 21 días después, en el caso de los ratones KO TLR4^{-/-} y sus controles, o 13 días después, en el caso de los ratones C3H/HeJ y sus controles, se obtuvieron los esplenocitos y fueron reestimulados *in vitro* durante 18 horas con levaduras (L) de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor (30 μg [peso seco] células/ml) o micelios (M) de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor (30 μg [peso seco] células/ml). Se utilizaron células sin estimular como control (blanco; B). La secreción de IFN-γ por células CD3⁺ CD4⁺ fue determinada por citometría de flujo utilizando el ensayo “IFN-γ secretion assay” como se ha descrito previamente. Los porcentajes indican las células CD3⁺ CD4⁺ secretoras de IFN-γ.

2. Participación de TLR2 y TLR4 en la respuesta frente a distintos estímulos fúngicos: efecto del método de inactivación del hongo

Las inconsistencias encontradas por distintos grupos de investigación en cuanto a la implicación de TLR2 y TLR4 en el reconocimiento de *C. albicans* son un indicativo de la complejidad de las interacciones hospedador-hongo. Estas interacciones estarían condicionadas por un amplio rango de parámetros relativos al hongo y al hospedador. Uno de estos parámetros podría ser la naturaleza del estímulo utilizado, ya que las diferencias en la respuesta inmunitaria del hospedador podrían deberse a posibles alteraciones en la superficie celular del hongo, producidas por los distintos métodos de inactivación utilizados, que podrían afectar a la exposición de PAMPs.

Esta cuestión se abordó mediante el estudio de la producción *in vitro* de citocinas Th1 (TNF- α e IFN- γ) por macrófagos y esplenocitos de ratones C57BL/6, TLR2-/- y TLR4-/- estimulados con células de *C. albicans* tanto viables como no viables (inactivadas por diferentes métodos: por calor, fijación química o tratamiento antifúngico).

2.1. Producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos de ratones deficientes en TLR2 o TLR4 en respuesta a diferentes estímulos de *C. albicans*.

En primer lugar se obtuvieron macrófagos peritoneales residentes de ratones control C57BL/6 y de ratones KO TLR2-/- y TLR4-/- y se estimularon *in vitro* durante 24 horas con levaduras y micelios de la cepa ATCC 26555 de *C. albicans* inactivados por tres métodos distintos: inactivación por calor, inactivación por fijación química e inactivación por tratamiento antifúngico. Además se utilizaron LPS y zimosán, agonistas de TLR4 y TLR2 respectivamente, y células sin estimular como controles.

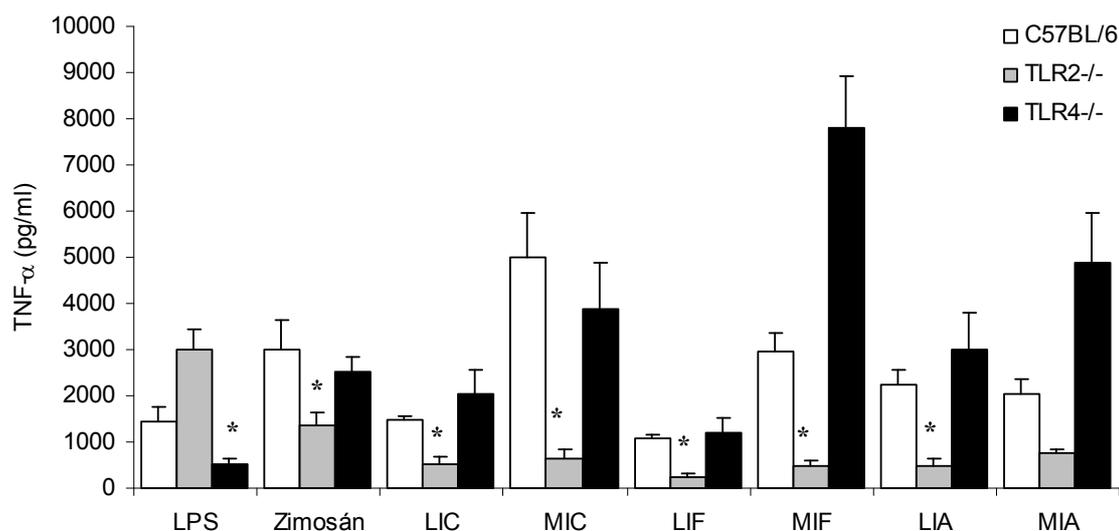


Fig. 7. Producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos peritoneales residentes en respuesta a células de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas. Macrófagos peritoneales residentes de ratones C57BL/6, TLR2-/- y TLR4-/- fueron estimulados *in vitro* durante 24 h con LPS (250 ng/ml), zimosán ($7,5 \times 10^6$ partículas/ml), 150 μ g (peso seco)/ml de levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor (LIC), fijación química (LIF) o tratamiento antifúngico (LIA) o con 150 μ g (peso seco)/ml de micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor (MIC), fijación química (MIF) o tratamiento antifúngico (MIA). Los niveles de TNF- α se determinaron por ELISA en los sobrenadantes libres de células de los cultivos. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de cuatro. * $P \leq 0,05$ comparado con la muestra control de cada estímulo (C57BL/6).

Los resultados mostrados en la figura 7 indican que la producción de TNF- α por macrófagos en respuesta a estímulos fúngicos se produce en gran medida como consecuencia de la señalización a través de TLR2. Los macrófagos procedentes de ratones TLR2-/- mostraron una inhibición significativa en la producción de la citocina, respecto al control (C57BL/6), en respuesta a los tres tipos de levaduras inactivadas (65% - 78% de inhibición), así como en respuesta a los tres tipos de micelios inactivados (70% - 88% de inhibición). Sin embargo, no se detectó una reducción en la producción de TNF- α por macrófagos obtenidos de ratones TLR4-/-, comparado con la producción por células de ratones C57BL/6. En el caso de los estímulos control se obtuvieron los resultados esperados: la producción de TNF- α en respuesta a LPS, un agonista de TLR4, mostró una inhibición del 73% en macrófagos TLR4-/- (la respuesta basal producida sugiere la presencia de

contaminación en la preparación de LPS), y la producción de dicha citocina en respuesta a zimosán, un agonista de TLR2, mostró un 70% de inhibición en macrófagos TLR2^{-/-}. Los niveles de TNF- α producidos por células sin estimular, utilizadas como control, estaban por debajo del límite de detección (<8 pg/ml). Estos resultados indican que independientemente del método de inactivación utilizado, el reconocimiento del hongo se produce fundamentalmente a través de TLR2.

Para comparar los resultados obtenidos con estímulos inactivados con la respuesta del hospedador frente a levaduras viables del hongo, se realizaron a continuación ensayos *in vitro* de producción de TNF- α utilizando como estímulos células viables de las cepas de *C. albicans* PCA2 y ATCC 26555. La cepa PCA2 no es capaz de germinar, por lo que durante el tiempo de cocultivo únicamente hay levaduras estimulando a los macrófagos. En cambio, la cepa ATCC 26555 es capaz de formar tubos germinativos, por lo que la estimulación de los macrófagos se producirá por formas miceliales. En este caso, se emplearon tiempos cortos de estimulación para evitar el crecimiento excesivo del hongo en la placa de cultivo. Como controles se utilizaron células sin estimular, zimosán y levaduras y micelios del hongo inactivados por calor.

Tras 6 horas de estimulación pudieron detectarse niveles de TNF- α (Fig. 8), excepto en el caso de las células sin estimular (dato no mostrado). Al igual que cuando se emplearon células no viables como estímulos, los macrófagos procedentes de ratones TLR2^{-/-} produjeron significativamente menos citocina en respuesta a células fúngicas viables que las células procedentes de ratones control; 79% de inhibición en respuesta a células de la cepa PCA2 (levaduras) y 75% de inhibición frente a células de la cepa ATCC 26555 (micelios). En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas en la producción de TNF- α por células obtenidas de ratones C57BL/6 y de ratones TLR4^{-/-}.

Los resultados obtenidos con las levaduras inactivadas y el zimosán utilizados como controles (Fig. 8), confirmaron los resultados descritos anteriormente (Fig. 7).

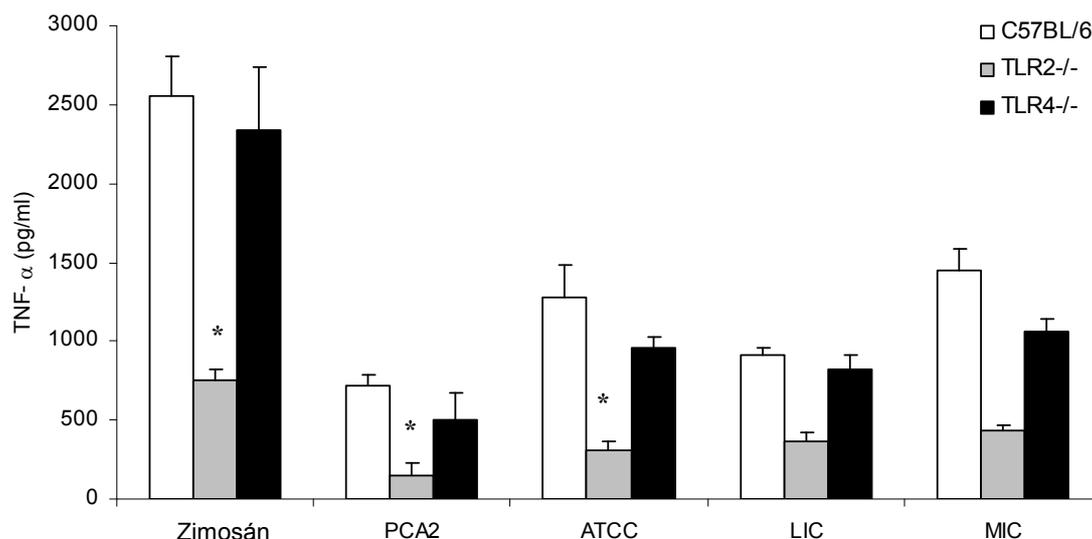


Fig. 8. Producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos peritoneales residentes en respuesta a células viables de *C. albicans*. Macrófagos peritoneales residentes de ratones C57BL/6, TLR2-/- y TLR4-/- fueron estimulados durante 6 h con zimosán ($7,5 \times 10^6$ partículas/ml), células viables de *C. albicans* PCA2 (levaduras; $1,25 \times 10^6$ células/ml), células viables de *C. albicans* ATCC 26555 (micelio; $1,25 \times 10^6$ células/ml) o levaduras (LIC) y micelios (MIC) de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor [$150 \mu\text{g}$ (peso seco)/ml]. Los niveles de TNF- α se determinaron en los sobrenadantes libres de células de los cultivos por ELISA. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de tres. * $P \leq 0,05$ comparado con la muestra control (C57BL/6).

Estos resultados indican que las células viables e inactivadas de *C. albicans* comparten PAMPs que son capaces de estimular *in vitro* la producción de TNF- α por macrófagos a través de una señalización dependiente, en gran parte, de TLR2. Además, el zimosán y los estímulos fúngicos viables e inactivados, tienen la capacidad de inducir una pequeña cantidad de TNF- α en macrófagos TLR2-/- (aproximadamente entre el 20% y el 30% del TNF- α producido por macrófagos de ratones C57BL/6), lo que indica que otros receptores además del TLR2 participarían en la inducción de la producción de TNF- α tras el reconocimiento del hongo.

2.2. Producción *in vitro* de IFN- γ por esplenocitos de ratones deficientes en TLR2 o TLR4 en respuesta a diferentes estímulos de *C. albicans*.

Para completar estos estudios se determinó la producción *in vitro* de IFN- γ en respuesta a *C. albicans*. Para ello ratones control y ratones KO fueron infectados con la cepa de baja virulencia PCA2 y tres días después de la infección se obtuvieron las células totales del bazo (esplenocitos) y se reestimularon *in vitro* con levaduras de *C. albicans* inactivadas por los tres métodos descritos, utilizándose además LPS, zimosán y células sin estimular como controles.

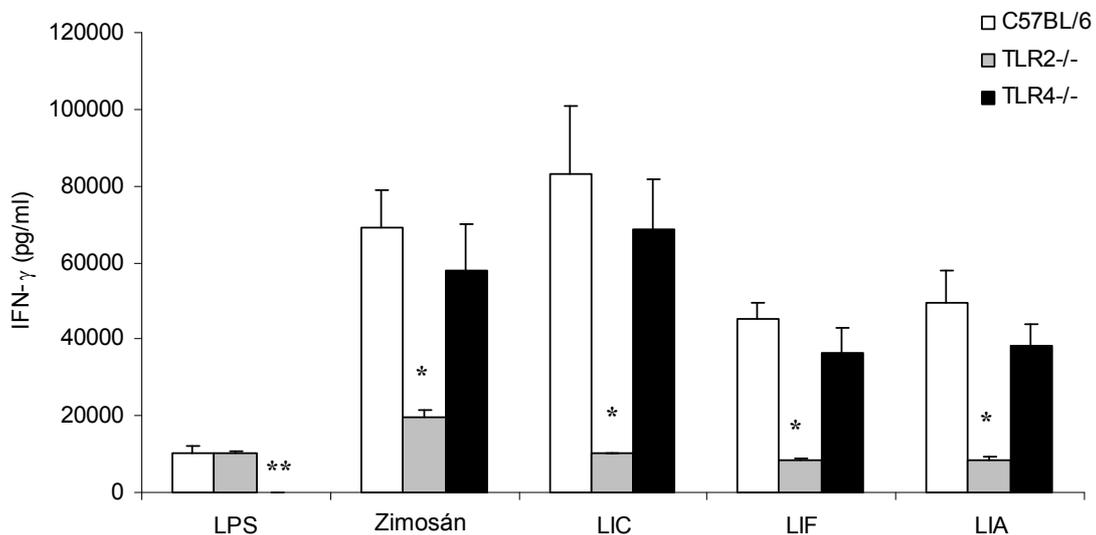


Fig. 9. Producción *in vitro* de IFN- γ por esplenocitos de ratones infectados con *C. albicans*. Ratones C57BL/6, TLR2-/- y TLR4-/- fueron infectados i.v. con $0,4 \times 10^6$ levaduras de la cepa de baja virulencia *C. albicans* PCA2. Los esplenocitos, obtenidos a día 3 postinfección, fueron reestimulados *in vitro* durante 48 h con LPS (250 ng/ml), zimosán ($7,5 \times 10^6$ partículas/ml), 150 μ g (peso seco)/ml de levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor (LIC), fijación química (LIF) o tratamiento antifúngico (LIA). Los niveles de TNF- α se determinaron por ELISA en los sobrenadantes libres de células de los cultivos. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de tres. * $P \leq 0,05$ y ** $P \leq 0,01$ comparados con la muestra control (C57BL/6).

La producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones TLR2-/- estaba significativamente reducida en respuesta a los tres tipos de estímulos fúngicos (80% - 90% de inhibición), mientras que la producción de la citocina por células de ratones TLR4-/- era muy similar a la producción por células de ratones control, independientemente del tipo de estímulo fúngico empleado. Como cabía esperar, la producción de IFN- γ en respuesta a LPS estaba fuertemente inhibida en ratones TLR4-/- (98% de inhibición), así como en respuesta a zimosán en ratones TLR2-/- (76% de inhibición) (Fig. 9). Los niveles de IFN- γ producidos por células sin estimular fueron indetectables.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos peritoneales residentes descritos en el apartado 2.1.

3. Participación de las células Natural Killer en la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans*

La implicación de las células NK en la resistencia frente a diversos patógenos, incluyendo *C. albicans*, podría estar mediada por la producción de diversas citocinas, principalmente IFN- γ ; no obstante no está establecido que la producción de esta citocina sea consecuencia de un reconocimiento directo del hongo por las NK, o bien sea consecuencia de la activación de las células NK por citocinas secretadas por otras células presentes en el foco de infección (Ferrante, 1989; Marodi *et al.*, 1993; Arancia *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2003). Por lo tanto, el objetivo de esta parte del trabajo de tesis doctoral fue estudiar la posible implicación de los receptores Toll en la producción *in vitro* de IFN- γ por células NK tras el reconocimiento de levaduras y micelios de *C. albicans*.

3.1. Producción *in vitro* de IFN- γ por células NK de ratón en respuesta a *C. albicans*

En primer lugar se analizó la capacidad de *C. albicans* de inducir la producción de IFN- γ por células NK en ausencia de citocinas exógenas. Para ello se purificaron células NK a partir de esplenocitos de ratones C57BL/6 mediante selección inmunomagnética, tal como se describe en el apartado de Material y Métodos. Estas células fueron puestas en cultivo y estimuladas con levaduras y micelios de *C. albicans* y/o zimosán y LPS, agonistas de TLR2 y TLR4 respectivamente. Para comprobar los niveles basales de producción de la citocina se utilizaron células sin estimular.

Como se muestra en la figura 10, tanto las levaduras como los micelios de *C. albicans* inactivados por calor no fueron capaces de inducir la producción de la citocina. Sin embargo, las células NK produjeron niveles detectables de IFN- γ (> 15 pg/ml) en respuesta a zimosán y LPS. Cuando se realizó la estimulación simultánea con zimosán o LPS y levaduras o micelios del hongo los niveles de la citocina fueron de nuevo indetectables.

Este resultado sugiere que las células fúngicas inhiben la producción de IFN- γ por células NK inducida por ligandos de TLR2 y TLR4 (zimosán y LPS respectivamente).

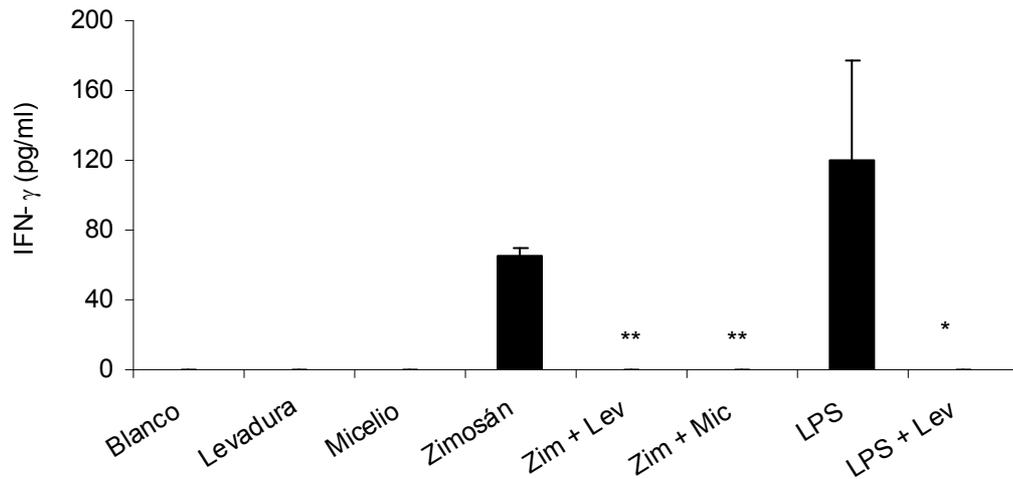


Fig. 10. Producción *in vitro* de IFN- γ por células NK obtenidas a partir de ratones C57BL/6 en respuesta a *C. albicans*. Células NK fueron estimuladas con levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor [150 μ g (peso seco) células/ml], micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor [150 μ g (peso seco) células/ml] y/o zimosán ($3,84 \times 10^6$ partículas/ml) y LPS (1 μ g/ml). Se utilizaron células NK sin estimular como control (Blanco). Los niveles de IFN- γ fueron cuantificados en los sobrenadantes libres de células de los cultivos por ELISA. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. * $P \leq 0,05$ y ** $P \leq 0,01$

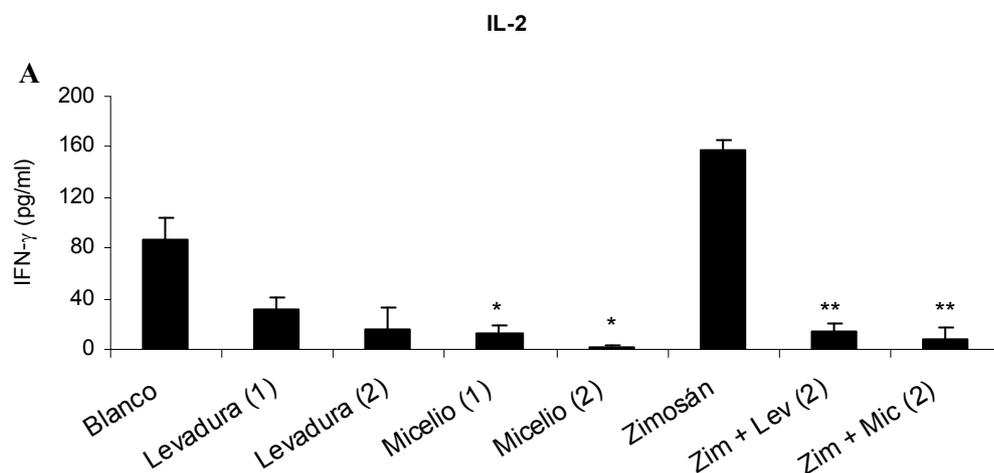
3.2. Producción *in vitro* de IFN- γ por células NK de ratón en respuesta a *C. albicans* y en presencia de citocinas.

Tras la observación anterior se decidió estudiar la respuesta de las células NK a estímulos fúngicos, zimosán y *C. albicans*, en presencia de diversas citocinas activadoras de las NK (IL-2, IL-12 e IL-15).

Como se puede observar en la figura 11A, la IL-2 indujo la producción de IFN- γ por células NK, sinergizando con la partícula fúngica zimosán para una mayor producción de citocina. Esta producción de IFN- γ fue de nuevo inhibida en presencia de levaduras y micelios de *C. albicans* inactivados por calor, de una manera dosis-dependiente. Esta inhibición de la producción de IFN- γ por células NK no fue debida a un aumento de la muerte celular inducida por los estímulos fúngicos, ya que la viabilidad de las células NK tras el cultivo, determinada mediante observación microscópica empleando azul tripán, fue similar (en torno al 60%) en todos los casos, incluido el control sin estímulo (dato no mostrado).

Un resultado similar se obtuvo cuando las células NK se estimularon en presencia de otras citocinas activadoras de células NK, como IL-12 e IL-15 (Fig. 11B y 11C).

Estos resultados confirmaron los obtenidos anteriormente estimulando las células NK en ausencia de citocinas: las células de *C. albicans* inactivadas por calor producen una inhibición de la producción de IFN- γ por células NK, incluso en presencia de citocinas activadoras y/o otros ligandos de los TLRs como zimosán.



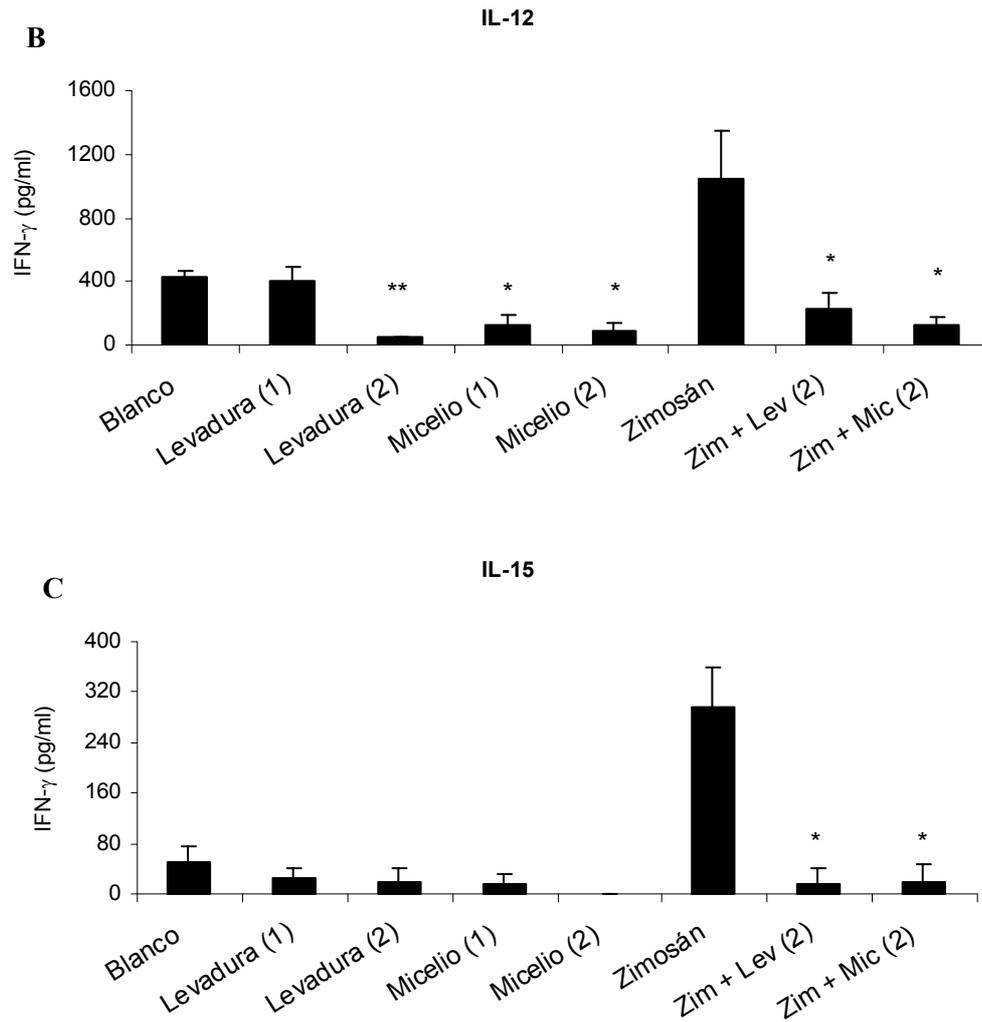


Fig. 11. Producción *in vitro* de IFN- γ por células NK obtenidas a partir de ratones C57BL/6 en respuesta a *C. albicans* en presencia de citocinas. Células NK fueron estimuladas con levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor [75 o 150 μ g (peso seco) células/ml; muestras 1 y 2 respectivamente], micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor [75 o 150 μ g (peso seco) células/ml; muestras 1 y 2 respectivamente] y/o zimosán ($3,84 \times 10^6$ partículas/ml), en presencia de IL-2 (A), IL-12 (B) o IL-15 (C). Se utilizaron células NK sin estimular como control (Blanco). Los niveles de IFN- γ fueron cuantificados en los sobrenadantes libres de células de los cultivos por ELISA. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de tres. * $P \leq 0,05$ y ** $P \leq 0,01$ comparados con el control o con la muestra estimulada con zimosán.

3.3. Producción de IFN- γ por células NK de ratón en respuesta a distintos estímulos fúngicos en presencia de IL-2 y zimosán.

Ya que la partícula fúngica zimosán y los estímulos inactivados de *C. albicans* producían efectos opuestos en la producción de IFN- γ por células NK, se analizó el efecto producido por otros estímulos. Para ello se emplearon levaduras de la cepa *C. albicans* PCA2 y de dos cepas de *S. cerevisiae* (la cepa SEY2101 y la cepa 1403) para estudiar su capacidad para inducir *in vitro* la producción de IFN- γ por células NK.

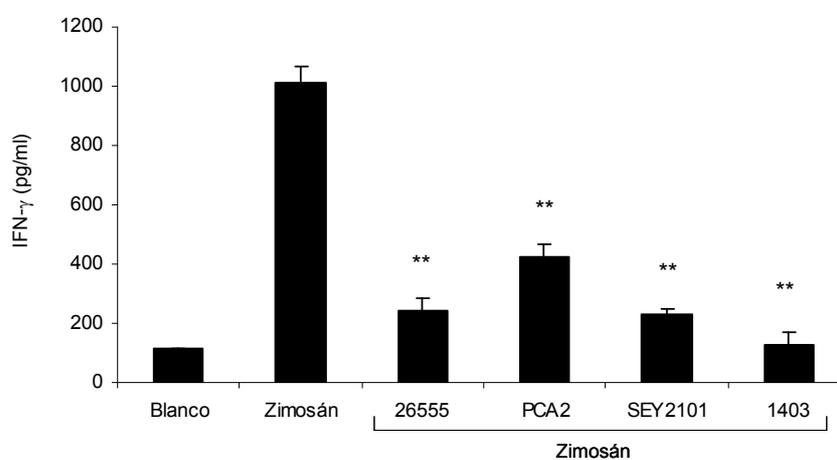


Fig. 12. Producción *in vitro* de IFN- γ por células NK obtenidas a partir de ratones C57BL/6 en respuesta a cepas fúngicas en presencia de IL-2 y zimosán. Células NK fueron estimuladas *in vitro*, en presencia de IL-2 y zimosán, con células fúngicas inactivadas por calor [150 μ g (peso seco) células/ml]: *C. albicans* ATCC 26555, *C. albicans* PCA2, *S. cerevisiae* SEY2101 y *S. cerevisiae* 1403. Se utilizaron células sin estimular como control (Blanco). Los niveles de IFN- γ fueron cuantificados en los sobrenadantes libres de células de los cultivos por ELISA. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. ** $P \leq 0,01$ comparado con la muestra estimulada con zimosán.

La producción de IFN- γ por células NK, estimuladas en presencia de IL-2 y zimosán, también fue inhibida por todas las cepas fúngicas utilizadas. Tanto las cepas de *C. albicans* como las cepas de *S. cerevisiae* fueron capaces de producir una inhibición significativa de la producción de la citocina por células NK inducida por IL-2 y por zimosán.

Finalmente, aunque ya se había comprobado que el tipo de tratamiento de inactivación fúngica no tenía efecto en la estimulación de macrófagos y esplenocitos (apartado 2), se realizaron experimentos de producción de IFN- γ por células NK, en presencia de IL-2 y zimosán, utilizando como estímulos levaduras y micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor, por fijación química o por tratamiento con antifúngico. Los resultados (datos no mostrados) indicaron que los tres tipos de células inactivadas eran capaces de inhibir la producción de IFN- γ por células NK de una manera similar, no encontrándose diferencias significativas entre ellas (los porcentajes de inhibición se situaron entre un 60% y un 65%). Resultados similares se obtuvieron utilizando levaduras de la cepa 1403 de *S. cerevisiae* inactivadas por los tres tratamientos. En este caso los porcentajes de inhibición fueron de entre un 75% y un 85%.

3.4. Producción de IFN- γ por células NK de ratón de ratones TLR2^{-/-} y ratones DBA2/J.

Puesto que TLR2 es esencial en el reconocimiento de *C. albicans* y en la consiguiente inducción de citocinas (Villamón *et al.*, 2004c), se emplearon células NK purificadas a partir de bazo de ratones TLR2^{-/-} para determinar si este receptor está también implicado en la inhibición de la producción de IFN- γ mediada por *C. albicans*. Como control se emplearon ratones KO TLR4^{-/-}.

Los resultados indicaron que las células fúngicas inhiben la producción de IFN- γ por células NK de ratones TLR2^{-/-} en respuesta a LPS en presencia de IL-12 (aproximadamente un 65% de inhibición tanto para levaduras como micelios). También se encontró una inhibición de la producción de la citocina por células TLR4^{-/-} en respuesta a zimosán e IL-12 (68% de inhibición en el caso de levaduras y un 75% de inhibición en el caso de micelios). Por tanto, TLR2 y TLR4 no parecen estar implicados en la inhibición de la producción de IFN- γ por células NK en respuesta a *C. albicans*.

La naturaleza del ligando fúngico responsable de esta inhibición es desconocida, aunque debe tratarse de una molécula asociada a pared celular, presente en células enteras y ausente en las partículas de zimosán, y probablemente, como se ha indicado anteriormente,

no se trata de un ligando de TLR4 ni de TLR2. Además, el receptor de la célula NK implicado en este efecto inhibitorio de *C. albicans* tampoco es conocido. Como ensayo complementario se realizaron experimentos con células NK purificadas de ratones DBA2/J que, como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, carecen del receptor CD94/NKG2A, para probar la posible implicación de este receptor. Los resultados mostraron que este receptor tampoco está implicado en el efecto inhibitorio mediado por *C. albicans* ya que en presencia de levaduras inactivadas se observó un 72% de inhibición de la producción de la citocina por células NK de ratones DBA2/J inducida por zimosán en presencia de IL-2.

Por último, se analizó el efecto de células de *C. albicans* sobre la proliferación de las células NK inducida por IL-2. Para ello las células NK obtenidas de ratones C57BL/6 fueron incubadas durante 48 horas en presencia de IL-2 antes de añadir 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) durante 16 horas más, y la BrdU incorporada se determinó utilizando un "kit" comercial, tal como se describe en Material y Métodos. Los resultados indicaron que las células de *C. albicans*, tanto levaduras como micelios, no tenían ningún efecto sobre la proliferación de las células NK inducida por IL-2, por lo que el efecto inhibitorio de la secreción de IFN- γ no puede ser atribuido a la muerte celular inducida por las células fúngicas.

4. Discusión

El desarrollo de la candidiasis invasiva depende de complejas interacciones entre factores de virulencia del hongo, el tamaño del inóculo y el estado inmunológico del hospedador. El reconocimiento de los microorganismos patógenos por células del sistema inmunitario innato a través de PRRs es el primer paso en la activación de una respuesta del hospedador adecuada y protectora frente al patógeno. Los TLRs son una familia de PRRs que participan en el reconocimiento de moléculas conservadas de microorganismos (PAMPs), induciendo la subsiguiente respuesta inflamatoria y también regulando las respuestas adaptativas (Barton y Medzhitov, 2002; Takeda *et al.*, 2003; Levitz, 2004; Romani, 2004). En un trabajo anterior (Villamón *et al.*, 2004a) nuestro grupo demostró la implicación de la molécula adaptadora MyD88 en la producción *in vitro* de citocinas inducida por *C. albicans* y en la resistencia del ratón frente a una candidiasis invasiva experimental. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Marr *et al.*, 2003; Bellocchio *et al.*, 2004), lo que indica una función importante de los TLRs en la respuesta del hospedador frente a *C. albicans*, ya que MyD88 participa en la transducción de señal mediada por estos receptores. Sin embargo, los trabajos sobre que receptor o receptores TLR son los implicados en el reconocimiento de *C. albicans*, así como las consecuencias de este reconocimiento en el desarrollo de la respuesta inmunitaria del hospedador, son, en algunos casos, contradictorios, lo que puede ser un reflejo de la complejidad de las interacciones hospedador-patógeno durante la infección fúngica.

Nuestro grupo había descrito previamente que el receptor TLR2 está implicado en la defensa frente a la candidiasis en un modelo experimental de infección y en la producción *in vitro* de citocinas en respuesta a *C. albicans*. Dada la complejidad estructural de la pared celular de *C. albicans* y el hecho de que los TLRs son capaces de reconocer múltiples ligandos sin aparente relación estructural, se planteó el estudio de la participación de otros TLR en la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans*. Por lo tanto se estudió el receptor TLR4, ya que dicho receptor participa en el reconocimiento de otros hongos (Wang *et al.*, 2001; Marr *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2003). Para ello se utilizó un modelo de candidiasis invasiva experimental empleando dos tipos de ratón deficientes en este receptor: ratones KO TLR4^{-/-} y ratones C3H/HeJ. Hoshino y colaboradores (1999) generaron los ratones KO TLR4^{-/-} y mostraron que presentaban

una respuesta defectiva al LPS, de manera similar a los ratones C3H/HeJ, que tienen una mutación puntual en la porción del gen *tlr4* que codifica para la región citoplasmática, lo que le confiere al receptor una transducción de señal defectiva. La ligera diferencia en la respuesta frente al LPS entre los ratones TLR4^{-/-} y C3H/HeJ podría ser debida a la diferente naturaleza de las mutaciones (interrupción génica en el caso de los ratones KO y mutación puntual en los ratones C3H/HeJ), y a las diferencias entre cepas de ratón, que también determinarían que las cepas presenten diferente susceptibilidad frente a la candidiasis.

El modelo de candidiasis invasiva experimental empleado en este trabajo demostró que la deficiencia en TLR4 no incrementa la susceptibilidad global del ratón a la infección sistémica por *C. albicans*; la supervivencia de los ratones control y de los dos tipos de ratón deficientes en TLR4 empleados (ratones KO TLR4^{-/-} y ratones C3H/HeJ) indica un nivel de resistencia frente al hongo inalterado en ausencia de TLR4 funcional.

Aunque *in vivo* no se encontraron diferencias significativas en los ratones deficientes en TLR4 respecto a los ratones control en la susceptibilidad a la infección, se planteó un estudio más profundo para determinar posibles alteraciones en los ratones deficientes en este receptor que no se manifestaran durante la infección *in vivo*. Se determinó que la producción *in vitro* de citocinas por macrófagos y esplenocitos en respuesta a *C. albicans* tampoco estaba disminuida en los ratones deficientes en TLR4 al compararlos con sus respectivos ratones control. Curiosamente, la producción de TNF- α por esplenocitos en respuesta a micelio estaba aumentada en ambos tipos de ratón deficientes en TLR4. Este resultado podría explicar, al menos en parte, el que tanto los ratones KO TLR4^{-/-} como los ratones C3H/HeJ muestren una supervivencia ligeramente mayor, aunque en ningún caso significativa, que sus respectivos ratones control, cuando son infectados con una cepa virulenta de *C. albicans* que se desarrolla fundamentalmente como micelio durante el proceso infeccioso. Paralelamente a estos estudios, Bellocchio y colaboradores (2004) describieron que ratones deficientes en el receptor TLR4 sobreviven significativamente más tiempo que ratones control en un modelo de candidiasis experimental similar, pero realizando la infección con una cepa más virulenta de *C. albicans*, capaz de causar la muerte de todos los ratones a día 6 postinfección. Estos resultados no apoyan los obtenidos por otros autores (Netea *et al.*, 2002) que describen una mayor susceptibilidad de los ratones C3H/HeJ a la candidiasis

invasiva, que la invasión fúngica del riñón es mayor en ratones C3H/HeJ y que el reclutamiento de neutrófilos está muy disminuido en estos ratones, aunque la producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos en respuesta a *C. albicans* no está afectada por la mutación. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que los ratones C3H/HeJ presentan un porcentaje de neutrófilos reclutados al sitio de infección significativamente mayor que los ratones control C3H/HeN, mientras que los ratones KO TLR4^{-/-} presentaban un porcentaje de neutrófilos muy similar al de los ratones control. No es posible encontrar una explicación clara para estos diferentes resultados, pero pueden ser consecuencia de la utilización de distintas condiciones experimentales, incluyendo el empleo de diferentes cepas de *C. albicans*, ya que la expresión de componentes de la pared celular, como proteínas y manoproteínas, varía entre cepas y está fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo (Gozalbo *et al.*, 2004). De todos modos, todos los grupos que han trabajado con células procedentes de ratones deficientes en el receptor TLR4 han descrito que no está implicado en la producción de citocinas inflamatorias, como TNF- α , en respuesta a *C. albicans* (Netea *et al.*, 2002; Jouault *et al.*, 2003; Bellocchio *et al.*, 2004; Roeder *et al.*, 2004a; 2004b).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la resistencia *in vivo* de los ratones deficientes en el receptor TLR4 frente a *C. albicans*, estos ratones son capaces de desarrollar una respuesta Th1 específica frente al hongo (cuantificada como producción *in vitro* de citocinas Th1 y porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ) similar a la de los ratones control, cuando son infectados con una cepa de *C. albicans* de baja virulencia.

Globalmente se han encontrado resultados consistentes entre los ratones KO TLR4^{-/-} y C3H/HeJ. Únicamente se han descrito ligeras diferencias que pueden ser debidas a diferencias en el tipo de mutación que afecta al receptor TLR4 y/o a la cepa de ratón. Por tanto, es posible concluir que el receptor TLR4 no es esencial para el reconocimiento del patógeno ni para la defensa del hospedador frente a *C. albicans*.

Otros autores han descrito que tanto TLR2 como TLR4 participarían en la resistencia y/o susceptibilidad frente a *C. albicans* y en la producción *in vitro* de citocinas en respuesta al hongo (Netea *et al.*, 2002; Bellocchio *et al.*, 2004; Blasi *et al.*, 2005; van der Graaf *et al.*, 2005). TLR2, identificado como el receptor del fosfolipomanano, un componente de la pared celular de *C. albicans*, estimula la producción de citocinas proinflamatorias a través de la activación del factor NF- κ B

(Jouault *et al.*, 2003; Roeder *et al.*, 2004c). Netea y colaboradores (2006) han descrito que el reconocimiento por TLR4 de residuos de manosa unidos por enlaces O-glicosídicos presentes en las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* participa en la inducción de la producción de TNF- α por macrófagos de ratón, mientras que TLR2 tiene un papel menor a través del reconocimiento de β -glucano por el complejo dectina-1/TLR2. Los resultados que describen la participación de TLR4 en el reconocimiento de residuos de manosa de la pared celular han sido obtenidos fundamentalmente mediante el empleo de mutantes de *C. albicans* deficientes en la glicosilación de las manoproteínas de la pared celular, y deben ser interpretados cuidadosamente. Los autores no han tenido en cuenta que las alteraciones en la pared celular en los mutantes estudiados no se deben solo al defecto genético directo de la mutación, sino que la pared celular puede presentar alteraciones adicionales en su estructura y/o composición debido a la existencia de mecanismos de compensación que se ponen en marcha en los mutantes para minimizar los efectos de la mutación (Poulain y Jouault, 2004; Gil y Gozalbo, 2006b).

Además, se han propuesto hipótesis alternativas acerca de las consecuencias del reconocimiento de *C. albicans* a través de TLR2 y TLR4 en la protección del hospedador, habiéndose propuesto dos modelos distintos (Netea *et al.*, 2002; Netea *et al.*, 2004b; Gil *et al.*, 2005; Gil y Gozalbo, 2006a). Según uno de estos modelos, TLR2 básicamente reconocería el micelio de *C. albicans* y conferiría susceptibilidad a la infección mediante la inducción de IL-10 y células Treg, lo que provoca una respuesta Th2, mientras que la morfología levaduriforme sería reconocida tanto por TLR2 como por TLR4, provocando el desarrollo de una respuesta Th1 (Bellocchio *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2004b). En el otro modelo (Fig. 13), propuesto por nuestro grupo, tanto la levadura como el micelio serían reconocidos a través de TLR2, y las diferencias en la respuesta inmunitaria generada frente a las dos morfologías podrían ser debidas a interacciones con otros PRRs como dectina-1 y dectina-2, que reconocerían ligandos expuestos diferencialmente en la levadura y el micelio de *C. albicans*, como se describirá más adelante (Gil *et al.*, 2005; Gil y Gozalbo, 2006a). La hipótesis propuesta por Netea y colaboradores (2004a; 2004b) según la cual TLR2 suprimiría la inmunidad frente a una infección por *C. albicans*, lo que representaría un nuevo mecanismo de evasión inmunitaria, no está claramente demostrada ya que (i) los ratones TLR2-/- parecen ser más susceptibles a la candidiasis (Villamón *et al.*, 2004c), y en ningún caso

más resistentes (Bellocchio *et al.*, 2004), (ii) el modelo subestima la función de la respuesta proinflamatoria mediada por TLR2 en respuesta a *C. albicans*, y (iii) no concuerda con la observación de que la producción de IL-10 por células dendríticas es independiente de MyD88 (Bellocchio *et al.*, 2004). La inducción de IL-10 y células Treg producida tras el reconocimiento de *C. albicans* podría indicar simplemente que la señalización dependiente de TLR2 está autorregulada para evitar una respuesta proinflamatoria exacerbada, de manera que la IL-10 y los Treg actuarían inhibiendo la respuesta inflamatoria una vez controlada la infección. Además, la inducción de células Treg por IL-10 producida por células dendríticas es necesaria para la generación de una inmunidad antifúngica de memoria a largo plazo, y por tanto, la menor respuesta de los ratones deficientes en TLR2 frente a *C. albicans* podría ser, al menos en parte, consecuencia de la disminución de la producción de IL-10 por células dendríticas (Montagnoli *et al.*, 2002; Bellocchio *et al.*, 2004)

Estas inconsistencias ponen de manifiesto la complejidad de las interacciones hongo-hospedador, que pueden estar influenciadas por una amplia variedad de parámetros relacionados tanto con el hospedador como con el hongo. Por lo tanto, los ensayos *in vitro* de producción de citocinas en respuesta a *C. albicans* pueden estar condicionados por la naturaleza del estímulo empleado. En esta tesis doctoral se ha estudiado la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias y Th1, TNF- α e IFN- γ , por células de ratones C57BL/6 y ratones KO TLR2-/- y TLR4-/- en respuesta a células de *C. albicans* viables e inactivadas por diferentes métodos, para determinar si las diferencias en la inducción de la respuesta del hospedador son debidas a alteraciones en la superficie celular fúngica, que pueden afectar a la exposición de PAMPs, producidas por los métodos de inactivación.

Los resultados presentados en este trabajo (apartado 2 del Capítulo I de Resultados y Discusión) indican que TLR2 es el principal PRR implicado en la inducción de citocinas proinflamatorias y citocinas Th1 (TNF- α e IFN- γ) por macrófagos de ratón y esplenocitos, respectivamente, en respuesta a los diferentes estímulos de *C. albicans*. Estos resultados no indican un papel importante de TLR4 en el reconocimiento de *C. albicans*, lo que apoya los resultados presentados previamente en este trabajo.

Además, los ligandos de los TLR presentes en la superficie celular del hongo (PAMPs) parecen estar conservados en todos los estímulos ensayados (células viables y

células inactivadas mediante tratamiento por calor, por fijación química o por tratamiento con un antifúngico), lo que indica que el tratamiento de inactivación no afecta significativamente a la exposición de ligandos fúngicos. Sin embargo, es importante destacar que Wheeler y Fink (2006) han encontrado que algunos tratamientos, como el tratamiento con dosis subinhibitorias de caspofungina, incrementan la exposición de β -glucanos, lo que provoca una mayor síntesis de TNF- α , probablemente mediada por el complejo dectina-1/TLR2. Se ha demostrado que la dectina-1, un receptor fagocítico que reconoce β -glucano de la pared celular fúngica, colabora con el receptor TLR2 en la inducción de una respuesta inflamatoria frente a la levadura, y que la dectina-1 participa en el reconocimiento de la levadura, y no del micelio, de *C. albicans* por los macrófagos, ya que el micelio no expone β -glucano en su superficie. Estas observaciones sugieren que la incapacidad del micelio de activar a través del receptor TLR2 podría contribuir a una disminución en la respuesta Th1 (Gantner *et al.*, 2003; 2005). Además, el receptor dectina-1 puede también estimular la señalización a través de una vía independiente de TLR2 para la producción de citocinas (Rogers *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2006).

A pesar de que no puede descartarse que las diferencias en los niveles de producción de citocinas observados en respuesta a los tres tipos de estímulos inactivados puedan deberse a modificaciones en la exposición de β -glucanos (u otros ligandos), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la exposición de glucano no está significativamente afectada por los tratamientos de inactivación, ya que la reducción en la producción de citocinas por células TLR2^{-/-} fue similar en respuesta a estímulos fúngicos viables y a los tres tipos de estímulos fúngicos inactivados. Además, se ha demostrado que los macrófagos reconocen de forma diferente *C. albicans* y *S. cerevisiae* a través de mecanismos que implican a TLR2 y galectina-3, lo que probablemente está asociado al reconocimiento de β -1,2 manósidos expresados exclusivamente en la superficie de la pared celular de *C. albicans* (Jouault *et al.*, 2006).

Estas observaciones también apoyan el modelo de la participación de los TLR en la respuesta del hospedador propuesto por nuestro grupo (Villamón *et al.*, 2004c; Gil *et al.*, 2005; Gil y Gozalbo, 2006a), que propone que TLR2 es el principal PRR implicado en la inducción de citocinas proinflamatorias a través de una vía de transducción de señal dependiente de MyD88 en respuesta tanto a levaduras como a micelios de *C. albicans* (Fig. 13). Las diferencias en la respuesta secretora frente a levaduras y

micelios de *C. albicans* (Van der Graaf *et al.*, 2005; Gil y Gozalbo, 2006a) puede implicar a otros PRRs además de TLR2, como dectina-1 y galectina-3, que pueden reconocer a diferentes PAMPs expuestos en la superficie celular de la levadura y/o el micelio. Además, ya que el zimósán y los estímulos fúngicos todavía retienen alguna capacidad de inducir citocinas en ausencia de TLR2, obviamente otros receptores pueden estar implicados en este proceso, como TLR4 y el receptor fagocítico dectina-1, que puede inducir la producción de citocinas de manera independiente de TLR2.

Otros autores (Gow *et al.*, 2007) han descrito que la producción de TNF- α en respuesta a levaduras inactivadas por calor está mediada mayoritariamente por la interacción de la dectina-1 con los β -glucanos que quedarían expuestos tras la inactivación de las levaduras, fenómeno que no se observa en respuesta a células fúngicas viables. En ensayos *in vitro* estos autores observan una gran diferencia en la producción de TNF- α al estimular con levaduras viables (niveles muy bajos de citocina) y levaduras inactivadas por calor (niveles muy altos de citocina), siendo la activación en este último caso inhibida en gran medida en presencia de glucan-fosfato, que bloquea la señalización por dectina-1. La interpretación de estos resultados es completamente errónea ya que estos autores no tienen en cuenta que no se pueden comparar estímulos fúngicos viables e inactivados, ya que en el primer caso las células fúngicas proliferan rápidamente destruyendo a las células fagocíticas y consumiendo los nutrientes del medio de cultivo durante los ensayos *in vitro* si las incubaciones son largas (18-24h), por lo que no son comparables ni la cantidad de estímulo ni el número de células fagocíticas.

Como se ha descrito en el apartado de Introducción, estudios recientes han mostrado la importancia de la respuesta Th17 en la respuesta inmunitaria del hospedador frente a *C. albicans*. La IL-23 es crítica para el mantenimiento de las células Th17, y la IL-17 induce la producción de quimiocinas en el sitio de infección y provoca reclutamiento de neutrófilos (Palm y Medzhitov, 2007); ratones deficientes en IL-17A son más susceptibles que los ratones control a una candidiasis sistémica, probablemente debido al menor porcentaje de neutrófilos reclutados (Huang *et al.*, 2004). Se ha descrito que el receptor dectina-1 induce la diferenciación de células Th17 mediada por el reconocimiento de *C. albicans* y también que un ligando puro de la dectina-1 (“curland”) induce una respuesta Th17 (LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007). Se ha sugerido que la dectina-2 promueve la secreción de IL-23 y la respuesta Th17 frente al

micelio, mientras que las levaduras, reconocidas por la dectina-1 y TLRs inducen una fuerte respuesta Th1 a través de la producción de más IL-12 que IL-23. La señalización a través de TLRs induce tanto IL-12 como IL-23 y por tanto participa en la generación de las respuestas Th (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Kabelitz y Medzhitov, 2007; LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007; Palm y Medzhitov, 2007). Se ha descrito que la señalización a través de TLR2 y TLR4 mediada por MyD88 participa en la secreción de IL-23 y el desarrollo de una respuesta Th17 que promueve inflamación y disminuye la resistencia inmunitaria antifúngica; la vía IL-23/Th17 ejerce de regulador negativo de la resistencia inmunitaria Th1 y juega un papel inflamatorio previamente atribuido a respuestas Th1 descontroladas, promoviendo inflamación y susceptibilidad durante la infección (Zelante *et al.*, 2007).

Como se ha descrito en el apartado de Introducción, diversos trabajos habían mostrado que las células NK expresan TLR funcionales y son capaces de responder a distintos ligandos de estos receptores aumentando su proliferación, su capacidad citotóxica y/o regulando la producción de citocinas (Hornung *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2003; Chalifour *et al.*, 2004; Sivori *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2005), aunque no existe información sobre la producción de citocinas tras el reconocimiento directo de las células fúngicas por las células NK. Por tanto, el objetivo inicial de este trabajo fue comprobar la posible participación de los receptores TLR en la producción *in vitro* de IFN- γ por células NK altamente purificadas en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans*, empleando para ello ratones KO TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-}. Sin embargo, durante la puesta a punto de la metodología necesaria para este estudio utilizando ratones control C57BL/6, se encontró un resultado inesperado: las células fúngicas inactivadas por calor producían una inhibición de la secreción *in vitro* de IFN- γ por células NK.

Cuando se analizó la capacidad de producción *in vitro* de IFN- γ de células NK altamente purificadas en respuesta a distintos estímulos se observó que las levaduras y micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor no estimulaban la producción de la citocina, mientras que los controles, zimosán (agonista del receptor TLR2) y LPS (agonista de TLR4) eran capaces de inducir niveles detectables de IFN- γ . Sin embargo, cuando se realizó una estimulación simultánea de las células NK con zimosán o LPS y con estímulos de *C. albicans*, los niveles de IFN- γ volvían a ser indetectables: las células fúngicas producen una inhibición de la producción de la citocina inducida por ligandos de TLR2 y TLR4 en células NK. Se repitió el mismo

experimento pero añadiendo al medio de cultivo distintas citocinas activadoras de las células NK (IL-2, IL-12 e IL-15) para comprobar si la inhibición producida por las células fúngicas también se producía en presencia de estas citocinas. En esta ocasión, y en presencia de todas las citocinas ensayadas, la producción de IFN- γ estaba también inhibida, de forma dosis-dependiente, por levaduras y micelios de *C. albicans* en respuesta a zimosán y a las citocinas. Ya que la inhibición observada podía ser efecto de una disminución en la viabilidad de las células NK causada por las células fúngicas, se comprobó la muerte celular tras la estimulación de las células NK. La viabilidad de las células NK fue similar en todos los casos, incluido en el control de células sin estimular, lo que indica que la inhibición de la producción de IFN- γ por células fúngicas no es producto de la inducción de la muerte de células NK por *C. albicans*.

Debido a que la partícula fúngica zimosán y las células inactivadas de *C. albicans* producían efectos opuestos en la producción de IFN- γ por células NK, también se comprobó la capacidad de una cepa no germinativa de *C. albicans*, la cepa PCA2, y de dos cepas de *S. cerevisiae*, la cepa SEY2101 y la cepa 1403, de inducir la producción de IFN- γ . Los resultados obtenidos mostraron que las levaduras inactivadas de las tres cepas eran capaces de inhibir la producción de la citocina por células NK, inducida por zimosán y en presencia de IL-2, de manera similar a la descrita para células inactivadas de la cepa *C. albicans* ATCC 26555. También se estudió la posible influencia del método de inactivación del hongo en el efecto inhibitorio descrito, comprobándose que células de *C. albicans* y *S. cerevisiae* inactivadas por calor, por fijación química o por tratamiento con un antifúngico eran también capaces de inhibir de manera similar la producción de IFN- γ , inducida por zimosán e IL-2, por células NK.

El receptor de las células NK implicado en este efecto es desconocido. Como se ha descrito previamente, las células NK poseen un elevado número de receptores, tanto activadores como inhibidores, y es el balance en las señales generadas por estos receptores el que determina la respuesta generada en estas células. En este trabajo se ha estudiado la implicación del receptor inhibitor CD94/NKG2A y de los receptores TLR2 y TLR4 en el efecto inhibitorio sobre la producción de IFN- γ producida por células fúngicas. Utilizando ratones DBA/2J, que no expresan de manera natural el receptor CD94/NKG2A en la superficie de las células NK, y ratones KO TLR2-/- y TLR4-/- se determinó que estos receptores no participan en la inhibición de la producción de IFN- γ por células NK mediada por células fúngicas, ya que en estos tres tipos de ratones

también se observó el efecto inhibitorio descrito. La naturaleza del ligando fúngico responsable tampoco se ha podido determinar; según los resultados obtenidos en este trabajo debe tratarse de una molécula asociada a pared celular, presente en células enteras y ausente en las partículas de zimosán, y probablemente no se trata de un ligando de TLR4 ni de TLR2.

Por último, también se estudió el efecto de las células de *C. albicans* en la proliferación de las células NK, y los resultados mostraron que las células de *C. albicans*, tanto levaduras como micelios, no tienen ningún efecto en la proliferación de las células NK inducida por IL-2, ni la aumentan ni la disminuyen, por lo que el efecto inhibitorio no es dependiente de una disminución de la proliferación causada por las células fúngicas.

A pesar de que la función *in vivo* de las células NK en la defensa del hospedador frente a bacterias invasivas o infecciones fúngicas no está claramente establecida, el efecto inhibitorio de las células de *C. albicans* sobre las células NK observado *in vitro* podría tener relevancia biológica *in vivo*. La participación de las células NK en la resistencia frente a *C. albicans* parece estar básicamente mediada por la producción de citocinas, incluyendo la producción de IFN- γ , que activa a las células fagocíticas (Marodi *et al.*, 1993; Arancia *et al.*, 1998), y por lo tanto la inhibición de esta producción puede favorecer la supervivencia del patógeno. Además, este efecto puede también (i) inhibir la producción de IFN- γ por células NK en respuesta a citocinas secretadas por otros tipos celulares activados (Hart *et al.*, 2005) y (ii) dificultar las interacciones entre células NK y células dendríticas, ya que el IFN- γ secretado por las NK controla la maduración de las células dendríticas y la actividad estimuladora de las células T (Degli-Esposti y Smyth, 2005; Della Chiesa *et al.*, 2005). Este fenómeno puede representar un nuevo mecanismo de evasión del sistema inmunitario, basado en la inhibición de las células NK, que contribuiría a la virulencia de *C. albicans*. El hecho de que *S. cerevisiae* y una cepa no virulenta de *C. albicans* muestren el mismo efecto únicamente indica que todas las cepas comparten el ligando o ligandos implicados en este fenómeno, pero no invalida la hipótesis, ya que la virulencia de *C. albicans* depende de una compleja combinación de factores de virulencia microbianos que están ausentes en las cepas de *S. cerevisiae* no virulentas.

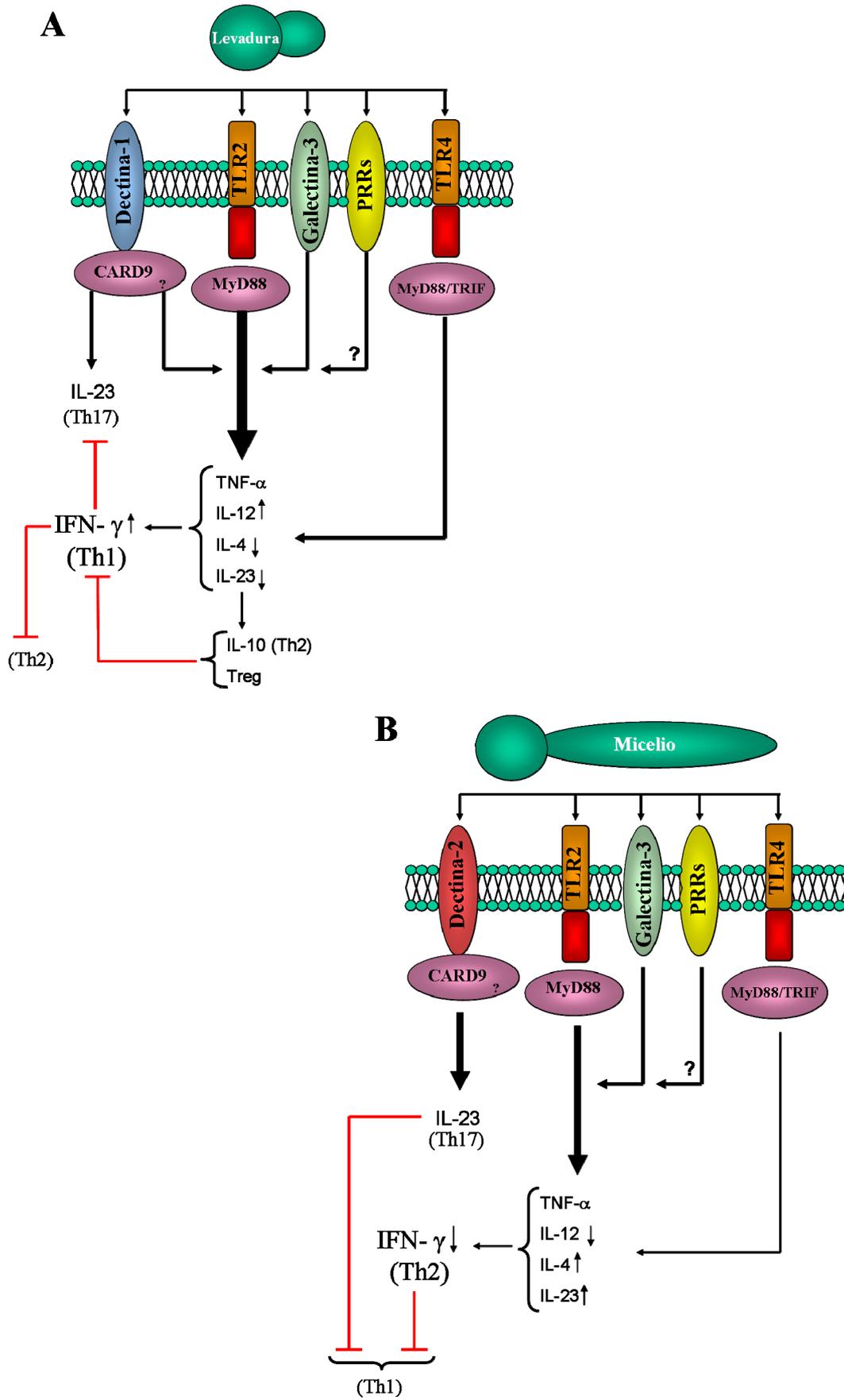


Fig. 13. Modelo hipotético simplificado de la respuesta inmunitaria tipo Th1 inducida por levaduras y micelios de *C. albicans*. (A) Las levaduras son reconocidas por TLR2, que induce una respuesta proinflamatoria temprana mediada por la producción de IL-12 dependiente de MyD88, lo que provoca el desarrollo de una respuesta Th1 protectora. Otros receptores, como la dectina-1, la galectina-3 y posiblemente otros PRRs todavía no descritos, colaboran con TLR2 en el desarrollo de la respuesta inmunitaria frente a las levaduras. TLR4 también puede contribuir al desarrollo de esta respuesta. La dectina-1 puede estimular, tras el reconocimiento de las levaduras, la producción de IL-10, una citocina que genera una respuesta Th17, mediante una vía independiente de MyD88. El balance está sesgado hacia la respuesta Th1, que inhibe a su vez el desarrollo de las respuestas Th17 y Th2. Para evitar una perjudicial respuesta inflamatoria exacerbada, la respuesta Th1 necesita ser contrarestanda mediante la secreción tardía de IL-10, una citocina Th2, y mediante células Treg. (B) TLR2 también media en el reconocimiento del micelio, pero en este caso induce el desarrollo de una respuesta Th2 no protectora, posiblemente debido a su colaboración con PRRs que reconocen diferencialmente levaduras o micelios y modulan las vías de señalización. TLR4 también puede contribuir a las respuestas inducidas tras el reconocimiento del micelio, aunque en menor medida que su implicación en el reconocimiento de la levadura. La dectina-2 interacciona preferentemente con micelio e induce la producción de IL-23 promoviendo la respuesta Th17. Debido a que la respuesta Th2 está inducida por una baja producción de IL-12 e IFN- γ , el desarrollo Th17 no está inhibido y, además, tanto la respuesta Th17 como la Th2 inhiben el desarrollo de una respuesta Th1. El balance final es la inducción de respuestas Th2 o Th17 dependiendo de múltiples factores (microambiente de citocinas, lugar de la infección, cepa fúngica, estado inmunológico del hospedador, etc.) aún no bien definidos; en cualquier caso, ambas respuestas son perjudiciales para el hospedador, ya que la respuesta antiinflamatoria no es protectora, mientras que la respuesta Th17 provoca una respuesta inflamatoria aumentada perjudicial que confiere susceptibilidad a la candidiasis. (Gil y Gozalbo, en prensa).

Capítulo II

Estudio de la expresión y
función de los receptores TLR durante el
envejecimiento: influencia en la respuesta
inmunitaria frente a *Candida albicans*

En adultos ancianos, las alteraciones en la inmunidad innata y adaptativa (inmunosenescencia) provocan un aumento de la susceptibilidad a diferentes infecciones. A pesar de que durante el envejecimiento ocurren diferentes alteraciones bien documentadas (descritas en el apartado de Introducción) todavía se sabe muy poco acerca de los cambios en la expresión y función de los receptores tipo Toll asociados al envejecimiento. Además, los escasos trabajos que han estudiado la función de los receptores tipo Toll en la inmunosenescencia presentan, en ocasiones, resultados contradictorios (Renshaw *et al.*, 2002; Boehmer *et al.*, 2004).

Las infecciones invasivas por *C. albicans* han aumentado su frecuencia entre la población anciana en los últimos años. Además de que el proceso de inmunosenescencia incrementa el riesgo y la severidad de las candidiasis en adultos ancianos, hay que considerar que, cada vez con mayor frecuencia, en la población de ancianos concurren distintos factores de riesgo, en gran parte consecuencia de los avances médicos: tratamientos inmunosupresores en transplantados y enfermos de cáncer, quimioterapia antibacteriana de amplio espectro, cirugía, etc.

En este trabajo se ha investigado el efecto de la inmunosenescencia en la expresión y función de los receptores TLR utilizando dos modelos experimentales distintos: (i) un modelo murino, utilizando ratones jóvenes y ancianos, y (ii) un modelo humano, utilizando sangre completa procedente de voluntarios jóvenes y ancianos. Los objetivos concretos y los procedimientos experimentales utilizados han sido distintos en cada modelo, aunque sin perder de vista el objetivo global del trabajo.

1. Modelo murino

Para el estudio del efecto de la inmunosenescencia del ratón en la expresión y función de los receptores TLR se ha comparado en ratones jóvenes y ancianos (i) la susceptibilidad *in vivo* a la candidiasis invasiva experimental, (ii) la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias, antiinflamatorias y quimiocinas por macrófagos en respuesta a *C. albicans*, (iii) el reclutamiento de células fagocíticas a la cavidad peritoneal, (iv) la actividad fungicida de macrófagos y neutrófilos, (v) los niveles de TLR2 en la superficie de macrófagos, (vi) la producción de citocinas Th1 por esplenocitos en respuesta al hongo, (vii) el desarrollo de una respuesta Th1 específica frente a *C. albicans* y (viii) la capacidad de desarrollar, tras vacunación con una cepa no virulenta, una resistencia adquirida y una respuesta humoral frente al hongo.

1.1. Susceptibilidad *in vivo* de ratones ancianos a la infección sistémica experimental por *C. albicans*.

En primer lugar se estudió el efecto de la inmunosenescencia en la resistencia del hospedador a la candidiasis sistémica. Para ello ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos fueron infectados por vía intravenosa con levaduras de la cepa virulenta *C. albicans* ATCC 26555. Los ratones fueron infectados con $0,8 \times 10^6$ levaduras por ratón y durante 21 días se monitorizó su supervivencia (Fig. 14A). Se eligió esta dosis fúngica tras estudios preliminares que evaluaron las tasas de mortalidad en ratones C57BL/6 jóvenes según el número de levaduras inyectado.

En estas condiciones el porcentaje de animales muertos a día 21 fue de 83% en el caso de los ratones ancianos, mientras que únicamente el 44% de ratones jóvenes había muerto a día 21 postinfección. Esta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,0031$) indica que, en nuestro modelo experimental, los ratones ancianos son más susceptibles a la candidiasis invasiva.

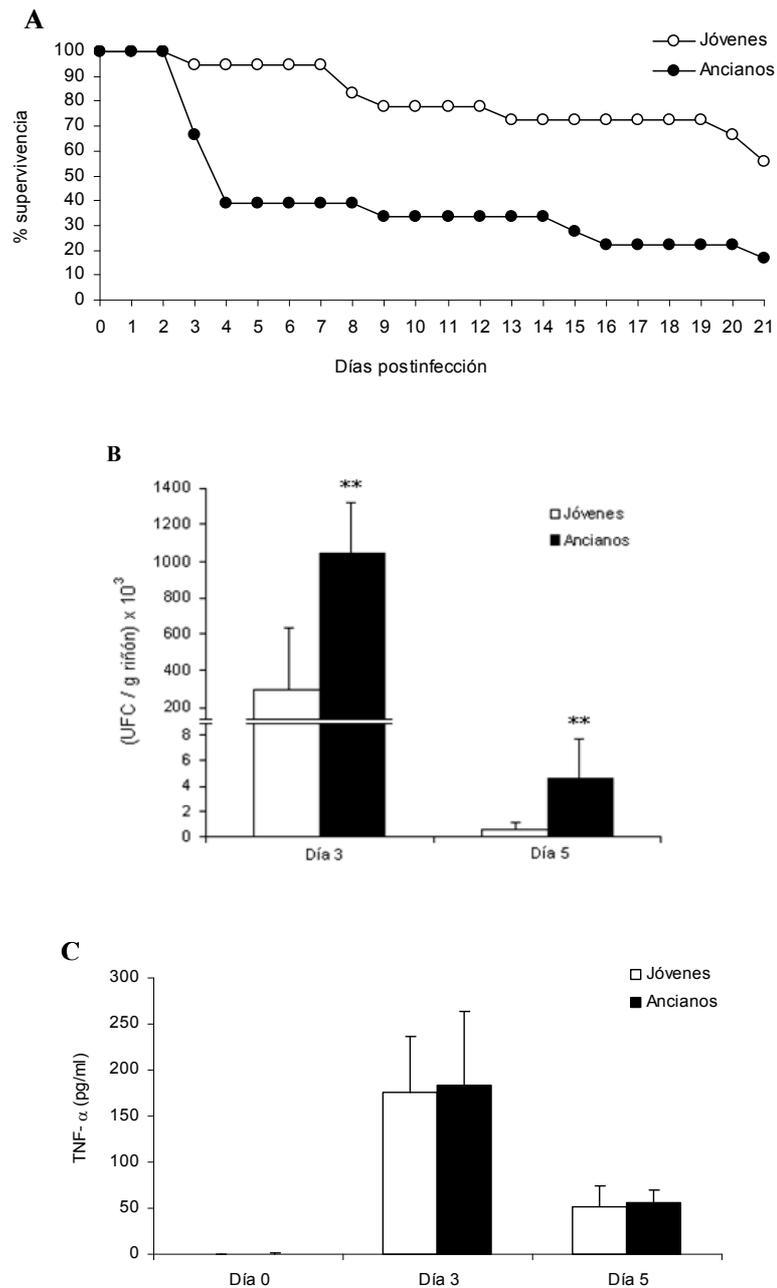


Fig. 14. Susceptibilidad *in vivo* de ratones jóvenes y ancianos a una infección sistémica experimental por *C. albicans*. (A) Ratones jóvenes y ancianos ($n = 18$) fueron infectados por vía i.v. con $0,8 \times 10^6$ levaduras de la cepa *C. albicans* ATCC 26555, y la supervivencia fue monitorizada durante 21 días. Los datos muestran un experimento representativo de dos. (B, C) Lotes adicionales de ratones jóvenes y ancianos fueron infectados de manera análoga. 4 ratones de cada grupo fueron sacrificados a día 3 y a día 5 postinfección y se determinó tanto la carga fúngica (UFC) (B) como los niveles de TNF- α (C) en riñón. Los niveles de TNF- α en riñón también fueron determinados en 2 ratones no infectados de cada grupo (día 0). Los resultados están expresados como la media \pm desviación estándar de un experimento representativo de dos. ** $P \leq 0,01$

Otro parámetro que indica el nivel de desarrollo de la infección sistémica es la invasión de los riñones por el hongo, ya que este órgano es el más afectado durante la infección. Para cuantificar la invasión fúngica del riñón en nuestro modelo de candidiasis invasiva experimental, se infectaron ratones jóvenes y ancianos de la misma forma ($0,8 \times 10^6$ levaduras por ratón) y, tras el sacrificio de un número adecuado de ratones a día 3 y 5 postinfección, se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de riñón. Como se puede observar en la figura 14B, el número de UFC en este órgano fue significativamente superior en ratones ancianos comparado con ratones jóvenes, tanto a día 3 como a día 5 postinfección, lo que indica de nuevo una mayor susceptibilidad de los ratones ancianos a la candidiasis sistémica.

También se midieron los niveles de TNF- α en los órganos (riñón) de los animales infectados, como indicador de la respuesta inflamatoria inducida por la infección. Se observó que, los niveles de TNF- α en los homogenados del órgano eran similares en ratones jóvenes y ancianos (Fig. 14C). Sin embargo, cuando se calcularon los niveles relativos de la citocina respecto a la carga fúngica en cada órgano $[(\text{pg/ml})/(\text{UFC} \times 10^{-6})]$, a día 3 postinfección se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre ratones jóvenes (3500 ± 1100) y ancianos (550 ± 240), lo que indica que la producción relativa de TNF- α en respuesta a la misma cantidad de estímulo fúngico está disminuida en ratones ancianos.

Cuando se realizaron los mismos ensayos con una dosis más baja de *C. albicans* ATCC 26555 ($0,65 \times 10^6$ levaduras) también se encontraron diferencias similares entre ratones jóvenes y ancianos, tanto en la invasión fúngica del riñón como en los niveles de TNF- α en este órgano a día 3 postinfección (dato no mostrado).

1.2. Efecto del envejecimiento en la producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos.

A continuación se planteó el estudio de las posibles causas de la mayor susceptibilidad de los ratones ancianos a las candidiasis. Debido a que el TNF- α es una citocina clave en la defensa frente a las candidiasis, se determinó la producción *in vitro* de esta citocina por macrófagos peritoneales residentes, obtenidos de ratones jóvenes y ancianos, en respuesta a *C. albicans*. Como controles se incluyeron LPS y zimosán, agonistas de TLR2 y TLR4 respectivamente, y macrófagos sin estimular, para detectar los niveles basales de la citocina.

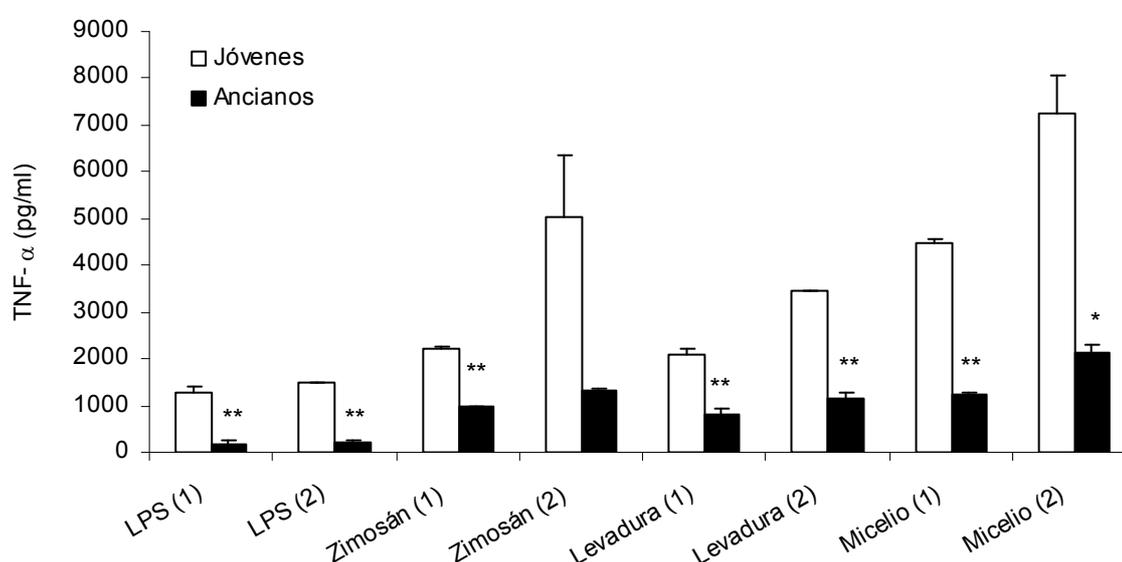


Fig. 15. Producción *in vitro* de TNF- α por macrófagos en respuesta a *C. albicans*. Macrófagos peritoneales residentes de ratones jóvenes y ancianos fueron estimulados durante 24 h con LPS (250 ng/ml y 500 ng/ml; muestras 1 y 2 respectivamente), zimosán ($3,75 \times 10^6$ partículas/ml y $7,5 \times 10^6$ partículas/ml; muestras 1 y 2 respectivamente), levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor [150 y 300 μ g (peso seco) de células/ml; muestras 1 y 2 respectivamente] y micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor [150 y 300 μ g (peso seco) de células/ml; muestras 1 y 2 respectivamente]. Los niveles de TNF- α en los sobrenadantes libres de células de los cultivos se determinaron por ELISA. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

Los niveles basales de la citocina medidos en los sobrenadantes de los cultivos de células sin estimular estuvieron por debajo del límite de detección (< 8 pg/ml) en ambos tipos de macrófagos. Se observó que la producción de TNF- α en respuesta a LPS y zimosán estaba significativamente disminuida en macrófagos de ratones ancianos en comparación con macrófagos de ratones jóvenes (Fig. 15). De igual forma, la producción de TNF- α por macrófagos de ratones ancianos en respuesta a las dosis utilizadas de levaduras y micelios de *C. albicans* fue significativamente menor que la producción de dicha citocina por macrófagos de ratones jóvenes.

1.3. Producción *in vitro* de citocinas y quimiocinas por macrófagos purificados.

Al realizar el experimento anterior se observó que el número total de células en la cavidad peritoneal de ratones ancianos era de 4 a 5 veces superior a la de los ratones jóvenes. Aunque los ratones ancianos tenían un peso medio superior al de los ratones jóvenes ($26,9 \pm 4,4$ gramos frente a $18,7 \pm 2,9$ gramos), esta diferencia de peso no explicaba por sí sola la diferencia en el número de células peritoneales. Por lo tanto se consideró interesante estudiar esta población celular en ancianos, ya que en ratones adultos aproximadamente el 80-90% de las células de la cavidad peritoneal son macrófagos. Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula F4/80 presente en la superficie de macrófagos maduros se determinó, mediante citometría de flujo, que únicamente el 56% de las células de la cavidad peritoneal de ratones ancianos expresan este marcador. Debido a este bajo porcentaje de macrófagos, se estudió esta población de células mediante citometría de flujo utilizando diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen moléculas presentes en distintos tipos de células inmunitarias maduras. Se observó que esta población no contenía células que expresen marcadores de linfocito T, linfocito B, célula NK, célula dendrítica o neutrófilo. El único marcador expresado por estas células fue la molécula de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) (datos no mostrados). Aunque no fue posible determinar la naturaleza de estas células, se puede sugerir que las células de la cavidad peritoneal de ratones ancianos son macrófagos que han perdido o disminuido la expresión de marcadores de célula madura, por lo que podían tener también alteradas otras funciones.

Por tanto, como la menor producción de TNF- α por células peritoneales totales de ratones ancianos podía ser debida al menor porcentaje de macrófagos maduros y no a una pérdida de funcionalidad de los mismos, se repitieron los experimentos de producción de TNF- α en respuesta a *C. albicans* utilizando macrófagos purificados. Para ello, mediante selección inmunomagnética, se purificaron macrófagos maduros (CD11b⁺) a partir de células peritoneales residentes y se estimularon *in vitro* con levaduras y micelios de *C. albicans*, utilizando como controles zimosán, como agonista de TLR2, y células sin estimular. Además, en los sobrenadantes libres de células de estos cultivos también se determinaron los niveles de otras dos citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-1 β), de la quimiocina MIP-2 (“Macrophage Inflammatory Protein-2”) y de la citocina antiinflamatoria IL-10.

Tal como se observó en las células residentes peritoneales totales, los macrófagos purificados a partir de células residentes peritoneales de ratones ancianos presentaban, al compararlos con los macrófagos purificados de ratones jóvenes, un defecto en la producción de TNF- α en respuesta a todos los estímulos utilizados: levaduras y micelios de *C. albicans* y zimosán (Fig. 16A). La producción de las otras citocinas proinflamatorias ensayadas (IL-6 e IL-1 β) también estaba disminuida en estos macrófagos en respuesta a todos los estímulos utilizados (Fig. 16B y 16C).

También la producción de la quimiocina MIP-2, una quimiocina CXC que induce quimiotaxis y activación de neutrófilos, por macrófagos (CD11b⁺) de ratones ancianos en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans* estaba significativamente disminuida, comparada con la producción por macrófagos de ratones jóvenes (Fig. 16D). Sin embargo, a diferencia de las citocinas proinflamatorias y la quimiocina MIP-2, la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans* no estaba afectada en macrófagos de ratones ancianos (Fig. 16E) y la producción de IL-10 en respuesta a zimosán estaba incluso aumentada en los macrófagos de ratones ancianos, en comparación con los macrófagos de ratones jóvenes. En todos los casos la producción basal de citocina o quimiocina por células sin estimular fue indetectable (dato no mostrado).

La menor producción de citocinas proinflamatorias, unido a una producción similar de citocinas antiinflamatorias en ratones ancianos, desplazaría el equilibrio Th1/Th2 hacia una respuesta antiinflamatoria (Th2), lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor susceptibilidad de los ratones ancianos a las candidiasis.

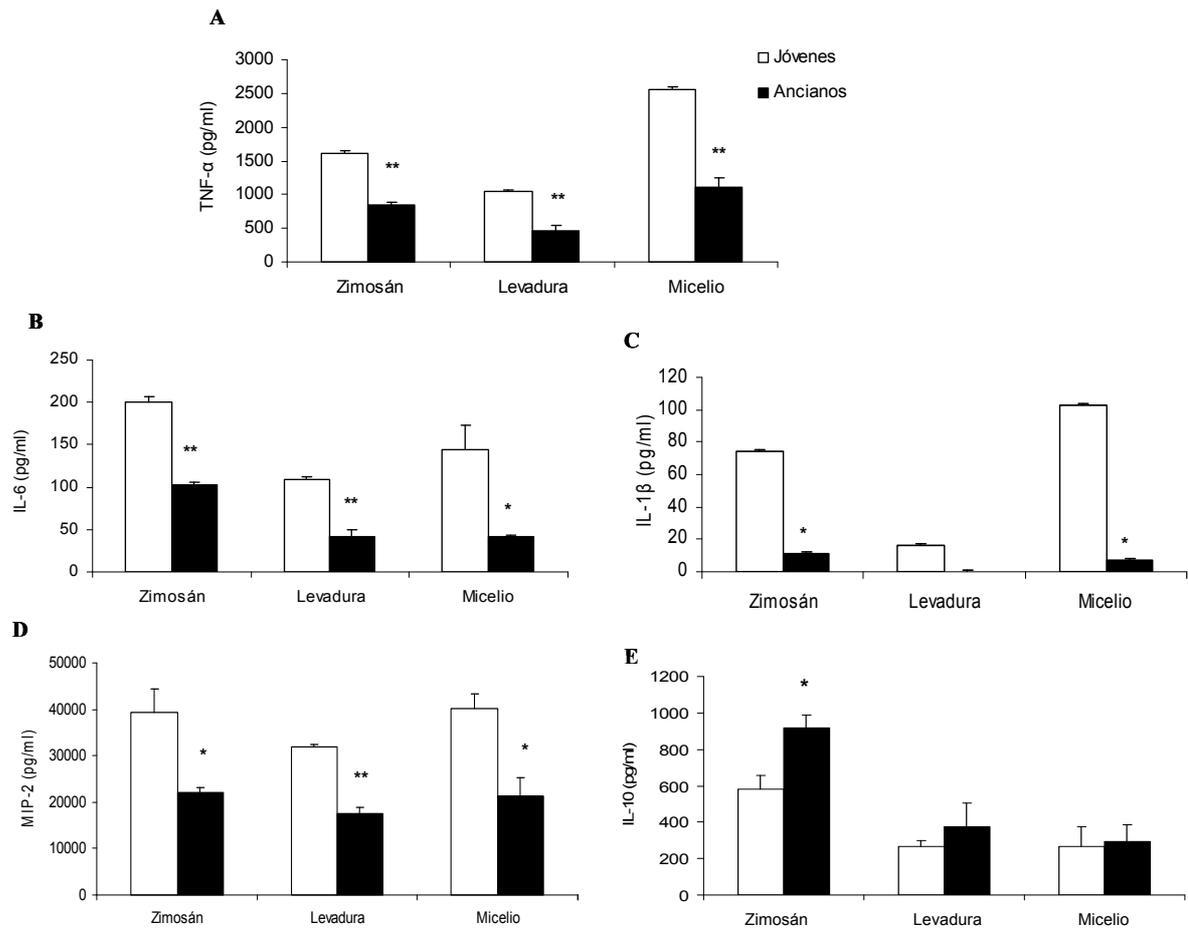


Fig. 16. Producción *in vitro* de citocinas y quimiocinas por células residentes peritoneales CD11b⁺ de ratones jóvenes y ancianos en respuesta a *C. albicans*. Células peritoneales residentes CD11b⁺ purificadas a partir de ratones jóvenes y ancianos fueron estimuladas *in vitro* durante 24 h con zimosán ($3,75 \times 10^6$ partículas/ml), levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por fijación [300 μ g (peso seco) de células/ml] y micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por fijación [300 μ g (peso seco) de células/ml]. Los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF- α (A), IL-6 (B) y IL-1 β (C), de la quimiocina MIP-2 (D) y de la citocina antiinflamatoria IL-10 (E) fueron determinados por ELISA en los sobrenadantes libres de células de los cultivos. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

1.4. Reclutamiento de células fagocíticas a la cavidad peritoneal.

A continuación, y debido a la heterogeneidad encontrada en la población celular de la cavidad peritoneal de ratones ancianos, así como la menor producción de citocinas proinflamatorias por sus macrófagos, se estudió si también existía alguna alteración en el reclutamiento de células fagocíticas a la cavidad peritoneal. Para ello se inyectaron 10×10^6 levaduras de *C. albicans* inactivadas por calor en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos, y se recogieron las células de la cavidad 4 o 72 h tras la inyección (para recuperar mayoritariamente neutrófilos o macrófagos, respectivamente). Mediante citometría de flujo se determinó en la población reclutada el porcentaje de macrófagos y neutrófilos, utilizando como marcadores específicos anticuerpos monoclonales conjugados con un fluorocromo. Las células recogidas de la cavidad peritoneal de ratones sin inyectar (tiempo 0 h) fueron analizadas como control.

Los resultados se muestran en la Tabla 1. El porcentaje de neutrófilos reclutados (a 4 h) fue significativamente menor en los ratones ancianos comparado con los ratones jóvenes (65,1% frente a 83,7%). Sin embargo, teniendo en consideración el número total de células en la cavidad peritoneal en los ratones ancianos, que es de 4 a 5 veces superior al de los ratones jóvenes, el número total de neutrófilos reclutados es incluso superior al de los ratones jóvenes (aproximadamente 3 veces superior). Lo mismo se observó en el caso de macrófagos reclutados (a 72 h): el porcentaje de macrófagos fue menor en ratones ancianos que en ratones jóvenes (50,3% frente a 67,5%), pero, teniendo en cuenta el número total de células reclutadas, el número total de macrófagos es superior en ratones ancianos que en ratones jóvenes.

Por lo tanto estos resultados indican que, aunque el porcentaje de células fagocíticas reclutadas sea menor en ratones ancianos, el número absoluto de células fagocíticas que acuden al foco de infección no está disminuido en ratones ancianos en comparación con los ratones jóvenes.

Tabla 1. Porcentaje de neutrófilos y macrófagos en la cavidad peritoneal de ratones jóvenes y ancianos

Tiempo	Células Peritoneales Totales		% células Ly-6G ⁺		% células F4/80 ⁺	
	Jóvenes	Ancianos	Jóvenes	Ancianos	Jóvenes	Ancianos
0 h	(3,3 ± 0,7) x 10 ⁶	(15,8 ± 3,3) x 10 ⁶ (**)	0,7 ± 0,1	1,5 ± 0,9	90,4 ± 5,1	56,7 ± 10,5 (**)
4 h	(3,6 ± 0,6) x 10 ⁶	(16,7 ± 1,1) x 10 ⁶ (**)	83,7 ± 3,1	65,1 ± 10,1 (**)	7,8 ± 2,7	19,6 ± 8,3
72 h	(4,4 ± 0,8) x 10 ⁶	(18,2 ± 4,8) x 10 ⁶ (**)	8,3 ± 5,9	4,4 ± 6,5	67,5 ± 6,9	50,3 ± 10,4 (*)

Tiempo: Horas tras la inyección i.p. de 10⁷ levaduras de *C. albicans* inactivadas por calor.

Células peritoneales totales: número medio de células peritoneales por ratón (n = 4)

% células Ly-6G⁺: porcentaje de neutrófilos en la cavidad peritoneal (n = 4)

% células F4/80⁺: porcentaje de macrófagos en la cavidad peritoneal (n = 4)

Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01

1.5. Actividad fungicida de células fagocíticas.

Para estudiar el efecto del envejecimiento sobre la capacidad fungicida de neutrófilos y macrófagos, se determinó la supervivencia de levaduras de *C. albicans* tras su incubación con células fagocíticas obtenidas de ratones jóvenes y ancianos. Se ensayaron diferentes poblaciones de células fagocíticas: (i) neutrófilos peritoneales reclutados, (ii) neutrófilos Ly6G⁺ purificados mediante selección inmunomagnética a partir de neutrófilos peritoneales reclutados, (iii) neutrófilos Ly6G⁺ purificados mediante selección inmunomagnética a partir de células de médula ósea, (iv) macrófagos peritoneales reclutados, (v) macrófagos CD11b⁺ purificados mediante selección inmunomagnética a partir de macrófagos peritoneales reclutados y (vi) macrófagos CD11b⁺ purificados mediante selección inmunomagnética a partir de macrófagos peritoneales residentes. Las distintas poblaciones celulares se cocultivaron con levaduras de la cepa PCA2 de *C. albicans*, se cuantificó el número de levaduras viables (UFC) y se calculó el porcentaje de muerte en cada muestra, tal como se indica en Material y Métodos.

Tabla 2. Capacidad fungicida de células fagocíticas de ratones jóvenes y ancianos.

Célula fagocítica	% Muerte	
	Jóvenes	Ancianos
Neutrófilos peritoneales reclutados:		
- Células totales	74,6 ± 0,1	23,7 ± 0,4 (**)
- Células Ly-6G ⁺	78,7 ± 3,6	83,8 ± 2,7
Células de médula ósea Ly-6G ⁺	68,2 ± 0,9	64,2 ± 1,1
Macrófagos peritoneales reclutados :		
- Células totales	67,1 ± 0,2	50,6 ± 0,4 (**)
- Células CD11b ⁺	86,4 ± 1,5	83,3 ± 1,8
Células peritoneales residentes CD11b ⁺	70,2 ± 1,6	65,1 ± 1,9

$$\% \text{ muerte} = [1 - (\text{UFC muestra (t= 2 o 4 h)}) / (\text{UFC control (t=2 o 4 h)})] * 100$$

Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. ** $P \leq 0,01$

Como se indica en la Tabla 2, las células reclutadas totales (neutrófilos y macrófagos) obtenidas de ratones jóvenes eran capaces de eliminar más eficazmente a *C. albicans* que las células obtenidas a partir de ratones ancianos. Sin embargo cuando se utilizaron células peritoneales reclutadas y purificadas, las procedentes de ratones ancianos, tanto macrófagos como neutrófilos, eran capaces de eliminar igual de eficazmente a las levaduras que las obtenidas a partir de ratones jóvenes.

La actividad fungicida de células CD11b⁺ purificadas a partir de células peritoneales residentes fue similar en ratones jóvenes y ancianos. Sin embargo, cuando se utilizó la población total de células de ratones ancianos deplecionada en las células CD11b⁺, su capacidad fungicida fue muy baja (porcentaje de muerte = 48.8 % ± 2,8)

Estos resultados indican que la población celular presente en la cavidad peritoneal de ratones ancianos que ha perdido marcadores de superficie tiene disminuida su capacidad fungicida, pero que las células fagocíticas, neutrófilos y macrófagos, que mantienen la expresión de marcadores de célula madura, conservan intacta su capacidad fungicida.

1.6. Expresión de TLR2 en la superficie de macrófagos.

Dado que nuestro grupo había descrito anteriormente que TLR2 es el principal receptor implicado en la producción *in vitro* de citocinas por macrófagos en respuesta a *C. albicans* (Villamón *et al.*, 2004c), se determinaron los niveles de este receptor en la superficie de macrófagos de ratones jóvenes y ancianos. Utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TLR2 se cuantificaron mediante citometría de flujo los niveles basales del receptor en células peritoneales residentes totales y en macrófagos CD11b⁺ purificados a partir de células peritoneales residentes de ratones jóvenes y ancianos.

Los resultados (Fig. 17) mostraron que tanto el porcentaje de células que expresaban TLR2 (TLR2⁺) como la intensidad media de fluorescencia eran menores en las dos poblaciones de células procedentes de ratones ancianos que en las células de ratones jóvenes. Esta menor expresión de TLR2 podría estar relacionada con la menor producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias por macrófagos de ratones ancianos.

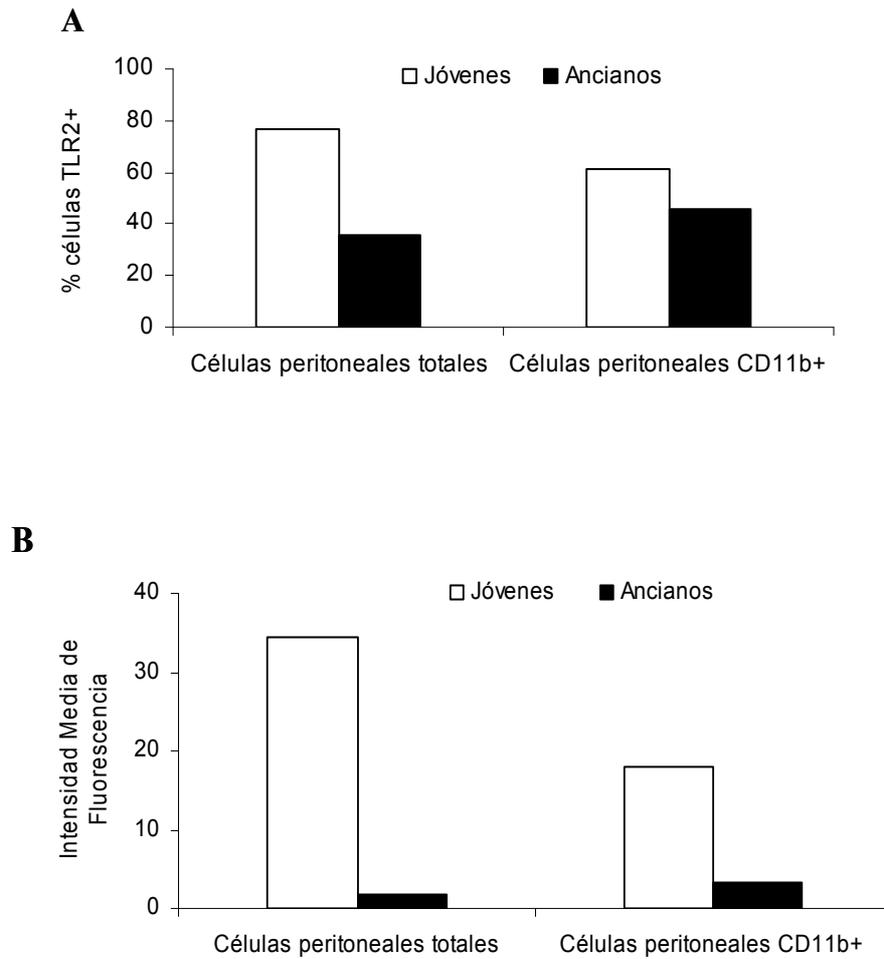


Fig. 17. Expresión de TLR2 en macrófagos peritoneales residentes, totales y purificados, de ratones jóvenes y ancianos. Porcentaje de células TLR2⁺ relativizado a la marca obtenida con el correspondiente anticuerpo de isotipo control (A) e intensidad media de fluorescencia (B) analizados por citometría de flujo en células peritoneales totales y macrófagos CD11b⁺ peritoneales obtenidos de ratones jóvenes y ancianos. Las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-TLR2 conjugado con PE y con su correspondiente anticuerpo isotipo control. Los resultados muestran los datos de un experimento representativo de dos.

1.7. Producción *in vitro* de citocinas por esplenocitos.

A continuación se estudió la respuesta inmunitaria específica frente a *C. albicans* en ratones ancianos. Para ello, en primer lugar se analizó la producción de IFN- γ por esplenocitos en respuesta al hongo. Esta citocina es clave en la defensa frente a las candidiasis ya que, entre otras funciones, activa la capacidad fungicida de neutrófilos ayudando a la eliminación del patógeno.

Los animales fueron infectados por vía i.v. con $0,4 \times 10^6$ levaduras de la cepa de baja virulencia *C. albicans* PCA2 o con la cepa virulenta *C. albicans* ATCC 26555. Tres días después de esta infección primaria se obtuvieron los esplenocitos, que fueron reestimulados *in vitro* con levaduras y micelios inactivados de *C. albicans*, utilizando como controles células sin reestimar y reestimuladas con LPS y zimosán, como agonistas de TLR4 y TLR2 respectivamente.

Como se observa en la figura 18A, en ratones ancianos infectados con la cepa PCA2 del hongo los niveles de IFN- γ producidos por los esplenocitos, en respuesta a todos los estímulos ensayados, estaban significativamente disminuidos, en comparación con los niveles producidos por esplenocitos de ratones jóvenes. Además, en estas células también se determinaron los niveles de la citocina TNF- α . Como ya se había observado en macrófagos peritoneales, los niveles de producción de esta citocina estaban disminuidos en los esplenocitos de ratones ancianos en respuesta a todos los estímulos ensayados: LPS (55% de inhibición respecto a los ratones jóvenes), zimosán (70% de inhibición), levaduras (50% - 90% de inhibición dependiendo de la dosis) y micelios (47% - 87% de inhibición dependiendo de la dosis).

Cuando este ensayo se realizó utilizando esplenocitos obtenidos a partir de ratones infectados con una dosis subletal de la cepa virulenta ATCC 26555 se obtuvieron los siguientes resultados: los esplenocitos de ratones ancianos presentaban una disminución estadísticamente significativa de la producción *in vitro* de IFN- γ frente a todos los estímulos ensayados en comparación con la producción de esta citocina por los esplenocitos de ratones jóvenes (Fig. 18B).

Tal como ya se había descrito previamente (Romani *et al.*, 1991; Romani, 2004; Villamón *et al.*, 2004a), la producción de IFN- γ fue menor en respuesta a micelios de *C. albicans* que en respuesta a levaduras (Fig. 18A y 18B).

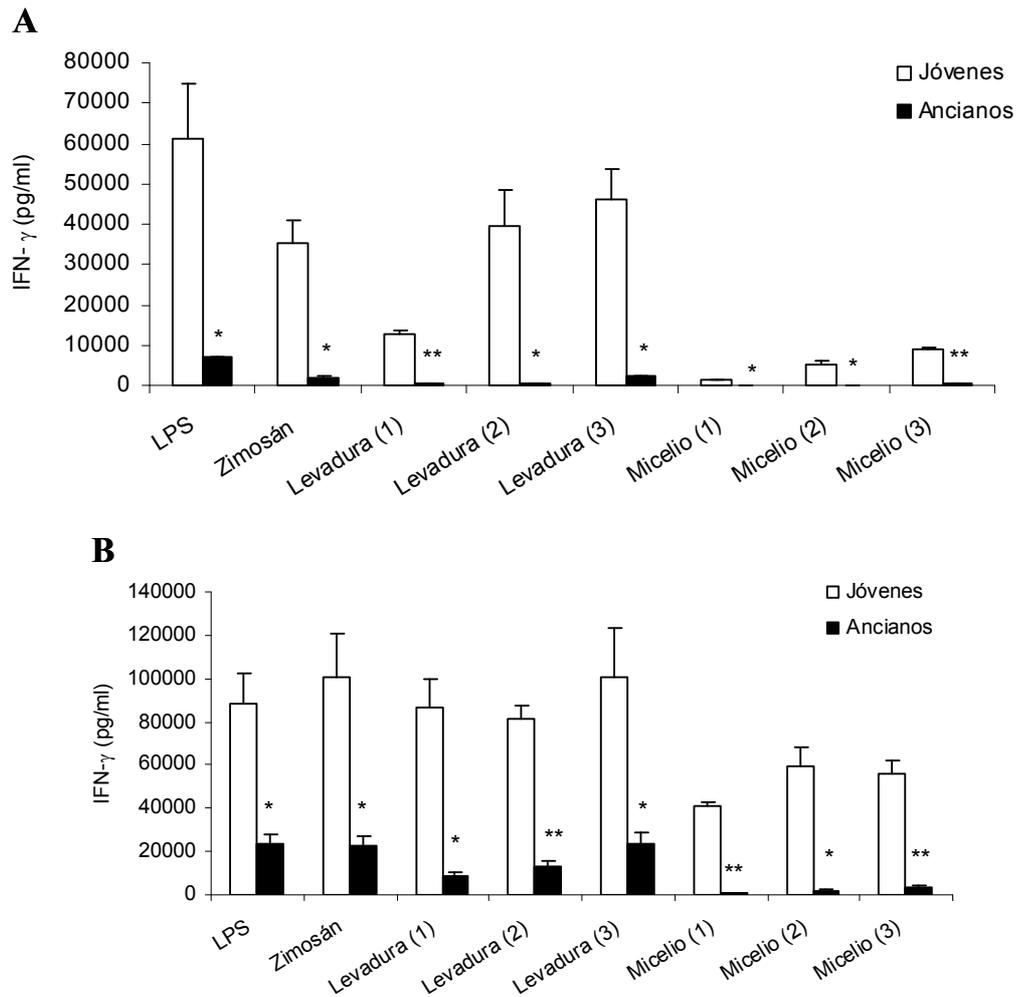


Fig. 18. Producción *in vitro* de IFN- γ por esplenocitos de ratones infectados en respuesta a *C. albicans*. Esplenocitos obtenidos de ratones jóvenes y ancianos [previamente infectados con $0,4 \times 10^6$ levaduras de la cepa de *C. albicans* PCA2 (A) o ATCC 26555 (B)] fueron reestimulados *in vitro* durante 48 h con LPS (250 ng/ml), zimosán ($3,75 \times 10^6$ partículas/ml), levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor [15, 30 o 60 μ g (peso seco) de células/ml; muestras 1, 2 y 3 respectivamente] y micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por calor [15, 30 o 60 μ g (peso seco) de células/ml; muestras 1, 2 y 3 respectivamente]. La concentración de IFN- γ en los sobrenadantes libres de células de los cultivos se determinó por ELISA. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar de duplicados de un experimento representativo de dos. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

1.8. Efecto del envejecimiento en el desarrollo de una respuesta Th1 frente a *C. albicans*.

Para estudiar el efecto del envejecimiento en el desarrollo de una respuesta adquirida Th1 específica de *C. albicans*, se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ en ratones infectados. Ratones jóvenes y ancianos fueron infectados con la cepa PCA2 o con la cepa ATCC 26555 de *C. albicans*, de manera idéntica a la descrita para el estudio de la producción *in vitro* de IFN- γ . A día tres postinfección se obtuvieron los esplenocitos de estos animales, fueron reestimulados *in vitro* durante 18 h con levaduras y micelios inactivados del hongo, utilizándose células sin reestimar como control, y se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ mediante citometría de flujo utilizando un “kit” de la casa comercial Miltenyi Biotec, tal como se ha descrito en Material y Métodos. Además, las células fueron simultáneamente marcadas con dos anticuerpos monoclonales para seleccionar las células CD3⁺ CD4⁺, es decir, los linfocitos T auxiliares.

En la figura 19A se muestran los resultados obtenidos con los ratones infectados con la cepa de baja virulencia PCA2. Se puede observar como el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ en respuesta a levaduras y micelios de *C. albicans* fue mayor en ratones jóvenes al compararlos con los ratones ancianos. También se obtuvieron resultados similares al utilizar esplenocitos obtenidos de ratones jóvenes y ancianos infectados con una dosis subletal de la cepa virulenta ATCC 26555; los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ fueron menores en ratones ancianos (Fig. 19B).

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos anteriormente en los experimentos de producción *in vitro* de IFN- γ por esplenocitos de ratones infectados, y demuestran que los ratones ancianos presentan defectos en el desarrollo de una respuesta inmunitaria Th1 específica frente a *C. albicans*. El porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ fue menor en respuesta a micelios que a levaduras de *C. albicans*, tanto en ratones jóvenes como ancianos, lo que concuerda también con los datos obtenidos anteriormente para la producción *in vitro* de la citocina por esplenocitos.

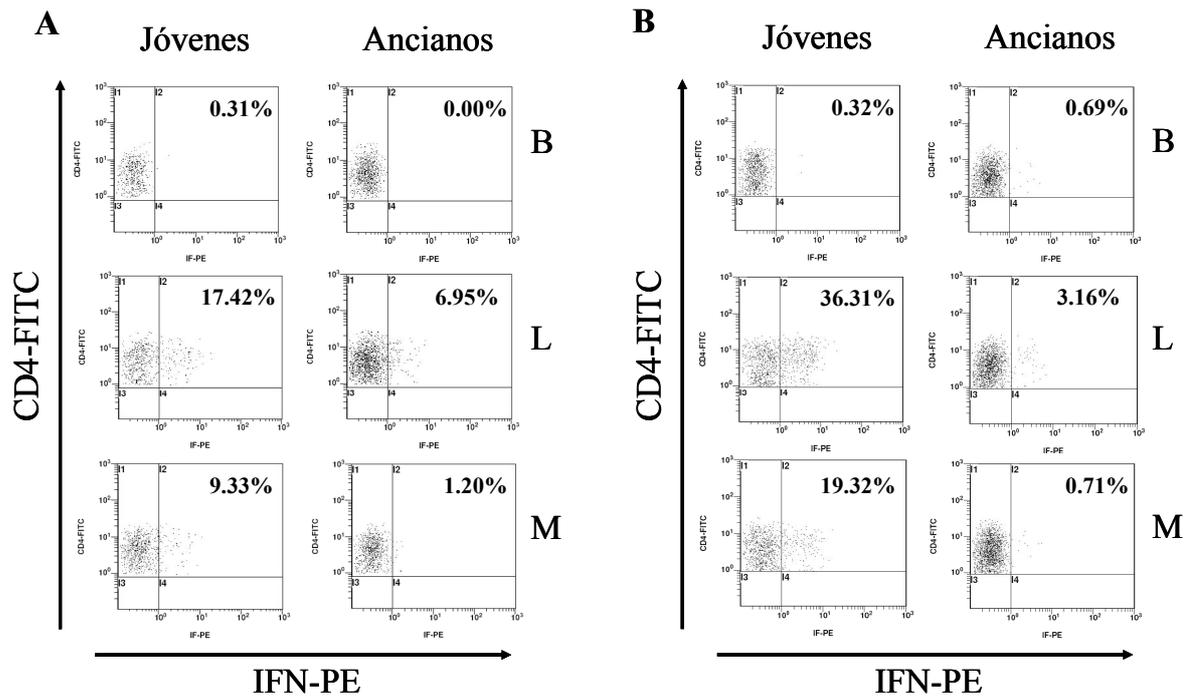


Fig. 19. Análisis de las células T CD4⁺ productoras de IFN- γ en respuesta a *C. albicans*. Esplenocitos de ratones jóvenes y ancianos infectados durante 3 días con $0,4 \times 10^6$ levaduras de la cepa de *C. albicans* PCA2 (A) o ATCC 26555 (B) fueron reestimulados *in vitro* durante 18 h con levaduras (L) y micelios (M) inactivados por calor [$30 \mu\text{g}$ (peso seco) de células/ml]. Se utilizaron células sin reestimar (blanco; B) como control. La secreción de IFN- γ (IFN-PE) se determinó mediante citometría de flujo utilizando el ensayo “IFN- γ -secretion assay” tal como se describe en Material y Métodos. En la figura se muestran histogramas biparamétricos de células T CD3⁺ CD4⁺ seleccionadas por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos de estas moléculas. Los datos muestran el porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ . Los resultados mostrados pertenecen a un experimento representativo de dos.

1.9. Respuesta humoral frente a *C. albicans* en ratones ancianos vacunados.

Por último, para investigar el efecto del envejecimiento en la capacidad de los ratones ancianos para desarrollar una resistencia adquirida tras la inmunización, se utilizó un modelo experimental en el que los ratones adultos adquieren una alta protección frente a la reinfección con una cepa virulenta mediante una infección previa subletal con la cepa no germinativa de baja virulencia PCA2 de *C. albicans* (Romani *et al.*, 1991; Villamón *et al.*, 2004b).

Los ratones ancianos fueron infectados por vía i.v. con 10^6 levaduras de la cepa PCA2 y su supervivencia fue monitorizada durante 15 días. Todos los ratones sobrevivieron a esta infección primaria y no mostraron síntomas de infección. La infección secundaria se realizó, a día 15 tras la infección primaria, mediante inyección i.v. de 10^6 levaduras de la cepa virulenta *C. albicans* ATCC 26555 y su supervivencia fue monitorizada durante 14 días. Como control, ratones ancianos sin inmunizar fueron infectados directamente con la cepa virulenta.

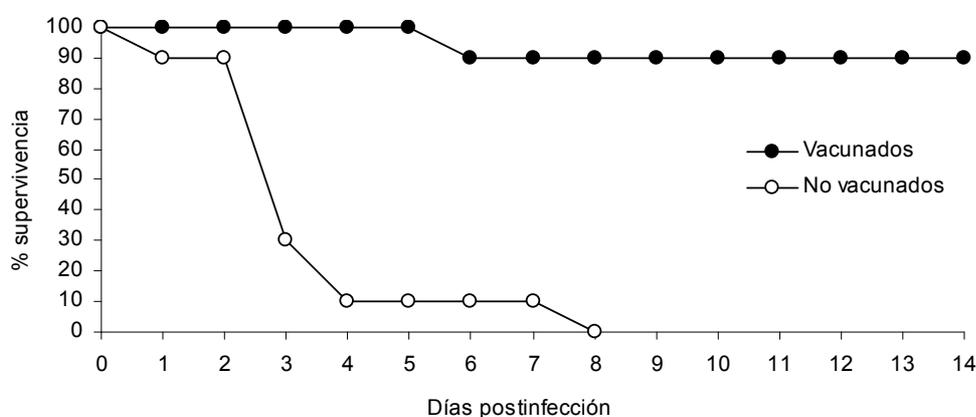


Fig. 20. Supervivencia a una infección secundaria en ratones ancianos previamente vacunados. Ratones ancianos ($n = 10$) fueron inmunizados mediante infección i.v. con 10^6 levaduras de la cepa de baja virulencia PCA2 de *C. albicans*. 15 días después de la infección primaria, ratones vacunados y no vacunados previamente, fueron infectados con 10^6 levaduras de la cepa virulenta *C. albicans* ATCC 26555 y la supervivencia fue monitorizada durante 14 días. La gráfica muestra datos de un experimento representativo de dos.

Los ratones infectados previamente con la cepa PCA2 fueron resistentes a la reinfección con la cepa virulenta (90% de supervivencia a día 14), mientras que el 100% de los ratones no vacunados previamente había muerto a día 8 tras la infección con la cepa virulenta ATCC 26555 (Fig. 20), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,01$). Se repitió el mismo protocolo de vacunación e infección secundaria con ratones jóvenes como control, y se observó, como se había descrito anteriormente (Villamón *et al.*, 2004b), un 100% de supervivencia tras la infección secundaria en los ratones vacunados, y una elevada mortalidad en los ratones sin vacunar (dato no mostrado).

Estos resultados indican que, aunque los mecanismos efectores de resistencia a una infección primaria están alterados en ratones ancianos, estos aún son capaces de desarrollar una resistencia adquirida significativa tras la vacunación por una infección primaria subletal.

Como estudio complementario, también se analizaron los anticuerpos específicos anti-*C. albicans* presentes en el suero de ratones vacunados, para comprobar la capacidad de los ratones ancianos para desarrollar una respuesta humoral específica. Para ello se obtuvo el suero de ratones jóvenes y ancianos a día 14 tras la infección secundaria con la cepa virulenta de *C. albicans*, y los anticuerpos IgG específicos de *C. albicans* fueron detectados mediante “Western immunoblotting” utilizando extractos solubles de levaduras y micelios de *C. albicans* como antígeno.

El suero control de ratones ancianos sin infectar mostró un nivel basal de anticuerpos más alto que el suero de ratones jóvenes sin infectar. Los títulos de IgG determinados por ELISA fueron similares en ratones jóvenes y ancianos a día 14 postinfección secundaria (dato no mostrado). Sin embargo, la diversidad de antígenos, tanto de levaduras como de micelios, reconocidos por el suero de ratones ancianos, vacunados y reinfectados con la cepa virulenta, estaba claramente disminuida al compararla con la diversidad de antígenos reconocidos por suero de ratones jóvenes. Además del menor número de antígenos reconocidos, la intensidad de las bandas inmunoreactivas fue también menor cuando se utilizó suero de ratones ancianos (Fig. 21).

Este resultado indica que la respuesta humoral específica desarrollada frente a *C. albicans* está afectada en ratones ancianos, comparada con la desarrollada por ratones jóvenes.

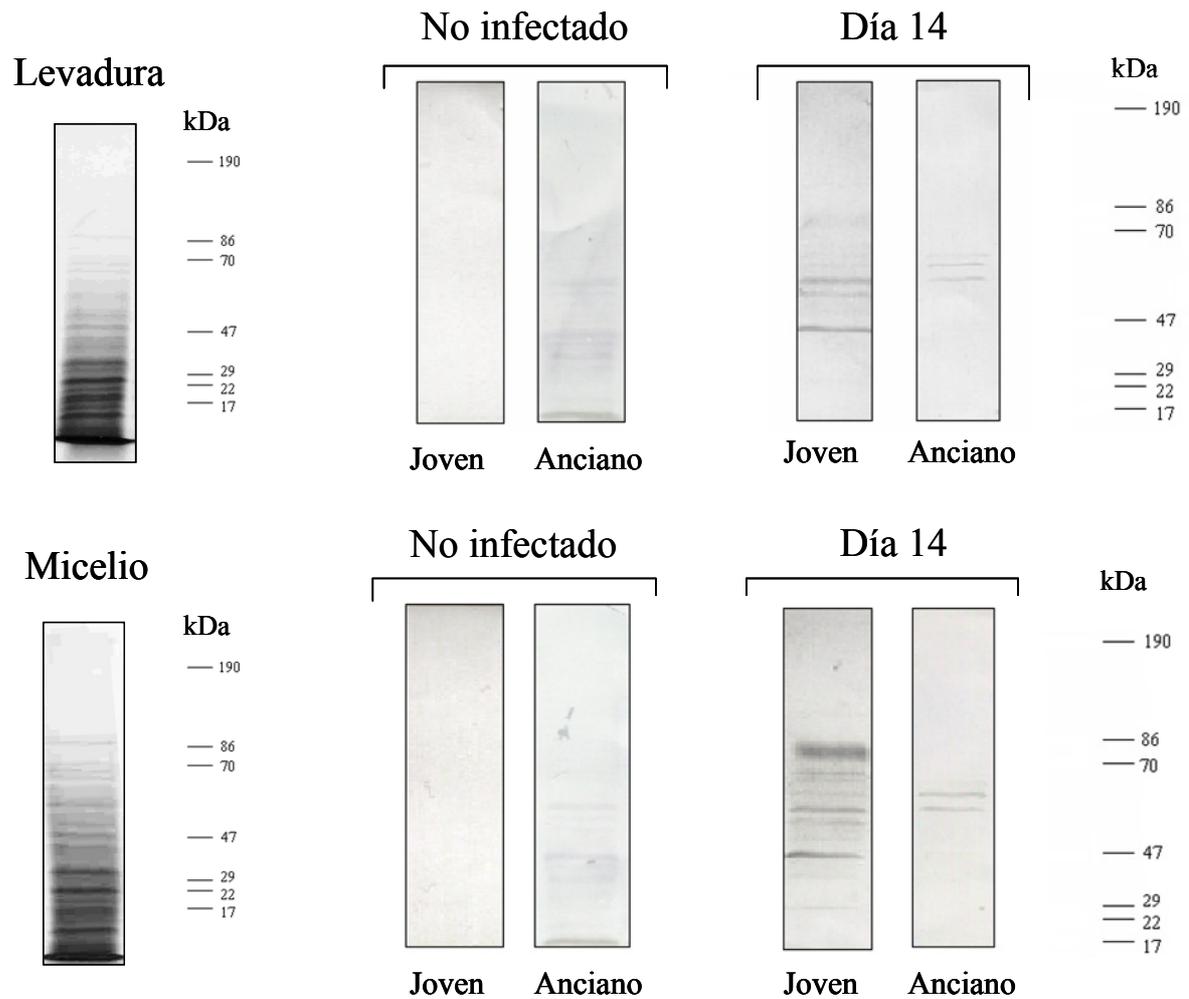


Fig. 21. Efecto del envejecimiento en la respuesta inmunitaria humoral frente a *C. albicans*. Se determinaron las IgG específicas de *C. albicans* presentes en el suero mediante “Western immunoblotting” de extractos celulares solubles obtenidos de levaduras y micelios de *C. albicans* ATCC 26555. Cada muestra analizada consistía en una mezcla de suero de 4 animales infectados (a día 14 tras la infección secundaria) o no infectados, seleccionados al azar. Se muestran los extractos celulares de *C. albicans* teñidos con azul de Coomasie para visualizar las proteínas y se indican la posición de los marcadores de peso molecular.

2. **Modelo humano: sangre humana completa**

Para el estudio del efecto de la inmunosenescencia humana en la expresión y función de los receptores TLR se utilizó sangre de voluntarios sanos, jóvenes y ancianos, en la que se analizaron los siguientes parámetros: (i) expresión de receptores tipo Toll en la superficie de células sanguíneas, (ii) producción *in vitro* de citocinas y prostaglandina E₂ (PGE₂) por cultivos de sangre humana completa en respuesta a *C. albicans*, (iii) actividad fungicida de sangre completa y (iv) presencia de anticuerpos específicos frente a *C. albicans* en plasma. Para la selección de los donantes se siguieron los criterios descritos en el apartado de Material y Métodos.

2.1. **Análisis por citometría de flujo de la expresión de distintos TLRs en la superficie de células sanguíneas.**

Para determinar la posible influencia del envejecimiento en el reconocimiento microbiano, se analizaron los niveles de diferentes receptores TLR en células sanguíneas de 96 voluntarios, jóvenes (49 donantes entre 15 y 42 años) y ancianos (47 donantes de más de 70 años de edad).

La secreción de diferentes mediadores, como citocinas proinflamatorias, es muy importante en la protección del hospedador frente a la candidiasis sistémica. Esta respuesta secretora es activada a través del reconocimiento de ligandos fúngicos por PPRs como los receptores Toll. Nuestro grupo ha descrito previamente que TLR2 es esencial para la resistencia del ratón a una candidiasis invasiva, estimulando la producción de citocinas proinflamatorias y participando en la inducción de la respuesta Th1 (Villamón *et al.*, 2004c). Por este motivo se determinaron los niveles basales de TLR2 en la superficie de las tres poblaciones de células sanguíneas humanas: linfocitos, monocitos y granulocitos. También se determinaron los niveles basales de TLR6, ya que el heterodímero TLR2/TLR6 es el responsable del reconocimiento de la partícula fúngica zimosán, y por tanto podría ser el responsable del reconocimiento de ligandos de *C. albicans* (Underhill *et al.*, 1999). Debido a que otros grupos han descrito la participación de TLR4 en la respuesta frente a *C. albicans*

(Bellochio *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2006), también se analizaron los niveles basales de este receptor en los distintos tipos celulares de la sangre de los donantes.

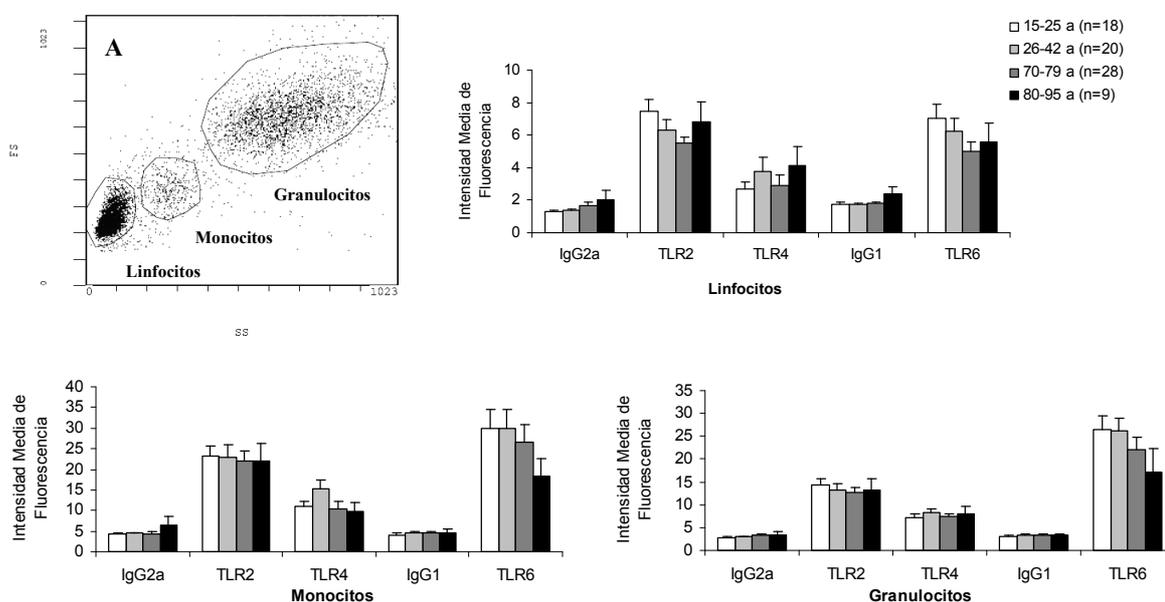


Fig. 22. Expresión de receptores Toll en la superficie de linfocitos, monocitos y granulocitos.

Muestras de sangre completa de donantes jóvenes y ancianos fueron incubadas con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC que reconocen específicamente a TLR2, TLR4 o TLR6. Se utilizaron como control sus correspondientes anticuerpos isotipos control: IgG_{2a} para los anticuerpos anti-TLR2 y TLR4 e IgG₁ para el anticuerpo anti-TLR6. Tras la lisis de eritrocitos y fijación de las células, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Se determinó la intensidad media de fluorescencia en linfocitos, monocitos y granulocitos, seleccionados en el citómetro de flujo según sus propiedades de dispersión frontal y lateral de luz (A). Los datos representados muestran la media \pm error estándar de la intensidad de fluorescencia de las muestras, agrupadas en cuatro categorías de edad.

Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas en la expresión de TLR2 y TLR4 en las tres poblaciones celulares de individuos jóvenes y ancianos, ni tampoco cuando se realizó el análisis estadístico agrupando a los individuos en cuatro categorías de edad (Fig. 22). Aunque los niveles de TLR6 tienden a ser menores en los granulocitos y monocitos de los individuos más ancianos (entre 80 y 95 años de edad),

estas diferencias no son en ningún caso significativas al compararlas con el resto de categorías de edad.

Sin embargo, esta observación no excluye posibles alteraciones en las vías de transducción de señal activadas por los receptores tipo Toll asociadas a la inmunosenescencia.

2.2. Producción *in vitro* de citocinas y prostaglandina E₂ por cultivos de sangre completa en respuesta a *C. albicans*.

Para comprobar si la producción de citocinas y prostaglandina E₂ (PGE₂) en respuesta a *C. albicans* estaba afectada en individuos ancianos respecto a individuos jóvenes, se realizaron cocultivos *in vitro* de sangre completa de cada donante con levaduras y micelios inactivados de *C. albicans*, utilizando como controles sangre sin estimular, y estimulada con LPS y zimosán. Este sistema de sangre completa tiene la ventaja de que las poblaciones celulares (granulocitos, monocitos y linfocitos) y otros factores importantes para la defensa frente a *C. albicans* (complemento, anticuerpos y otros factores del suero) pueden interactuar entre sí y con el hongo, por lo que el resultado tiene más significado fisiológico.

No se encontraron diferencias significativas entre individuos jóvenes y ancianos en la producción de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12p70 y PGE₂ frente a ninguno de los estímulos empleados (LPS, zimosán y levaduras y micelios inactivados de *C. albicans*), ni incluso cuando se agrupó a los individuos en cuatro categorías de edad para el análisis estadístico. No se detectaron niveles de ninguna citocina ni de PGE₂ en los controles sin estimular (Fig. 23).

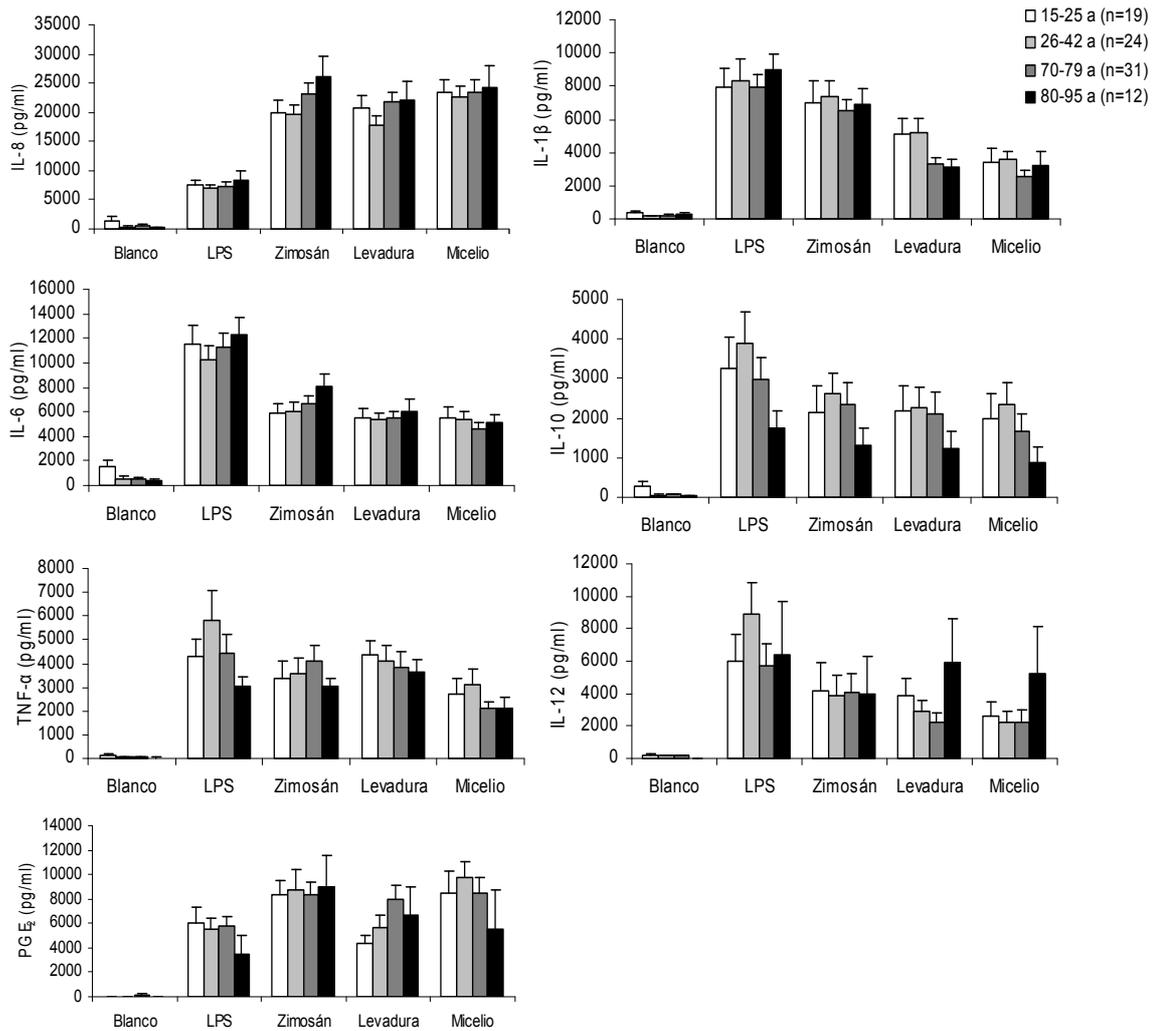


Fig. 23. Producción *in vitro* de citocinas y PGE₂ por sangre completa en respuesta a *C. albicans*. Cultivos de sangre completa de donantes jóvenes y ancianos fueron estimulados *in vitro* durante 24 horas con LPS (5 µg/ml), zimosán (30 x 10⁶ partículas/ml) y levaduras y micelios de *C. albicans* ATCC 26555 inactivados por fijación (500 µg (peso seco) de células/ml). La concentración de citocinas y PGE₂ fue determinada en los cultivos libres de células de los cultivos mediante citometría de flujo por la técnica "Cytometric Bead Array" (CBA) y mediante ELISA, respectivamente. Las gráficas muestran la producción media ± error estándar de IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, IL-12p70 y PGE₂ por la sangre de los donantes, agrupados en cuatro categorías de edad

2.3. Actividad fungicida de células sanguíneas.

Aunque en los estudios anteriores no se encontraron alteraciones en los niveles de los receptores TLR analizados ni en la producción de citocinas ni PGE₂ por células sanguíneas de individuos ancianos, se investigó el efecto del envejecimiento en la actividad fungicida de sangre completa, ya que la fagocitosis y la destrucción del hongo está mediada por otros receptores y mecanismos que podrían estar alterados en individuos ancianos. Para ello se determinó la supervivencia de levaduras de *C. albicans* tras su incubación con muestras de sangre completa de individuos jóvenes y ancianos.

Las muestras de sangre completa fueron incubadas con levaduras viables de la cepa *C. albicans* ATCC 26555 utilizando una ratio 1:1 (levadura : leucocito). Como control, se realizó la misma incubación utilizando plasma de cada donante. Tras 1 hora de cocultivo se determinó el número de levaduras viables (UFC) por recuento en placa.

Los resultados (Tabla 3) indicaron que la viabilidad del hongo no se reduce en presencia de los componentes del plasma, y que incluso las levaduras podrían ser capaces de crecer en el plasma de los donantes. Sin embargo, la supervivencia de las levaduras en presencia de sangre completa se redujo entre un 39% y un 54%, lo que representa una capacidad fungicida de la sangre de entre un 45% y un 60%. No se encontraron diferencias significativas en la actividad fungicida entre donantes jóvenes y ancianos, ni tampoco al realizar el análisis estadístico agrupando a los donantes en cuatro categorías de edad.

Tabla 3. Supervivencia de *C. albicans* en plasma y sangre de donantes jóvenes y ancianos, agrupados en cuatro categorías de edad.

Grupos de Edad	% UFC Sangre	% UFC Plasma	% Supervivencia	% Muerte
15-25 años (n=22)	47,41 ± 4,72	113,20 ± 6,10	44,77 ± 4,96	55,23 ± 4,96
26-42 años (n=25)	43,14 ± 5,22	114,42 ± 6,11	39,45 ± 5,61	60,55 ± 5,61
70-79 años (n=31)	54,92 ± 5,01	116,78 ± 4,99	46,16 ± 3,58	53,85 ± 3,58
80-95 años (n=13)	55,23 ± 7,85	109,60 ± 7,56	54,15 ± 8,21	45,85 ± 8,21

% UFC sangre = [UFC sangre (1 h) / UFC sangre (0 h)] x 100; %UFC plasma = [UFC plasma (1 h) / UFC plasma (0 h)] x 100; % supervivencia = (%UFC sangre / %UFC plasma) x 100; % muerte = 100 - % supervivencia. Los datos representan la media ± error estándar.

2.4. Presencia de anticuerpos específicos anti-*C. albicans* en plasma.

A pesar de que no existe una correlación directa entre los anticuerpos anti-*C. albicans* circulantes y la protección frente a la candidiasis, hay evidencias que indican que ciertos anticuerpos específicos tienen un efecto protector durante la infección (Calderone, 2002; Romani, 2004). Además en individuos sanos se pueden detectar bajos niveles de anticuerpos circulantes específicos de algunas proteínas de *C. albicans* (anticuerpos naturales) (Pitarch *et al.*, 2004). Por lo tanto se consideró interesante determinar los niveles de anticuerpos específicos frente a *C. albicans* en el plasma de donantes jóvenes y ancianos. Los niveles de IgG se cuantificaron por dos métodos distintos: (i) mediante ELISA, utilizando placas tapizadas con extractos solubles de levaduras o micelios de *C. albicans*, y (ii) mediante inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo, incubando levaduras de *C. albicans* con el plasma de cada donante y utilizando un anticuerpo secundario conjugado con FITC.

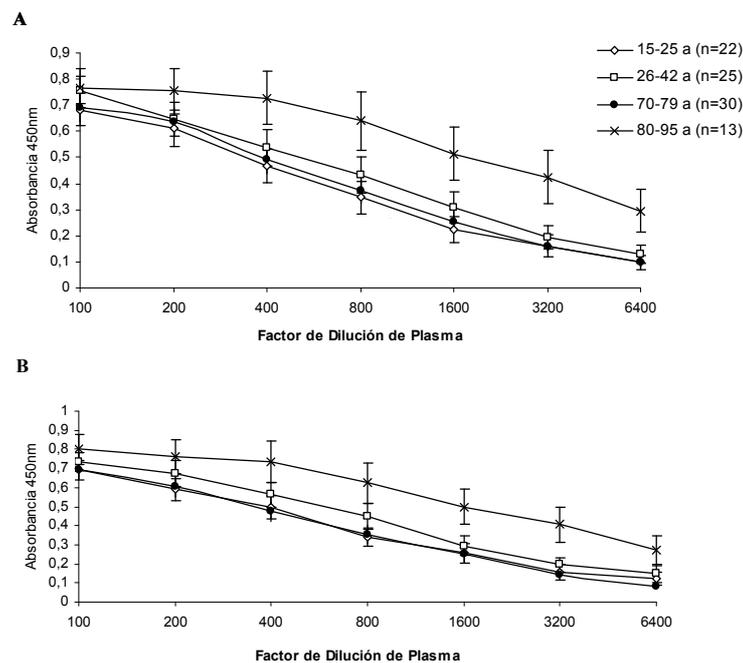


Fig. 24. Titulación de anticuerpos específicos anti-*C. albicans* en el plasma de donantes jóvenes y ancianos determinados por ELISA. Las IgG específicas anti-*C. albicans* en plasma humano de donantes jóvenes y ancianos fueron determinadas por ELISA, utilizando placas tapizadas con extractos solubles obtenidos a partir de levaduras (A) o micelios (B) de *C. albicans*. Los datos muestran la absorbancia media a 450nm \pm error estándar de cada una de las muestras, agrupadas en cuatro categorías de edad.

Cuando se determinaron los títulos de anticuerpos anti-*C. albicans* presentes en el plasma de donantes mediante ELISA (Fig. 24) se observó un ligero, pero estadísticamente significativo, aumento en el título de anticuerpos en el plasma de los donantes más ancianos (85-90 años de edad) cuando se comparó con el resto de grupos de edad ($P \leq 0,05$, tanto para los extractos de levadura como de micelio). Sin embargo, la diversidad de antígenos reconocidos por el plasma de individuos ancianos (de ambas categorías de edad), determinado mediante “Western immunoblotting” utilizando los mismos extractos de levadura y micelio empleados para la técnica ELISA, fue muy similar a la reconocida por plasma de individuos jóvenes (dato no mostrado).

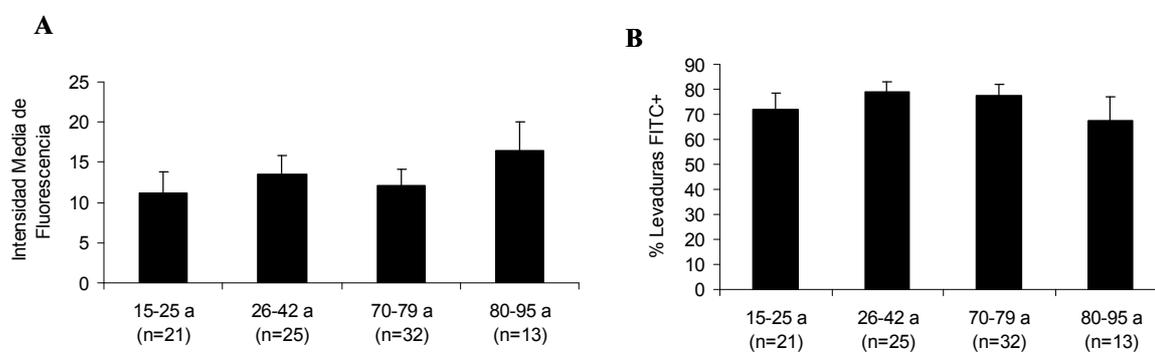


Fig. 25. Cuantificación de anticuerpos específicos anti-*C. albicans* en el plasma de donantes jóvenes y ancianos determinados por inmunofluorescencia indirecta. Levaduras de *C. albicans* inactivadas por fijación química fueron incubadas con plasma de donantes jóvenes y ancianos y a continuación con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con FITC. La intensidad media de fluorescencia de las levaduras (A) y el porcentaje de levaduras FITC⁺ (B) fueron determinados por citometría de flujo. Los datos representan la media \pm error estándar de cada categoría de edad.

Cuando se analizaron los niveles de anticuerpos específicos frente a *C. albicans* presentes en el plasma de los donantes mediante inmunofluorescencia indirecta, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos de edad, ni en la intensidad media de fluorescencia (Fig. 25A) ni en el porcentaje de levaduras marcadas (Fig. 25B).

3. Discusión

En este capítulo de la tesis doctoral se ha estudiado el efecto del envejecimiento en el desarrollo de la respuesta inmunitaria frente al hongo patógeno *C. albicans* utilizando dos modelos experimentales distintos: (i) un modelo murino de candidiasis sistémica experimental, empleando ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos, y (ii) un modelo humano, utilizando sangre completa procedente de donantes sanos jóvenes y ancianos.

En el modelo murino se procedió a estudiar en primer lugar la susceptibilidad de ratones ancianos a la candidiasis invasiva experimental utilizando una cepa virulenta de *C. albicans*, la cepa ATCC 26555. Se encontró que los ratones ancianos presentaban mayor mortalidad que los ratones jóvenes al infectarlos con esta cepa. Esto se correlacionó con una mayor invasión fúngica del riñón en ratones ancianos, órgano que es el más afectado en este modelo de candidiasis sistémica. Sin embargo, los niveles de la citocina TNF- α en homogenados de riñón de ratones ancianos infectados eran similares a los de ratones jóvenes. Teniendo en consideración que en ratones ancianos el número de levaduras viables en este órgano era muy superior al de ratones jóvenes, la producción relativa de la citocina por el riñón de ratones ancianos estaría disminuida, lo que sugiere que en ancianos la producción de citocinas proinflamatorias en respuesta a *C. albicans* podría estar afectada. Además, hay que tener en cuenta que la mayor invasión fúngica del riñón también contribuye a un aumento de la respuesta inflamatoria, por lo que la producción de TNF- α estaría inducida por el hongo así como por el daño tisular.

Una vez demostrada la mayor susceptibilidad de los ratones ancianos a la infección por una cepa virulenta de *C. albicans*, se procedió a estudiar las posibles causas que pueden contribuir a que los ratones ancianos sean menos resistentes a las candidiasis. Las citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , secretadas por macrófagos son claves en la protección del hospedador frente a las candidiasis, por lo que se procedió a determinar si existía alguna alteración asociada a la edad en las vías de señalización celular que conducen a la producción de esta citocina por macrófagos tras el reconocimiento de *C. albicans*. Nuestros resultados mostraron que los macrófagos peritoneales residentes (células totales) procedentes de ratones ancianos presentaban

una disminución significativa en la producción *in vitro* de TNF- α en respuesta a levaduras y micelios inactivados de *C. albicans*, lo que apoyaba la observación de una menor producción *in vivo* de esta citocina durante la infección primaria. Este resultado apoya los descritos previamente por otros autores que muestran que los macrófagos obtenidos a partir de ratones ancianos secretan significativamente menos citocinas proinflamatorias en respuesta a distintos ligandos de los receptores tipo Toll (Renshaw *et al.*, 2002; Boehmer *et al.*, 2004, 2005).

Al analizar las poblaciones celulares de la cavidad peritoneal, se encontró un incremento significativo en el número de células en la cavidad de ratones ancianos (un incremento de 4 a 5 veces respecto a los ratones jóvenes) que no era explicado únicamente por el mayor peso medio de los ratones ancianos respecto a los ratones jóvenes (un incremento de 1,4). Se comprobó en ratones ancianos que en esta cavidad existía una población significativa de células (un 43,3 %) que expresaban MHC de clase II pero no el marcador F4/80 de macrófago maduro. Aunque no es posible determinar la naturaleza de estas células, ya que no expresan otros marcadores de célula inmunitaria madura, es probable que sean macrófagos que han perdido algunas moléculas de superficie. Por tanto, la menor producción *in vitro* de TNF- α en respuesta a *C. albicans* observada en células peritoneales de ratones ancianos podría ser debida a la presencia de esta población celular de macrófagos potencialmente anómalos. Para obtener información válida sobre la funcionalidad de los macrófagos de los ratones ancianos se repitieron los experimentos de producción *in vitro* de citocinas en respuesta a *C. albicans* utilizando macrófagos CD11b⁺ purificados mediante selección inmunomagnética a partir de células peritoneales residentes. En este caso también se encontró una disminución significativa en la producción de TNF- α por macrófagos CD11b⁺ de ratones ancianos, así como en la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β , tanto frente a levaduras y micelios inactivados del hongo como frente a la partícula zimosán, agonista de TLR2. La producción de la quimiocina MIP-2 por macrófagos de ratones ancianos también estaba disminuida en respuesta a todos los estímulos ensayados, aunque la capacidad de reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección en ratones ancianos parece no estar alterada, tal como se describirá más adelante. Sin embargo, la producción de IL-10 por macrófagos purificados de ratones ancianos estaba incrementada en respuesta a zimosán e inalterada frente a levaduras y micelios de *C. albicans*. Estos resultados sugieren que el balance entre la

respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria frente a *C. albicans* estaría claramente alterado en ratones ancianos, desviándose hacia un perfil antiinflamatorio. La disminución en la producción de citocinas proinflamatorias junto con un nivel sustancial de citocinas antiinflamatorias podría resultar en un desarrollo defectivo tanto de la respuesta inmunitaria celular protectora (Th1) como de la respuesta adaptativa humoral frente a *C. albicans* en ratones ancianos, lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor susceptibilidad de estos ratones a la candidiasis invasiva.

Ya que nuestro grupo había descrito que TLR2 es el principal receptor tipo Toll implicado en la producción de TNF- α por macrófagos en respuesta a *C. albicans* (Villamón *et al.*, 2004c; Gil y Gozalbo, 2006a), se procedió a estudiar si la expresión de este receptor en macrófagos se encontraba alterada en ratones ancianos mediante citometría de flujo. Se observó que existía una disminución de la expresión superficial del receptor en células peritoneales totales y en macrófagos CD11b⁺ procedentes de ratones ancianos, y resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la intensidad media de fluorescencia del marcaje de TLR2 en estas células. Esta disminución en la expresión del receptor podría ser, al menos parcialmente, responsable de la menor producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos de ratones ancianos en respuesta a *C. albicans*.

Estos resultados están de acuerdo con diversos trabajos que aportan evidencias de una alteración asociada a la edad en las respuestas mediadas por TLRs en ratones ancianos. Varios autores también han encontrado defectos en la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos de ratones ancianos en respuesta a ligandos de los Toll (Renshaw *et al.*, 2002; Boehmer *et al.*, 2004; 2005), aunque proponen diferentes explicaciones a este hecho. En el trabajo realizado por Renshaw y colaboradores (2002) se describe una menor expresión de receptores tipo Toll en macrófagos de ratones ancianos, lo que correlacionan con la menor producción de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, Boehmer y colaboradores (2004) describen que no existen alteraciones en la expresión de TLR4 en macrófagos de ratones ancianos, y que los defectos en la señalización a través de los receptores tipo Toll se correlacionan con una disminución en la expresión de MAPKs. En otro estudio posterior sobre los cambios de expresión génica en macrófagos inducidos por LPS se demuestra que los macrófagos de ratones ancianos presentan un defecto global en la vía de transducción de señal inducida por los TLR y en la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, mientras que la

expresión de genes implicados en la producción de citocinas antiinflamatorias esta aumentada; la expresión de algunos genes que codifican moléculas adaptadoras, como MyD88, y varios miembros de la vía de activación de NF- κ B está disminuida en ratones ancianos, aunque la expresión de varios TLR (TLR4, TLR6 y TLR9) es similar en ratones jóvenes y ancianos, exceptuando la de TLR2, que está disminuida en ancianos (Chelvarajan *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de que los trabajos citados anteriormente indican la existencia de alteraciones en las vías de transducción de señal mediadas por TLRs en ratones ancianos, un estudio más reciente muestra que tanto células dendríticas mieloides como macrófagos de ratones ancianos tienen intacta la transducción de señal a través de TLRs, al compararlos con ratones jóvenes (Tesar *et al.*, 2006).

Dado que los ratones ancianos presentan alteraciones en las poblaciones celulares de la cavidad peritoneal y en la producción *in vitro* de la quimiocina MIP-2 en respuesta a *C. albicans*, se estudió si también existían alteraciones en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a esta cavidad en respuesta a levaduras no viables de *C. albicans*. Los resultados mostraron un menor porcentaje de neutrófilos y macrófagos reclutados a la cavidad de ratones ancianos al compararlos con ratones jóvenes. No obstante, al tener en cuenta el número total de células de la cavidad peritoneal se observó que los ratones ancianos habían reclutado un número total de neutrófilos y macrófagos incluso superior al de ratones jóvenes, lo que sugiere que no existen alteraciones asociadas a la edad en el reclutamiento de células fagocíticas.

A continuación se analizó la capacidad de las células fagocíticas de ratones ancianos para eliminar *in vitro* a *C. albicans*. Para ello se realizaron ensayos de supervivencia de levaduras en presencia de fagocitos obtenidos de ratones jóvenes y ancianos. El primer grupo de experimentos, utilizando como fagocitos células totales reclutadas a la cavidad peritoneal tras la inyección de *C. albicans*, indicaban que las células de ratones jóvenes eran capaces de eliminar más eficazmente a las levaduras que los fagocitos procedentes de ratones ancianos, tanto los reclutados a 4 horas (mayoritariamente neutrófilos) como a las 72 horas (macrófagos fundamentalmente), aunque un alto porcentaje de células de la cavidad peritoneal de ratones ancianos han perdido o disminuido la expresión de moléculas de superficie propias de macrófagos maduros. Por este motivo se repitieron los experimentos de capacidad fungicida utilizando neutrófilos Ly6G⁺ purificados (a partir de células reclutadas a la cavidad

peritoneal o a partir de médula ósea) o macrófagos CD11b⁺ purificados (de células reclutadas o residentes de la cavidad peritoneal). En este caso se observó que las células procedentes de ratones ancianos eran capaces de eliminar al hongo igual de eficazmente que las células de ratones jóvenes. Por tanto, estos resultados indican que no existen diferencias significativas en la capacidad fungicida de neutrófilos y macrófagos de ratones C57BL/6 jóvenes y ancianos.

Al analizar por citometría de flujo la capacidad de células totales de la cavidad peritoneal de internalizar a *C. albicans* se observó que esta capacidad era similar en ratones jóvenes y ancianos (dato no mostrado). Estos resultados sugieren que las células de la cavidad peritoneal de ratones ancianos serían capaces de internalizar levaduras, pero la ingestión del hongo por las células que han perdido marcadores de superficie, y que no son capaces de eliminar eficazmente al hongo, podría prevenir su internalización por fagocitos maduros que si son capaces de eliminarlo correctamente, dificultando así la eliminación del patógeno en ratones ancianos.

Para estudiar el efecto de la inmunosenescencia en el desarrollo de una respuesta adquirida se determinó la producción de citocinas por esplenocitos obtenidos de ratones jóvenes y ancianos infectados con la cepa de baja virulencia *C. albicans* PCA2. La producción de IFN- γ observada al reestimar *in vitro* los esplenocitos con estímulos fúngicos estaba significativamente disminuida en ratones ancianos al compararla con ratones jóvenes. Este resultado indica que tras una infección primaria la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo la citocina Th1 IFN- γ , está disminuida en ratones ancianos. Para correlacionar estos resultados con el desarrollo en ratones ancianos de una inmunidad adquirida frente a *C. albicans*, se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ en ratones infectados con la cepa *C. albicans* PCA2; esta cepa induce una respuesta inmunitaria adquirida Th1 en ratones adultos (Romani *et al.*, 1991). Los resultados mostraron una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ en ratones ancianos en comparación con ratones jóvenes, lo que indica que los ratones ancianos desarrollan una menor respuesta celular Th1 protectora frente a una infección por *C. albicans*.

Para determinar si esta respuesta Th1 alterada podía explicar la mayor susceptibilidad de los ratones ancianos a la infección primaria, se estudió el desarrollo de una respuesta adquirida Th1 tras la infección de los ratones con una dosis subletal con la cepa virulenta *C. albicans* ATCC 26555. Se obtuvieron resultados similares a los

obtenidos con la cepa *C. albicans* PCA2: los ratones ancianos también mostraron una menor producción *in vitro* de IFN- γ por esplenocitos, así como una respuesta Th1 disminuida, lo que indica que esta alteración está implicada en la susceptibilidad del ratón anciano a la infección primaria por *C. albicans*. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la alteración en el balance de producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias frente a *C. albicans* provocaría un desarrollo defectuoso de la respuesta inmunitaria adaptativa Th1 frente al hongo en ratones ancianos.

También se estudió el efecto de la inmunosenescencia en el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral específica frente a *C. albicans* tras una infección secundaria (con la cepa virulenta ATCC 26555) en animales previamente vacunados con la cepa de baja virulencia *C. albicans* PCA2. El suero de ratones ancianos sin infectar mostraba unos niveles basales de anticuerpos frente a *C. albicans* más altos que los de ratones jóvenes, probablemente debido al incremento de inmunoglobulinas séricas que se ha descrito en individuos ancianos (Ginaldi *et al.*, 2001). A día 14 tras la infección secundaria, los títulos de IgG eran similares en ratones jóvenes y ancianos (dato no mostrado), pero el patrón de antígenos de *C. albicans* reconocido por el suero de ratones jóvenes y ancianos, determinado por “Western immunoblotting”, era diferente. El suero obtenido de ratones ancianos reconocía menos proteínas antigénicas en los extractos de levadura y micelio que el suero de ratones jóvenes. Este resultado puede ser explicado por la alteración de la respuesta Th1 y también por un déficit intrínseco en el número de células B, ya que existe una disminución asociada a la edad en el número de linfocitos B y en el desarrollo de anticuerpos protectores de alta afinidad (Ginaldi *et al.*, 2001; McGlauchlen y Vogel, 2003). Por tanto, la respuesta adquirida humoral frente a *C. albicans* está alterada en ratones ancianos comparada con la de ratones jóvenes. Sin embargo, no existen evidencias que indiquen que esto tenga implicaciones directas en la mayor susceptibilidad de los ratones ancianos a una candidiasis primaria. Los anticuerpos frente a *C. albicans* tienen efectos complejos, ya que en el suero inmune existe una mezcla de anticuerpos protectores, no protectores y perjudiciales (Bromuro *et al.*, 2002). A pesar de que se acepta que la respuesta humoral no es crítica para la defensa del hospedador frente a las candidiasis durante una infección primaria, se ha demostrado que la administración de anticuerpos frente a determinados antígenos de *C. albicans* confiere protección frente a una infección por el hongo en ratones no inmunizados previamente, y también que algunos antígenos de *C.*

albicans pueden ser usados para la protección mediada por anticuerpos frente a una candidiasis sistémica, tal como se ha descrito en el apartado de Introducción (Bromuro *et al.*, 2002; Matthews *et al.*, 2003; Montagnoli *et al.*, 2004; Vilanova *et al.*, 2004; Torosantucci *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

A pesar de los defectos en el desarrollo de la respuesta Th1 adquirida y la alteración en la respuesta adquirida humoral que presentan los ratones ancianos, estos aún son capaces de desarrollar una respuesta adquirida protectora tras la vacunación en el modelo de infección subletal con la cepa de baja virulencia *C. albicans* PCA2. Esto indica que, aunque el envejecimiento se asocia con una disminución en la respuesta inmunitaria, los ratones ancianos conservan la capacidad de desarrollar una respuesta protectora.

Como resumen, nuestros resultados muestran que la mayor susceptibilidad de los ratones ancianos a la infección invasiva experimental por *C. albicans* se asocia con una menor producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, que a su vez se correlaciona con una menor expresión de TLR2 en la superficie de macrófagos ancianos, una menor respuesta específica Th1 protectora y un defecto en la producción de anticuerpos específicos, aunque los ratones ancianos son capaces de desarrollar una resistencia adquirida tras la vacunación y la capacidad fungicida de los fagocitos no está alterada en ratones ancianos. En estos ratones el balance de la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias está desplazado hacia una respuesta antiinflamatoria, lo que podría explicar los defectos en el desarrollo de una correcta respuesta adquirida Th1 protectora. Es decir, las consecuencias del envejecimiento en la funcionalidad de los sistemas de transducción de señal mediados por el reconocimiento del patógeno a través de los TLR pueden alterar el desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida, contribuyendo a aumentar la morbilidad y mortalidad de las candidiasis en ratones ancianos.

Para complementar los resultados anteriores obtenidos en el modelo animal, se estudió la influencia del envejecimiento en la respuesta del sistema inmunitario humano frente a *C. albicans*, empleando sangre completa de donantes sanos jóvenes y ancianos.

En primer lugar, y a diferencia de los resultados obtenidos con ratones ancianos, no se observó ninguna alteración en la expresión ni en la función de TLR2, TLR4 o TLR6 en individuos ancianos: (i) granulocitos, monocitos y linfocitos de donantes ancianos expresan niveles basales de estos receptores muy similares a los expresados por individuos jóvenes, y (ii) la producción de citocinas y PGE₂ por células sanguíneas (sangre completa) tras la estimulación con ligandos de los TLR (LPS y zimosán) y estímulos fúngicos (levaduras y micelios de *C. albicans*) también fue similar tanto en sangre de donantes jóvenes como en sangre de donantes ancianos, lo que indica la funcionalidad de los sistemas de transducción de señal mediados por TLRs en ancianos. Un resultado similar ha sido descrito recientemente por van Duin y colaboradores (2007), que demuestran que, aunque la producción de TNF- α inducida por un ligando específico de TLR1/TLR2 está disminuida en monocitos purificados de adultos ancianos, la producción de citocinas inducida a través de TLR4 y TLR2/TLR6 es muy similar en monocitos procedentes de donantes jóvenes y ancianos. Estos autores también muestran que la expresión superficial de TLR1 en monocitos purificados a partir de individuos ancianos es un 36% menor que su expresión en monocitos de individuos jóvenes, mientras que la expresión de TLR2 en estas células no está alterada en ancianos. Además, la expresión de TLR4 parece estar ligeramente disminuida en monocitos de individuos ancianos, aunque no se observa una disminución en la producción de citocinas en respuesta a LPS (van Duin *et al.*, 2007). Otros autores (Fulop *et al.*, 2004) tampoco han encontrado cambios asociados a la edad en la expresión de TLR2 y TLR4 en neutrófilos humanos. Posibles alteraciones en la función de otros TLRs en individuos ancianos está aún por determinar.

Para investigar posibles deficiencias en la capacidad de células sanguíneas de individuos ancianos para eliminar a *C. albicans*, se realizaron ensayos de supervivencia del hongo en presencia de sangre humana completa. Los neutrófilos son cruciales para la defensa inmediata frente a *C. albicans* en la sangre, ya que controlan la viabilidad y el crecimiento del hongo (Fradin *et al.*, 2005). Los resultados sobre las alteraciones en las funciones efectoras de neutrófilos asociadas a la edad descritos en la literatura científica son controvertidos, tal como se ha descrito en el apartado de Introducción (Fulop *et al.*,

2004; Gomez *et al.*, 2008). En el modelo experimental empleado en este trabajo no se ha encontrado diferencias significativas en la capacidad fungicida de sangre procedente de voluntarios jóvenes y ancianos, lo que sugiere que los neutrófilos de individuos ancianos son capaces de eliminar correctamente las células de *C. albicans* en la sangre, siendo funcionalmente equivalentes a los neutrófilos de individuos jóvenes. Estos resultados indican que probablemente los receptores implicados en la fagocitosis (dectina-1, MR, DC-SIGN, etc.) y sus vías de transducción de señal, así como los mecanismos fungicidas, son también funcionales en neutrófilos de individuos ancianos.

A pesar de que hay datos controvertidos sobre la implicación concreta de los anticuerpos en la defensa frente a las candidiasis, cada vez existen más evidencias que indican que algunos anticuerpos específicos pueden tener una función protectora frente a la infección (Casadevall *et al.*, 1998; Bromuro *et al.*, 2002; Fernández-Arenas *et al.*, 2004). Se ha demostrado que en individuos sanos frecuentemente se pueden detectar niveles de anticuerpos circulantes frente a algunas proteínas abundantes de *C. albicans* (Pitarch *et al.*, 2004). La presencia de estos anticuerpos frente a *C. albicans* puede ser consecuencia de la continua exposición a estos antígenos durante la colonización inocua del hospedador por el hongo. También, teniendo en consideración la naturaleza ubicua, la gran abundancia y el alto grado de homología de estas proteínas entre distintas especies, la presencia de estos anticuerpos podría explicarse por fenómenos de reactividad cruzada con anticuerpos generados frente a otros agentes comensales o infecciosos. Por lo tanto, también se determinaron los niveles de anticuerpos específicos de *C. albicans* en el plasma de donantes jóvenes y ancianos, encontrándose un título de anticuerpos significativamente mayor en el plasma de los individuos más ancianos (de entre 80 y 95 años de edad) al compararlos con los otros tres grupos de edad. Probablemente, este resultado sea consecuencia del incremento inespecífico en los niveles de IgG descritos en individuos ancianos (Ginaldi *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo los anticuerpos específicos frente a antígenos de la superficie de *C. albicans* presentes en el plasma de los individuos, no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de edad. Además, el patrón de antígenos, tanto de levaduras como de micelios, determinado por “Western immunoblotting” era muy similar al comparar plasma de individuos jóvenes y ancianos (dato no mostrado).

En resumen, nuestro estudio no ha encontrado diferencias entre individuos jóvenes y ancianos en la expresión superficial de TLRs en células sanguíneas, en la producción de citocinas y PGE₂ por sangre humana completa en respuesta a *C. albicans*, ni en la capacidad fungicida de sangre completa. Por tanto, estos resultados sugieren que la mayor susceptibilidad a infecciones por *C. albicans* asociadas al envejecimiento no son consecuencia de defectos en la expresión o señalización de TLRs, ni de una disminución en la actividad fungicida de la sangre.

Hay que resaltar que los donantes ancianos seleccionados para realizar este estudio no presentaban patologías asociadas (ancianos sanos). Es posible especular que el incremento en la incidencia y letalidad de las enfermedades infecciosas en la vejez se presente en poblaciones de ancianos con otras patologías y/o enfermedades subyacentes que constituyan factores de riesgo frente a las infecciones fúngicas, y no sean consecuencia de defectos asociados al envejecimiento en la transducción de señal mediada por los TLR y otros receptores. Sin embargo, tampoco se puede descartar la posibilidad de que existan defectos en la expresión o funcionalidad de los receptores TLR en individuos ancianos que presenten determinados tipos de patologías.

Conclusiones / Conclusions

1. El receptor TLR4 no es esencial para la resistencia del ratón frente a la candidiasis sistémica: (i) no está implicado en la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α) por macrófagos en respuesta a *C. albicans* y (ii) los ratones deficientes en TLR4 no tienen disminuida la producción de citocinas Th1 (IFN- γ), y son capaces de generar una respuesta inmunitaria protectora de tipo Th1 frente a *C. albicans*.
2. TLR2 es el principal receptor implicado en la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias y citocinas Th1 por células de ratón en respuesta a *C. albicans*. Además, el reconocimiento mediado por TLR2 parece estar bien conservado en células de *C. albicans* inactivadas, independientemente de cual sea el método de inactivación empleado (calor, fijación química o tratamiento antifúngico).
3. *C. albicans* inhibe la producción de IFN- γ por células NK de ratón en respuesta a ligandos de los receptores TLR, tanto en ausencia como en presencia de citocinas activadoras de las células NK. Este efecto puede representar un nuevo mecanismo de evasión inmunitaria que contribuya a la virulencia de *C. albicans*.
4. Los ratones ancianos desarrollan una respuesta inmunitaria innata y adquirida alterada en respuesta a *C. albicans* y son más sensibles a la candidiasis sistémica experimental. Esta mayor susceptibilidad se correlaciona con defectos en la expresión de TLR2, defectos en la producción de citocinas proinflamatorias y defectos en la respuesta inmunitaria adquirida (Th1 y humoral), pero no con alteraciones en la capacidad fungicida de los fagocitos (macrófagos y neutrófilos).
5. En humanos ancianos sanos no se han detectado defectos en la expresión o señalización por TLRs, ni una disminución en la actividad fungicida de células sanguíneas, que puedan explicar la mayor susceptibilidad a las candidiasis descrita en individuos ancianos.

1. TLR4 is dispensable for murine immune resistance to systemic candidiasis: (i) TLR4 is not involved in the production of proinflammatory cytokines (TNF- α) in response to *C. albicans*, and (ii) TLR4-deficient mice do not show an impaired Th1 cytokine (IFN- γ) production, and are capable of mounting a protective Th1 adaptive immune response against *C. albicans*.
2. TLR2 is the main receptor involved in the *in vitro* production of proinflammatory and Th1 cytokines by murine cells in response to *C. albicans*. Moreover, the TLR2-mediated recognition of *C. albicans* appears to be well conserved in killed fungal cells, regardless of the inactivating treatment employed (heat-killed, formaldehyde-fixed or antimycotic-treated).
3. *C. albicans* inhibits IFN- γ production by murine NK cells in response to TLR ligands, both in the absence and in the presence of NK-activating cytokines. This effect may represent a novel mechanism of immune evasion that contributes to the virulence of *C. albicans*.
4. Aged mice develop an altered innate and adaptive immune response to *C. albicans* and are more susceptible to systemic primary candidiasis. This increased susceptibility correlates with defects in TLR2 expression, defects in the production of proinflammatory cytokines, as well as defects in the adaptive immune response (Th1 and humoral), but not with an impaired fungicidal activity of phagocytotic cells (macrophages and neutrophils).
5. No defects were observed neither in TLR expression and/or signalling, nor in the fungicidal activity of blood cells from healthy aged donors, that may account for the described increased susceptibility to *C. albicans* infections in the elderly.

Resumen / Summary

Candida albicans es la especie más frecuentemente asociada a las infecciones fúngicas invasivas. Dichas infecciones representan una de las principales causas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, y son también cada vez más frecuentes y graves entre la población anciana, debido, al menos en parte, a alteraciones del sistema inmunitario innato y adaptativo asociadas a la edad (inmunosenescencia). Los receptores tipo Toll (TLRs) son una familia de receptores que están implicados en el reconocimiento inicial del patógeno y en el consiguiente desarrollo de la respuesta inmunitaria innata, encaminada a eliminar al microorganismo en los primeros estadios de la infección, aunque también participan en la generación y regulación de la respuesta adaptativa. Los objetivos de la presente tesis doctoral han sido (1) determinar la participación de los TLRs en la respuesta inmunitaria frente a *C. albicans*, y (2) estudiar el efecto del envejecimiento (inmunosenescencia) en la respuesta inmunitaria frente al hongo, así como en la expresión y función de los TLRs.

Estudios previos de nuestro grupo habían mostrado que TLR2 es esencial en la defensa frente a las candidiasis, por lo que en la primera parte de este trabajo se ha estudiado la participación de TLR4 (receptor implicado en el reconocimiento de otros hongos) en la respuesta frente a *C. albicans*. Los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* utilizando un modelo murino de infección y ratones deficientes para este receptor muestran que TLR4 no es esencial en la defensa frente a la candidiasis. Además, empleando células de ratones TLR2^{-/-}, se comprobó que la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias y Th1 está mediada por TLR2, tanto en respuesta a células de *C. albicans* viables como inactivadas por diferentes métodos (calor, fijación química y tratamiento antifúngico). Resultados adicionales obtenidos empleando linfocitos NK altamente purificados muestran que *C. albicans* es capaz de inhibir la producción *in vitro* de IFN- γ inducida por ligandos de los TLRs, lo que puede representar un mecanismo de evasión del sistema inmunitario que contribuya a la virulencia de *C. albicans*.

Los estudios sobre inmunosenescencia se abordaron empleando una doble aproximación experimental: modelo murino (ratones ancianos) y humano (sangre completa de donantes sanos). Los resultados mostraron que los ratones ancianos son más susceptibles a la candidiasis experimental, lo que se correlaciona con defectos en la producción de citocinas proinflamatorias, una disminución en la expresión de TLR2 en la superficie de macrófagos y una respuesta Th1 disminuida. Por otra parte, empleando sangre humana completa, no se han encontrado deficiencias en la expresión o función de los receptores tipo Toll en células sanguíneas de individuos ancianos sanos que puedan explicar la mayor susceptibilidad a la candidiasis descrita en personas ancianas.

Candida albicans is the species most frequently associated with systemic fungal infections. These infections represent one of the main causes of mortality in the immunocompromised population, and their incidence and severity is also increasing in the aged population due, at least in part, to age-related alterations in the innate and adaptive immune system (immunosenescence). Toll-like receptors (TLRs) are a family of receptors involved in the initial recognition of the pathogen and the subsequent generation of the innate immune response, aimed at eliminating the pathogen in the initial stages of the infection, although TLRs also contribute to the generation and regulation of the adaptive immune response. The objectives of this PhD thesis were (1) to determine the participation of TLRs in the immune response against *C. albicans*, and (2) to study of the effects of aging (immunosenescence) on the immune response against the fungus, as well as on the expression and function of TLRs.

Previous studies by our group have shown that TLR2 is essential in the host immune response during candidiasis, and therefore, in the first part of this work, we have studied the possible participation of TLR4 (the receptor involved in the recognition of other fungal species) in the response against *C. albicans*. *In vivo* and *in vitro* results obtained employing a murine model of infection using mice deficient for TLR4 show that this receptor is not essential in the defence against candidiasis. Secondly, we have confirmed the role of TLR2 in protection against *C. albicans*; using cells from TLR2^{-/-} mice, we have shown that the *in vitro* production of proinflammatory and Th1 cytokines is mediated by TLR2, both in response to viable and non-viable *C. albicans* cells inactivated by different treatments (heat-killed, formaldehyde-fixed or antimycotic-treated). Additional results obtained using highly-purified NK lymphocytes show that *C. albicans* is able to inhibit the *in vitro* production of IFN- γ induced by TLR ligands, an effect that may represent a novel mechanism of immune evasion that contributes to the virulence of *C. albicans*.

The immunosenescence studies were performed using a double experimental approach: a murine model (aged mice) and a human model (whole blood from healthy donors). The results show that aged mice are more susceptible to experimental candidiasis, and this correlates with defects in the production of proinflammatory cytokines, a diminished TLR2 expression in the macrophages cell surface and an impaired Th1 response. However, no deficiencies were found in neither TLR expression or function in blood cells from aged healthy human donors, that could account for the described increased susceptibility to *C. albicans* infections in the elderly.

Artículos de Investigación

Los resultados presentados en esta tesis doctoral se recogen en los siguientes artículos de investigación:

- ❖ **Murciano, C., E. Villamón, D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor and M.L. Gil.** 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., A. Yáñez, M.L. Gil and D. Gozalbo.** 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

- ❖ **Murciano, C., E. Villamón, J.E. O'Connor, D. Gozalbo and M.L. Gil.** 2006. Killed *Candida albicans* Yeasts and Hyphae Inhibit Gamma Interferon Release by Murine Natural Killer Cells. *Infect Immun.* **74**: 1403-1406

- ❖ **Murciano, C., E. Villamón, A. Yáñez, J.E. O'Connor, D. Gozalbo and M.L. Gil.** 2006. Impaired immune response to *Candida albicans* in aged mice. *J Med Microbiol.* **55**: 1649-1656

- ❖ **Murciano, C., A. Yáñez, J.E. O'Connor, D. Gozalbo and M.L. Gil.** 2008. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **53**: 214-221

- ❖ **Murciano, C., E. Villamón, A. Yáñez, J. Murciano, A. Mir, J.E. O'Connor, D. Gozalbo and M.L. Gil.** 2007. *In vitro* response to *Candida albicans* in cultures of whole human blood from young and aged donors. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **51**: 327-335

Bibliografía

A

- Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani.** 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* **8**: 639-646
- Alberti-Segui, C., A.J. Morales, H. Xing, M.M. Kessler, D.A. Willins, K.G. Weinstock, G. Cottarel, K. Fechtel and B. Rogers.** 2004. Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast.* **21**: 285-302
- Alem, M.A. and L.J. Douglas.** 2004. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 41-47
- Algarra, I., E. Ortega, M.J. Serrano, G. Alvarez de Cienfuegos and J.J. Gaforio.** 2002. Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following *in vivo* depletion of natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell-deficient nude mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **33**: 159-163
- Arancia, G., A. Stringaro, P. Crateri, A. Torosantucci, C. Ramoni, F. Urbani, C.M. Ausiello and A. Cassone.** 1998. Interaction between human interleukin-2-activated natural killer cells and heat-killed germ tube forms of *Candida albicans*. *Cell Immunol.* **186**: 28-38
- Arancia, S., S. Sandini, A. Cassone, F. De Bernardis and R. La Valle.** 2004. Construction and use of PCR primers from a 65 kDa mannoprotein gene for identification of *C. albicans*. *Mol Cell Probes.* **18**: 171-175
- Ashman, R.B., A. Fulurija and J.M. Papadimitriou.** 1999. Both CD4+ and CD8+ lymphocytes reduce the severity of tissue lesions in murine systemic candidiasis, and CD4+ cells also demonstrate strain-specific immunopathological effects. *Microbiology.* **145**: 1631-1640

B

- Bacci, A., C. Montagnoli, K. Perruccio, S. Bozza, R. Gaziano, L. Pitzurra, A. Velardi, C.F. d'Ostiani, J.E. Cutler and L. Romani.** 2002. Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J Immunol.* **168**: 2904-2913
- Baillie, G.S. and L.J. Douglas.** 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol.* **48**: 671-679
- Balish, E., T. Warner, C.J. Pierson, D.M. Bock and R.D. Wagner.** 2001. Oropharyngeal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects. *Med Mycol.* **39**: 261-268
- Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow.** 2000. *Yeasts: characteristics and identification.* 3rd ed. Cambridge University Press

- Barton, G.M. and R. Medzhitov.** 2002. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* **14**: 380-383
- Bauer, S. and G. Hartmann.** 2008. *Toll-like Receptors (TLRs) and Innate Immunity.* 1st ed. Springer
- Becker, I., N. Salaiza, M. Aguirre, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L.G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A.P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado and A. Isibasi.** 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* **130**: 65-74
- Beharka, A.A., M. Meydani, D. Wu, L.S. Leka, A. Meydani and S.N. Meydani.** 2001. Interleukin-6 production does not increase with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **56**: B81-88
- Bell, J.K., G.E. Mullen, C.A. Leifer, A. Mazzone, D.R. Davies and D.M. Segal.** 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* **24**: 528-533
- Bellocchio, S., C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S.S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S.M. Levitz and L. Romani.** 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
- Betz, M. and B.S. Fox.** 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* **146**: 108-113
- Blander, J.M. and R. Medzhitov.** 2006. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* **440**: 808-812
- Blasi, E., A. Mucci, R. Neglia, F. Pezzini, B. Colombari, D. Radzioch, A. Cossarizza, E. Lugli, G. Volpini, G. Del Giudice and S. Peppoloni.** 2005. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans.* *FEMS Immunol Med Microbiol.* **44**: 69-79
- Blumberg, H.M., W.R. Jarvis, J.M. Soucie, J.E. Edwards, J.E. Patterson, M.A. Pfaller, M.S. Rangel-Frausto, M.G. Rinaldi, L. Saiman, R.T. Wiblin and R.P. Wenzel.** 2001. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis.* **33**: 177-186
- Bodey, G.P.** 1993. *Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis and treatment.* 1st ed. Raven Press
- Boehmer, E.D., J. Goral, D.E. Faunce and E.J. Kovacs.** 2004. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *J Leukoc Biol.* **75**: 342-349
- Boehmer, E.D., M.J. Meehan, B.T. Cutro and E.J. Kovacs.** 2005. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. *Mech Ageing Dev.* **126**: 1305-1313
- Bottino, C., R. Castriconi, L. Moretta and A. Moretta.** 2005. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol.* **26**: 221-226

- Bozza, S., C. Montagnoli, R. Gaziano, G. Rossi, G. Nkwanyuo, S. Bellocchio and L. Romani.** 2004. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine*. **22**: 857-864
- Braun, B.R. and A.D. Johnson.** 2000. TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*. **155**: 57-67
- Brint, E.K., D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A.N. McKenzie, L.A. O'Neill and F.Y. Liew.** 2004. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol*. **5**: 373-379
- Bromuro, C., A. Torosantucci, P. Chiani, S. Conti, L. Polonelli and A. Cassone.** 2002. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun*. **70**: 5462-5470

C

- Calderone, R.A. and P.C. Braun.** 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. **55**: 1-20
- Calderone, R.A.** 1993. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol*. **1**: 55-58
- Calderone, R.A. and W.A. Fonzi.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. **9**: 327-335
- Calderone, R.A.** 2002. *Candida* and Candidiasis. 3rd ed. American Society for Microbiology Press
- Cambi, A., K. Gijzen, J.M. de Vries, R. Torensma, B. Joosten, G.J. Adema, M.G. Netea, B.J. Kullberg, L. Romani and C.G. Figdor.** 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
- Carile, M.J. and S.C. Watkinson.** 1994. *The Fungi*. 1st ed. Academic Press
- Casadevall, A., A. Cassone, F. Bistoni, J.E. Cutler, W. Magliani, J.W. Murphy, L. Polonelli and L. Romani.** 1998. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? *Med Mycol*. **36**: 95-105
- Casanova, M., M.L. Gil, L. Cardenoso, J.P. Martinez and R. Sentandreu.** 1989. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun*. **57**: 262-271
- Casanova, M., A.M. Cervera, D. Gozalbo and J.P. Martinez.** 1997. Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun*. **65**: 4360-4364
- Chaffin, W.L., J.L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo and J.P. Martinez.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**: 130-180

- Chalifour, A., P. Jeannin, J.F. Gauchat, A. Blaecke, M. Malissard, T. N'Guyen, N. Thieblemont and Y. Delneste.** 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood*. **104**: 1778-1783
- Chandra, J., D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick and M.A. Ghannoum.** 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. **183**: 5385-5394
- Chelvarajan, R.L., S.M. Collins, J.M. Van Willigen and S. Bondada.** 2005. The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. *J Leukoc Biol*. **77**: 503-512
- Chelvarajan, R.L., Y. Liu, D. Popa, M.L. Getchell, T.V. Getchell, A.J. Stromberg and S. Bondada.** 2006. Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. *J Leukoc Biol*. **79**: 1314-1327
- Chen, S.C. and T.C. Sorrell.** 2007. Antifungal agents. *Med J Aust*. **187**: 404-409
- Chiani, P., C. Bromuro and A. Torosantucci.** 2000. Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*. *Infect Immun*. **68**: 5628-5634
- Choi, J.H., H.M. Ko, J.W. Kim, H.K. Lee, S.S. Han, S.B. Chun and S.Y. Im.** 2001. Platelet-activating factor-induced early activation of NF-kappa B plays a crucial role for organ clearance of *Candida albicans*. *J Immunol*. **166**: 5139-5144
- Chuang, T.H. and R.J. Ulevitch.** 2004. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol*. **5**: 495-502
- D**
- d'Ostiani, C.F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli and L. Romani.** 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
- De Bernardis, F., L. Agatensi, I.K. Ross, G.W. Emerson, R. Lorenzini, P.A. Sullivan and A. Cassone.** 1990. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis*. **161**: 1276-1283
- De Bernardis, F., D. Adriani, R. Lorenzini, E. Pontieri, G. Carruba and A. Cassone.** 1993. Filamentous growth and elevated vaginopathic potential of a nongerminative variant of *Candida albicans* expressing low virulence in systemic infection. *Infect Immun*. **61**: 1500-1508
- De Bernardis, F., M. Boccanera, D. Adriani, E. Spreghini, G. Santoni and A. Cassone.** 1997. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun*. **65**: 3399-3405
- Deepe, G.S., Jr.** 1997. Prospects for the development of fungal vaccines. *Clin Microbiol Rev*. **10**: 585-596
- Degli-Esposti, M.A. and M.J. Smyth.** 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol*. **5**: 112-124

- Delgado, M.L., M.L. Gil and D. Gozalbo.** 2003. *Candida albicans* TDH3 gene promotes secretion of internal invertase when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-invertase fusion protein. *Yeast*. **20**: 713-722
- Della Chiesa, M., S. Sivori, R. Castriconi, E. Marcenaro and A. Moretta.** 2005. Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. *Trends Microbiol.* **13**: 128-136
- Deva, R., R. Ciccoli, L. Kock and S. Nigam.** 2001. Involvement of aspirin-sensitive oxylipins in vulvovaginal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett.* **198**: 37-43
- Deva, R., P. Shankaranarayanan, R. Ciccoli and S. Nigam.** 2003. *Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of Toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Immunol.* **171**: 3047-3055
- Divanovic, S., A. Trompette, S.F. Atabani, R. Madan, D.T. Golenbock, A. Visintin, R.W. Finberg, A. Tarakhovsky, S.N. Vogel, Y. Belkaid, E.A. Kurt-Jones and C.L. Karp.** 2005. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol.* **6**: 571-578
- Dixon, D.M., M.M. McNeil, M.L. Cohen, B.G. Gellin and J.R. La Montagne.** 1996. Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep.* **111**: 226-235
- Donnelly, S.M., D.J. Sullivan, D.B. Shanley and D.C. Coleman.** 1999. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology.* **145**: 1871-1882
- Douglas, L.J.** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**: 30-36

E

- Effros, R.B.** 2001. Ageing and the immune system. *Novartis Found Symp.* **235**: 130-139
- Eisenhauer, P.B. and R.I. Lehrer.** 1992. Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun.* **60**: 3446-3447
- Emr, S.D., R. Schekman, M.C. Flessel and J. Thorner.** 1983. An MF alpha 1-SUC2 (alpha-factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* **80**: 7080-7084
- Erb-Downward, J.R. and M.C. Noverr.** 2007. Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infect Immun.* **75**: 3498-3505
- Ernst, J.F.** 2000. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology.* **146**: 1763-1774

F

- Fernandez-Arenas, E., G. Molero, C. Nombela, R. Diez-Orejas and C. Gil.** 2004. Low virulent strains of *Candida albicans*: unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics.* **4**: 3007-3020

- Ferrante, A.** 1989. Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity: increased fungicidal activity against *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release. *Infect Immun.* **57**: 2115-2122
- Fidel, P.L. and G.B. Huffnagle.** 2005. *Fungal Immunology. From an organ perspective.* 1st ed. Springer
- Filler, S.G., B.O. Ibe, A.S. Ibrahim, M.A. Ghannoum, J.U. Raj and J.E. Edwards, Jr.** 1994. Mechanisms by which *Candida albicans* induces endothelial cell prostaglandin synthesis. *Infect Immun.* **62**: 1064-1069
- Forche, A., K. Alby, D. Schaefer, A.D. Johnson, J. Berman and R.J. Bennett.** 2008. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol.* **6**: 1084-1097
- Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F.C. Odds and B. Hube.** 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* **56**: 397-415
- Fukazawa, Y. and K. Kagaya.** 1997. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol.* **35**: 87-99
- Fulop, T., A. Larbi, N. Douziech, C. Fortin, K.P. Guerard, O. Lesur, A. Khalil and G. Dupuis.** 2004. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell.* **3**: 217-226

G

- Gaforio, J.J., E. Ortega, I. Algarra, M.J. Serrano and G. Alvarez de Cienfuegos.** 2002. NK cells mediate increase of phagocytic activity but not of proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6], tumor necrosis factor alpha, and IL-12) production elicited in splenic macrophages by tilorone treatment of mice during acute systemic candidiasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* **9**: 1282-1294
- Galván, B. and F. Mariscal.** 2006. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol.* **23**: 12-15
- Gantner, B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira and D.M. Underhill.** 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* **197**: 1107-1117
- Gantner, B.N., R.M. Simmons and D.M. Underhill.** 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**: 1-12
- Geiger, H. and G. Van Zant.** 2002. The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat Immunol.* **3**: 329-333
- Ghaleb, M., M. Hamad and K.H. Abu-Elteen.** 2003. Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis. *Clin Exp Immunol.* **131**: 26-33

- Gil, M.L., D. Fradelizi and D. Gozalbo.** 2005. TLR2: for or against *Candida albicans*? Trends Microbiol. **13**: 298-299
- Gil, M.L. and D. Gozalbo.** 2006a. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. Microbes Infect. **8**: 2299-2304
- Gil, M.L. and D. Gozalbo.** 2006b. About the role of TLR2 and TLR4 in cytokine secretion by murine macrophages in response to *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol. **46**: 1-2
- Gil, M.L. and D. Gozalbo.** En prensa. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. Front Biosci.
- Ginaldi, L., M.F. Loreto, M.P. Corsi, M. Modesti and M. De Martinis.** 2001. Immunosenescence and infectious diseases. Microbes Infect. **3**: 851-857
- Gomez, C.R., E.D. Boehmer and E.J. Kovacs.** 2005. The aging innate immune system. Curr Opin Immunol. **17**: 457-462
- Gomez, C.R., V. Nomellini, D.E. Faunce and E.J. Kovacs.** 2008. Innate immunity and aging. Exp Gerontol. **43**: 718-728
- Gow, N.A.R. and G.M. Gadd.** 1994. The growing fungus. 1st ed. Chapman and Hall
- Gow, N.A., T.H. Perera, J. Sherwood-Higham, G.W. Gooday, D.W. Gregory and D. Marshall.** 1994. Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. Scanning Microsc. **8**: 705-710
- Gow, N.A., S. Bates, A.J. Brown, E.T. Buurman, L.M. Thomson and C. Westwater.** 1999. *Candida* cell wall mannosylation: importance in host-fungus interaction and potential as a target for the development of antifungal drugs. Biochem Soc Trans. **27**: 512-516
- Gow, N.A., M.G. Netea, C.A. Munro, G. Ferwerda, S. Bates, H.M. Mora-Montes, L. Walker, T. Jansen, L. Jacobs, V. Tsoni, G.D. Brown, F.C. Odds, J.W. Van der Meer, A.J. Brown and B.J. Kullberg.** 2007. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. J Infect Dis. **196**: 1565-1571
- Gozalbo, D., P. Roig, E. Villamón and M.L. Gil.** 2004. *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. Curr Drug Targets Infect Disord. **4**: 117-135
- Gozalbo, D. and M.L. Gil.** En prensa. IFN- γ in *Candida albicans* infections. Front Biosci.
- Greenfield, R.A., V.L. Abrams, D.L. Crawford and T.L. Kuhls.** 1993. Effect of abrogation of natural killer cell activity on the course of candidiasis induced by intraperitoneal administration and gastrointestinal candidiasis in mice with severe combined immunodeficiency. Infect Immun. **61**: 2520-2525
- Gringhuis, S.I., J. den Dunnen, M. Litjens, B. van Het Hof, Y. van Kooyk and T.B. Geijtenbeek.** 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., A. Gewies, K. Finger, M. Schafer, T. Sparwasser, C. Peschel, I. Forster and J. Ruland. 2006. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*. **442**: 651-656

Gutierrez, J., P. Morales, M.A. Gonzalez and G. Quindos. 2002. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol*. **42**: 207-227

H

Han, Y. and J.E. Cutler. 1995. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun*. **63**: 2714-2719

Han, Y., M.H. Riesselman and J.E. Cutler. 2000. Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect Immun*. **68**: 1649-1654

Han, Y., T.R. Kozel, M.X. Zhang, R.S. MacGill, M.C. Carroll and J.E. Cutler. 2001. Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J Immunol*. **167**: 1550-1557

Hart, O.M., V. Athie-Morales, G.M. O'Connor and C.M. Gardiner. 2005. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol*. **175**: 1636-1642

Hashimoto, C., K.L. Hudson and K.V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. **52**: 269-279

Hayashi, F., T.K. Means and A.D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. **102**: 2660-2669

Hodgetts, S., L. Nooney, R. Al-Akeel, A. Curry, S. Awad, R. Matthews and J. Burnie. 2008. Efungumab and caspofungin: pre-clinical data supporting synergy. *J Antimicrob Chemother*. **61**: 1132-1139

Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. **168**: 4531-4537

Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. **162**: 3749-3752

Hostetter, M.K. 1994. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*. **7**: 29-42

Hostetter, M.K. 1999. Integrin-like proteins in *Candida* spp. and other microorganisms. *Fungal Genet Biol*. **28**: 135-145

Hsu, H.C., H.G. Zhang, L. Li, N. Yi, P.A. Yang, Q. Wu, J. Zhou, S. Sun, X. Xu, X. Yang, L. Lu, G. Van Zant, R.W. Williams, D.B. Allison and J.D. Mountz. 2003. Age-related thymic involution in C57BL/6J x DBA/2J recombinant-inbred mice maps to mouse chromosomes 9 and 10. *Genes Immun.* **4**: 402-410

Huang, W., L. Na, P.L. Fidel and P. Schwarzenberger. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis.* **190**: 624-631

Huffnagle, G.B. and G.S. Deepe. 2003. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol.* **6**: 344-350

I

Ibrahim, A.S., F. Mirbod, S.G. Filler, Y. Banno, G.T. Cole, Y. Kitajima, J.E. Edwards, Jr., Y. Nozawa and M.A. Ghannoum. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* **63**: 1993-1998

J

Janeway, C.A., P. Traveres, M. Walport and M.J. Shlomchick. 2003. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* 2nd ed. Elsevier-Masson

Janssens, S. and R. Beyaert. 2002. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci.* **27**: 474-482

Jouault, T., S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P.A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira and D. Poulain. 2003. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis.* **188**: 165-172

Jouault, T., M. El Abed-El Behi, M. Martinez-Esparza, L. Breuilh, P.A. Trinel, M. Chamaillard, F. Trottein and D. Poulain. 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

K

Kabelitz, D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* **19**: 39-45

Kabelitz, D. and R. Medzhitov. 2007. Innate immunity - cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol.* **19**: 1-3

Kalo-Klein, A. and S.S. Witkin. 1990. Prostaglandin E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun.* **58**: 260-262

Kanbe, T., T. Horii, T. Arishima, M. Ozeki and A. Kikuchi. 2002. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast.* **19**: 973-989

- Kaposzta, R., P. Tree, L. Marodi and S. Gordon.** 1998. Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. *Infect Immun.* **66**: 1708-1717
- Karbassi, A., J.M. Becker, J.S. Foster and R.N. Moore.** 1987. Enhanced killing of *Candida albicans* by murine macrophages treated with macrophage colony-stimulating factor: evidence for augmented expression of mannose receptors. *J Immunol.* **139**: 417-421
- Kauffman, C.A.** 2001. Fungal infections in older adults. *Clin Infect Dis.* **33**: 550-555
- Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira.** 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* **11**: 115-122
- Kawai, T. and S. Akira.** 2007a. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* **13**: 460-469
- Kawai, T. and S. Akira.** 2007b. TLR signaling. *Semin Immunol.* **19**: 24-32
- Kerridge, D., F.C. Odds and H. Vaden-Bossche.** 1993. Dimorphic fungi in biology and medicine. 1st ed. Plenum Press
- Kim, J.M., N.I. Kim, Y.K. Oh, Y.J. Kim, J. Youn and M.J. Ahn.** 2005. CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34+ cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF-kappaB-independent pathways. *Int Immunol.* **17**: 1525-1531
- Kim, H.A., S.H. Kim, H.M. Ko, J.H. Choi, K.J. Kim, S.H. Oh, K.O. Cho, I.W. Choi and S.Y. Im.** 2008. Nitric oxide plays a key role in the platelet-activating factor-induced enhancement of resistance against systemic candidiasis. *Immunology.* **124**: 428-435
- Kirsch, D.R., R. Kelly and M.B. Kurtz.** 1990. The Genetics of *Candida*. 1st ed. CRC Press
- Klis, F.M., P. de Groot and K. Hellingwerf.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol.* **39**: 1-8
- Kohatsu, L., D.K. Hsu, A.G. Jegalian, F.T. Liu and L.G. Baum.** 2006. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol.* **177**: 4718-4726
- Kozel, T.R.** 1996. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev.* **9**: 34-46
- Kozel, T.R.** 1998. Complement activation by pathogenic fungi. *Res Immunol.* **149**: 309-320; discussion 514-305
- Kozel, T.R., R.S. MacGill, A. Percival and Q. Zhou.** 2004. Biological activities of naturally occurring antibodies reactive with *Candida albicans* mannan. *Infect Immun.* **72**: 209-218
- Kretschmar, M., B. Hube, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schroder, H. Hof and T. Nichterlein.** 1999. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun.* **67**: 6637-6642
- Kumagai, Y., O. Takeuchi and S. Akira.** 2008. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother.* **14**: 86-92

Kunkel, S.L., M. Spengler, M.A. May, R. Spengler, J. Larrick and D. Remick. 1988. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem.* **263**: 5380-5384

L

- Lanier, L.L.** 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol.* **15**: 308-314
- Le Cabec, V., L.J. Emorine, I. Toesca, C. Cougoule and I. Maridonneau-Parini.** 2005. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *J Leukoc Biol.* **77**: 934-943
- Lee, K.L., H.R. Buckley and C.C. Campbell.** 1975. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia.* **13**: 148-153
- Lee, K.H., M.S. Yoon and W.H. Chun.** 1997. The effects of monoclonal antibodies against iC3b receptors in mice with experimentally induced disseminated candidiasis. *Immunology.* **92**: 104-110
- Lee, S.J., N.Y. Zheng, M. Clavijo and M.C. Nussenzweig.** 2003. Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun.* **71**: 437-445
- Lehrer, R.I.** 2004. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol.* **2**: 727-738
- LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M.J. Robinson, F. Osorio, E.C. Slack, S.V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G.D. Brown, J. Ruland and C. Reis e Sousa.** 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
- Lemaitre, B. and J. Hoffmann.** 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* **25**: 697-743
- Levitz, S.M.** 2004. Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect.* **6**: 1351-1355
- Ligthart, G.J., J.X. Corberand, C. Fournier, P. Galanaud, W. Hijmans, B. Kennes, H.K. Muller-Hermelink and G.G. Steinmann.** 1984. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev.* **28**: 47-55
- Linehan, S.A., L. Martinez-Pomares, P.D. Stahl and S. Gordon.** 1999. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: *In situ* expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med.* **189**: 1961-1972
- Linton, P.J. and K. Dorshkind.** 2004. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* **5**: 133-139
- Liu, H.** 2001. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* **4**: 728-735
- Liu, L., K. Kang, M. Takahara, K.D. Cooper and M.A. Ghannoum.** 2001. Hyphae and yeasts of *Candida albicans* differentially regulate interleukin-12 production by human blood monocytes: inhibitory role of *C. albicans* germination. *Infect Immun.* **69**: 4695-4697

- Lo, H.J., J.R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti and G.R. Fink.** 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. **90**: 939-949
- Lockhart, S.R., C. Pujol, K.J. Daniels, M.G. Miller, A.D. Johnson, M.A. Pfaller and D.R. Soll.** 2002. In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics*. **162**: 737-745
- Lockhart, S.R., K.J. Daniels, R. Zhao, D. Wessels and D.R. Soll.** 2003. Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. **2**: 49-61
- Loo, S. and J. Rine.** 1994. Silencers and domains of generalized repression. *Science*. **264**: 1768-1771
- Lopez-Ribot, J.L.** 2005. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol*. **15**: 453-455
- Lucas, R., M. Alves, E. del Olmo, A. San Feliciano and M. Paya.** 2003. LAAE-14, a new *in vitro* inhibitor of intracellular calcium mobilization, modulates acute and chronic inflammation. *Biochem Pharmacol*. **65**: 1539-1549
- Lucas, R., E. Villamón, M. Paya, M. Alves, E. del Olmo, D. Gozalbo and M.L. Gil.** 2004. LAAE-14, a new anti-inflammatory drug, increases the survival of *Candida albicans*-inoculated mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **40**: 239-242

M

- Maneu, V., J.P. Martinez and D. Gozalbo.** 2000. Identification of *Candida albicans* clinical isolates by PCR amplification of an EFB1 gene fragment containing an intron-interrupted open reading frame. *Med Mycol*. **38**: 123-126
- Mansour, M.K. and S.M. Levitz.** 2002. Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol*. **5**: 359-365
- Marodi, L., H.M. Korchak and R.B. Johnston, Jr.** 1991. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. **146**: 2783-2789
- Marodi, L., S. Schreiber, D.C. Anderson, R.P. MacDermott, H.M. Korchak and R.B. Johnston, Jr.** 1993. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest*. **91**: 2596-2601
- Marr, K.A., S.A. Balajee, T.R. Hawn, A. Ozinsky, U. Pham, S. Akira, A. Aderem and W.C. Liles.** 2003. Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun*. **71**: 5280-5286
- Martinez, J.P., M.L. Gil, J.L. Lopez-Ribot and W.L. Chaffin.** 1998. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*. **11**: 121-141
- Masuoka, J. and K.C. Hazen.** 1999. Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells. *Glycobiology*. **9**: 1281-1286

- Matsumoto, M., T. Tanaka, T. Kaisho, H. Sanjo, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins and S. Akira.** 1999. A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages. *J Immunol.* **163**: 5039-5048
- Matthews, R.C., J. Burnie and W. Lee.** 1991. The application of epitope mapping in the development of a new serological test for systemic candidosis. *J Immunol Methods.* **143**: 73-79
- Matthews, R.C. and J. Burnie.** 1992. The role of hsp90 in fungal infection. *Immunol Today.* **13**: 345-348
- Matthews, R., S. Hodgetts and J. Burnie.** 1995. Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis. *J Infect Dis.* **171**: 1668-1671
- Matthews, R. and J. Burnie.** 2001. Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis. *Curr Opin Investig Drugs.* **2**: 472-476
- Matthews, R.C., G. Rigg, S. Hodgetts, T. Carter, C. Chapman, C. Gregory, C. Illidge and J. Burnie.** 2003. Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**: 2208-2216
- McGlauchlen, K.S. and L.A. Vogel.** 2003. Ineffective humoral immunity in the elderly. *Microbes Infect.* **5**: 1279-1284
- Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr.** 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* **91**: 295-298
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C.A. Janeway, Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388**: 394-397
- Meier, A., C.J. Kirschning, T. Nikolaus, H. Wagner, J. Heesemann and F. Ebel.** 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* **5**: 561-570
- Mencacci, A., E. Cenci, F. Bistoni, A. Bacci, G. Del Sero, C. Montagnoli, C. Fe d'Ostiani and L. Romani.** 1998a. Specific and non-specific immunity to *Candida albicans*: a lesson from genetically modified animals. *Res Immunol.* **149**: 352-361
- Mencacci, A., E. Cenci, G. Del Sero, C. Fe d'Ostiani, P. Mosci, C. Montagnoli, A. Bacci, F. Bistoni, V.F. Quesniaux, B. Ryffel and L. Romani.** 1998b. Defective co-stimulation and impaired Th1 development in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha double-deficient mice infected with *Candida albicans*. *Int Immunol.* **10**: 37-48
- Meri, T., A. Hartmann, D. Lenk, R. Eck, R. Wurzner, J. Hellwage, S. Meri and P.F. Zipfel.** 2002. The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun.* **70**: 5185-5192
- Meyer, J.E., J. Harder, T. Gorogh, J.B. Weise, S. Schubert, D. Janssen and S. Maune.** 2004. Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic *Candida* infection. *Anticancer Res.* **24**: 1025-1030
- Miyake, K.** 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* **12**: 186-192

- Moazed, D. and D. Johnson.** 1996. A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell*. **86**: 667-677
- Montagnoli, C., A. Bacci, S. Bozza, R. Gaziano, P. Mosci, A.H. Sharpe and L. Romani.** 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
- Montagnoli, C., S. Bozza, A. Bacci, R. Gaziano, P. Mosci, J. Morschhauser, L. Pitzurra, M. Kopf, J. Cutler and L. Romani.** 2003. A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity. *Eur J Immunol*. **33**: 1193-1204
- Montagnoli, C., S. Sandini, A. Bacci, L. Romani and R. La Valle.** 2004. Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis. *Med Mycol*. **42**: 319-324
- Moragues, M.D., M.J. Omaetxebarria, N. Elguezabal, M.J. Sevilla, S. Conti, L. Polonelli and J. Ponton.** 2003. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. *Infect Immun*. **71**: 5273-5279
- Moran, G.P., D.J. Sullivan and D.C. Coleman.** 2002. Emergence of non-*Candida albicans* species as pathogens. En: *Candida and Candidiasis*. (Ed. Calderone, R.A., ASM press), pp 37-53
- Mullick, A., M. Elias, S. Picard, L. Bourget, O. Jovcevski, S. Gauthier, A. Tuite, P. Harakidas, C. Bihun, B. Massie and P. Gros.** 2004. Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. *Infect Immun*. **72**: 5868-5876

N

- Nagai, Y., K.P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrn, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu and P.W. Kincade.** 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*. **24**: 801-812
- Naglik, J.R., S.J. Challacombe and B. Hube.** 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. **67**: 400-428
- Narumiya, S., Y. Sugimoto and F. Ushikubi.** 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. **79**: 1193-1226
- Nemazee, D., A. Gavin, K. Hoebe and B. Beutler.** 2006. Immunology: Toll-like receptors and antibody responses. *Nature*. **441**: discussion E4
- Netea, M.G., W.L. Blok, B.J. Kullberg, M. Bemelmans, M.T. Vogels, W.A. Buurman and J.W. van der Meer.** 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., C.A. Van Der Graaf, A.G. Vonk, I. Verschueren, J.W. Van Der Meer and B.J. Kullberg.** 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., R. Suttmüller, C. Hermann, C.A. Van der Graaf, J.W. Van der Meer, J.H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema and B.J. Kullberg.** 2004a. 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., J.W. Van der Meer and B.J. Kullberg.** 2004b. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol.* **12**: 484-488
- Netea, M.G., N.A. Gow, C.A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R.P. Hobson, G. Bertram, H.B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E.T. Buurman, K. Gijzen, D.L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D.M. MacCallum, F.C. Odds, J.W. Van der Meer, A.J. Brown and B.J. Kullberg.** 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
- Nett, J. and D. Andes.** 2006. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* **9**: 340-345
- Nicola, A.M., A. Casadevall and D.L. Goldman.** 2008. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Microbiol.* **11**: 313-317
- Nombela, C., C. Gil and W.L. Chaffin.** 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* **14**: 15-21
- Noverr, M.C., J.R. Erb-Downward and G.B. Huffnagle.** 2003. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev.* **16**: 517-533
- Nucci, M. and E. Anaissie.** 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis.* **33**: 1959-1967

O

- O'Garra, A. and P. Vieira.** 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* **10**: 801-805
- Odds, F.C.** 1988. *Candida* and candidosis, a review and bibliography. 2nd ed. Ballière Tindall
- Odds, F.C., A.J. Brown and N.A. Gow.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**: 272-279
- Ortega, E., I. Algarra, M.J. Serrano, M.A. de Pablo, G. Alvarez de Cienfuegos and J.J. Gaforio.** 2000. Enhanced resistance to experimental systemic candidiasis in tilorone-treated mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **28**: 283-289

P

- Pachl, J., P. Svoboda, F. Jacobs, K. Vandewoude, B. van der Hoven, P. Spronk, G. Masterson, M. Malbrain, M. Aoun, J. Garbino, J. Takala, L. Drgona, J. Burnie and R. Matthews.** 2006. A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* **42**: 1404-1413

- Palm, N.W. and R. Medzhitov.** 2007. Antifungal defense turns 17. *Nat Immunol.* **8**: 549-551
- Pasare, C. and R. Medzhitov.** 2005. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature.* **438**: 364-368
- Peman, J., E. Canton, A. Orero, A. Viudes, J. Frasquet and M. Gobernado.** 2002. Epidemiology of candidemia in Spain - Multicenter study. *Rev Iberoam Micol.* **19**: 30-35
- Peman, J., E. Canton and M. Gobernado.** 2005. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **24**: 23-30
- Perez-Martin, J., J.A. Uria and A.D. Johnson.** 1999. Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene. *EMBO J.* **18**: 2580-2592
- Peters-Golden.** 1997. Lipid mediator synthesis by lung macrophages. 1st ed. Marcel Dekker, Inc.
- Pevsner-Fischer, M., V. Morad, M. Cohen-Sfady, L. Rousso-Noori, A. Zanin-Zhorov, S. Cohen, I.R. Cohen and D. Zipori.** 2007. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood.* **109**: 1422-1432
- Pfaller, M.A., S.A. Messer, A. Houston, M.S. Rangel-Frausto, T. Wiblin, H.M. Blumberg, J.E. Edwards, W. Jarvis, M.A. Martin, H.C. Neu, L. Saiman, J.E. Patterson, J.C. Dibb, C.M. Roldan, M.G. Rinaldi and R.P. Wenzel.** 1998. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **31**: 289-296
- Pfaller, M.A., D.J. Diekema, A.L. Colombo, C. Kibbler, K.P. Ng, D.L. Gibbs and V.A. Newell.** 2006. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* **44**: 3578-3582
- Pfaller, M.A. and D.J. Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* **20**: 133-163
- Pitarch, A., R. Diez-Orejas, G. Molero, M. Pardo, M. Sanchez, C. Gil and C. Nombela.** 2001. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics.* **1**: 550-559
- Pitarch, A., J. Abian, M. Carrascal, M. Sanchez, C. Nombela and C. Gil.** 2004. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics.* **4**: 3084-3106
- Plackett, T.P., E.D. Boehmer, D.E. Faunce and E.J. Kovacs.** 2004. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol.* **76**: 291-299
- Plowden, J., M. Renshaw-Hoelscher, C. Engleman, J. Katz and S. Sambhara.** 2004. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell.* **3**: 161-167
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science.* **282**: 2085-2088

- Ponton, J. and A. del Palacio.** 2007. Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections. *Rev Iberoam Micol.* **24**: 181-186
- Poulain, D., C. Slomianny, T. Jouault, J.M. Gomez and P.A. Trinel.** 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
- Poulain, D. and T. Jouault.** 2004. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol.* **7**: 342-349
- Presterl, E., A. Lassnigg, P. Mueller-Uri, I. El-Menyawi and W. Graninger.** 1999. Cytokines in sepsis due to *Candida albicans* and in bacterial sepsis. *Eur Cytokine Netw.* **10**: 423-430

Q

- Qureshi, S.T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J. Moore, P. Gros and D. Malo.** 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J Exp Med.* **189**: 615-625

R

- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov.** 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* **118**: 229-241
- Ramage, G., K. VandeWalle, J.L. Lopez-Ribot and B.L. Wickes.** 2002. 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
- Ramage, G., S.P. Saville, D.P. Thomas and J.L. Lopez-Ribot.** 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* **4**: 633-638
- Ramsey, H., B. Morrow and D.R. Soll.** 1994. An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A. *Microbiology.* **140**: 1525-1531
- Raulet, D.H.** 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol.* **5**: 996-1002
- Reeves, E.P., H. Lu, H.L. Jacobs, C.G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E.O. Potma, A. Warley, J. Roes and A.W. Segal.** 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature.* **416**: 291-297
- Reis e Sousa, C.** 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol.* **16**: 27-34
- Renshaw, M., J. Rockwell, C. Engleman, A. Gewirtz, J. Katz and S. Sambhara.** 2002. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol.* **169**: 4697-4701

- Richardson, M.D. and P. Carlson.** 2002. Culture- and non-culture-based diagnostics for *Candida* species. En: *Candida* and Candidiasis (Ed. Calderone, R.A., ASM press), pp 387-394
- Robzyk, K., J. Recht and M.A. Osley.** 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*. **287**: 501-504
- Rodier, M.H., C. Imbert, C. Kauffmann-Lacroix, G. Daniault and J.L. Jacquemin.** 2003. Immunoglobulins G could prevent adherence of *Candida albicans* to polystyrene and extracellular matrix components. *J Med Microbiol*. **52**: 373-377
- Roeder, A., C.J. Kirschning, R.A. Rupec, M. Schaller and H.C. Korting.** 2004a. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol*. **12**: 44-49
- Roeder, A., C.J. Kirschning, R.A. Rupec, M. Schaller, G. Weindl and H.C. Korting.** 2004b. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*. **42**: 485-498
- Roeder, A., C.J. Kirschning, M. Schaller, G. Weindl, H. Wagner, H.C. Korting and R.A. Rupec.** 2004c. Induction of nuclear factor- kappa B and c-Jun/activator protein-1 via toll-like receptor 2 in macrophages by antimycotic-treated *Candida albicans*. *J Infect Dis*. **190**: 1318-1326
- Rogers, N.C., E.C. Slack, A.D. Edwards, M.A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D.L. Williams, S. Gordon, V.L. Tybulewicz, G.D. Brown and C. Reis e Sousa.** 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*. **22**: 507-517
- Roig, P. and D. Gozalbo.** 2003. Depletion of polyubiquitin encoded by the UBI4 gene confers pleiotropic phenotype to *Candida albicans* cells. *Fungal Genet Biol*. **39**: 70-81
- Roilides, E., H. Katsifa, S. Tsaparidou, T. Stergiopoulou, C. Panteliadis and T.J. Walsh.** 2000. Interleukin 10 suppresses phagocytic and antihyphal activities of human neutrophils. *Cytokine*. **12**: 379-387
- Roitt, I., P. Delves, S. Martin and D. Burton.** 2008. *Inmunología. Fundamentos*. 11th ed. Editorial Médica Panamericana
- Romani, L., S. Mocci, C. Bietta, L. Lanfaloni, P. Puccetti and F. Bistoni.** 1991. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. *Infect Immun*. **59**: 4647-4654
- Romani, L., E. Cenci, A. Mencacci, R. Spaccapelo, U. Grohmann, P. Puccetti and F. Bistoni.** 1992a. Gamma interferon modifies CD4+ subset expression in murine candidiasis. *Infect Immun*. **60**: 4950-4952
- Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, P. Mosci, G. Vitellozzi, U. Grohmann, P. Puccetti and F. Bistoni.** 1992b. Course of primary candidiasis in T cell-depleted mice infected with attenuated variant cells. *J Infect Dis*. **166**: 1384-1392
- Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, P. Mosci, P. Puccetti and F. Bistoni.** 1993a. CD4+ subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance. *J Immunol*. **150**: 925-931

- Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, E. Schiaffella, L. Tonnetti, P. Puccetti and F. Bistoni.** 1993b. Natural killer cells do not play a dominant role in CD4+ subset differentiation in *Candida albicans*-infected mice. *Infect Immun.* **61**: 3769-3774
- Romani, L., F. Bistoni and P. Puccetti.** 2002. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol.* **10**: 508-514
- Romani, L., F. Bistoni and P. Puccetti.** 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.** 2004. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* **4**: 1-23
- Romani, L., C. Montagnoli, S. Bozza, K. Perruccio, A. Spreca, P. Allavena, S. Verbeek, R.A. Calderone, F. Bistoni and P. Puccetti.** 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
- Romani, L. and P. Puccetti.** 2006. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol.* **14**: 183-189
- Romani, L. and P. Puccetti.** 2007. Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **5**: 1007-1017
- Ross, I.K., F. De Bernardis, G.W. Emerson, A. Cassone and P.A. Sullivan.** 1990. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol.* **136**: 687-694
- Ruiz-Herrera, J., M.V. Elorza, E. Valentin and R. Sentandreu.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* **6**: 14-29
- Ruprecht, C.R. and A. Lanzavecchia.** 2006. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol.* **36**: 810-816

S

- Saijo, S., N. Fujikado, T. Furuta, S.H. Chung, H. Kotaki, K. Seki, K. Sudo, S. Akira, Y. Adachi, N. Ohno, T. Kinjo, K. Nakamura, K. Kawakami and Y. Iwakura.** 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol.* **8**: 39-46
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia.** 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* **182**: 389-400
- San Millan, R., N. Elguezabal, P. Regulez, M.D. Moragues, G. Quindos and J. Ponton.** 2000. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology.* **146**: 2105-2112
- Sandor, F. and M. Buc.** 2005. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha).* **51**: 188-197

- Sanglard, D. and F.C. Odds.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* **2**: 73-85
- Sato, K., X.L. Yang, T. Yudate, J.S. Chung, J. Wu, K. Luby-Phelps, R.P. Kimberly, D. Underhill, P.D. Cruz, Jr. and K. Ariizumi.** 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.* **281**: 38854-38866
- Schaller, M., C. Borelli, H.C. Korting and B. Hube.** 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* **48**: 365-377
- Schneider, J.J., A. Unholzer, M. Schaller, M. Schafer-Korting and H.C. Korting.** 2005. Human defensins. *J Mol Med.* **83**: 587-595
- Schofield, D.A., C. Westwater and E. Balish.** 2004. beta-defensin expression in immunocompetent and immunodeficient germ-free and *Candida albicans*-monoassociated mice. *J Infect Dis.* **190**: 1327-1334
- Sergeeva, M.G., M.V. Gonchar, A.T. Mevkh and S.D. Varfolomeyev.** 1997. Prostaglandin E2 biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentrations. *FEBS Lett.* **418**: 235-238
- Sevilla, M.J., B. Robledo, A. Rementeria, M.D. Moragues and J. Ponton.** 2006. A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis. *Infect Immun.* **74**: 3042-3045
- Shepherd, V.L., B.I. Tarnowski and B.J. McLaughlin.** 1991. Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **32**: 1779-1784
- Singleton, D.R., J. Masuoka and K.C. Hazen.** 2001. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *J Bacteriol.* **183**: 3582-3588
- Sivori, S., M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta and A. Moretta.** 2004. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 10116-10121
- Soll, D.R.** 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.* **5**: 183-203
- Soll, D.R., B. Morrow and T. Srikantha.** 1993. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* **9**: 61-65
- Soll, D.R.** 2004. Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays.* **26**: 10-20
- Sonesson, A., L. Ringstad, E.A. Nordahl, M. Malmsten, M. Morgelin and A. Schmidtchen.** 2007. Antifungal activity of C3a and C3a-derived peptides against *Candida*. *Biochim Biophys Acta.* **1768**: 346-353
- Staab, J.F., S.D. Bradway, P.L. Fidel and P. Sundstrom.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science.* **283**: 1535-1538

- Standiford, T.J., S.L. Kunkel, M.W. Rolfe, H.L. Evanoff, R.M. Allen and R.M. Strieter.** 1992. Regulation of human alveolar macrophage- and blood monocyte-derived interleukin-8 by prostaglandin E2 and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **6**: 75-81
- Steinshamn, S. and A. Waage.** 1992. Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice. *Infect Immun.* **60**: 4003-4008
- Steinshamn, S., M.H. Bemelmans, L.J. van Tits, K. Bergh, W.A. Buurman and A. Waage.** 1996. TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense. *J Immunol.* **157**: 2155-2159
- Strassmann, G., V. Patil-Koota, F. Finkelman, M. Fong and T. Kambayashi.** 1994. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med.* **180**: 2365-2370
- Stuyt, R.J., M.G. Netea, I. Verschueren, G. Fantuzzi, C.A. Dinarello, J.W. Van Der Meer and B.J. Kullberg.** 2002. Role of interleukin-18 in host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Infect Immun.* **70**: 3284-3286
- Stuyt, R.J., M.G. Netea, J.H. van Krieken, J.W. van der Meer and B.J. Kullberg.** 2004. Recombinant interleukin-18 protects against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *J Infect Dis.* **189**: 1524-1527
- Sullivan, D.J. and D.C. Coleman.** 2002. Molecular approaches to identification and typing of *Candida* species. En: *Candida and Candidiasis.* (Ed. Calderone, R.A., ASM press), pp 427-441
- Sundstrom, P.** 2002. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol.* **4**: 461-469

T

- Taguchi, T., J.L. Mitcham, S.K. Dower, J.E. Sims and J.R. Testa.** 1996. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics.* **32**: 486-488
- Takahashi, K., M.J. Donovan, R.A. Rogers and R.A. Ezekowitz.** 1998. Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood. *Cell Tissue Res.* **292**: 311-323
- Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* **21**: 335-376
- Takeda, K. and S. Akira.** 2004a. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci.* **34**: 73-82
- Takeda, K. and S. Akira.** 2004b. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* **16**: 3-9
- Takeda, K. and S. Akira.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* **17**: 1-14
- Tang, N., L. Liu, K. Kang, P.K. Mukherjee, M. Takahara, G. Chen, T.S. McCormick, K.D. Cooper and M. Ghannoum.** 2004. Inhibition of monocytic interleukin-12 production by *Candida albicans* via selective activation of ERK mitogen-activated protein kinase. *Infect Immun.* **72**: 2513-2520

- Tardif, F., J.P. Goulet, A. Zakrzewski, P. Chauvin and M. Rouabhia.** 2004. Involvement of interleukin-18 in the inflammatory response against oropharyngeal candidiasis. *Med Sci Monit.* **10**: 239-249
- Tarnowski, B.I., V.L. Shepherd and B.J. McLaughlin.** 1988. Expression of mannose receptors for pinocytosis and phagocytosis on rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **29**: 742-748
- Tavares, D., A. Salvador, P. Ferreira and M. Arala-Chaves.** 1993. Immunological activities of a *Candida albicans* protein which plays an important role in the survival of the microorganism in the host. *Infect Immun.* **61**: 1881-1888
- Tavares, D., P. Ferreira and M. Arala-Chaves.** 2000. Increased resistance to systemic candidiasis in athymic or interleukin-10-depleted mice. *J Infect Dis.* **182**: 266-273
- Taylor, P.R., S.V. Tsoni, J.A. Willment, K.M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon and G.D. Brown.** 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* **8**: 31-38
- Tesar, B.M., W.E. Walker, J. Unternaehrer, N.S. Joshi, A. Chandele, L. Haynes, S. Kaech and D.R. Goldstein.** 2006. Murine [corrected] myeloid dendritic cell-dependent toll-like receptor immunity is preserved with aging. *Aging Cell.* **5**: 473-486
- Thoman, M.L.** 1995. The pattern of T lymphocyte differentiation is altered during thymic involution. *Mech Ageing Dev.* **82**: 155-170
- Torosantucci, A., G. Romagnoli, P. Chiani, A. Stringaro, P. Crateri, S. Mariotti, R. Teloni, G. Arancia, A. Cassone and R. Nisini.** 2004. *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. *Infect Immun.* **72**: 833-843
- Torosantucci, A., C. Bromuro, P. Chiani, F. De Bernardis, F. Berti, C. Galli, F. Norelli, C. Bellucci, L. Polonelli, P. Costantino, R. Rappuoli and A. Cassone.** 2005. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med.* **202**: 597-606
- Tortorano, A.M., J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor, C.C. Kibbler, O. Faure, E. Biraghi, E. Canton, K. Zimmermann, S. Seaton and R. Grillot.** 2004. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **23**: 317-322
- Tran, P., R. Ahmad, J. Xu, A. Ahmad and J. Menezes.** 2003. Host's innate immune response to fungal and bacterial agents *in vitro*: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. *Immunology.* **109**: 263-270
- Trinchieri, G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* **3**: 133-146
- Trinel, P.A., E. Maes, J.P. Zanetta, F. Delplace, B. Coddeville, T. Jouault, G. Strecker and D. Poulain.** 2002. *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem.* **277**: 37260-37271

- Trzonkowski, P., J. Mysliwska, G. Pawelec and A. Mysliwski.** 2008. From bench to bedside and back: the SENIEUR Protocol and the efficacy of influenza vaccination in the elderly. *Biogerontology*. [Epub ahead of print]
- Tzung, K.W., R.M. Williams, S. Scherer, N. Federspiel, T. Jones, N. Hansen, V. Bivolarevic, L. Huizar, C. Komp, R. Surzycki, R. Tamse, R.W. Davis and N. Agabian.** 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 3249-3253

U

- Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti and A. Aderem.** 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. **401**: 811-815
- Underhill, D.M.** 2003a. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res*. **9**: 176-180
- Underhill, D.M.** 2003b. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol*. **33**: 1767-1775
- Underhill, D.M. and B. Gantner.** 2004. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect*. **6**: 1368-1373
- Underhill, D.M.** 2007. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol Rev*. **219**: 75-87
- Urban, C.F., S. Lourido and A. Zychlinsky.** 2006a. How do microbes evade neutrophil killing?. *Cell Microbiol*. **8**: 1687-1696
- Urban, C.F., U. Reichard, V. Brinkmann and A. Zychlinsky.** 2006b. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. **8**: 668-676

V

- van Burik, J.A. and P.T. Magee.** 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol*. **55**: 743-772
- van der Graaf, C.A., M.G. Netea, I. Verschueren, J.W. van der Meer and B.J. Kullberg.** 2005. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun*. **73**: 7458-7464
- van Duin, D., S. Mohanty, V. Thomas, S. Ginter, R.R. Montgomery, E. Fikrig, H.G. Allore, R. Medzhitov and A.C. Shaw.** 2007. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J Immunol*. **178**: 970-975
- van Enkevort, F.H., M.G. Netea, A.R. Hermus, C.G. Sweep, J.F. Meis, J.W. Van der Meer and B.J. Kullberg.** 1999. Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice. *Med Mycol*. **37**: 419-426
- van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek.** 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*. **3**: 697-709

- Vassiliou, E., H. Jing and D. Ganea. 2003. Prostaglandin E₂ inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol.* **223**: 120-132
- Vazquez-Torres, A. and E. Balish. 1997. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**: 170-192
- Vilanova, M., L. Teixeira, I. Caramalho, E. Torrado, A. Marques, P. Madureira, A. Ribeiro, P. Ferreira, M. Gama and J. Demengeot. 2004. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. *Immunology.* **111**: 334-342
- Villamón, E., D. Gozalbo, P. Roig, C. Murciano, J.E. O'Connor, D. Fradelizi and M.L. Gil. 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
- Villamón, E., D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, M.L. Ferrandiz, D. Fradelizi and M.L. Gil. 2004b. Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. *Microbes Infect.* **6**: 542-548
- Villamón, E., D. Gozalbo, P. Roig, J.E. O'Connor, D. Fradelizi and M.L. Gil. 2004c. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect.* **6**: 1-7
- Villamón, E., P. Roig, M.L. Gil and D. Gozalbo. 2005. Toll-like receptor 2 mediates prostaglandin E₂ production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*. *Research in Microbiology.* **156**: 115-118
- Vylkova, S., N. Nayyar, W. Li and M. Edgerton. 2007. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 154-161

W

- Wald, D., J. Qin, Z. Zhao, Y. Qian, M. Naramura, L. Tian, J. Towne, J.E. Sims, G.R. Stark and X. Li. 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* **4**: 920-927
- Walsh, T.J., J.W. Hathorn, J.D. Sobel, W.G. Merz, V. Sanchez, S.M. Maret, H.R. Buckley, M.A. Pfaller, R. Schaufele, C. Sliva and *et al.* 1991. Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med.* **324**: 1026-1031
- Wang, J.E., A. Warris, E.A. Ellingsen, P.F. Jorgensen, T.H. Flo, T. Espevik, R. Solberg, P.E. Verweij and A.O. Aasen. 2001. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun.* **69**: 2402-2406
- Weig, M., U. Gross and F. Muhlschlegel. 1998. Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. *Trends Microbiol.* **6**: 468-470

- Wells, C.A., J.A. Salvage-Jones, X. Li, K. Hitchens, S. Butcher, R.Z. Murray, A.G. Beckhouse, Y.L. Lo, S. Manzanero, C. Cobbold, K. Schroder, B. Ma, S. Orr, L. Stewart, D. Lebus, P. Sobieszczuk, D.A. Hume, J. Stow, H. Blanchard and R.B. Ashman.** 2008. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol.* **180**: 7404-7413
- West, A.P., A.A. Koblansky and S. Ghosh.** 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**: 409-437
- Wetzler, L.M.** 2003. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine.* **21**: 55-60
- Wheeler, R.T. and G.R. Fink.** 2006. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog.* **2**: e35
- Whiteway, M. and C. Bachewich.** 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* **61**: 529-553
- Willment, J.A. and G.D. Brown.** 2008. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol.* **16**: 27-32
- Witkin, S.S., A. Kalo-Klein, L. Galland, M. Teich and W.J. Ledger.** 1991. Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. *J Infect Dis.* **164**: 396-399
- Wolfs, T.G., W.A. Buurman, A. van Schadewijk, B. de Vries, M.A. Daemen, P.S. Hiemstra and C. van't Veer.** 2002. *In vivo* expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol.* **168**: 1286-1293

Y

- Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira.** 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* **169**: 6668-6672

Z

- Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M.L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, F. Bistoni, P. Puccetti, R.A. Kastelein, M. Kopf and L. Romani.** 2007. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol.* **37**: 2695-2706
- Zhang, D., G. Zhang, M.S. Hayden, M.B. Greenblatt, C. Bussey, R.A. Flavell and S. Ghosh.** 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* **303**: 1522-1526

Zhang, M.X., M.C. Bohlman, C. Itatani, D.R. Burton, P.W. Parren, S.C. St Jeor and T.R. Kozel. 2006. Human recombinant antimannan immunoglobulin G1 antibody confers resistance to hematogenously disseminated candidiasis in mice. *Infect Immun.* **74**: 362-369

