



Tesis doctoral

Marcadores de infección por  
*Candida albicans* y su utilidad en el diagnóstico  
y protección frente a la candidiasis invasora

Ander Díez Villalba

Leioa, 2021

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco      Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Enfermería  
Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea

**Marcadores de infección por**  
***Candida albicans* y su utilidad en el diagnóstico**  
**y protección frente a la candidiasis invasora**

Tesis doctoral

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Immunologia, Microbiologia eta Parasitologia Saila

Departamento de Enfermería I  
Erizaintza I Saila

Ander Díez Villalba

Leioa, 2021



*A mi Ama*



## **Agradecimientos**

En este apartado me gustaría mostrar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de uno u otro modo, con su apoyo y colaboración han hecho posible que este trabajo se lleve a cabo.

En primer lugar, a la Dra. María Dolores Moragues Tosantos por haberme aceptado en su grupo de investigación y haber permitido que realizara esta tesis doctoral bajo su dirección. Muchísimas gracias Lola, por la confianza en mí desde un primer momento, por guiarme y apoyarme a lo largo de estos años, y a pesar de los reveses que se han presentado durante el desarrollo de esta tesis, por haber estado siempre respaldándome con paciencia y cercanía. Este último año no ha sido nada fácil para ti, pero aun así has estado pendiente de nosotros en todo momento, gracias.

Agradecer también al Dr. Iñigo Fernández de Larrinoa Santamaría por haber confiado en mí y haber asumido la dirección de esta tesis. Su ayuda, consejos y correcciones han sido imprescindibles para completar este trabajo de la mejor manera posible. Gracias Iñigo por haber estado siempre disponible a echarme una mano y por la rápida respuesta a todas mis consultas.

Agradezco al Dr. Guillermo Quindós, director del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología por haber autorizado el desarrollo de esta tesis doctoral en el departamento.

Quiero agradecer al Dr. Elena Rodríguez, actual directora del Departamento de Enfermería I, por haberme permitido realizar esta tesis en el citado departamento.

Gracias a la Dra. Marisol Cuétara por proporcionarme los sueros sin los cuales habría sido imposible realizar este trabajo.

Me gustaría agradecer también a la Dra. Arantza Alejo y Gloria Lete del Servicio General de Animalario por su ayuda y asesoramiento en la parte de experimentación animal de esta tesis.

También quiero dar las gracias al resto de los profesores y personal colaborador de la Facultad de Medicina y Enfermería. Gracias a Ernesto, Aroa y en especial a Cristina, por haber colaborado de forma activa en la realización de este trabajo, ¡muchas gracias!

Agradecer también a la Dra. Simona Pauloni y Anna Castagnoli su colaboración en este trabajo durante la estancia de tres meses que pasaron con nosotros, grazie mille!

Agradezco a mis compañeros de laboratorio; Inés, Giulia, Lucia, Pilar y Marta, por toda la ayuda que me habéis dado, por los buenos momentos y por todo lo que he aprendido de vosotras durante estos años, especialmente a Inés y Giulia que me acogieron y me guiaron desde el primer año que entre al laboratorio. ¡Muchas gracias por vuestro apoyo! A los compañeros del labo de Quindós: Cristina, Iker, Unai, Ainara, Juan Daniel, Camino, Sandra, Kathe, Aitzol, Irene, Iñigo e Iratxe. Gracias por el buen ambiente que ha habido siempre y sobre todo por los hamaiketako, las comidas y todas las celebraciones de cumpleaños. Eskerrik asko!

Por último, quiero dar las gracias a toda mi familia, por su apoyo, preocupación y sacrificio. Pero especialmente a mis padres, a los que les debo tanto que dedicarles una tesis se queda corto. Gracias por estar siempre ahí y gracias por permitir que tomase siempre el camino de mi elección. A mis cuñadas, Naiara y Jone, por su incondicional apoyo, por animarme siempre y trasmitirme su positivismo. Mila esker!

Eta amaitzeko, nire eskerrik sakonenak eta beroenak Oianerentzat dira. Hasieratik bukaerara arte hor egon zarelako ni ulertzen saiatzen, laguntzen eta maitatzen. Mila esker nigan ni baino gehiago sinisteagaitik, nire borrokak zureak ere badirela sentiarazten eta zoriontsu egiten nauena aukeratzeko animatzen. Bizitzako arlo guztietan eredu bat izan zarelako.

Eskerrik asko!!

# Abreviaturas





$\alpha$ :	Riesgo alfa
A:	Eficacia o precisión
A <sub>490</sub> :	Absorbancia a 490 nanometros
aa:	Aminoácido
Ach1:	Acetil-CoA-hidrolasa
Aco1:	Aconitasa-1
Acs2:	Acetil-CoA-sintasa
Ade17:	Adenosin imidazolcarboxamida-ribonucleótido transformilasa
Adh1:	Alcohol deshidrogenasa
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNr:	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
Als:	Agglutinin-like sequence
ANOVA:	Análisis de la varianza
ATP:	Adenosin trifosfato
Atp2:	Subunidad $\beta$ F1 del complejo F1F0-ATPase
AVC:	Área bajo la curva
B-ME:	$\beta$ -mercaptoetanol
BDG:	$\beta$ -1,3-glucano
Bgl2:	$\beta$ -1,3-glicosiltransferasa
B:	Enterrado
BSA:	Albúmina de suero bovino
C:	Espiral al azar
°C:	Grado centígrado
CAGTA:	Anticuerpos anti-tubo germinal de <i>C. albicans</i>
CAMP:	Adenosín monofosfato cíclico
cel:	Célula
CFA:	Adyuvante completo de Freund
CI:	Candidiasis Invasora
cm:	Centímetro
CRM197:	Cross reacting material
CS:	Candida Score
Cta1:	Catalasa A

C-terminal:	Carboxilo-terminal
CVV:	Candidiasis vulvovaginal
Da:	Dalton
DAMP:	Patrón molecular asociado a peligro
DC:	Células Dendríticas
DC-SING:	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DE:	Desviación estándar
DM:	Diabetes Mellitus
DTT:	Ditiotreitol
E:	Eluido
E:	Especificidad
E:	Expuesto
E:	Lámina Beta
ECIL3:	European Conference on Infections in Leukemia
EFI:	Enfermedad Fúngica Invasora
Egd2:	Subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente
ELISA:	Ensayo inmunoenzimático
Enf.:	Enfermedad
Enol:	Enolasa
EORTC/MSG:	Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del cáncer/Grupo de Estudio de las Micosis
EPOC:	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
Fba1:	Fructosa -1, 6-bifosfato aldolasa
Fc:	Receptor específico de anticuerpos
FcyR:	Receptor Fc de IgG
FDA:	Food and Drugs Administration
G:	Gauge
g:	Gramo
G1:	Grupo 1
G2:	Grupo 2
G3:	Grupo 3

Gap1:	Gliceroaldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GAPDH:	Gliceroaldehido-3-fosfato deshidrogenasa
Gdp1:	Glicerol-3-fostato deshidrogenasa
GEIFI:	Grupo de Estudio de la Infección Fúngica Invasora
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
Gpm1:	Fosfoglicerato mutasa 1
Gpp1:	Glicerol-3-fosfatasa
Grp2:	Metilglioxal reductasa
H:	Hélice alfa
h:	Horas
Hem13:	Coproporfirinógeno oxidasa
Hsp:	Proteína de shock térmico
HSV:	Herpes Simple Virus
Hwp1:	Hyphal-wall protein
Hxk2:	Hexoquinasa-2
Hyr:	Hyalin repeat
IC:	Inmunocompetente
ID:	Inmunodeprimido
IDSA:	Asociación de Enfermedades Infecciosas de América
IEDB:	Inmune Epitope Database
IFA:	Adyuvante incompleto de Freund
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
IFN:	Interferón
IgG-FITC:	Isotiocianato de fluoresceína anti-inmunoglobulina G
IL:	Interleucina
Ilv5:	Cetoácido reductoisomerasa
Imh3:	Inosin monofosfato deshidrogenasa
Ino1:	Inositol-1-fosfato-sintasa
lpf17186:	NAD(P)H oxidorreductasa
lpp1:	Pirofosfatasa
IPTG:	Isopropil- $\beta$ -D-I-tiogalactopiranósido

IV:	Intravenosa
K:	Kappa
Kb:	Kilobase
kDa:	Kilodalton
KLH:	Keyhole Lympe Hemocyanin
l:	Litro
lacUV5:	Promotor mutado del operón lac <i>Escherichia coli</i>
Lam:	Laminarina
LB:	Caldo de lisogenia
LES:	Lupus Eritrematoso Sistémico
Leu1:	Isopropil malato deshidratasa
Lev:	Levadura
LH:	Linfoma Hodking
Línea ND:	Línea de No Discriminación
LLA:	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC:	Leucemia Linfocítica Crónica
LMA:	Leucemia Mieloide Aguda
LNH:	Linfoma No Hodking
LPA:	Leucemia Promielocítica Aguda
µg:	microgramo
µl:	microlitro
M:	Molar
M:	Muestra
mA:	Miliamperios
MAPK:	Proteína quinasas activadas por mitógenos
Mb:	Megabase
MBL:	Mannan-Binding Lectin
Mdh1:	Malato deshidrogenasa
Met6:	Metionina sintasa
MetH:	Metionina sintasa dependiente de cobalamina
MetE:	Metionina sintasa independiente de cobalamina
mg:	Miligramo

MHC:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MHC II:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
min:	Minuto
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
MN:	Manano
MR:	Receptor de Manosa
MTL:	Mating Type Like
MWCO:	Límite de peso molécula
NCPF:	National Collection of Pathogenic Fungi
NF-kB:	Nuclear Factor-kB
NK:	Natural Killers
nm:	Nanómetro
N-terminal:	Amino-terminal
O:	Célula opaca
OPD:	Ortofenilendiamina
PAF:	Factor Activador de Plaquetas
PAMP:	Patrón Molecular Asociado a Patógeno
Pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón Fosfato Salino
PBS-BT:	Tampón Fosfato Salino con albúmina de suero bovino-Tween20
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pdc11:	Piruvato descarboxilasa
Pdi:	Proteína disulfuro-isomerasa
Pfk1:	Fosfofructoquinasa-1
PGAM:	Fosfoglicerato Mutasa
PGE2:	Prostaglandina E2
Pgi1:	Fosfoglucoisomerasa-1
Pgk1:	Fosfoglicerato quinasa 1
Phr1:	Phosphate Starvation Response-1
Phr2:	Phosphate Starvation Response-2
PK:	Piruvato quinasa

PLM:	Fosfolipomanano
Por1:	Porina-1
POX:	Peroxidasa
Pra1:	Antígeno 1 regulado por pH
PRR:	Receptor de Reconocimiento de Patrones
PTT:	Púrpura Trombocitopénica Trombótica
PVDF:	Fluoruro de polivinilideno
Pyk1:	Piruvato quinasa
UPV/EHU:	Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
Qcr2:	Ubiquinol citocromo-c reductasa
QT:	Quimioterapia
RGD:	Arginina-Glicina-Aspartato
RNA:	Ácido ribonucleico
ROC:	Característica operativa del Receptor
rpm:	Revoluciones por minuto
S:	Sensibilidad
Sah1:	S-adenosil-L-homocisteina hidrolasa
Sap:	Proteínas aspárticas
SC:	Standford DNA sequencing and Technology center
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SGIker:	Servicios generales de investigación
Shm2:	Serina hidroximetiltransferasa
Sir:	Silent information regulators
SMD:	Síndrome Mielodisplásico
Sod1:	Superoxido dismutasa 1
Sod2:	Superoxido dismutasa 2
STD:	Desviación estándar común
t:	Tiempo
TBS:	Tampón tris-salino
TEMED:	Tetrametilendiamina
TEP:	Tromboembolismo Pulmonar

TFI:	Triosa Fosfato Isomerasa
TGF- $\beta$ :	Factor $\pm$ Crecimiento Transformante Beta
Th:	Células T colaboradoras
Tkl1:	Transcetolasa
TNF- $\alpha$ :	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Tpi1:	Triosafosfato isomerasa-1
Treg:	Células T reguladoras
UCI:	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC:	Unidad Formadora de Colonias
V:	Voltio
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
vol:	Volumen
VPN:	Valor Predictivo Negativo
VPP:	Valor Predictivo Positivo
v/v:	Volumen/volumen
W:	Célula blanca
WO-1:	Célula blanca-opaca
Yhb1:	Yeast flavohemoglobin 1
YPD:	Extracto de levadura peptona dextrosa
%:	Porcentaje





# Índice



<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1. El género <i>Candida</i>. Características generales</b>	<b>3</b>
1.1.1. Morfología	4
1.1.2. Requerimientos nutricionales	5
1.1.3. Genoma de <i>C. albicans</i>	6
1.1.4. Ciclo sexual	6
<b>1.2. Pared celular</b>	<b>7</b>
1.2.1. Estructura y composición	8
1.2.1.1. Polisacáridos	9
1.2.1.2. Lípidos	10
1.2.1.3. Proteínas	10
<b>1.3. Características antigénicas</b>	<b>12</b>
1.3.1. Antígenos citoplasmáticos	13
1.3.2. Antígenos de la pared celular	17
1.3.3. Antígenos secretados al medio	19
<b>1.4. Factores de virulencia</b>	<b>20</b>
1.4.1. Adhesión	21
1.4.2. Dimorfismo	22
1.4.3. Cambio fenotípico o <i>switching</i>	24
1.4.4. Enzimas hidrolíticas	25
1.4.5. Hidrofilia	26
1.4.6. <i>Quorum sensing</i> y tigmotropismo	26
1.4.7. Adquisición de hierro	27
1.4.8. Sinergismo con bacterias	28
1.4.9. Biopelículas o <i>biofilms</i>	28
1.4.10. Mimetismo molecular	29
1.4.11. Respuesta al estrés	29
<b>1.5. Candidiasis</b>	<b>30</b>
1.5.1. Candidiasis superficiales o mucocutáneas	30
1.5.2. Candidiasis profundas	31

<b>1.6. Respuesta inmunológica frente a <i>C. albicans</i></b>	<b>32</b>
1.6.1. Inmunidad innata	33
1.6.1.1. Activación del complemento	34
1.6.1.2. Fagocitosis	34
1.6.1.3. Inflamación inducida por complemento, eicosanoides y citocinas	36
1.6.1.4. Activación de células citolíticas NK “Natural Killer”	37
1.6.2. Inmunidad específica	38
1.6.2.1. Inmunidad mediada por células	38
1.6.2.2. Linfocitos B: anticuerpos	40
<b>1.7. Diagnóstico de la candidiasis invasora</b>	<b>40</b>
1.7.1. Diagnóstico microbiológico convencional	41
1.7.2. Diagnóstico microbiológico independiente del cultivo	42
1.7.2.1. Detección de $\beta$ -1,3-glucano	43
1.7.2.2. Diagnóstico serológico	45
1.7.2.3. Otras aproximaciones diagnósticas	47
1.7.2.4. Combinaciones de marcadores biológicos	47
<b>1.8. Tratamiento de la candidiasis invasora</b>	<b>48</b>
<b>1.9 Prevención: profilaxis e inmunización</b>	<b>50</b>
<b>2. Justificación y objetivos</b>	<b>55</b>
<b>3. Pacientes, Materiales y Métodos</b>	<b>59</b>
<b>3.1. Pacientes</b>	<b>61</b>
<b>3.2. Determinación serológica de (1-3)-beta-D-glucano (BDG)</b>	<b>62</b>
<b>3.3. Titulación de CAGTA en suero</b>	<b>62</b>
3.3.1. Obtención de células inviables de <i>C. albicans</i> . Tratamiento por calor	62
3.3.2. Obtención de tubos germinales de <i>C. albicans</i>	63
3.3.3. Determinación del título de anticuerpos contra antígenos de la fase micelial de <i>C. albicans</i> (título CAGTA)	64
<b>3.4. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes</b>	<b>65</b>
3.4.1. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes	65
3.4.2. Preparación del extracto celular	67

3.4.3. Purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad	67
3.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	69
3.4.5. Tinción Coomassie	72
3.4.6. Electrotransferencia y tinción de Ponceau	73
3.4.7. Inmunodetección de antígenos (Western Blotting)	73
<b>3.5. Determinación de anticuerpos en suero por enzimoimmunoensayo (ELISA)</b>	<b>74</b>
3.5.1. Procedimiento del enzimoimmunoensayo (ELISA)	74
3.5.2. Titulación en “tablero de ajedrez” (Checkerboard)	76
3.5.3. Selección de sueros positivos y negativos	77
3.5.4. Determinación del punto de corte o cut-off	77
<b>3.6. Tratamiento estadístico</b>	<b>78</b>
3.6.1. Valoración de la utilidad diagnóstica	78
3.6.2. Curvas ROC	79
3.6.2.1. Evaluación de la capacidad discriminativa de un test diagnóstico	80
3.6.2.2. Comparación de la capacidad discriminativa de los tests diagnósticos	80
3.6.2.3. Determinación del punto de corte óptimo	81
3.6.3. Concordancia entre técnicas	81
3.6.4. Capacidad diagnóstica de la combinación de técnicas	82
<b>3.7. Selección de epítomos <i>in silico</i></b>	<b>82</b>
3.7.1. Longitud de la secuencia	82
3.7.2. Exposición de los epítomos	83
3.7.3. Epítomos lineales vs conformacionales	83
3.7.4. Características de los residuos de la secuencia	84
<b>3.8. Construcción del péptido antigénico y conjugación a KLH</b>	<b>85</b>
<b>3.9. Experimentación animal</b>	<b>85</b>
3.9.1. Estimación del tamaño muestral	86
3.9.2. Protocolo de inmunización	88
3.9.3. Determinación de anticuerpos en suero de ratón	88
3.9.4. Determinación de carga fúngica	89

3.9.5. Infección intravenosa experimental con <i>C. albicans</i> y seguimiento	89
<b>3.10. Aspectos Éticos</b>	<b>90</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>91</b>
4.1. Grupos de pacientes y especies responsables de la infección	93
4.2. Evaluación de la capacidad diagnóstica de la detección de CAGTA	94
4.3. Desarrollo de pruebas ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a proteínas de <i>C. albicans</i>	96
4.3.1. Inducción de las proteínas recombinantes Hwp1-N y Met6	96
4.3.2. Purificación de las proteínas recombinantes Hwp1-N y Met6	98
4.3.3. Puesta a punto de las condiciones de ensayo	99
4.4. Evaluación de la capacidad diagnóstica de la detección de anticuerpos frente a Als3-N, Hwp1-N y Met6	100
4.4.1. Determinación del punto de corte óptimo	102
4.4.2. Determinación de la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos frente a Als3-N, Hwp1-N y Met6	105
4.4.2.1. Curvas ROC	106
4.5. Evaluación de la capacidad diagnóstica de la detección de (1→3)-β-D-glucano	107
4.6. Concordancia entre las técnicas estudiadas y el hemocultivo	109
4.7. Capacidad diagnóstica de las pruebas según la especie responsable de la infección	109
4.8. Capacidad diagnóstica de la combinación de técnicas	111
4.9. Capacidad diagnóstica de cada prueba en función del estado inmunológico de los pacientes	114
4.9.1. Capacidad diagnóstica de las técnicas en función del estado inmunológico de los pacientes	114
4.9.1.1. Curvas ROC	119
4.9.1.2. Capacidad diagnóstica de la combinación de técnicas en función del estado inmunológico de los pacientes y concordancia con el hemocultivo	120
4.10. Selección de epítomos de las proteínas Als3-N, Hwp1 y Met6	123
4.10.1. Als3-N	125
4.10.2. Hwp1-N	131

4.11.3. Met6	136
4.10.4. Caracterización de los epítomos seleccionados y construcción del péptido antigénico 3P-KLH	145
<b>4.11. Inmunización de ratones con 3P-KLH y efecto protector frente a la infección por <i>C. albicans</i></b>	<b>148</b>
4.11.1. Carga fúngica en riñones	150
4.11.2. Registro de supervivencia en el modelo animal de infección por <i>C. albicans</i>	151
<b>5. Discusión</b>	<b>153</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>171</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>175</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>219</b>





# 1. Introducción



## 1.1. El género *Candida*. Características generales

El género *Candida* fue descrito por primera vez por Berkhout en 1923 (Berkhout, 1923) y se incluye dentro del *Phylum Ascomycota*, *Clase Deuteromycetes*, *Orden Saccharomycetales*, *Familia Cryptococcaceae* (Kurtzman, Fell & Boekhout, 2011). *Candida* engloba unas 200 especies de levaduras que se dividen en 12 grupos fisiológicos por criterios de identificación, pero todas ellas se caracterizan por formar pseudohifas, su incapacidad de hidrolizar la urea y la reacción negativa con azul de diazonio (Barnett, Payne & Yarrow, 1990). Las especies del género difieren en su capacidad de asimilar distintos compuestos, por la composición de polisacáridos de la pared celular y por la capacidad de presentar diferentes morfologías (Barnett, Payne & Yarrow, 2000; Kirsch, Kelly & Kurtz, 1990b). Sólo 17 especies han sido notificadas como patógenos humanos, de hecho, alrededor del 65% de las especies del género *Candida* son incapaces de crecer a 37°C, condición indispensable para generar una infección en el ser humano (Schauer & Hanschke, 1999). El 90% de las infecciones son producidas por sólo 5 especies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* (Vázquez & Sobel, 2011). Otra especie del género de reciente aparición es *Candida auris*, una levadura multirresistente cuya primera identificación se realizó en 2009 al aislarse del conducto auditivo externo de un paciente en Japón (Lockhart et al., 2017).

Las especies del género *Candida* forman parte del microbioma humano en aproximadamente el 50% de las personas (Olsen, 1974; Shimizu et al., 2008), aunque es importante resaltar que la prevalencia de cada especie varía en función del área geográfica y del individuo en particular (Azie et al., 2012; Pfaller & Diekema, 2007; Pfaller et al., 2014). *Candida* se halla frecuentemente como comensal inocuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal, y en el tracto gastrointestinal humano y de otros mamíferos. La especie más frecuentemente aislada de este género es *C. albicans*, constituyendo un 60-80% de los aislamientos en la cavidad oral (Odds, 1988; Richardson & Warnock, 2003; Sánchez-Vargas et al., 2005a; Sánchez-Vargas et al., 2005b) y un 80-90% de los vaginales (Richardson & Warnock, 2003). En individuos sanos suele encontrarse en forma saprófita (50% de las personas), pero en determinadas condiciones puede invadir

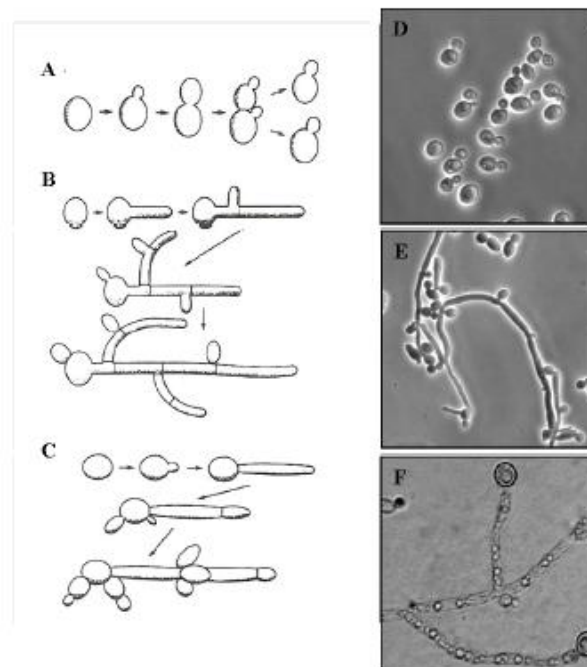
cualquier tejido del cuerpo desde su hábitat normal y manifestar carácter patógeno (Calderone, 2002; Pfaller & Diekema, 2007). El equilibrio entre *C. albicans* como saprobio y el hospedador se mantiene gracias a la participación de la microbiota normal, la integridad de la piel y mucosas y el correcto funcionamiento del sistema inmunológico tanto humoral como celular. La alteración de este equilibrio por factores endógenos y/o exógenos puede hacer de *C. albicans* un patógeno oportunista capaz de desencadenar una infección, desde una candidiasis superficial o mucocutánea si afecta a la piel o las mucosas, a una candidiasis sistémica o invasiva (CI), cuando el hongo se disemina por el torrente circulatorio invadiendo tejidos y órganos internos (Calderone & Clancy, 2012; Odds, 1988).

### 1.1.1. Morfología

Los miembros del género *Candida* (figura 1.1.) crecen en forma de levaduras o blastoconidios que son células de aspecto ovoide o globular, según la especie, con un tamaño de 3-8  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se multiplican por gemación preferentemente polar y su crecimiento se ve favorecido en condiciones de aerobiosis, temperaturas inferiores a 33°C y dentro de un rango de pH de 2,5-7,5. La mayoría de las especies tienen la capacidad de formar pseudohifas o pseudomicelios, formados por una cadena de blastosporas alargadas que permanecen unidas después de su multiplicación, y cuyas colonias son indistinguibles de las producidas por blastosporas (Odds, 1988).

*Candida albicans* y *C. dubliniensis* además, son consideradas especies polimórficas por su capacidad de formar verdaderas hifas. Las hifas son estructuras alargadas y cilíndricas separadas por septos y cuyo crecimiento se ve favorecido por temperaturas superiores a 33°C y un pH cercano a la neutralidad. La transición levadura-micelio de *C. albicans* requiere la presencia de un inductor de la filamentación como el suero animal, N-acetil glucosamina o prolina, y un estado nutritivo adecuado de las levaduras (Calderone & Clancy, 2012; Sudbery, Gow & Berman, 2004). Esta conversión ocurre a través de la emisión de un tubo germinal cuyo primer septo se forma a 1-2  $\mu\text{m}$  de la célula madre. El tubo germinal se desarrolla por crecimiento apical en una hifa que puede llegar a una maraña de filamentos denominados micelios (Garzon et al., 1989; Shepherd, 1988).

En condiciones de inanición pueden aparecer en el ápice de las hifas unas células grandes y redondeadas de 6-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, de pared gruesa y refringente, que se denominan clamidosporas o clamidoconidios, las cuales son formas de resistencia asexuales. Estas células tienen una actividad metabólica muy baja y pueden originar una nueva levadura o bien degenerar (Miller & Finnerty, 1979). Las clamidosporas se caracterizan por tener una capa externa compuesta principalmente por  $\beta$ -1,3-glucano y en menor proporción quitina, una gruesa capa interna compuesta por proteínas y una región central de la célula rica en ácido ribonucleico y glóbulos lipídicos (Barnett et al., 2000; Jansons & Nickerson, 1970; Kerridge, Odds & Vaden-Bossche, 1993; Odds, 1988).



**Figura 1.1.** Morfología celular de *C. albicans*: levadura (A), micelio (B) y pseudomicelio (C). Imágenes de microscopía de las formas de levadura (D) micelio (E) y clamidosporas terminales (F) (Calderone, 2002).

### 1.1.2. Requerimientos nutricionales

*C. albicans* puede crecer en aerobiosis en un rango de temperatura entre 20-45°C. Presenta un metabolismo quimioheterótrofo y, aunque es capaz de crecer en un medio definido con una fuente de carbono (glucosa), nitrógeno (sales de amonio, pero no

nitratos) y fosfato, requiere varios factores como la biotina, tiamina y otros componentes del grupo vitamínico B. Fermenta glucosa y maltosa, pero no lactosa ni sacarosa. Esta especie es capaz de asimilar gran variedad de carbohidratos, además de acetato y lactato, pero no utiliza lactosa, celobiosa, rafinosa, inositol, D-ribosa ni D-arabinosa (Calderone & Clancy, 2012; Odds, 1988; Sheperd, Poulter & Sullivan, 1985).

### **1.1.3. Genoma de *C. albicans***

El Standford Genome Technology Center publicó en 2004 la secuencia completa del genoma diploide de la cepa de referencia SC5314 de *C. albicans* (Jones et al., 2004). El genoma de *C. albicans* está compuesto por ocho pares de cromosomas homólogos, cuyo tamaño oscila entre 0,95 y 3,3 Mb, siendo el cromosoma 1 el más grande y el cromosoma 7 el más pequeño. El octavo cromosoma se denomina cromosoma R, contiene el ADN ribosómico (ADNr) y presenta un tamaño variable en función del número de copias de ADNr (Magee, 2007). El tamaño completo del genoma se estima en 15-16 Mb, mientras que el genoma mitocondrial comprende aproximadamente 40kb (Chu, Magee & Magee, 1993; Jones et al., 2004). Existe un grado significativo de plasticidad en el genoma de *C. albicans*. La mayoría de las cepas poseen un cariotipo estándar con dos copias de cada cromosoma, pero el tamaño de los cromosomas no es fijo y en respuesta al estrés pueden darse reordenamientos cromosómicos numéricos y estructurales para generar diversidad genética, denominados polimorfismos de longitud cromosómica (contracción/expansión de repeticiones), translocaciones recíprocas, deleciones cromosómicas y trisomías. Estas alteraciones cariotípicas conducen a cambios en el fenotipo como estrategias de adaptación (Larriba & Calderone, 2008; Magee, 2007).

### **1.1.4. Ciclo sexual**

A diferencia de la mayoría de las levaduras, *C. albicans* es un organismo diploide con fase haploide no conocida. Tradicionalmente, ha sido considerado un organismo con reproducción asexual, sin embargo, en 1996 la secuenciación de su genoma por parte de Hull y Johnson mostró que posee un locus sexual homólogo al locus *MTL* (Mating

Type Like) de *Saccharomyces cerevisiae* (Hull & Johnson, 1999). Debido a que la mayoría de los aislamientos clínicos de *C. albicans* son heterocigotos para el locus *MTL* (*MTLa/MTL $\alpha$* ), expresan los dos tipos de información  $\alpha$  y  $\alpha$ , lo que llevó a pensar que ésta era la causa por la cual no se había observado un ciclo sexual en este organismo (Hull, Raisner & Johnson, 2000). Slutsky y colaboradores (Slutsky et al., 1987) describieron que *C. albicans* lleva a cabo un cambio fenotípico o switching reversible de blanco (forma levaduriforme normal) a opaco (célula elongada), que es la forma competente para realizar el apareamiento. Este cambio fenotípico es un paso crítico en el ciclo sexual de *C. albicans*, y está controlado por mecanismos epigenéticos que implican a los reguladores transcripcionales del locus *MTL* y éstos a su vez, regulan la expresión del gen *WOR1*, que es necesario para inducir este cambio fenotípico (Soll, 2014; Zordan, Galgoczy & Johnson, 2006).

## 1.2. Pared celular

*Candida* presenta una estructura celular eucariótica, con una membrana citoplasmática que limita el citosol con los diferentes orgánulos y el núcleo, además de una pared celular. Esta última es una estructura esencial para mantener la integridad y la forma celular. La rigidez de la pared protege a la célula de agresiones físicas externas, resiste la presión de turgencia del protoplasto y evita la lisis de la célula cuando ocurren variaciones en la osmolaridad del medio. La pared celular de *Candida* presenta propiedades adhesivas y es fundamental en la virulencia y la formación de biofilms (Chaffin et al., 1998; Cutler, 1991). Esta estructura experimenta cambios continuos en respuesta a señales del ambiente y para permitir el crecimiento y la morfogénesis de la célula la pared sufre procesos de remodelación no solo cualitativos sino también cuantitativos; se trata pues de una estructura rígida, pero a la vez dinámica (Calderone, 2002).

La pared celular y sus componentes constituyen la primera línea de interacción entre *C. albicans* y el hospedador y por tanto su papel es fundamental en la colonización y la infección fúngica. Por otro lado, la supervivencia del hongo en el hospedador depende,



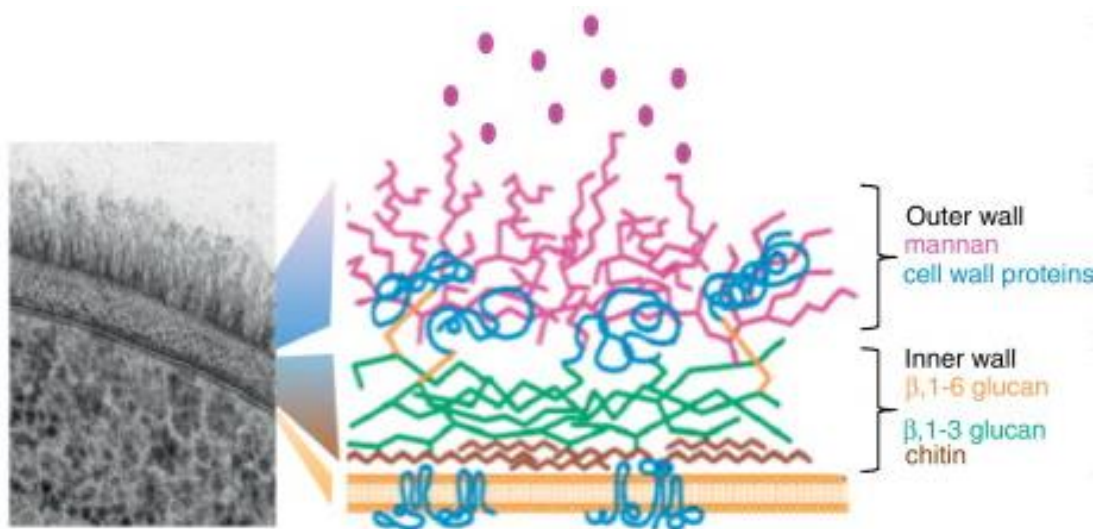
entre otros factores, de la impermeabilidad de la pared y su resistencia a enzimas y otros componentes de la respuesta inmunitaria del huésped (Barnett et al., 1990; Gow & Hube, 2012; Pontón et al., 2001).

### 1.2.1. Estructura y composición

La pared celular de *C. albicans* representa el 30% del peso seco de la célula y tiene aproximadamente 200nm de espesor. Está formada mayoritariamente por carbohidratos (80-90% del peso seco de la pared), mientras que las proteínas representan el 10% y los lípidos y sales inorgánicas son un componente minoritario (1-7%) (Gow & Hube, 2012). Su aspecto estructural es variable y depende de la morfología, de las condiciones de crecimiento e, incluso, de la cepa examinada y de las condiciones de preparación de la muestra (Martínez, et al., 1998).

La estructura básica de la pared celular está organizada en dos capas (figura 1.2.). Una capa interna de polisacáridos unidos covalentemente, que proporciona a la pared su fuerza y rigidez, y está formada principalmente por moléculas de  $\beta$ -1,3-glucano con ramificaciones de quitina y  $\beta$ -1,6-glucano. La capa más externa, enriquecida con manoproteínas unidas covalentemente a  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glucano, le proporciona su estructura fibrilar (Chaffin et al., 1998; Gow & Hube, 2012).

Las distintas interacciones entre estos tres 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 (Gozalbo et al., 2004; Ruiz-Herrera et al., 2006).



**Figura 1.2.** Esquema representativo de la estructura de la pared celular de *C. albicans* (Gow & Hube, 2012).

#### 1.2.1.1. Polisacáridos

Los mananos (MN) son polímeros ramificados de D-manopiranososa unidos por enlaces  $\alpha$ -glicosídicos y constituyen el principal componente de la matriz de la pared celular de *C. albicans* en la que se encuentran embebidos los polímeros estructurales glucano y quitina, siendo alrededor del 20-30% del peso seco de la pared celular. Los oligómeros de manosa se unen a residuos de asparagina por un enlace N-glicosídico mediante dos moléculas N-acetilglucosamina, o bien se unen a residuos de treonina o serina por un enlace O-glicosídico para formar manoproteínas (Chaffin et al., 1998).

Los glucanos son polímeros de glucosa que constituyen el 50-60% del peso seco de la pared celular de *Candida*. Dependiendo del tipo de unión de los ciclos de azúcar pueden dividirse en  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos. Se pueden distinguir tres tipos de estructuras en la pared de *C. albicans*; largas cadenas de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,3-O-glicosídicos, polímeros de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,6-O-glicosídicos, y cadenas de  $\beta$ -1,3 glucano unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 a polímeros de quitina. El  $\beta$ -glucano es, además, un importante ligando del receptor dectina-1, que se encuentra en las células que forman parte de la respuesta inmune innata (Brown et al., 2002).

La quitina es un homopolímero lineal sintetizado por la enzima quitina sintasa a partir de residuos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlaces  $\beta$ -(1,4)-O-glicosídicos, que se depositan en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. La quitina representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras, sin embargo, en la pared de las hifas de *C. albicans* puede llegar a ser tres veces mayor (Pontón, 2008).

#### **1.2.1.2. Lípidos**

Los lípidos constituyen un 2% del peso seco de la pared celular de *C. albicans*. La presencia de los diferentes lípidos en la pared (fosfolípidos, esteroides, triglicéridos y ácidos grasos libres) varía con la morfología y la edad de las células (Ghannou et al., 1986). Los lípidos están presentes formando parte del complejo fosfolipomanoano (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 glicosfingolípido altamente glicosilado, cuyo carácter hidrofílico permite su difusión a través de la pared celular (Poulain et al., 2002). Los lípidos de la pared también han sido relacionados con la adhesión a células animales, la patogenicidad y la formación de biopelículas (Ghannoum et al., 1986).

#### **1.2.1.3. Proteínas**

Las proteínas representan el 35% del peso seco de la pared celular de *C. albicans*. En los últimos años se han realizado grandes progresos en las técnicas de extracción de proteínas, métodos físicos y enzimáticos que permiten romper las células, digerir los enlaces covalentes y eliminar parcialmente los glucanos asociados a las proteínas, que han permitido estudiar el papel que estas desempeñan en la pared celular. Además, la disponibilidad de la secuencia del genoma de *C. albicans* y los avances realizados en la espectrometría de masas han aumentado considerablemente nuestro conocimiento acerca de estas proteínas (De Groot, Hellingwerf & Klis, 2003; Eisenhaber et al., 2004). Las proteínas de la pared celular de *C. albicans* pueden clasificarse de acuerdo con su tipo de unión a la pared y el método de extracción.

### **Proteínas unidas a la pared celular mediante enlace covalente**

Las proteínas que se encuentran covalentemente unidas al esqueleto de polisacáridos de la pared celular están implicadas en los mecanismos que ha desarrollado *C. albicans* para poder sobrevivir en el huésped, diseminarse e invadir los tejidos. Las funciones asociadas a estas proteínas incluyen la formación de biopelículas, la adherencia al hospedador, la invasión del epitelio, la protección frente al sistema inmune del hospedador y la adquisición de hierro. Las estrechas uniones formadas por estas proteínas, la presencia de largas cadenas laterales y los puentes disulfuro intermoleculares condicionan el grado de permeabilidad de la pared celular (Yin et al., 2007). Esta estructura evita que los polisacáridos sean degradados por glucanasas, y que el  $\beta$ -glucano sea reconocido por el receptor de  $\beta$ -glucano de mamíferos dectina-1 (Gantner, Simmons & Underhill, 2005; Gow et al., 2007).

El 88% de las proteínas unidas covalentemente a la pared celular están unidas mediante un anclaje GPI. Estas proteínas forman un complejo altamente conservado caracterizado por contener un grupo lipídico con *myo*-inositol, N-acetilglucosamina, tres moléculas de manosa y un grupo fosfoetanolamina que se une a las proteínas mediante un enlace amida (Calderone & Clancy, 2012; Chaffin et al., 1998). El otro 12% de las proteínas de pared lo componen un pequeño grupo de proteínas unidas directamente al  $\beta$ -1,3-glucano mediante enlaces covalentes sensibles al tratamiento alcalino, entre las que están las proteínas Pir. Estas proteínas son ricas en residuos de serina y se cree que están altamente glicosiladas (Castillo et al., 2003; Klis et al., 2002). Los dos alelos del gen *PIR1* de la cepa CAI4 de *C. albicans* (*IPF15363* y *IPF19968*) codifican para dos manoproteínas de la pared celular (Martínez, et al., 2004).

### **Proteínas unidas a la pared celular mediante enlaces no covalentes**

Este grupo de proteínas lo componen aquellas que están unidas a la pared celular mediante uniones débiles, las cuales pueden ser extraídas utilizando detergentes iónicos como el SDS. Pueden tener diferentes funciones enzimáticas relacionadas con la estructura de la pared, la glicólisis, la respuesta al estrés, o bien muestran funciones inmunomoduladoras.

Estas proteínas pueden dividirse en 2 subgrupos. En el primero de ellos las proteínas carecen del péptido señal característico de las proteínas de pared, y pueden ser exportadas por rutas no clásicas; en este grupo se encuentran las enzimas enolasa (Eno1), piruvato quinasa (PK), fosfoglicerato mutasa (PGAM) y metionina sintasa (Met6) (Cleves et al., 1996). En el segundo subgrupo las proteínas presentan péptido señal funcional, y llegan a la pared por la ruta de secreción, como es el caso del antígeno 1 regulado por pH (Pra1) y la  $\beta$ -1,3-glicosiltransferasa (Bgl2) (Sarthy et al., 1997).

### **Proteínas de la pared celular asociadas a la morfología**

La composición proteica de la pared celular varía en función de las condiciones ambientales, tales como la temperatura o el pH. De hecho, la presencia de unas proteínas u otras y la cantidad de las mismas en la pared está estrechamente relacionada con la morfología de *C. albicans*, siendo por tanto diferente el proteoma de la pared de la forma levaduriforme y la forma micelial. La totalidad de estos cambios ocurren en la superficie celular, tanto de las blastosporas como de los micelios, modificando su potencia antigénica y la exposición de componentes fúngicos a las células del sistema inmune del huésped van generando diferentes respuestas inmunológicas (Munro & Richard, 2012). El estudio comparativo del proteoma de la pared en las diferentes fases del hongo resulta muy interesante para la búsqueda de nuevos biomarcadores de CI, ya que los antígenos específicos de la fase micelial pueden ser la base de nuevas estrategias diagnósticas de la CI. Entre las proteínas identificadas como específicas de la pared celular de la fase micelial de *C. albicans* se encuentran algunos miembros de la familia de adhesinas ALS “agglutinin-like sequence” (Als3) y la proteína micelial Hwp1 (hyphal-wall protein 1), las cuales se describirán con más detalle en el apartado 1.3.2.

## **1.3. Características antigénicas**

En los últimos años, en el estudio de la composición y características antigénicas se han acumulado evidencias sobre la existencia de anticuerpos específicos contra *Candida* que pueden ser inmunoprotectores durante la infección, sugiriendo la viabilidad de la

inmunoterapia y/o el desarrollo de vacunas para el tratamiento de las candidiasis. Además, la caracterización de nuevos antígenos reconocidos por los sueros de pacientes infectados permitiría estudiar nuevos biomarcadores de CI aplicables tanto en la terapia antifúngica como en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas (Pitarch, Nombela, & Gil, 2010).

*Candida albicans* posee una composición antigénica muy compleja. Se han identificado un gran número de antígenos, el cual sigue en aumento gracias a que la caracterización del inmunoma de *C. albicans*, la parte del proteoma que actúa como diana del sistema inmunitario, está siendo objeto de numerosos estudios (Baer et al., 2012; Pitarch, et al., 2001; Xin, 2016) mediante el uso de la inmunoproteómica.

Estos antígenos de *C. albicans* forman parte de las distintas estructuras del hongo, y se encuentran sobre todo en tres localizaciones: el citoplasma, la pared celular y en el exterior, como antígenos liberados al medio.

### **1.3.1. Antígenos citoplasmáticos**

Las nuevas técnicas inmunoproteómicas han permitido la identificación de un gran número de antígenos citoplasmáticos de la fase levaduriforme de *C. albicans*. Estos estudios fueron promovidos por la teoría de que para su liberación era necesaria la destrucción celular del hongo por las células fagocíticas del paciente y, por tanto, la sensibilización frente a estos antígenos se produciría únicamente durante el proceso de invasión tisular. Los antígenos citoplasmáticos son proteínas *housekeeping*, es decir proteínas necesarias para las funciones básicas de la célula (tabla 1.2.).

**Tabla 1.2.** Antígenos citoplasmáticos agrupados en diferentes categorías en base a su función (Fernández-Arenas et al., 2004; Pitarch et al., 1999; Pitarch et al., 2001; Pitarch et al., 2004).

<b>a) Proteínas de choque térmico</b>
- Hsp90 y miembros de la familia de la Hsp70
Ssa1, Ssb1, Ssc1, Sse1
- Proteínas de plegamiento (Pdi1)
<b>b) Proteínas implicadas en diferentes rutas metabólicas:</b>
- Enzimas de la ruta glicolítica
Fosfofructoquinasa-1 (Pfk1)
Hexoquinasa-2 (Hxk2)
Fosfoglucoisomerasa-1 (Pgi1)
Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (Fba1)
Triosafosfato isomerasa-1 (Tpi1)
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gap1)
Fosfoglicerato quinasa-1 (Pgk1)
Fosfoglicerato mutasa-1 (Gpm1)
Enolasa (Eno1)
Piruvato quinasa (Cdc19 o Pyk1)
- Enzimas fermentativas
Piruvato descarboxilasa (Pdc11)
Alcohol deshidrogenasa (Adh1)
- Enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Aconitasa 1 (Aco1)
Malato deshidrogenasa (Mdh1)
Transcetolasa (Tkl1)
Inositol-1-fosfato sintasa (Ino1)
Acetil-CoA sintasa (Acs2)
- Ácidos grasos:
Acetil-CoA –hidrolasa (Ach1)
- Aminoácidos:
Metionina sintasa (Met6)
S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa (Sah1)
Cetoácido reductoisomerasa (Ilv5)
Serina hidroximetiltransferasa (Shm2)
Isopropil malato deshidratasa (Leu1)
- Nucleótidos:
Inosin monofosfato deshidrogenasa (Imh3)
Adenosin imidazolcarboxamida-ribonucleótido transformilasa (Ade17)
- Energía:
Ubiquinol-citocromo-c reductasa (Qcr2)
Subunidad beta F1 del complejo F1F0-ATPasa (Atp2)
Pirofosfatasa (Ipp1)

c) Factores de elongación (Eft3, Eft2 y Tif1) y proteínas ribosómicas (Bel1)
d) Porinas:
Porina-1 (Por1)
e) Enzimas redox:
Metilglioxa-reductasa (Grp2)
Coproporfirinógeno oxidasa (Hem13)
f) Proteínas de función desconocida o manoproteínas de 50, 51 y 52 kDa.

Pitarch y colaboradores (Pitarch et al., 2008) definieron un conjunto de anticuerpos frente a 15 de estas 42 proteínas (Ssa, Ssc, Fba1, Pgc1, Eno1, Pdc11, Adh1, Aco1, Mdh1, Met6, Ade1, Eft3, Bel1, Grp2, Ipf17186) que discriminaba a los pacientes con CI del grupo control de pacientes sin infección. En los pacientes con CI se observó una elevada co-expresión del patrón de anticuerpos frente a un grupo de antígenos (Ssa, Fba1, Pgc1, Eno1, Pdc11, Met6, Bel1 e Ipf17186), lo que podría resultar provechoso para el desarrollo de nuevos test diagnósticos con múltiples biomarcadores.

Hernando y colaboradores (Hernando et al., 2007) ensayaron extractos citoplasmáticos de dos morfologías de *C. albicans*, levaduriforme y micelial, llevando a cabo la misma estrategia inmunoproteómica que en los estudios de Pitarch y colaboradores. Detectaron 16 antígenos, 10 de los cuales aparecían en ambos morfotipos, de los otros 6 antígenos restantes, 4 de ellos se detectaron únicamente en blastoconidios, y 2 de ellos solo en micelios. Se identificaron 8 de estos 16 antígenos, de los cuales 5 (Eno1, Pgc1, Mdh1, y dos isoformas de Fba) ya habían sido previamente descritos (Pitarch et al., 2004), mientras que el precursor de Kexina, la chaperona I del complejo mitocondrial y un dominio catalítico del diacilglicerol kinasa fueron descritas por primera vez en este estudio como proteínas inmunogénicas de *C. albicans*.

Un importante antígeno citoplasmático es la enzima metionina sintasa (Met6). Existen dos tipos de Met6 que no comparten ninguna homología de secuencia entre ellas: la enzima metionina sintasa dependiente de cobalamina (Meth), presente en los seres humanos y otros organismos que son capaces de sintetizar cobalamina y la metionina sintasa independiente de cobalamina (MetE), que se encuentra en los hongos, las plantas superiores y algunos procariotas.



El gen *MET6* de *C. albicans* se compone de 2304 pb y codifica para la proteína metionina sintasa (Met6), formada por 767 aminoácidos y con un peso molecular de 86 kDa. Esta enzima se localiza en las capas internas de la pared celular cuando *C. albicans* se encuentra en su forma levaduriforme, pero al filamentar, también se localiza en a la superficie de la pared celular de los tubos germinales (Sáez-Rosón, Sevilla & Moragues, 2014). Met6 es una enzima esencial para el crecimiento de *Candida* y está implicada en la virulencia, en la respuesta inmunológica del huésped y en la morfogénesis. Esta enzima transfiere un grupo metilo del 5-metil-tetrahidrofolato a la homocisteína para formar metionina, por lo que es esencial que se exprese, aunque sea en un nivel mínimo para limitar la toxicidad de la homocisteína (Suliman, Appling & Robertus, 2007). La proteína Met6 sirve además como antígeno útil para el diagnóstico de la candidiasis invasiva, permitiendo la diferenciación con la colonización (Pitarch et al., 2006).

La enzima enolasa (2-fosfato-D-gliceratohidrolasa) es también uno de los antígenos más destacados de *C. albicans*. Esta proteína de 440 aminoácidos es una enzima de las rutas de la glucólisis y gluconeogénesis altamente conservada, codificada por un solo gen (*ENO1*), que cataliza la reacción reversible de 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato. Además de su función glicolítica también puede actuar como un alérgeno (Jackson et al., 2009) y como receptor del plasminógeno humano, generando la enzima proteolítica plasmina, lo que podría aumentar la cualidad invasiva tisular y necrótica de *C. albicans* (Crowe et al., 2003; Jong et al., 2003). Eno1 es una enzima citoplasmática abundante y también se ha descrito su presencia en la pared celular, así como en el sobrenadante de cultivos líquidos (Sundstrom & Aliaga, 1994) y en el torrente sanguíneo de pacientes con CI (Walsh et al., 1991).

Diversos grupos han detectado anticuerpos específicamente dirigidos contra la enolasa en pacientes con candidiasis sistémica (Mitsutake et al., 1994; Strockbine et al., 1984; Sudbery et al., 2004; van Deventer, et al., 1994), abriendo la posibilidad a su empleo en el serodiagnóstico y evidenciando su capacidad inmunogénica frente a la candidiasis invasora. Por otra parte, diversos autores han descrito el posible papel inmunoprotector

de los anticuerpos anti-enolasa frente al desarrollo de candidiasis sistémica (Fernández-Arenas et al., 2004; Laín et al., 2007; Montagnoli et al., 2004; van Deventer et al., 1996).

### 1.3.2. Antígenos de la pared celular

Los antígenos de la pared celular de *C. albicans* pueden ser de naturaleza glucídica o proteica. El manano y el  $\beta$ -glucano son los polisacáridos descritos que poseen características antigénicas, de hecho, ambos son parte de investigaciones en el campo del diagnóstico y la inmunoprotección de la CI. En cuanto a los antígenos de naturaleza proteica, Pitarch y colaboradores mostraron mediante un ensayo inmunoproteómico propiedades antigénicas para las proteínas de pared Bgl2, Eno1, Tpi1, Pkg1, Met6, Gap1 y Fba1 (Pitarch et al., 2006). En otro estudio proteómico de extractos de pared celular de blastosporas y tubos germinales de *C. albicans*, Sáez-Rosón y colaboradores identificaron 7 proteínas [Met6, Ino1, Eno-1, Adh1, Pkg1, proteína 14-3-3 (Bmh1) y la subunidad alfa del complejo asociado al polipeptido naciente (Egd2)] que eran reconocidas por los anticuerpos anti-micelio (CAGTA) desarrollados en un modelo de candidiasis invasora en conejo (Sáez-Rosón, Sevilla & Moragues, 2014), sugiriendo que estos antígenos o sus anticuerpos específicos pueden ser útiles para el desarrollo de una futura vacuna o inmunoterapia (Moragues et al., 2014).

La pared celular y el secretoma de *C. albicans* son compartimentos subcelulares de especial interés en la búsqueda de nuevos biomarcadores de CI para ser utilizados tanto en el diagnóstico como en la inmunoterapia y/o vacunación. Este subproteoma de *C. albicans* es de gran interés ya que es el responsable de las interacciones iniciales entre el ser humano y el hongo. Los antígenos asociados a la pared pueden no solo alterar el ambiente del huésped, sino que también están involucrados en diferentes aspectos de la patogenicidad de *C. albicans*, tales como la virulencia, la adhesión, la hidrofilia, el reconocimiento por el sistema inmune del huésped, y la modulación de esta respuesta inmune, entre otros (Chaffin et al., 1998; Chaffin, 2008; Pitarch et al., 2006). En este trabajo destacaremos los antígenos Als3 y Hwp1.

Als3 forma parte de la familia de adhesinas “ALS”, codificada por ocho genes (ALS1-ALS9) que forman glicoproteínas de la superficie celular de *C. albicans*. Estas glicoproteínas están implicadas en la adhesión a superficies (Sundstrom, 2002) interaccionando con distintos ligandos del hospedador como laminina, fibronectina y colágeno, probablemente al reconocer determinados grupos de aminoácidos (treonina, serina o alanina). El extremo N-terminal de Als3 contiene un péptido señal, seguido de un dominio de 300 aminoácidos parecido al de las inmunoglobulinas, y un dominio rico en treoninas con estructura de láminas- $\beta$  con 401 aminoácidos. El dominio central está formado por una serie de repeticiones en tándem de 36 aminoácidos, ricas en serinas y treoninas, que varían en función de la cepa (Sheppard et al., 2004). El extremo carboxilo terminal, también rico en serinas y treoninas, está altamente glicosilado y contiene un sitio de anclaje a GPI, el cual se elimina cuando la proteína se une a la pared celular del hongo (Kapteyn et al., 2000).

La proteína Als3 está envuelta en múltiples procesos que son necesarios en la colonización por *C. albicans* y para el desarrollo de la CI, como la adhesión a las células del huésped (Beucher et al., 2009; Brena et al., 2007; Coleman et al., 2009; Laforce-Nesbitt et al., 2008; Sheppard et al., 2004; Zhao et al., 2004), la formación de biopelículas (Nobile et al., 2006; Zhao et al., 2006), la invasión (Phan et al., 2007; Zhao et al., 2004) y la adquisición de hierro (Almeida et al., 2008). Esta proteína se encuentra altamente expresada en la superficie celular de *C. albicans*, y es un buen candidato tanto para el diagnóstico como para la inmunoprotección frente a la CI.

La proteína micelial Hwp1 es una proteína relacionada estructuralmente con los miembros de la familia ALS que ha sido identificada como sustrato de la transglutaminasa epitelial, lo que favorece la adhesión del hongo a la superficie epitelial del huésped 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).

Hwp1 es una glicoproteína de 61,1kDa (634 aminoácidos), con un punto isoeléctrico de 3,37, codificada por un solo gen (*HWP1*) y que se expresa únicamente en la superficie de la pared celular de los tubos germinales de *C. albicans*. El tratamiento con  $\beta$ -(1,3)-glucanasa libera por lo menos el 75% del contenido en Hwp1 de la pared lo que indica que la mayor parte de esta adhesina está unida covalentemente a la pared celular (Sundstrom, 2002). La secuencia de aminoácidos de Hwp1 es rica en prolina, glutamina, serina y treonina, lo que predice la posibilidad de modificaciones post-traduccionales de O-glicosilación. El extremo carboxilo terminal de Hwp1 está integrado en la pared celular y presenta una cadena de unos 15-50 aminoácidos conservados en secuencias que especifican modificaciones GPI (Staab, Ferrer & Sundstrom, 1996; Staab et al., 1999; Staab et al., 2004).

### 1.3.3. Antígenos secretados al medio

*C. albicans* es capaz de secretar al medio una serie de componentes, algunos de los cuales provocan una respuesta inmune en el huésped. Entre los antígenos secretados destacan las enzimas hidrolíticas, en particular, las proteinasas aspárticas (Sap) y las fosfolipasas, en especial la fosfolipasa B.

Las proteinasas aspárticas Sap (Secreted Aspartic Proteinases) ayudan en la adhesión al tejido del hospedador, provocan daño celular y están relacionadas con la respuesta inmune del huésped (Pichová et al., 2001). Estas enzimas constituyen una familia codificada por un grupo de al menos 10 genes (SAP1-SAP10) (Odds, 1988). Ocho de estas proteinasas son secretadas al espacio extracelular (Sap1-8), mientras que Sap9 y Sap10 permanecen ancladas en la superficie celular mediante un motivo GPI (Albrecht et al., 2006; Naglik, Challacombe & Hube, 2003; Taylor et al., 2005). El rango de pH óptimo para la actuación de estas enzimas es 2-7, por lo que pueden contribuir a la patogénesis fúngica y al desarrollo de la infección en diferentes tejidos del ser humano (Naglik, et al., 2003). También se sabe que Sap1-3 son necesarias para generar daño a nivel del tejido epitelial in vitro, así como para la virulencia en un modelo murino de CI (Correia et al., 2010). Se han estudiado los anticuerpos anti-Sap como posibles candidatos a vacunas. Pevion Biotech AG (Ittigen, Suiza) comercializa la vacuna intramuscular e intravaginal

PEV7, basada en una proteína Sap2 recombinante incorporada en vehiculada en la superficie de los virosomas del virus influenza (Edwards Jr, 2012). En esta nueva vacuna PEV7, confirió protección a las ratas infectadas con *C. albicans*, como lo demuestra la eliminación acelerada del hongo de la vagina y la resolución de la infección al menos una semana antes que los controles (administración de virosomas vacíos). La vacuna virosómica r-Sap2 generó una protección persistente contra *C. albicans* después de la inmunización intravaginal en ratas. Este estado de protección duradero se asoció con la persistencia de anticuerpos anti-Sap2 en la vagina de los animales. Posteriormente, Pevion realizó un estudio clínico en fase I para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de PEV7 en 48 voluntarias sanas. Los resultados mostraron una generación de células B con memoria específica y funcional en el 100% de las mujeres vacunadas (De Bernardis et al., 2018).

Las fosfolipasas actúan durante la invasión tisular hidrolizando algunos enlaces éster de los glicerofosfolípidos contribuyendo al daño celular y a la adhesión de las blastosporas en el tejido del huésped (Gonçalves et al., 2016). La familia de las fosfolipasas está compuesta por cuatro clases diferentes (PLA, PLB, PLC, y PLD) (Niewerth & Kortling, 2001). Hasta la fecha únicamente cinco componentes fosfolipasa B (PLB1-5) juegan un papel en la virulencia de *C. albicans*, presentando una actividad hidrolasa y lisofosfolipasa-transacilasa, de tal forma que puede liberar ácidos grasos de fosfolípidos y lisofosfolípidos (Theiss et al., 2006).

## 1.4. Factores de virulencia

El factor más importante que determina la capacidad invasiva de *Candida* spp. es el estado fisiológico del hospedador. Sin embargo, el espectro de afecciones causadas por *C. albicans*, y otras especies del género, sobrepasan la capacidad de la mayoría de los otros microorganismos comensales, lo que es atribuible a un amplio repertorio de factores intrínsecos cuya misión es facilitar y promover la infección de los tejidos del hospedador. Al conjunto de esos factores se les denomina factores de virulencia. Estos elementos sirven al hongo para poder reconocer y establecer un contacto con el

organismo hospedador y junto con la capacidad de secretar enzimas se incrementa su grado de virulencia (Calderone & Fonzi, 2001).

Para el desarrollo de un proceso infeccioso, en primer lugar, es necesario el reconocimiento y posterior unión del parásito a las células del hospedador, además de la producción, por parte de *C. albicans*, de una serie de enzimas degradativas que favorecen la infección. Por otro lado, la invasión de los tejidos se facilita por la transición levadura-micelio (morfogénesis). Finalmente, la variabilidad fenotípica contribuye en gran medida a la plasticidad del microorganismo y a la posibilidad de evadir los mecanismos de defensa del hospedador.

Entre los factores de virulencia destacan la morfogénesis levadura-micelio, la adhesión a los tejidos del hospedador, la secreción de hidrolasas extracelulares, la variabilidad fenotípica o *switching*, la hidrofilia y la asimilación de hierro.

#### **1.4.1. Adhesión**

La primera etapa de la colonización se basa en la adhesión de los microorganismos a la superficie de las células hospedadoras, y es un factor crucial para que la infección se desarrolle con éxito. *Candida* es capaz de adherirse a células epiteliales (Rotrosen, Calderone & Edwards, 1986), endoteliales (Glee et al., 1996; Gustafson et al., 1991), del sistema inmune, queratinocitos (Ollert, Wadsworth & Calderone, 1990) y a diversos materiales de la matriz extracelular (Makihira et al., 2002) así como a superficies plásticas de materiales médicos (Rotrosen et al., 1986; San Millán et al., 1996), en las que forman biopelículas o *biofilms*.

Las principales moléculas encargadas de la adhesión a los tejidos del huésped son las proteínas denominadas adhesinas. Las adhesinas reconocen distintos componentes de la matriz (laminina, fibronectina, colágeno, vitronectina y entactina) y también pueden promover uniones a superficies abióticas mediante interacciones hidrofóbicas (Chaffin, 2008). Se han identificado varios genes de *C. albicans* que codifican estas adhesinas,

entre los que se encuentran la familia génica *ALS*, y los genes *HWP1*, *INT1* (integrin-like), *MNT1* ( $\alpha$ -1,2-manosil transferasa) y *EAP1* (adherencia aumentada a poliestireno).

Existen también otros componentes de la pared celular del hongo que, a pesar de no ser adhesinas, de alguna forma ayudan y/o participan en el proceso de adhesión del hongo. Es el caso de las fimbrias, mediante las cuales la levadura se une a los glicofosfolípidos que se presentan en la superficie de las células epiteliales orales (Vitkov et al., 2002). Los polisacáridos (Fukazawa & Kagaya, 1997) y lípidos (Chaffin, 2008) también pueden participar en este proceso.

#### **1.4.2. Dimorfismo**

El dimorfismo es uno de los factores de virulencia más estudiados en *C. albicans*. Se trata de la transición morfológica levadura-micelio, la cual 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 & Magee, 2001). Tradicionalmente esta transición morfológica se ha considerado 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), concluyendo que la forma micelial estaría mejor adaptada que las levaduras para la adhesión y penetración de las capas epiteliales (Calderone, 1993; Gow, 1994; Kretschmar et al., 1999). 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 (Baillie & Douglas, 1999; Lo et al., 1997; Ramage et al., 2002; Romani, Bistoni & Puccetti, 2003). También se ha observado que las levaduras y el micelio pueden inducir una diferente respuesta inmunitaria, tal como se detalla en el punto 1.6. de este apartado de Introducción. La transición levadura-micelio tiene lugar bajo ciertas condiciones ambientales, entre las que se encuentran, la temperatura fisiológica de 37°C, un pH igual o mayor que 7, una concentración de CO<sub>2</sub> de 5,5% y la presencia de suero o fuentes de carbono, condiciones similares a las que se encuentra el hongo al infectar un huésped. Sin embargo, la producción de levaduras es estimulada

a temperaturas más bajas y pH más ácidos, en ausencia de suero y con altas concentraciones de glucosa (Mayer, Wilson & Hube, 2013). Estos cambios le confieren particularidades propias a la forma micelial que afectan a la adhesión, la hidrofilia, la expresión de antígenos que están relacionados con una mayor virulencia (Gozalbo et al., 2004; Kirsch, Kelly & Kurtz, 1990a; Ruiz-Herrera et al., 2006).

La base genética de dichos cambios morfológicos está siendo muy estudiada. Se han descrito una variedad de genes que se expresan únicamente durante la fase micelial, entre los que se encuentran *SAP4*, *SAP5* y *SAP6*, que codifican para las respectivas proteínas aspárticas, *HWP1*, y las adhesinas *ALS3* y *ALS8* (Mayer et al., 2013). También 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 que 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 & Johnson, 2000; Ernst, 2000; Liu, 2001; Whiteway & Bachewich, 2007). La proteína Efg1p tiene una función central en el control de la morfogénesis y además, la vía de transducción que implica a Efg1p está conectada con el metabolismo de cAMP; de este modo, 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 las vías de señalización de MAPK ("Mitogen-Activated Protein Kinase") y una vía que detecta los cambios de pH externo (Whiteway & Bachewich, 2007).

La formación de clamidosporas también se considera un proceso dimórfico. En ciertas condiciones de ausencia de oxígeno y escasez de nutrientes, la parte distal de algunas hifas se rodean de una pared gruesa y se segregan del micelio parental en forma de clamidospora. Este cambio morfogénico también está asociado con la expresión génica. En el repositorio de secuencias de *Candida* conocido como *CGD* (*Candida Genome Database*), se han reconocido hasta el momento 19 genes de *C. albicans* y 14 genes de *C. glabrata* implicados en el proceso de formación de clamidosporas. Entre



ellos, algunos de los genes más relevantes son: *EFG1*, *NRG1*, *HOG1*, *OLE1*, *SUV3*, *SCH9*, *ISW2* y *RIM13* (Staib & Morschhauser, 2007).

**Tabla 1.1.** Funciones dependientes de la morfología de *C. albicans* durante la infección.

<b>Morfología</b>		
<b>Actividad fúngica</b>	<b>Levaduriforme</b>	<b>Hifa</b>
<b>Expresión de genes asociados a hifas</b>	Bajo ciertas condiciones	Por definición
<b>Adhesión</b>	Moderada	Fuerte
<b>Invasión inducida por endocitosis por penetración activa</b>	Baja Ninguna	Moderada Alta
<b>Daños</b>	Ninguno	Alto
<b>Diseminación</b>	Por sangre	A través de barreras epiteliales; interepiteliales
<b>Adquisición de hierro vía ferritina</b>	No descrito	Vía Als3
<b>Escape de los fagocitos</b>	No descrito	Si

Adaptada de Jacobsen y col (Jacobsen et al., 2012).

### 1.4.3. Cambio fenotípico o *switching*

Algunas cepas de *C. albicans* presentan una gran variabilidad adaptativa para sobrevivir a las difíciles condiciones ambientales que en el desarrollo de una infección y le permite evadir los sistemas de defensa del hospedador. Se trata de la habilidad de cambiar de forma espontánea, reversible y con alta frecuencia entre diferentes fenotipos, afectando a diferentes parámetros morfológicos y fisiológicos, tales como la potencia antigénica, la morfología, el tamaño celular, la adhesión, la secreción de proteasa ácida, la sensibilidad a los fármacos, etc. La frecuencia de cambio entre una forma colonial y otra puede aumentar por radiación y temperatura (Calderone, 2002; Soll, Morrow & Srikantha, 1993). Una misma cepa de *C. albicans* puede llegar a presentar más de ocho morfologías coloniales diferentes, interconvertibles entre sí a lo largo del tiempo. Como consecuencia de estas transiciones se altera la expresión de muchos genes, tales como reguladores transcripcionales (TUPI, EFG1, etc.). La hipótesis 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*, por lo que estos genes estarían localizados en posiciones cromosómicas que pueden presentar dos estados alternativos: silencioso y activo. La transición entre ambos estados parece depender de los genes *sir* (“silent information regulators”) necesarios para establecer el estado silencioso (Loo & Rine, 1994; Ramsey, Morrow & Soll, 1994). El cambio fenotípico más estudiado en *C. albicans* es la transición blanco-opaco (WO-1). Las células opacas (O) son más grandes, alargadas y tienen una superficie rugosa, mientras que las células blancas (W) son levaduras ovoides normales, y ambos tipos difieren en muchas propiedades bioquímicas. Las células O tienen una mayor eficiencia de apareamiento que las W, lo que sugiere que el fenotipo O es una forma competente de *C. albicans* para el apareamiento (Lockhart et al., 2003). 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).

#### 1.4.4. Enzimas hidrolíticas

*C. albicans* secreta enzimas hidrolíticas al exterior de la célula fúngica que favorecen la invasión tisular digiriendo las membranas celulares del huésped, degradan moléculas en la superficie mucosa para desenmascarar receptores y promover la adhesión, o digieren moléculas del sistema inmune del huésped (Calderone, 2002). La acción de estas enzimas afecta a la función y viabilidad de *Candida* en el hospedador, por lo que son consideradas factores de virulencia que contribuyen al establecimiento de la infección (Calderone, 2002; Chaffin et al., 1998).

Las tres familias de enzimas hidrolíticas más relacionadas con la virulencia de *C. albicans* son: las proteínas aspárticas, las fosfolipasas, como ya se ha explicado en el apartado 1.3.3. de la Introducción, y las lipasas.

Las lipasas extracelulares (lipasas y estererasas) actúan catalizando la hidrólisis de los enlaces éster de los mono-, di- y triacilgliceroles. Las lipasas hidrolizan enlaces éster en la interfase entre la fase insoluble de triacilglicerol y la fase acuosa en la que está disuelta

la enzima, sin embargo, las esterasas son las encargadas de actuar sobre sustratos solubles (Schaller et al., 2005). Las lipasas de *C. albicans* están codificadas por una familia de al menos 10 genes (*LIP1-LIP10*) (Fu et al., 1997; Hube et al., 2000), que codifican para proteínas con un alto grado de homología en sus secuencias de aminoácidos (alrededor de un 80%).

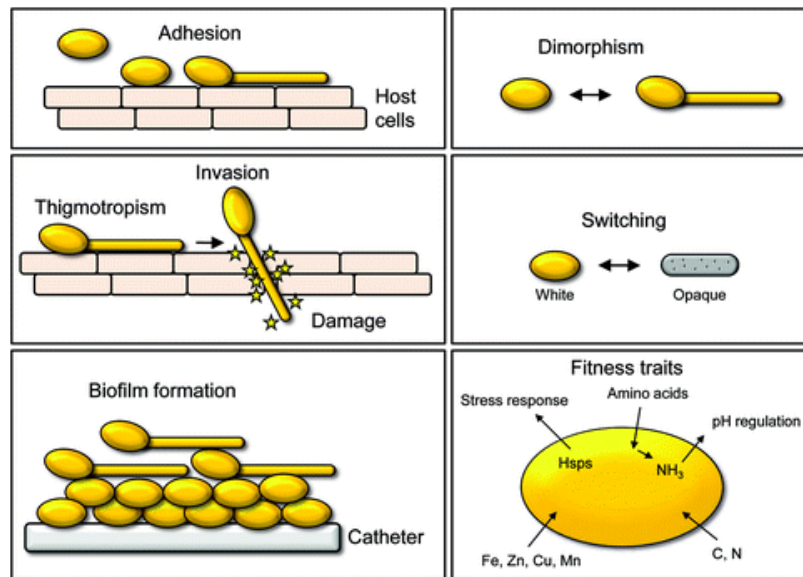
#### **1.4.5. Hidrofilia**

La hidrofilia 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 como el aumento de la adherencia a las superficies endoteliales y epiteliales, a las proteínas de la matriz extracelular y al plástico, la evasión de la acción de las células fagocíticas y la captación de algunas sustancias del medio, por lo que un mayor carácter hidrofóbico proporciona a *C. albicans* protección frente a los mecanismos de defensa del huésped. Este carácter hidrofóbico 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 (Gozalbo et al., 2004; Lockhart et al., 2002; Masuoka & Hazen, 1999; Singleton, Masuoka & Hazen, 2001; Soll, 2004). Recientemente, Singleton y cols. (Singleton et al., 2005) han identificado el primer gen, *CSH1*, implicado en la determinación del fenotipo de hidrofobia superficial de *C. albicans*, demostrando que la proteína Csh1p contribuye a la virulencia en modelos de diseminación hematogena.

#### **1.4.6. Quorum sensing y tigmotropismo**

El *quorum sensing* se refiere a la comunicación o señalización entre células llevada a cabo por los microorganismos, los cuales producen moléculas de señalización extracelulares para comunicarse o interactuar con otros microorganismos y con el ambiente químico-físico. *C. albicans* en contacto con una determinada superficie, puede inducir un cambio morfológico levadura-micelio o bien la formación de biopelículas o *biofilms* (Kumamoto, 2008).

Por otro lado, el tigmotropismo es el crecimiento de un organismo como respuesta a la topografía. En el caso de *C. albicans*, este crecimiento de las hifas está dirigido por los surcos, irregularidades y poros del sustrato, lo que podría facilitar la invasión del epitelio a través de invaginaciones, heridas o puntos de debilidad en la integridad de la superficie (Gow, 1994; Mayer et al., 2013).



**Figura 1.3.** Resumen gráfico de algunos de los factores de virulencia de *C. albicans* (Mayer et al., 2013).

#### 1.4.7. Adquisición de hierro

El hierro es un factor limitante en el crecimiento del hongo, influyendo en el proceso de la infección por *C. albicans*. Un aumento de la concentración de hierro en la sangre, aumenta la susceptibilidad del hospedador a las infecciones generadas por *Candida* (Almeida, Wilson & Hube, 2009). Para evitar la toxicidad del hierro libre en la sangre y evitar que los patógenos tengan acceso a dicho metal, los mamíferos utilizan la transferrina para transportar el hierro en la sangre. La privación de hierro altera la composición de la superficie celular e inhibe la formación del tubo germinal (Lan et al., 2004). *C. albicans* es capaz de adquirir hierro de tres maneras; a partir de la ferritina y transferrina del huésped o del ambiente mediante un sistema reductor, a partir de los sideróforos de otros microorganismos, y a partir de la hemoglobina y hemina del

huésped (Almeida et al., 2009). Además, la proteína Als3 ayuda en la adquisición de hierro como nutriente para mantener y fortalecer la patogenicidad de *C. albicans* (Sui, Yan & Jiang, 2017).

#### **1.4.8. Sinergismo con bacterias**

*C. albicans* es el único hongo que se encuentra como comensal formando parte de la microbiota normal en las mucosas humanas, por lo que tiene que competir con bacterias anaerobias y estreptococos, que pueden evitar la colonización y crecimiento excesivo de *Candida*, por la adhesión a dichas superficies (Kennedy & Volz, 1985). Sin embargo, *C. albicans* también es capaz de mantener relaciones sinérgicas con bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y enterococos, como ocurre en el caso de las biopelículas o *biofilms* (Fourie et al., 2016).

#### **1.4.9. Biopelículas o *biofilms***

La capacidad de este hongo de crecer formando biopelículas es un factor de virulencia fundamental, ya que 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 (López-Ribot, 2005).

La formación del *biofilm* es un proceso que sucede a través de varias fases de desarrollo: una fase inicial que incluyen un anclaje y colonización, mediados por factores inespecíficos (hidrofilia de la superficie celular fúngica y fuerzas electrostáticas) y por adhesinas específicas de la superficie fúngica, una fase intermedia en la que se forma una matriz estructurada por formas dimórficas de levaduras e hifas y finalmente, una fase de maduración de la biopelícula. Finalmente, 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 (López-Ribot, 2005; Ramage et al., 2005).

#### 1.4.10. Mimetismo molecular

El mimetismo molecular es la capacidad de un organismo para expresar en su superficie moléculas similares a las del hospedador y, de esta forma, pasar inadvertido ante los mecanismos responsables de su eliminación.

Se ha observado que las blastosporas de *C. albicans* expresan una proteína relacionada antigénica y estructuralmente con CD11b/CD18, un miembro de la integrina  $\beta 2$ , que es una adhesina de los neutrófilos de mamíferos. Esta proteína y su análogo en *C. albicans* poseen la misma afinidad por el ligando C3iC3b, permitiendo al hongo ser confundido con los neutrófilos y eludiendo así la fagocitosis (Gustafson et al., 1991).

#### 1.4.11. Respuesta al estrés

*C. albicans* es capaz de enfrentarse a diferentes tipos de estrés, entre los que se incluyen el térmico, el osmótico, el oxidativo y el nitrosativo (Calderone & Clancy, 2012). Esta respuesta al estrés facilita su adaptación a las diferentes condiciones ambientales y protege al propio hongo frente a los sistemas de defensa del huésped, contribuyendo a su supervivencia y virulencia. *C. albicans* tiene la capacidad vivir en distintas localizaciones del hospedador con un amplio rango de pH, desde el medio ácido del estómago hasta el alcalino de la vagina. Para que esta adaptación sea posible las proteínas de la pared celular Phr1 se expresan en medio alcalino y las Phr2 en medio ácido, participando en procesos patológicos sistémicos y vaginales, respectivamente (Fonzi, 1999; Mayer et al., 2013). Por otra parte, la levadura tiene una gran flexibilidad metabólica permitiéndole la asimilación de nutrientes, principalmente glucosa, así como lípidos y proteínas, en cualquier lugar anatómico del organismo (Mayer et al., 2013).

La respuesta al estrés térmico está mediada por proteínas Hsp, proteínas de choque térmico, que actúan como chaperonas para prevenir la agregación de proteínas y plegamientos no deseados de las mismas (Calderone & Clancy, 2012).

El estrés osmótico deriva en una acumulación intracelular de glicerol para contrarrestar la pérdida de agua. La biosíntesis del glicerol está mediada por la glicerol-3-fosfatasa (Gpp1) y por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gpd1) (Waechtler et al., 2011).

Al estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno, como el peróxido, aniones superóxido y radicales hidroxilos, *C. albicans* responde mediante la catalasa (Cta1) y las superóxido dismutasas Sod1 y Sod5 (Hwang et al., 2002; Martchenko et al., 2004; Wysong et al., 1998).

Las especies reactivas de nitrógeno producidas por los neutrófilos inducen un estrés en las células fagocitadas de *C. albicans*. Activando la respuesta nitrosativa de Yhb1, una proteína relacionada con la flavohemoglobina (Hromatka, Noble & Johnson, 2005).

## **1.5. Candidiasis**

Las infecciones producidas por las levaduras del género *Candida* reciben el nombre de candidiasis. La candidiasis es la cuarta causa de infección nosocomial (aprox. 8%) en hospitales españoles y la enfermedad fúngica más común entre los pacientes hospitalizados (Pemán & Salavert, 2013). *Candida* puede infectar cualquier localización del cuerpo humano, desde zonas más superficiales como ocurre en la vulvovaginitis, estomatitis o candidiasis mucocutánea hasta zonas más profundas, denominándose en este caso, candidiasis invasora (CI).

### **1.5.1. Candidiasis superficiales o mucocutáneas**

Las candidiasis superficiales incluyen las candidiasis cutáneas, las orofaríngeas (muguet, queilitis angular y lengua negra) y las candidiasis genitourinarias y anales (vulvovaginitis, balanopostitis y manifestaciones perianales). Aunque son menos graves que las candidiasis profundas, son las más frecuentes, y en ocasiones pueden llegar a ser crónicas.

Las candidiasis cutáneas engloban el intertrigo de grandes pliegues (axilas, ingles, surco interglúteo, pliegues submamaros y pliegues suprapúbicos en personas obesas) y la erosión interdigital en dedos de los pies y manos (Rubio et al., 2001).

La candidiasis de la mucosa oral es la presentación clínica de mayor prevalencia. Una serie de factores predisponentes como el uso de prótesis dentales, xerostomía, terapias con múltiples antibióticos e inmunosupresores, hace que las especies del género *Candida* puedan comportarse como patógenos capaces de causar infecciones orales en pacientes infectados por el VIH, siendo las principales manifestaciones: la candidiasis eritematosa (Arendorf et al., 1998; Sharma et al., 2009), la candidiasis pseudomembranosa (Sharma et al., 2009; Taiwo et al., 2006) y la queilitis angular (Arendorf et al., 1998; Taiwo et al., 2006).

La candidiasis genital tiene una incidencia 10 veces mayor en la mujer que en los hombres. La candidiasis vulvovaginal (CVV) se presenta mayoritariamente en mujeres con diabetes, gestantes o que reciben un tratamiento con antibióticos. Se estima que al menos un 75% de las mujeres han sufrido un episodio de CVV en su vida (Hurley & De Louvois, 1979; Sobel et al., 1998; Uppuluri, Khan & Edwards, 2017) y que de estas entre el 40-50% sufre una segunda infección (Hurley & De Louvois, 1979). *C. albicans* es la especie mayoritariamente aislada (90%).

### **1.5.2. Candidiasis profundas**

La forma más habitual de que se produzca una CI es cuando *Candida* alcanza el torrente circulatorio y adquiere la capacidad de invadir tejidos y órganos profundos. El hongo puede penetrar directamente en el caso de que el paciente haya sufrido un traumatismo, debido por ejemplo a una intervención quirúrgica o por la inserción de catéteres. La principal fuente de infección por *Candida* es endógena, previa colonización de la piel o mucosas. Sin embargo, también puede haber un componente exógeno, siendo el propio personal sanitario el transmisor del hongo, otros pacientes o incluso material sanitario que esté contaminado. Los pacientes con deficiencias inmunológicas (oncohematología, tumores sólidos, VIH) tienen un alto riesgo de sufrir una CI.



Desafortunadamente, las manifestaciones clínicas de la CI son a menudo inespecíficas y su sintomatología puede llegar a confundirse con infecciones bacterianas. La mortalidad entre los pacientes con CI alcanza un 40%, y en neonatos y niños hasta un 15%, incluso cuando los pacientes ya han recibido terapia antifúngica (Pfaller et al., 2010). *Candida albicans* continúa siendo el agente etiológico más frecuente de las candidiasis invasivas y alrededor del 50% de todos los aislamientos de hemocultivos corresponden a esta especie. Sin embargo, la incidencia creciente de las especies *no-albicans* del género *Candida* es preocupante, al igual que su resistencia a los fármacos antifúngicos (Quindós, 2014).

## 1.6. Respuesta inmunológica frente a *C. albicans*

Los factores de virulencia no son los únicos determinantes que posee *C. albicans* para provocar infección en el hospedador. De hecho, la patogenicidad de *C. albicans* depende del equilibrio entre los factores de virulencia expresados por el hongo y el estado inmunológico del hospedador. Así, antes de que se produzca una infección se establecen una serie de complejas relaciones entre el sistema inmunitario del hospedador y la patogenicidad de *C. albicans*, que determinarán su desarrollo. 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).

La primera línea de defensa del hospedador frente a la invasión microbiana está constituida por barreras físicas, bioquímicas y microbiológicas. Los epitelios, la barrera física entre el medio interno y los agentes patógenos del exterior, abarcan la piel y los revestimientos de las estructuras tubulares del cuerpo, como el tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario.

La superficie de la piel está expuesta a la luz ultravioleta, no presenta un alto grado de humedad y tiene su propia microbiota con la que el hongo debe competir, por lo que no es un lugar que favorezca su desarrollo. La mayoría de los microorganismos no son capaces de sobrevivir durante mucho tiempo sobre la piel, ya que el ácido láctico, los ácidos grasos del sudor, las secreciones sebáceas y el bajo pH que estos crean, tienen efectos inhibitorios directos sobre ellos (Calderone, 2002; Roitet et al., 2008). Las mucosas epiteliales, por su parte, secretan un fluido viscoso (mucus) que envuelve a los microorganismos e impide que puedan adherirse al epitelio del hospedador (Janeway et al., 2003). La piel, y el tracto respiratorio, también produce péptidos antimicrobianos conocidos como  $\beta$ -defensinas, capaces de suprimir el crecimiento de bacterias y hongos (Janeway et al., 2003; Schneider et al., 2005). *C. albicans* es capaz de inducir la expresión de  $\beta$ -defensinas con efecto fungicida específico, tanto en epitelios humanos (Meyer et al., 2004) como en tejidos de ratón (Schofield, Westwater & Balish, 2004; Vylkova et al., 2007). Además, la mayoría de las superficies epiteliales están asociadas a una microbiota normal no patógena con los que *C. albicans* debe competir por los nutrientes y los sitios de unión (Janeway et al., 2003). La colonización por *C. albicans*, y por otros hongos, resulta reforzada 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; Pemán, Cantón, Gobernado & Spanish ECMM Working Grp Candidaem, 2005; Tortorano et al., 2004).

### 1.6.1. Inmunidad innata

El sistema inmunitario innato usa varios tipos de receptores celulares que reconocen los PAMP (patrones moleculares asociados a moléculas) y DAMP (patrones moleculares asociados al daño) de *C. albicans*. Estas moléculas de reconocimiento celulares del sistema inmunitario innato las expresan los fagocitos (macrófagos primarios y neutrófilos), las células dendríticas DC, los linfocitos citolíticos naturales (NK), los mastocitos y muchos otros tipos de células que ocupan los tejidos y los órganos. En la respuesta innata también se activan muchas proteínas en la sangre, como el sistema del complemento, y en los líquidos extracelulares que reconocen PAMP como opsoninas, defensinas y citoquinas (Netea et al., 2008).

### 1.6.1.1. Activación del complemento

El sistema del complemento está formado por un gran número de proteínas plasmáticas que interactúan entre sí en cascadas catalíticas. Estudios *in vivo* han demostrado que el complemento es un componente importante en la resistencia frente a la infección producida por hongos mediante la opsonización de los microorganismos, quimiotaxis de fagocitos, inflamación y citólisis directa del patógeno (Kozel, 1998; Roitt et al., 2008). El componente principal y más abundante del sistema del complemento es C3 y su ruptura proteolítica 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, la vía clásica, la vía alternativa y vía de las lectinas MBL (“Mannan-Binding Lectin”). Estudios de inmunofluorescencia con *C. albicans* han permitido demostrar la activación *in vivo* de la vía clásica del complemento por anticuerpos anti-manano, lo que conlleva a la deposición de los fragmentos de degradación de C3, C3b y iC3b, en la superficie celular fúngica. Además de activarse las vías alternativa y clásica en presencia de *C. albicans*, el MN presente en la superficie celular del hongo puede tener un papel importante en la activación del complemento por la vía de las lectinas (Kozel, 1996; Meri et al., 2002; Poulain & Jouault, 2004).

### 1.6.1.2. Fagocitosis

Las principales células encargadas de la fagocitosis de los microorganismos, opsonizados o no, son los neutrófilos y los macrófagos (Janeway et al., 2003; Roitt et al., 2008). La fagocitosis es un proceso activo que se inicia tras la unión del agente patógeno a receptores de membrana de células fagocíticas. Los neutrófilos, aunque son las células fagocíticas más abundantes en la sangre, no están presentes en los tejidos sanos, por lo que las células de estos tejidos expresan receptores de quimioquinas en su superficie que al interactuar con éstas inducen el reclutamiento de los neutrófilos al lugar de la infección. Una vez los neutrófilos toman contacto con los microorganismos, éstos son internalizados mediante una vacuola fagocítica llamada fagosoma que se fusiona con gránulos intracelulares que liberan su contenido en él formando el fagolisosoma.

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. No

obstante, la fagocitosis de levaduras de *C. albicans* también puede producirse en ausencia de opsoninas en el suero, aunque éstas son necesarias para la óptima muerte intracelular del hongo. En la fagocitosis del hongo no opsonizado están implicados los llamados *receptores de reconocimiento de patrones* (PRRs) (“Pattern Recognition Receptors”), capaces de reconocer patrones moleculares muy conservados en los microorganismos (PAMPs) y que no están presentes en las células de mamífero (Lee *et al.*, 2003). En general, la neutropenia o defectos congénitos en la función de los neutrófilos se han asociado con una mayor susceptibilidad a las candidiasis (Pemán *et al.*, 2005; Pfaller & Diekema, 2007; Tortorano *et al.*, 2004; Urban, Lourido & Zychlinsky, 2006a; Vázquez-Torres & Balish, 1997).

Las células dendríticas (DC) 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 DC destruyen a las células de *C. albicans* fagocitadas mediante mecanismos no oxidativos similares a los utilizados por macrófagos y neutrófilos (Mansour & Levitz, 2002).

El receptor dectina-1 (“DCAssociated C-type Lectin-1”) es otro PRR implicado en la fagocitosis del hongo *C. albicans*. La dectina-1 es el principal receptor implicado en la fagocitosis de la levadura (Gantner *et al.*, 2005). Este receptor es una lectina de tipo C (dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que reconoce principalmente  $\beta$ -(1,3)-glucano, y que se expresa en células mieloides incluyendo macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Se ha comprobado que esta lectina se une específicamente a zonas concretas de la levadura en gemación, en zonas donde el  $\beta$ -glucano queda expuesto, que corresponden a las cicatrices de las yemas viejas (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  $\beta$ -glucano no queda expuesto, lo que puede representar una ventaja de la forma micelial de *C. albicans* para establecer el proceso infeccioso (Underhill, 2007). El receptor dectina-2, al contrario, es una lectina que reconoce residuos de manosa/fucosa e interacciona preferentemente con la forma micelial de *C. albicans*, induciendo respuestas

inmunitarias innatas a través del receptor *Fc gamma*, ya que la dectina-2 carece de dominio intracelular capaz de transmitir señales de activación (Sato et al., 2006).

### **1.6.1.3. Inflamación inducida por complemento, eicosanoides y citoquinas**

La inflamación es una reacción inmunológica como respuesta a un daño tisular o al reconocimiento de un microorganismo patógeno. Desempeña varias funciones esenciales para combatir la infección: proporcionar una barrera física que impida la extensión de la infección, reclutar células efectoras al foco de infección para aumentar la destrucción de los microorganismos invasores y promover la reparación del tejido dañado (Janeway et al., 2003; Roitt et al., 2008). Estos cambios son inducidos por diferentes mediadores inflamatorios como el factor activador de plaquetas (PAF), los péptidos del complemento (C3a y C5a), eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) y citoquinas.

Se ha demostrado que la capacidad inmunológica para generar PAF en respuesta a una infección por *C. albicans* es un mecanismo esencial en la activación temprana del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (“Nuclear Factor- $\kappa$ B”) en modelo murino, ya que induce la producción de citoquinas proinflamatorias, así como la producción de óxido nítrico, el cual es capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans* mediante la actividad fungicida de los macrófagos (Choi et al., 2001; Kim et al., 2008).

Los péptidos del complemento C3a y C5a activan los mastocitos provocando liberación de histamina y la contracción del músculo liso, además de la activación de los neutrófilos (Janeway et al., 2003). Estudios de CI en ratón han demostrado que la falta de C5 produce una rápida proliferación de *Candida* en los órganos diana y la incapacidad para desarrollar una respuesta inflamatoria protectora (Mullick et al., 2004).

La prostaglandina E2 (PGE2), a pesar de poseer acciones proinflamatorias, presenta otras acciones antagónicas, como la inhibición de la producción de citoquinas y linfocitos y la inhibición de la respuesta Th1 (Betz & Fox, 1991; Kunkel et al., 1988; Sergeeva et al., 1997; Standiford et al., 1992; Strassmann et al., 1994; Vassiliou, Jing & Ganea, 2003). La producción de prostaglandinas en el lugar de la infección podría favorecer la

colonización por el hongo, ya que la PGE2 estimula la formación de micelio en *C. albicans* (Kalo-Klein & Witkin, 1990). Esto explicaría la contraindicación que el fármaco antiinflamatorio aspirina tiene sobre la CVV (Deva et al., 2001).

Las citoquinas son pequeñas proteínas sintetizadas por todos los tipos celulares, especialmente por macrófagos y linfocitos T, que se unen a receptores específicos de las células diana. Están implicadas en la elaboración de la respuesta inmunitaria, tanto innata, a través de la activación de macrófagos y linfocitos citolíticos NK, como específica, actuando sobre los linfocitos T y B, y sirven de conexión entre los dos tipos de respuesta. Además, las citoquinas tienen una función muy importante en la regulación de la hematopoyesis (Roitt et al, 2008). TNF- $\alpha$ , Interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6 son las principales citoquinas producidas durante la candidiasis (Presterl et al., 1999).

#### **1.6.1.4. Activación de células citolíticas NK “Natural Killer”**

Las células “Natural Killer” NK son linfocitos provenientes de la médula ósea que se encuentran en la sangre y tejidos linfáticos, especialmente en el bazo. Las células NK son una subpoblación altamente heterogénea, cuyas principales funciones son la citotoxicidad, que permite la eliminación de células infectadas por virus y células tumorales, y la secreción de citoquinas, fundamentalmente IFN de tipo I, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , que activan el potencial citolítico de las propias células NK, e IFN- $\gamma$  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 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- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  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 (Arancia et al., 1998; Ferrante, 1989; Marodi et al., 1993; Tran et al., 2003).

## 1.6.2. Inmunidad específica

La inmunidad innata por sí sola no suele ser suficiente para destruir por completo al agente infeccioso, por lo que es necesaria la activación de la respuesta específica en los tejidos linfoides. 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.

### 1.6.2.1. Inmunidad mediada por células

#### Linfocitos T CD4+

Las células T CD4<sup>+</sup> colaboradores (Th) de tipo 1 y 2 se producen a partir de un precursor común T CD4<sup>+</sup> inmaduro. En la respuesta inmunitaria frente a diferentes hongos una respuesta Th1, que está caracterizada por la producción de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF (“Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor”), se relaciona con la resistencia a la infección fúngica, sin embargo, la respuesta Th2, la cual produce IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, está relacionada con una mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas (Huffnagle & Deepe, 2003). Las citoquinas producidas por Th1 activan las células fagocíticas favoreciendo la eliminación de *C. albicans*, mientras que las citoquinas que provienen de las células Th2 inhiben el desarrollo de una respuesta Th1 desactivando las células encargadas de la fagocitosis (Romani, 2004). Además, la aparición de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> reguladoras (Treg) actúan regulando negativamente la respuesta Th1, para evitar una respuesta inflamatoria exacerbada (Romani, Bistoni & Puccetti, 2002).

Otro tipo de linfocitos T colaboradores son las células Th-17, cuya función es eliminar ciertos patógenos, principalmente hongos y micobacterias que no lograron ser eliminados tras una respuesta celular Th-1 y Th-2. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), que comparte la vía de producción de las células T reguladoras, y las citoquinas proinflamatorias IL-6 y IL-23 son necesarias para el desarrollo de las células Th-17, mientras que en ausencia de estas citoquinas proinflamatorias se generarán células T reguladoras. Los linfocitos Th-17 son esenciales para mantener la integridad de la mucosa gastrointestinal; sin embargo, la presencia constante de IL-23 perpetúa la producción de Th-17 favoreciendo la aparición de ciertas

enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal. Un mayor conocimiento de las vías de señalización y vías de producción de células Th-17 podría generar blancos terapéuticos para el tratamiento de patologías en donde las células Th-17 y/o sus citocinas estén implicadas (González-Hernández et al., 2011).

### Linfocitos T CD8+

Las células CD8<sup>+</sup> efectoras se activan gracias a una fuerte señal coestimuladora, la cual procede de las células presentadoras de antígenos o de la colaboración de ciertos linfocitos CD4<sup>+</sup>, para eliminar parásitos intracelulares mediante la lisis de las células infectadas. Existen dos mecanismos diferentes para completar esta función citolítica: inducción de la muerte celular programada (apoptosis) en las células diana a través de moléculas de membrana especializadas, o destrucción de las células mediante la formación de canales en la membrana producidos por perforinas y granzimas (Janeway et al., 2003; Roitt et al., 2008). Las células CD8<sup>+</sup> poseen un efecto antifúngico frente al micelio de *C. albicans* (Deepe, 1997). Estudios en modelo murino, sugieren la participación de las células T CD8<sup>+</sup> en la protección frente a la candidiasis, ya que tras la infección se observa un aumento considerable de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Ghaleb, Hamad, & Abu-Elteen, 2003), mientras que la eliminación de dichos linfocitos produce un aumento en la gravedad de las lesiones tisulares (Ashman, Fulurija & Papadimitriou, 1999).

### Células Dendríticas

Estudios *in vitro* han demostrado que las DCs de ratón y humanas son capaces de fagocitar levaduras y micelios de *C. albicans* (Romani et al., 2002). Los PRRs (MR, dectina-1 y DC-SIGN), receptores Fc y receptores de diferentes componentes del complemento son los principales receptores implicados en la fagocitosis del hongo por las células dendríticas. La forma levaduriforme del hongo es fagocitada por las células dendríticas por medio de los PRRs y la forma micelial requiere una opsonización previa (Bozza et al., 2004). La fagocitosis del hongo opsonizado genera citoquinas 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). Se ha descrito que las células dendríticas tratadas con levaduras de *C. albicans* son capaces de proporcionar resistencia



antifúngica mediante una respuesta específica Th1. Estas observaciones, en conjunto, plantean la posibilidad de desarrollar terapias alternativas frente a infecciones fúngicas a través de las células dendríticas (d'Ostiani et al., 2000; Bacci et al., 2002; Montagnoli et al., 2002; Bozza et al., 2004).

#### **1.6.2.2. Linfocitos B: anticuerpos**

A pesar de que 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). Cada vez existen más evidencias que indican que los anticuerpos específicos anti-*Candida* pueden ser inmunoprotectores frente a la infección (Bromuro et al., 2002; Casadevall et al., 1998; (Fernández-Arenas et al., 2004). Los anticuerpos ejercen su efecto protector a través de diferentes mecanismos como son la opsonización, la inhibición de la adhesión, la inhibición de la transición levadura-micelio, la neutralización de factores de virulencia y la actividad fungicida directa. Algunas de estas actividades biológicas se han demostrado para algunos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de *C. albicans* (Gozalbo et al., 2004; Martínez, et al., 1998; Moragues et al., 2003).

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

### **1.7. Diagnóstico de la candidiasis invasora**

El diagnóstico de la candidiasis invasora puede resultar complicado debido a la falta de signos específicos de la enfermedad y a la dificultad para distinguir entre la colonización del huésped y la infección diseminada por sus tejidos. La carencia de un test diagnóstico

óptimo, a menudo conduce a la administración tardía e inadecuada del tratamiento, lo cual se asocia con una elevada tasa de mortalidad (Morgan et al., 2005; Parkins et al., 2007).

El diagnóstico de laboratorio de la CI se basa en 3 estrategias complementarias: la observación del hongo en la muestra clínica, el crecimiento del hongo a partir de la muestra clínica en medios de cultivo específicos y la detección de biomarcadores fúngicos que circulan por el torrente sanguíneo de los pacientes con candidiasis invasora. Actualmente, los marcadores biológicos más interesantes para el diagnóstico son el manano, el  $\beta$ -1,3-D-glucano, el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Candida* y algunos anticuerpos que se producen contra antígenos de la pared celular de *Candida* (Pontón, 2009).

### **1.7.1. Diagnóstico microbiológico convencional**

#### Estudio microscópico

El estudio microscópico de las muestras clínicas, tales como secciones de tejidos o biopsias, es una de las técnicas más fiables para establecer un diagnóstico de CI. Mediante la observación directa es posible diferenciar entre colonización e invasión, ya que en el segundo caso se apreciarían las hifas formadas por *Candida*, esta técnica solamente es útil con las especies capaces de filamentosas. Sin embargo, debido al estado crítico de muchos pacientes, puede resultar complicado obtener una biopsia, además, para la observación de las estructuras características de los hongos es necesario que sean abundantes, lo cual se da principalmente en las fases más avanzadas de la infección. El éxito de la técnica para el diagnóstico requiere que la presencia de levaduras en la muestra sea abundante y esto ocurre en fases avanzadas de la infección.

#### Hemocultivo

El diagnóstico de referencia o *gold standard* es el hemocultivo, que ofrece una baja sensibilidad, aproximadamente del 50%, la cual se atribuye a una presencia transitoria del hongo en la sangre, a su localización dentro de los fagocitos y al gran tamaño relativo de las células de *Candida* que pueden quedar atrapadas en los capilares (Arvanitis et al.,

2014). Otro de los inconvenientes es que requiere entre 2 y 10 días para la obtención de un resultado, variando este tiempo en función de la especie de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* requieren entre 3 y 4 días, mientras que *C. krusei* y *C. glabrata* pueden tardar hasta 10 días en crecer. No obstante, es recomendable prolongar su incubación hasta 30 días a 22-30°C con un subcultivo final antes de descartarlo como negativo (Loza, Planes & Rodríguez-Creixems, 2003). Un retraso de 12-24h en la instauración del tratamiento antifúngico puede doblar la mortalidad por candidemia (Morrell, Fraser & Kollef, 2005), por lo que se hace necesario desarrollar nuevos tests diagnósticos y/o identificar factores de riesgo que permitan adelantar el tratamiento antifúngico específico. Recientemente se han desarrollado varios avances, como el control de CO<sub>2</sub> (Loza et al., 2003), que parecen mejorar la sensibilidad y/o reducir el tiempo necesario para obtener un resultado, así como el sistema MALDI-TOF. Este sistema de espectrometría de masas permite identificar un elevado número de microorganismos a partir del hemocultivo (Bao et al., 2018; Croxatto, Prod'hom & Greub, 2012; Turhan et al., 2017). Yaman y colaboradores (Yaman, Akyar & Can, 2012) comprobaron que el sistema MALDI-TOF fue capaz de identificar el 100% de las especies de *Candida* en un total de 281 muestras.

Sin embargo, a pesar de estos avances, el diagnóstico mediante hemocultivo continúa teniendo una baja sensibilidad y puede presentar problemas de especificidad, ya que *Candida* es un colonizador habitual de las mucosas humanas y puede dar un resultado falso positivo en individuos que son simplemente portadores.

### **1.7.2. Diagnóstico microbiológico independiente del cultivo**

Las limitaciones asociadas con las técnicas microbiológicas clásicas para el diagnóstico de la CI han llevado a la búsqueda y comercialización de nuevas técnicas alternativas de apoyo basadas en la detección de marcadores biológicos, entre los que destacan componentes estructurales o metabólicos de *Candida* como el manano (Platelia *Candida* antigen and antibody BioRad), el  $\beta$ -1,3-D-glucano (Fungitell, Associates of Cape Cod, Inc, Falmouth, MA, EE.UU.), el D-arabinitol, y el ADN, así como otros componentes antigénicos de *Candida* o la detección de anticuerpos específicos. Sin embargo, ninguno

de estos métodos está totalmente validado para su aplicación en la práctica clínica (Pemán & Zaragoza, 2012; Pontón, 2009; Quindós et al., 2012). Por ello es necesario continuar investigando en la búsqueda de nuevas herramientas que permitan establecer un diagnóstico temprano que lleve a la identificación correcta de la especie implicada, para poder instaurar un tratamiento antifúngico adecuado a tiempo.

#### **1.7.2.1. Detección de $\beta$ -1,3-glucano**

El beta-1,3-D-glucano (BDG) es un componente polisacárido localizado en la pared celular de la mayoría de los hongos. Su detección no permite un diagnóstico específico porque el BDG es un biomarcador panfúngico que se detecta en pacientes que sufren otras enfermedades fúngicas invasoras (EFI), con la excepción de la mucormicosis y la criptococosis, aunque hay estudios publicados en los que el test podría ser útil en algunos casos de mucormicosis y/o criptococosis (Rhein et al., 2014; Son et al., 2017). El hecho de que el BDG se encuentre en la mayoría de los hongos, pero no en bacterias, virus o células animales, hace de éste un buen marcador para las enfermedades fúngicas invasoras (Loza et al., 2003).

Existen varias pruebas comercializadas para la detección de BDG, siendo Fungitell la prueba autorizada tanto en Europa como en EE.UU. (Arvanitis et al., 2014; Quindós et al., 2012). La detección de BDG en suero se realiza mediante una técnica cromogénica muy sensible basada en la activación de la cascada de coagulación del cangrejo herradura japonés (*Limulus*). Esta técnica emplea una detección cinética de BDG y un punto de corte de 80 pg/ml. Es útil para el diagnóstico de AI en pacientes oncohematológicos con neutropenia, con una sensibilidad del 64% al 88%, una especificidad cercana al 90%, y un valor predictivo positivo y negativo del 70% al 89% y del 73% al 96%, respectivamente. También ha demostrado utilidad en el diagnóstico de otras EFIs, como la candidiasis invasora en pacientes críticos y en neumonías por *Pneumocystis jirovecii*. La detección de BDG en suero de pacientes con neumonía por *P. jirovecii* es una herramienta diagnóstica prometedora con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85% (Loza et al., 2003). Los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo, conseguidos con esta técnica, la califican como una técnica útil para discriminar entre presencia o ausencia de enfermedad fúngica invasiva

(EFI), y además presenta la ventaja añadida de ser una técnica rápida, pudiendo obtener resultados en dos horas aproximadamente.

Pero, a pesar de estas ventajas, la detección de BDG también presenta algunos inconvenientes. Por un lado, esta técnica permite poner de manifiesto, o descartar, la presencia de una EFI, pero no ofrece información sobre la especie causante de la misma, lo cual es necesario para poder establecer un tratamiento antifúngico adecuado. La detección de glucano también presenta varios inconvenientes técnicos ya que, debido a la ubicuidad de BDG, una de las causas de falsa positividad es la contaminación de los materiales de laboratorio con este compuesto. Se han descrito resultados falsos positivos en pacientes en hemodiálisis con membranas de acetato de celulosa, en contacto con gasas y esponjas quirúrgicas o en tratamientos con inmunoglobulinas humanas intravenosas, polisacáridos antitumorales (lentinano y polisacárido K), albúmina, factores de coagulación, proteínas plasmáticas, quimioterapia antitumoral, amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilinatazobactam (Quindós et al., 2012). Los sueros hemolizados, algunas bacteriemias por microorganismos grampositivos (*Streptococcus* spp.) y por gramnegativos (*Alcaligenes* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*) son otras causas conocidas de resultados falsos positivos. Los falsos negativos se asocian con la existencia de sueros hiperpigmentados (bilirrubina) y triglicéridos elevados, el tratamiento empírico o profilaxis antifúngica y con la especie infectante, ya que no todas liberan la misma cantidad de BDG durante la infección (Arvanitis et al., 2014; Pontón, 2009).

La utilidad diagnóstica en pacientes con micosis invasoras (exceptuando la neumocistosis) ha sido revisada favorablemente en las guías de la Asociación de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) y ha sido incluida como criterio de micosis invasora probable en las definiciones de consenso de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer /Grupo de Estudio de las Micosis (De Pauw et al., 2008). Sin embargo, su recomendación en pacientes oncohematológicos ha sido declarada de utilidad moderada por la tercera European Conference on Infections in Leukemia (ECIL3) (Marchetti et al., 2012).

### 1.7.2.2. Diagnóstico serológico

#### Detección de antígenos

La detección de antígenos de *Candida* permite, teóricamente, realizar un diagnóstico en las primeras fases de la enfermedad, y además es independiente del estado inmunológico de los pacientes, condición muy útil ya que en muchos casos los pacientes están inmunodeprimidos. Sin embargo, este método presenta un gran problema de sensibilidad, debido a la transitoriedad de la presencia de los antígenos fúngicos en la sangre, ya que éstos son rápidamente eliminados de la misma por la formación de complejos inmunes. Entre los antígenos más importantes en el diagnóstico de la CI se encuentran el manano, la enolasa y las proteínas Sap (Naglik, Challacombe & Hube, 2003).

#### Detección de anticuerpos

Con el fin de subsanar los problemas relacionados con la transitoriedad en la detección de antígenos, la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos anti-*Candida* ha sido objeto de múltiples estudios. A pesar de ello, esta técnica puede presentar dos limitaciones importantes. Por un lado, debido al carácter comensal de *Candida*, los pacientes suelen presentar anticuerpos anti-*Candida*, lo que dificulta la diferenciación entre las fases de colonización e invasiva. A esto se suma el hecho de que en pacientes inmunocomprometidos la respuesta humoral puede ser débil, retardada o incluso no producirse.

Sin embargo, estas dos limitaciones podrían superarse seleccionando antígenos adecuados que estén relacionados con el proceso invasivo y desarrollando técnicas lo suficientemente sensibles como para detectar niveles bajos de anticuerpos. Por otro lado, el análisis de sueros correlativos de los pacientes, podría contribuir a mejorar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas, y permitiría ir observando la cinética de la respuesta humoral tanto a nivel de diagnóstico como en respuesta al tratamiento.

En la UPV/EHU nuestro Grupo de Estudio de la Infección Fúngica Invasora (GEIFI; <http://www.ehu.es/es/web/geifi/hasiera>) trabaja en el desarrollo de enfoques de diagnóstico para prevenir la CI o mejorar su tratamiento, y ha desarrollado una técnica

de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos específicos (CAGTA). Estos anticuerpos antimicelio van dirigidos frente a antígenos de *C. albicans* que se expresan mayoritariamente en la superficie de la pared celular de la fase micelial del hongo (Moragues et al., 2004), que es la fase morfológica asociada al proceso invasivo. Esta técnica presenta como ventaja añadida la posibilidad de diferenciar entre la colonización del tejido y la infección invasora del huésped, ya que la fase micelial de *C. albicans* está asociada con el proceso invasivo. La detección de CAGTA alcanza valores interesantes de capacidad diagnóstica (Moragues et al., 2004; Zaragoza et al., 2009a) y su detección combinada con el BDG alcanza una sensibilidad del 90,3% en pacientes con complicaciones abdominales severas y estancia en UCI superior a 7 días (León et al., 2012). Altos niveles de anticuerpos CAGTA también se han asociado con una mayor supervivencia de los pacientes con CI en UCI (Pemán et al., 2011; Zaragoza et al., 2009b). Sin embargo, la detección de CAGTA por microscopía de fluorescencia es una técnica de interpretación subjetiva, por lo que sería interesante poder disponer de una técnica de diagnóstico objetiva.

Nuestro grupo ha identificado un conjunto de antígenos de *C. albicans* que son reconocidos por los anticuerpos CAGTA de conejos infectados con este hongo (Sáez-Rosón, Sevilla & Moragues, 2014). Entre otros, podemos citar la proteína micelial Hwp1, la adhesina Als3, la sintasa Met6 y la enolasa, coincidiendo en muchos casos con los resultados publicados por otros autores (Laín et al., 2008). La detección de anticuerpos marcadores de CI frente a algunos de estos antígenos se ha ensayado en grupos reducidos de pacientes con resultados prometedores.

Dado que algunos de estos antígenos pueden obtenerse en el laboratorio como proteínas recombinantes, Laín et al. desarrollaron un ELISA para detectar anticuerpos contra el fragmento amino terminal de la proteína Hwp1, un marcador específico de la fase micelial de *C. albicans* (Laín et al., 2007). Con esta prueba se consiguió una sensibilidad del 88,9%, una especificidad del 82,6%, un valor predictivo positivo del 80% y un valor predictivo negativo del 90,2% para el diagnóstico de la CI en un grupo de pacientes que incluía personas inmunocompetentes e inmunodeprimidas.

Pitarch et al. en cambio, detectaron anticuerpos anti-Met-6 para diagnosticar CI, con una sensibilidad del 60%, una especificidad del 82%, un valor predictivo positivo del 56% y un valor predictivo negativo del 84% (Pitarch, Nombela & Gil, 2007) Clancy et al. también obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad similares, sin embargo, el valor predictivo positivo fue muy superior (76,6 - 90,7%) (Clancy et al., 2008).

### **1.7.2.3. Otras aproximaciones diagnósticas**

#### Técnicas moleculares

Los métodos de amplificación y detección de ácidos nucleicos son útiles para el diagnóstico y manejo de una variedad de enfermedades, la más ampliamente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR amplifica cantidades ínfimas de ácidos nucleicos y genera millones de copias idénticas de una secuencia determinada del ADN o ARN blanco en cuestión de horas (Mullis, 1990; Garibyan & Avashia, 2013). Esto le permite ser una herramienta poderosa para el diagnóstico rápido y preciso de una serie de enfermedades infecciosas, con una sensibilidad entre un 90%-100% y una especificidad de más del 95%. Sin embargo, puesto que *C. albicans* forma parte de la microbiota normal humana, su detección por PCR no diferencia entre colonización e infección.

#### MALDI-TOF

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) está basada en la identificación de un perfil proteico específico de cada microorganismo que permite en un número importante de casos y de una manera rápida, menos de 10 minutos, obtener un resultado a nivel de especie con una elevada sensibilidad. Sin embargo, requiere el crecimiento previo en el laboratorio del microorganismo presente en una muestra infecciosa, por lo que conlleva las mismas desventajas que el hemocultivo.

### **1.7.2.4. Combinaciones de marcadores biológicos**

Puesto que todas las técnicas utilizadas en el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora tienen limitaciones, la combinación de técnicas diagnósticas es una posibilidad que se recomienda en muchos trabajos, porque los resultados obtenidos con una técnica pueden suplir las deficiencias de las otras (Pontón & del Palacio, 2007). La



realización de varias pruebas presenta el inconveniente de la complejidad de realización y del incremento en el coste, pero puede ser necesaria para mejorar el diagnóstico. Sin embargo, en algunos estudios, la combinación no ha dado resultados satisfactorios. Se han estudiado numerosas combinaciones para el diagnóstico de la candidiasis invasora, incluidos antígenos y anticuerpos, antígenos y ADN, y antígenos, metabolitos y ADN con resultados dispares (Pontón, 2009). León et al. analizaron la combinación de las técnicas de detección de BDG y anticuerpos CAGTA para el diagnóstico de la candidiasis invasora, obteniendo un valor predictivo negativo muy alto que les permitía la diferenciación entre la colonización y la infección por *Candida spp.* (León et al, 2012). En la tabla 1.3. se muestran algunos ejemplos más de estas combinaciones.

Tabla 1.3. Combinaciones de técnicas que detectan marcadores biológicos para el diagnóstico de la candidiasis invasora (Pontón, 2009).

Marcadores	Pacientes	Sensibilidad <sup>a</sup> (%)	Especificidad <sup>a</sup> (%)	Sensibilidad <sup>b</sup> (%)	Especificidad <sup>b</sup> (%)	Observaciones	Referencia
Manano con enlaces $\beta$ y manano con enlaces $\alpha$	Candidiasis invasora	85	95	69	98	Las cinéticas de eliminación de ambos marcadores fueron diferentes. Los mejores resultados se obtuvieron detectando manano con enlaces $\alpha$	Sendid et al <sup>17</sup>
Manano, anticuerpos antimanano	Candidiasis invasora	80	93	40	98	Las cinéticas de ambos marcadores fueron complementarias. Los mejores resultados se obtuvieron detectando manano	Sakai et al <sup>15</sup>
Betaglucano, manano, PCR, anticuerpos antimanano	Candidemia	100	92,3	88	100	La PCR detectó <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> . Los mejores resultados se obtuvieron detectando ADN	Alam et al <sup>3</sup>
Betaglucano, anticuerpos antimicelio	Neutropenia	83,3	100	83,3	89,6	La combinación fue útil para identificar los falsos positivos de cada prueba. Los mejores resultados se obtuvieron detectando betaglucano	Pazos et al <sup>14</sup>
PCR, manano	Riesgo alto	100	97	95	97	La combinación es necesaria para ayudar al diagnóstico. Los mejores resultados se obtuvieron detectando ADN	White et al <sup>14</sup>
Betaglucano, manano	Riesgo alto	80,7	44,5	87	70,4	La combinación redujo la especificidad. Los mejores resultados se obtuvieron detectando betaglucano	Persat et al <sup>15</sup>

ADN: ácido desoxirribonucleico; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>a</sup>Calculada para el conjunto de marcadores utilizados.

<sup>b</sup>Del mejor marcador biológico individual.

## 1.8. Tratamiento de la candidiasis invasora

El tratamiento de las candidiasis superficiales se basa en el empleo de antifúngicos tópicos y dependiendo de la gravedad y/o persistencia de la infección se administran antifúngicos orales o sistémicos tales como los azoles (ketoconazol, fluconazol e itraconazol), la nistatina, la griseofulvina o la alilamina terbinafina.

Por el contrario, en el caso de las candidiasis sistémicas, el tratamiento varía en función de la localización anatómica de la infección, la enfermedad de base del paciente, su estado inmunológico, la especie de *Candida* causante de la infección y la susceptibilidad de la cepa a los antifúngicos. El tratamiento de la CI se ha basado fundamentalmente en el empleo de tres grupos terapéuticos: antibióticos poliénicos (anfotericina B), flucitosina y azoles (ketoconazol y fluconazol). Sin embargo, estos fármacos son muy tóxicos y su aplicación terapéutica requiere dosis elevadas, pudiendo desencadenar una depresión en la función hematopoyética medular, lo que agudiza los estados de inmunosupresión de los pacientes tratados (Sobel & Rex, 2001). En los últimos años, han aparecido nuevos antifúngicos: triazoles de nueva generación (posaconazol, ravuconazol, voriconazol), y nuevos antibióticos del grupo de las equinocandinas (casposfungina, anidulafungina, micafungina).

Los antibióticos macrólidos poliénicos son sustancias sintetizadas por actinomicetos del género *Streptomyces* y fueron los primeros antifúngicos desarrollados como formulaciones galénicas en la década de 1950 (Chen, Sharon & Sorrell, 2007; Maesaki et al., 1999). Son moléculas circulares que consisten en una región hidrófoba y otra hidrófila lo que facilita que sean moléculas anfóteras. Actúan uniéndose al ergosterol de la membrana celular fúngica alterando la permeabilidad de ésta y causando la muerte celular. La nistatina y la anfotericina B son los componentes más importantes de esta familia, siendo el segundo el antifúngico de referencia para las micosis invasoras y, por tanto, con el que se comparan el resto de antifúngicos sistémicos. Aunque la mayoría de las especies patógenas del género *Candida* son sensibles a la anfotericina B, el principal problema de este fármaco es su elevada toxicidad renal, por lo que se han desarrollado formulaciones lipídicas que tratan de evitar estos problemas de toxicidad (Wingard & Leather, 2004).

Los azoles inhiben la enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilasa dependiente del sistema enzimático del citocromo P450 que convierte el lanosterol en ergosterol, el cual es un componente de la membrana celular, ocasionando una destrucción de la membrana celular fúngica y una acumulación de precursores tóxicos del esterol. En este grupo se incluyen los imidazoles como el ketoconazol y miconazol, y los triazoles tales como el

fluconazol e itraconazol. El fluconazol tiene una gran eficacia en el tratamiento de la candidiasis en pacientes neutropénicos, y debido a su uso profiláctico se ha conseguido disminuir considerablemente la incidencia de la candidiasis invasiva. Además, el fluconazol tiene bajo coste, baja toxicidad y se puede administrar tanto por vía oral como intravenosa, pero tiene reducida su actividad en *C. glabrata* (Fortún, 2011). Posteriormente, se han desarrollado triazoles de segunda generación, como el voriconazol y el posaconazol, presentando ambos una excelente actividad *in vitro* frente a numerosas especies de *Candida*, incluyendo algunas cepas resistentes al fluconazol (Stevens, 2012a).

Las equinocandinas son metabolitos secundarios de ciertos hongos que consisten en un hexapéptido cíclico con una cadena lipídica responsable de la actividad antifúngica. Son lipopéptidos que presentan un mecanismo de acción único entre los antifúngicos, ya que inhiben la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano, componente esencial de la pared fúngica, sin afectar a las células de los mamíferos (Chen, Sharon & Sorrell, 2007; Gozalbo et al., 2004; Odds, Brown & Gow, 2003). Existen tres compuestos comercializados denominados caspofungina, micafungina y anidulafungina. Éstos muestran una potente actividad fungicida frente a casi todas las especies del género *Candida* y además presentan un menor número de efectos secundarios que los azoles (Chen et al., 2011; Stevens, 2012b).

## 1.9. Prevención: profilaxis e inmunización

En los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos para el tratamiento de las micosis invasoras, sin embargo, el hecho de que la toxicidad asociada en la mayoría de los casos sea alta, que estén apareciendo resistencias, que la mortalidad asociada a las mismas continúe siendo elevada, y que supone un elevado coste para nuestro sistema sanitario, hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas al tratamiento antifúngico actual. Debido a esto, en los últimos años ha habido numerosos intentos de desarrollar vacunas profilácticas y/o un protocolo de inmunización pasiva con anticuerpos policlonales o monoclonales tanto para infecciones oportunistas como endémicas, y

especialmente la mayor parte del trabajo se ha centrado en las infecciones causadas por especies del género *Candida*. En general, mientras que el diagnóstico y tratamiento de las candidiasis superficiales no suponen un problema sanitario destacable, no sucede lo mismo con las candidiasis sistémicas invasivas. A pesar del actual arsenal terapéutico de drogas antifúngicas, la mortalidad sigue siendo inaceptablemente elevada (Leroy et al., 2009). En consecuencia, es imprescindible adoptar medidas profilácticas y estrategias terapéuticas para combatir la creciente incidencia de las candidiasis con riesgo vital para el paciente, así como el elevado número de fallos terapéuticos. Puesto que la candidiasis sistémica es la cuarta infección hematológica más común en pacientes hospitalizados, la vacunación podría ser una estrategia muy adecuada para la prevención de las infecciones fúngicas invasivas, estrategia cuya tecnología se encuentra en desarrollo activo (Cassone, 2008; Cutler, Deepe & Klein, 2007; Deepe, 1997; Feldmesser, 2005; Fidel & Cutler, 2011; Ito et al., 2009; Perruccio et al., 2004; Spellberg, 2011).

Se ha descrito una gran variedad de candidatos para el desarrollo de vacunas anti-*Candida*, como células de *C. albicans* inactivadas por calor, polisacáridos, antígenos de la pared, la chaperona Hsp90, etc. Sin embargo, a pesar de que varias de las vacunas han llegado a estudiarse en ensayos clínicos, ninguna de ellas ha llegado a la fase III.

Existen numerosos estudios acerca de los componentes antigénicos de *C. albicans*. Pitarch y colaboradores utilizando una aproximación proteómica han descrito que el suero de ratones detecta 31 proteínas fúngicas, entre las que se encuentran las enzimas glicolíticas fructosa bifosfato aldolasa (Fba), triosa fosfato isomerasa (TPI), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), enolasa (Eno1) y piruvato kinasa (PK), otras enzimas metabólicas como la metionina sintasa (Met6) y alcohol deshidrogenasa (ADH), y miembros de la familia HSP70 (Ssa1, Ssb1) (Pitarch et al., 2001). También mediante una aproximación proteómica, empleando suero de ratones vacunados y no vacunados, se han identificado varios anticuerpos protectores del subtipo IgG2a (Inmunoglobulina G2a) 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).

La proteína recombinante Als3-N ha sido objeto de múltiples estudios como posible candidata para la inmunoprotección frente a la CI (Baer et al., 2012; Lin et al., 2009; Spellberg et al., 2008). La vacuna NDV-3 desarrollada por NovaDigm Therapeutics Inc. (Grand Forks, ND, EE.UU) y basada en la adhesina Als3, ha demostrado su eficacia y seguridad en la protección frente al desarrollo de candidiasis vaginal, en un ensayo clínico fase I ([www.novadigm.net](http://www.novadigm.net)). Pevion Biotech Ltd. (Ittigen, Suiza) desarrolló la vacuna PEV7, basada en una proteína recombinante Sap2 de *C. albicans*, la cual también ha sido estudiada en ensayos clínicos fase I con buenos resultados ([www.pevion.com](http://www.pevion.com)). Así mismo, Novartis Pharma AG (Basilea, Suiza) comercializó el anticuerpo monoclonal Mycograb<sup>®</sup>, que reconoce específicamente la chaperona Hsp90 (Matthews & Burnie, 1988; Matthews & Burnie, 2005). Burnie y colaboradores afirmaron que Mycograb<sup>®</sup> mostraba una acción sinérgica con la anfotericina B, por lo que su empleo en terapia combinada podría disminuir los efectos tóxicos y el riesgo de resistencias frente a la anfotericina B (Burnie & Matthews, 2004). Sin embargo, en 2006 la EMEA denegó su comercialización, concluyendo que la relación riesgo/beneficio en combinación con anfotericina B era negativa (Moragues et al., 2014). Posteriormente, se ha desarrollado un nuevo derivado denominado Mycograb C28Y, pero estudios preliminares en modelos murinos de CI indican que esta formulación no es tan efectiva (Boniche et al., 2020; Louie et al., 2011).

La inmunización de ratones con una fracción de manano implicada en la adhesión de las células fúngicas al hospedador desencadena una respuesta humoral protectora frente a las candidiasis diseminadas (Han & Cutler, 1995; Martínez et al., 1998). Los anticuerpos monoclonales del isotipo IgM e IgG específicos de un epítipo de la superficie de *C. albicans* [ $\beta$ -(1,2)-manotriosa] protegen al ratón frente a las candidiasis, incrementando la fagocitosis y muerte de las células fúngicas, mientras que un anticuerpo monoclonal del isotipo IgM que reconoce un epítipo distinto de MN no confiere protección alguna (Han, Riesselman & Cutler, 2000; Han et al., 2001). En un trabajo más reciente, Zhang y colaboradores, 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 (Zhang et al., 2006). También se ha descrito un anticuerpo monoclonal (MAb C7) frente a una manoproteína de alto peso molecular que se expresa en la superficie del micelio, y que presenta tres actividades anti-*Candida in vitro*: 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).

Xin y Cutler han desarrollado vacunas basadas en inmunización mediante células dendríticas que presentan conjugados glicopeptídicos inmunogénicos,  $\beta$ -1,2-manotriosa [ $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>] unidos a diferentes epítomos de proteínas de *C. albicans*. Los ratones inmunizados con tres de los seis glicoconjugados ensayados,  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Fba,  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Hwp1,  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Met6, mostraron un mayor grado de protección frente a la CI, con una mayor supervivencia y una carga fúngica menor (Xin & Cutler, 2011).

Torosantucci y colaboradores han descrito una vacuna conjugada capaz de inmunizar ratones frente a *C. albicans* por mecanismos basados en las propiedades antifúngicas de los anticuerpos anti- $\beta$ -glucano. Estos autores conjugan laminarina 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- $\beta$ -glucano, ya que estos anticuerpos se unen a micelios de *C. albicans* e inhiben su crecimiento. Además, también ha mostrado protección frente a una infección letal causada por conidios de *Aspergillus fumigatus* (Torosantucci et al., 2005).

La enzima enolasa es uno de los antígenos inmunodominantes de *C. albicans*, y aunque la inmunización con esta proteína recombinante tiene un ligero efecto protector en ratón, dicho efecto no se puede atribuir a los anticuerpos anti-enolasa, ya que este mismo efecto aparece en ratones deficientes en linfocitos B (Montagnoli et al., 2004).

Se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-Sap, proteasas aspárticas implicadas en la virulencia de *Candida*, durante el curso de las candidiasis sistémicas y vaginales (Naglik et al., 2003). Modelos experimentales de vaginitis en rata han demostrado que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-Sap2 o de anticuerpos anti-Sap2 de

fluidos vaginales y la inmunización con Sap2, protegen parcialmente frente a la CI (DeBernardis et al., 1997; Vilanova et al., 2004).

Luo y colaboradores han elaborado una vacuna con la proteína Hyr1, un antígeno de la pared celular de *C. albicans*, que en combinación con un adyuvante aluminico mejora significativamente la supervivencia y disminuye la carga fúngica de ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos con candidiasis diseminada (Luo et al., 2011).

Sin embargo, a pesar de las extensas investigaciones de todas estas vacunas, ninguna de ellas ha sido aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU., ya sea para la inmunización activa o bien para la inmunidad pasiva en seres humanos (Edwards Jr, 2012).

## 2. Justificación y Objetivos





A pesar de los avances realizados en las últimas décadas, el diagnóstico de la candidiasis invasora continúa siendo un importante problema médico. El hemocultivo, método de referencia para el diagnóstico de CI, ofrece una baja sensibilidad (aprox. 50%) y puede tardar 24-48h en dar un resultado positivo. Un retraso de 12-24h en el tratamiento antifúngico puede doblar la mortalidad por candidemia, por lo que se hace necesario desarrollar nuevos tests diagnósticos y/o identificar factores de riesgo que permitan adelantar el tratamiento antifúngico específico.

Nuestro Grupo de Estudio de la Infección Fúngica Invasora (GEIFI) ha desarrollado una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos de la pared celular de los tubos germinales de *C. albicans* (CAGTA) (Moragues et al., 2004). Entre el conjunto de antígenos de *C. albicans* reconocidos por los CAGTA, hemos identificado agglutinin-like sequence 3 (Als3), hyphal wall protein 1 (Hwp1) y metionina sintasa (Met6). De forma adicional, estos antígenos podrían constituir la base para el desarrollo futuro de vacunas frente a la CI. Este trabajo pretende evaluar la utilidad de la detección de anticuerpos frente a estos antígenos obtenidos de forma recombinante para el diagnóstico de la CI y profundizar en su aplicación tanto para el diagnóstico como por el posible efecto protector de estos antígenos a modo de vacuna.

Para alcanzar este objetivo general se han propuesto diferentes objetivos parciales:

- Valorar la utilidad clínica de la detección de anticuerpos específicos contra las proteínas de superficie de los tubos germinales de *Candida albicans*, agglutinin-like sequence-N (Als3-N), hyphal-wall protein 1-N (Hwp1-N) y metionina sintasa (Met6), para el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora (CI).
- Expresar y purificar las proteínas recombinantes Hwp1-N y Met6.
- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y eficacia, tanto para pacientes inmunocompetentes como para pacientes inmunosuprimidos.

- Comparar los resultados con la técnica comercial de detección de beta-1,3-D-glucano (Fungitell).
- Comparar los resultados con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de CAGTA.
- Determinar si la combinación de resultados de las pruebas de determinación de beta-1,3-D-glucano, CAGTA y anticuerpos específicos frente a Als3-N, Hwp1-N y Met6 contribuye a mejorar el diagnóstico de la CI.
- Evaluar la posible capacidad inmunoprotectora de péptidos derivados de Als3-N, Hwp1 y Met6 frente a la infección por *C. albicans* en ratones inmunocompetentes.
- Diseñar una secuencia peptídica inmunogénica a partir de epítomos de las proteínas Als3, Hwp1 y Met6.
- Comprobar la producción de anticuerpos y evaluar la supervivencia y/o la carga fúngica en los órganos de ratones inmunizados en comparación con un grupo control sin inmunizar.

### 3. Pacientes, Materiales y Métodos



### 3.1. Pacientes

Para el desarrollo de este trabajo se estudiaron un total de 627 sueros de 297 pacientes adultos ingresados en diferentes unidades del Hospital Severo Ochoa de Madrid, que presentaban todos ellos factores de riesgo de sufrir una infección fúngica invasora. Los pacientes se clasificaron en tres grupos en función de sus datos clínicos y microbiológicos:

Grupo 1: Pacientes con candidiasis invasora probada por presentar hemocultivos positivos para especies del género *Candida*. En este grupo se estudiaron 332 sueros de 126 pacientes.

Grupo 2: Pacientes que no presentaron hemocultivos positivos para especies del género *Candida*, pero sí para otras especies fúngicas. Este grupo recoge 164 sueros de 66 pacientes.

Grupo 3 (Grupo control): Pacientes con factores de riesgo similares a los del grupo 1 y 2 pero sin evidencias de infección invasora por especies fúngicas. En este grupo se incluyeron 131 sueros de 105 pacientes.

**Tabla 3.1.** Servicios hospitalarios donde estaban ingresados los pacientes estudiados.

Servicio	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
UCI	30	6	19
Medicina interna	27	18	14
Cirugía	21	1	
Reanimación	20	1	11
Digestivo	9		1
Hematología	5	23	49
Oncología	3		
Nefrología	2		1
Urología	1		
Geriatría	1		
Traumatología	1		
Reumatología	1		

<b>Cardiología</b>	1		
<b>Neumología</b>		14	6
<b>Otorrinolaringología</b>	1		
<b>Alergología</b>			
<b>Endocrinología</b>			2
<b>Falta el dato</b>	4	2	2
<b>Total</b>	126	66	105

### 3.2. Determinación serológica de (1-3)-beta-D-glucano

Se utilizó el ensayo Fungitell® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de BDG se estimaron a partir de las medidas de absorbancia de un modelo cinético registradas en el lector de microplacas BIOTEK ELX808TM que fueron analizadas con el software KC4 (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU). Los puntos de corte propuestos por el fabricante son: positivo  $\geq 80$  pg/mL, indeterminado  $\geq 60$  pg/mL  $< 80$  pg/mL, negativo  $< 60$  pg/mL. En este estudio los resultados indeterminados fueron considerados como negativos, siguiendo el criterio descrito por Martínez-Jiménez y otros (Martínez-Jiménez et al., 2015).

### 3.3. Titulación de CAGTA en suero

#### 3.3.1. Obtención de células inviables de *C. albicans*. Tratamiento por calor

##### Material

- **Agar glucosado de Sabouraud** (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU)
- **PBS (Phosphate buffered saline; tampón fosfato salino)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac Química, Barcelona, España)	0,386 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac Química)	1,02 g
NaCl (Panreac Química)	8,5 g
Agua hasta 1 l	
Ajustar a pH 7,2	

### **Método**

Se inocularon en césped placas de agar glucosado de Sabouraud con células de *C. albicans* NCPF 3153 y se incubaron 48 h a 24°C. Las levaduras se cosecharon y se lavaron con PBS estéril por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min. Las células suspendidas en PBS (aprox.  $10^{11}$  cél/ml) se incubaron en un baño a 60°C durante 2 h. Después, se realizaron 3 lavados con PBS estéril mediante centrifugación, y se ajustó la suspensión a una concentración de  $10^{10}$  cél/ml mediante recuento en una cámara Bürker. Por último, se distribuyó la suspensión de levaduras en alícuotas de 80 µl en viales Eppendorf y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para comprobar la eficacia del tratamiento térmico se sembró 0,1 ml de esta suspensión en agar glucosado de Sabouraud y tras 24h de incubación a 24°C se verificó la ausencia de crecimiento.

### **3.3.2. Obtención de tubos germinales de *C. albicans***

#### **Material**

- **Medio TC199** (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.)

#### **Método**

Para empezar, se incubaron levaduras de *C. albicans* NCPF 3153 en 2 placas de agar Sabouraud durante 48 h a 24°C. Las células se cosecharon con PBS y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. A continuación, se inocularon en medio TC199 a 24°C en agitación (120 rpm) durante 18 h. Para inducir la germinación de las levaduras, el inóculo ( $5 \times 10^7$  cél/ml) se repartió en 4 matraces con 500 ml de TC199 precalentado a 37°C y se incubaron a 37°C con agitación (120 rpm) durante 3 horas.

Finalmente, los micelios fueron cosechados por filtración y lavados con PBS antes de ser almacenados a -20°C.



### 3.3.3. Determinación del título de anticuerpos contra antígenos de la fase micelial de *C. albicans* (título CAGTA)

#### Material

PBS- Azul de Evans- Tween 20 (PBS-TA)	
Tween 20 (Sigma-Aldrich)	50 µl
Azul de Evans (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)	50 µg
PBS hasta 100 ml	
Glicerina tamponada	
Glicerina (Panreac Química)	90 ml
Tampón Carbonato-Bicarbonato 0,5 M pH 9	10 ml

#### Método

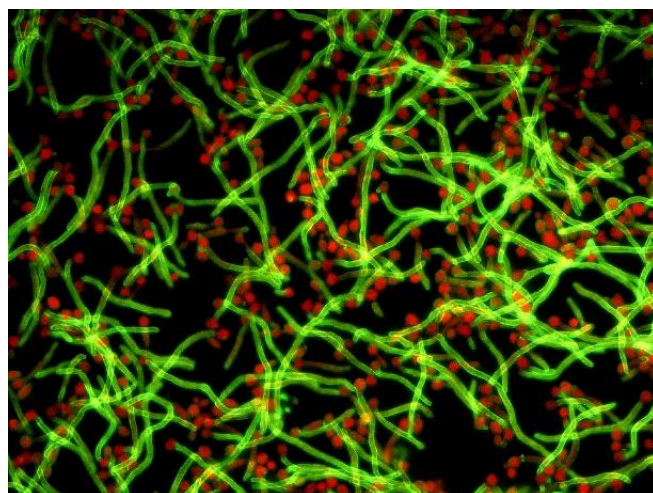
La detección de los anticuerpos anti-micelio (CAGTA) de los sueros se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) según la técnica descrita por Moragues y colaboradores (Moragues et al., 2004).

Se prepararon los portaobjetos con tubos germinales de *C. albicans* NCPF 3153 depositando 10 µl de una suspensión de aproximadamente  $10^5$  tubos germinales por mL de PBS-formaldehído (4%) en cada pocillo de un portaobjetos recubierto de teflón (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche, se fijaron con acetona y se lavaron con PBS durante 5 minutos en agitación.

Se añadieron 20 µl de suero, previamente diluido 1:3 con PBS, a un Eppendorf con 80 µl de levaduras de *C. albicans* NCPF 3153 inactivadas por calor y se incubaron una hora a temperatura ambiente en la noria para eliminar los anticuerpos dirigidos contra la superficie de la pared celular de las blastosporas. A continuación, se centrifugaron los viales 5 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante, considerado como dilución 1/20, se diluyó de forma seriada (1/40, 1/80, 1/160, 1/320...) en PBS y se depositó 10 µl en los pocillos del portaobjetos conteniendo los tubos germinales de *C. albicans* NCPF 3153. Los portaobjetos fueron incubados durante media hora en cámara húmeda a 37 °C y

después, se lavaron en agitación con PBS durante 5 min y se secaron. Posteriormente se realizó una segunda incubación en las mismas condiciones con el conjugado anti-Immunoglobulina G humana-isotiocianato de fluoresceína (anti-human IgG-FITC; Sigma-Aldrich), diluido 1:150 en PBS-TA. Los portaobjetos volvieron a ser lavados y secados. Finalmente, se depositaron los cubreobjetos con glicerina tamponada para proceder a su observación en un microscopio de epifluorescencia Eclipse 80i (Nikon Corporation, Tokio, Japón).

La reacción positiva se evidenció por la presencia de fluorescencia intensa de color verde manzana en la superficie de los tubos germinales y no en las blastosporas (figura 3.1). Se estableció el título CAGTA de un suero, como la última dilución del suero que presenta una reacción positiva sobre toda la superficie de los tubos germinales. El resultado se consideró positivo para títulos de anticuerpos anti-micelio en dilución igual o mayor a 1:160.



**Figura 3.1.** Muestra positiva para el ensayo CAGTA en microscopio de fluorescencia.

### **3.4. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes**

#### **3.4.1. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes**

Previamente en nuestro grupo de investigación se habían clonado las secuencias codificantes para los fragmentos N-terminales de las proteínas Als3 y Hwp1, y la proteína

Met6 completa. Como cepa de expresión se utilizó un hospedador lisógeno del bacteriófago denominado *E. coli* Rosetta™ (DE3) (Novagen), que es una cepa BL21 ideal para la expresión de proteínas debido a su alta eficiencia de transformación. El bacteriófago DE3 contiene el gen codificante de la RNA polimerasa del fago T7, regulado por el promotor inducible *lacUV5* que mediante la adición de IPTG, induce la expresión de la proteína recombinante a partir del vector pET, consiguiendo así altos niveles de producto.

Las proteínas expresadas en este sistema tienen una cola HSV en el extremo carboxilo terminal, una secuencia de 11 aminoácidos derivada de la proteína D del virus del Herpes simple, que permite la inmunodetección mediante un anticuerpo monoclonal anti-HSV.Tag. Así mismo, también presentan una cola de seis histidinas (His-tag), lo que permite la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad.

La expresión de las proteínas Als3-N, Hwp1-N y Met6 se inició inoculando en 10 ml de caldo LB bacterias *E. coli* Rosetta™ (DE3) transformadas con el correspondiente plásmido recombinante,. Este cultivo se suplementó con carbenicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) para crear un medio selectivo gracias a las resistencias ofrecidas por el plásmido recombinante y se incubó a 37 °C con agitación fuerte (250 rpm) durante 18 h. El cultivo se utilizó como inóculo para 4 matraces de 0,5 l de medio LB fresco obteniendo una densidad óptica a 600 nm de 0,1-0,2 y se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica de 0,7-0,8. En este momento se inducía la expresión de las proteínas recombinantes añadiendo IPTG hasta una concentración 1mM para la expresión de Met6 y 0,5mM para las otras dos proteínas (Als3-N y Hwp1-N). Tras 4 horas de incubación, las células se recogieron por centrifugación durante 10 min a 4500 rpm y se congelaron a -20°C.

La producción de las proteínas recombinantes se comprobó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (apartado 3.4.4.) seguida de una electrotransferencia a membranas de PVDF (apartado 3.4.6.) y posterior inmunodetección con el anticuerpo monoclonal HSV.Tag® (Novagen, Merck).

### 3.4.2. Preparación del extracto celular

Las células se mantuvieron como mínimo una noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  para mejorar la capacidad del método de extracción. La solubilización de las proteínas se realizó siguiendo el protocolo del fabricante (BugBuster<sup>®</sup> His.Bind<sup>®</sup> Purification Kit, Merck Millipore). Se resuspendieron las células con el agente BugBuster<sup>®</sup> (5ml/g de células), que produce la ruptura de las células junto con las enzimas Benzonasa<sup>®</sup> Nuclease (Novagen, Merck) (endonucleasa que ataca los ácidos nucleicos presentes en los cuerpos de inclusión,  $1\mu\text{l}/\text{ml}$  BugBuster<sup>®</sup>) y rLysozyme Solution (Sigma-Aldrich) a razón de  $16,15\mu\text{l}/\text{ml}$  BugBuster, y se incubó a temperatura ambiente en la noria durante 10-20 minutos. La suspensión se centrifugó a 16000 rpm durante 20 minutos, y se comprobó la existencia de proteína en el sobrenadante mediante electroforesis e inmunodetección específica (Western Blotting).

Als3-N y Met6 forman agregados insolubles o cuerpos de inclusión por lo que la pastilla de células fue sometida a un tratamiento previo a la purificación con el fin de solubilizar estas proteínas. Las pastillas de Als3-N y Met6 se resuspendieron en el mismo volumen de Bugbuster usado con el pellet inicial. Se volvió a añadir rLysozyme Solution y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se resuspendió el pellet en la mitad de volumen de BugBuster usado anteriormente y se volvió a centrifugar a 16000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, el sedimento obtenido se resuspendió en una solución de tampón de unión (Binding Buffer<sup>®</sup>) y urea 6 M y se incubó durante 1 h en hielo para solubilizar completamente la proteína. Tras esta última incubación, el material insoluble se eliminó por centrifugación a 16000 rpm durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se recuperó el sobrenadante con la proteína diana solubilizada para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

### 3.4.3. Purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó mediante cromatografía de afinidad a níquel a partir de los extractos de las células de expresión inducidas. Para ello

se utilizó el kit de purificación BugBuster® His.Bind® Purification Kit (Merck Millipore), que permite la purificación rápida de proteínas solubles que contengan una cola de hexahistidina. Esta cola se unirá a los cationes Ni<sup>2+</sup> que se encuentran inmovilizados en la resina de la columna y se lavarán las proteínas o contaminantes que no se unen a ella. Finalmente, la proteína diana se recupera por elución con imidazol.

El proceso comienza con la preparación de la columna. Para ello, se humedece un poco la columna seca con agua destilada y tras agitar vigorosamente la resina His.Bind® proporcionada por el fabricante, se añaden 5 ml a la columna. Esperaremos hasta que la resina se deposite por gravedad, obteniendo un volumen final de 2,5 ml de resina empaquetada. A continuación, se equilibra la columna mediante una serie de lavados: 3 vol. de agua destilada (1 volumen equivale al volumen de lecho empaquetado), 5 vol. de tampón de carga (Charge Buffer) y 3 vol. de tampón de unión (Binding Buffer).

Una vez preparada la columna se añadió el extracto celular, y se dejó pasar a través del lecho. Posteriormente se lavó la columna con 10 vol. de tampón de unión (Binding Buffer) y 6 vol. de tampón de lavado (Wash Buffer). La proteína diana se eluyó mediante la adición de 6 vol. de tampón de elución (Elute Buffer), conteniendo imidazol, que se recogieron en distintas fracciones. Finalmente, se añadió el Strip Buffer, que es el tampón de mantenimiento de la resina para su almacenamiento hasta que vuelva a ser usada, ya que estas resinas tienen capacidad de purificar hasta 20 mg de proteína. Los tampones empleados en la preparación de la resina, los lavados y la elución final, fueron suministrados por el fabricante.

Las fracciones con los péptidos purificados se analizaron mediante electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior tinción con azul de Coomassie e inmunodetección de la proteína recombinante transferida a Immobilon® (Merck Millipore, Burlington, MA, EE.UU.) con el anticuerpo monoclonal HSV.Tag® (Novagen, Merck), seleccionando de esta forma las fracciones en las que únicamente está presente la proteína de interés. El proceso de transferencia e inmunodetección es el mismo que se describe en los próximos apartados (3.4.6. y 3.4.7.), con la salvedad de que la transferencia se llevó a cabo a 0,25 mA/cm<sup>2</sup> y en la inmunodetección la primera

incubación se realizó con el anticuerpo monoclonal HSV.Tag® (dilución 1:200) y la segunda con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) (dilución 1:300). Las fracciones seleccionadas se dializaron con membrana de diálisis (MWCO 12,000–14,000 Da; Medicell International, London, UK) frente a PBS y se concentraron con polietilenglicol 20000 (Merck Millipore) (Sáez-Rosón, Sevilla & Moragues, 2014). La concentración final de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford usando el kit Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay (Thermo Fisher Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la integridad y la correcta purificación de la proteína se realizaron electroforesis e inmunodetección con un anticuerpo específico (Western Blotting). Finalmente, las fracciones conteniendo la proteína purificada se alicuotaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### 3.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

##### Material

- **Tampón I (Running Buffer)**

Trizma® Base 181,5 g

Ajustar a pH 8,8 con HCl

Agua destilada hasta 1 l

- **Tampón II (Stacking Buffer)**

Trizma® Base 60 g

Ajustar a pH 6,8 con HCl

Agua destilada hasta 1 l

- **Tampón de electrodos**

SDS 1 g

Trizma® Base 3 g

Glicina 14,4 g

Ajustar a pH 8

Agua destilada hasta 1 l

- **Tampón de carga 5X**

Tris-HCl 1M (pH 6,8) 2,5 ml

SDS 10% 4 ml

Glicerol	2 ml
Azul de bromofenol	1 mg
Agua destilada	0,5 ml

Completar con  $\beta$ -mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) a una concentración final del 5% (v/v) en el momento de usar.

- **SDS al 10%**

SDS	10 g
-----	------

Agua destilada hasta 100 ml

- **Persulfato amónico al 10%**

Persulfato amónico (Bio-Rad)	10 g
------------------------------	------

Agua destilada hasta 100 ml

Se prepara en el momento de usar

- **Acrilamida/Bis stock al 40% (Bio-Rad)**

- **TEMED (Bio-Rad)**

### Método

La electroforesis de las proteínas recombinantes se realizó de acuerdo con el método descrito por Laemmli (Laemmli UK, 1970). En esta técnica las muestras proteicas se tratan con calor en presencia de los agentes desnaturizantes  $\beta$ -mercaptoetanol, que destruye los enlaces disulfuro, y SDS, que se une a las proteínas desnaturizándolas y otorgándoles una carga negativa, y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas en función de su peso molecular.

El sistema se compone de dos fases:

#### **Gel de separación (Running) Acrilamida 10%**

Tampón I (Running Buffer)	2,5 ml
SDS al 10%	100 $\mu$ l
Acrilamida/Bis (stock al 40%)	2,475 ml
Agua destilada	4,875 ml

Se agitó suavemente la mezcla y se desgasificó al vacío durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después se añadió

Persulfato amónico al 10%	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

antes de su vertido en los moldes para su polimerización, la cual se favoreció con una capa de agua de 1cm de altura aproximadamente.

Una vez polimerizado el gel de separación, se preparó el gel de apilamiento.

#### **Gel de apilamiento (Stacking)**

Tampón II (Stacking Buffer)	1,25 ml
SDS al 10%	75 $\mu$ l
Acrilamida/Bis (stock al 40%)	488 $\mu$ l
Agua destilada	3,213 ml

Se agitó suavemente la mezcla y se desgasificó al vacío durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras retirar la capa de agua del gel inferior, se completó el gel de apilamiento con

Persulfato amónico al 10%	25 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

y se rellenó el molde con los cristales hasta el borde superior. Se insertó el peine en el gel de apilamiento para crear las calles donde cargar las muestras y se dejó polimerizar el gel superior a temperatura ambiente.

Las muestras se completaron con  $\frac{1}{4}$  vol. de tampón de carga y se sumergieron en agua hirviendo durante 5 min. En una de las calles se cargó una muestra (5  $\mu$ l) del marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). La separación de los péptidos se llevó a cabo en una cámara de electroforesis



MiniProtean II (Bio-Rad), a un voltaje constante de 200 V durante 45 min, utilizando el mismo tampón de electrodos en los receptáculos del ánodo y el cátodo.

La cámara de electroforesis tiene capacidad para correr dos geles al mismo tiempo, en nuestro caso, uno de ellos se teñía con azul de Coomassie para visualizar la separación de las proteínas y el otro se sometió a electrotransferencia para realizar la inmunodetección de las bandas de interés.

### 3.4.5. Tinción Coomassie

#### Material

- **Solución azul de Coomassie**

Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich)	1,2 g
Metanol (Panreac Química)	500 ml
Ácido acético (Panreac Química)	100 ml
Agua destilada hasta 1 l	

- **Solución de desteñir I**

Metanol	500 ml
Ácido acético	100 ml
Agua destilada hasta 1 l	

- **Solución de desteñir II**

Metanol	50 ml
Ácido acético	70 ml
Agua destilada hasta 1 l	

#### Método

Tras la electroforesis, uno de los dos geles se tiñó con la tinción azul de Coomassie. Primero, se trataron durante 1 h, o bien toda la noche, con la solución azul de Coomassie en agitación (120 rpm). Posteriormente, se retiró el exceso de colorante y el gel se lavó durante 1 h en agitación (120 rpm) con la solución de desteñir I. Por último, el gel se sumergió en solución de desteñir II durante una hora al menos para su rehidratación y registro fotográfico.

### 3.4.6. Electrotransferencia y tinción de Ponceau

#### Material

- **Metanol (Fluka, Sigma-Aldrich)**
- **Tampón de electrotransferencia o Fast Blot**

Trizma® Base (Sigma-Aldrich)	3,03 g
Glicina (Panreac Química)	11,26 g
Metanol (Fluka, Sigma-Aldrich)	100 ml
Agua destilada hasta 1 l	
- **Solución Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich)**
- **Ácido acético (Panreac Química) al 5%**

#### Método

Con el otro gel obtenido de la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Immobilon®). Las membranas fueron previamente hidratadas en metanol durante 5 segundos y en el tampón de transferencia durante 5 minutos. La electrotransferencia se realizó con el sistema de Western Blot semiseco Fast-Blot (Biometra, Alemania) a 0,25 mA/cm<sup>2</sup>, 60 voltios y 10 vatios durante 1 h. Las proteínas transferidas a las membranas de PVDF se revelaron con la tinción de Ponceau, seguida de un lavado de 5 minutos con ácido acético al 5%, con el fin de verificar la eficacia de la transferencia y la localización de las bandas proteicas.

### 3.4.7. Inmunodetección de antígenos (Western Blotting)

#### Material

- **Tampón Tris-Salino (TBS)**

Trizma® Base (Sigma-Aldrich)	12 g
NaCl (Panreac Química)	9 g
Ajustar pH a 7,3	
Agua destilada hasta 1 l	
- **TBS-leche al 8%**

Leche en polvo descremada (Nestlé, Vevey, Suiza)	8 g
--	-----

TBS hasta 100 ml

### **Método**

En primer lugar, con las proteínas ya transferidas, las membranas de PVDF se bloquearon con TBS-leche al 8% durante una hora a 37°C. A continuación, se incubaron otra hora con los CAGTA diluidos en TBS-leche al 8% en las mismas condiciones. Las membranas se lavaron 3 veces durante 3 minutos con TBS y se realizó una segunda incubación en las mismas condiciones con anti-IgG de conejo (dilución 1:300 en TBS-leche al 8%; Sigma-Aldrich) o con anti-IgG humana (1:200 en TBS-leche al 8%; Sigma-Aldrich), en ambos casos conjugados a peroxidasa. Tras esta segunda incubación, se volvieron a lavar las membranas con TBS y se procedió a su revelado mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Immun-Star™ HRP Chemiluminescent (Bio-Rad). Finalmente, las imágenes se visualizaron mediante el equipo Bio-Rad Chemidoc y el programa informático Quantity One (Bio-Rad).

## **3.5. Determinación de anticuerpos en suero por enzoinmunoensayo (ELISA)**

### **3.5.1. Procedimiento del enzoinmunoensayo (ELISA)**

#### **Material**

- **Tampón Carbonato-Bicarbonato Sódico pH 9,6**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Panreac Química)	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma Aldrich)	2,93 g
NaN <sub>3</sub> (Panreac Química)	0,2 g
Agua destilada hasta 1 l	
- **PBS-BSA 1%**

BSA (Sigma-Aldrich)	1 g
PBS hasta 100 ml	
- **PBS-BSA-Tween 20 (PBS-BT)**

PBS-BSA 1%	100 ml
------------	--------

Tween 20 (Sigma-Aldrich)	50 µl
<b>• Solución de revelado</b>	
Ácido cítrico (Bio-Rad) 0,05 M	4,86 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1M (Panreac Química)	5,14 ml
Ortofenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich)	5 mg

Disolver la pastilla de OPD y completar con 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en el momento de usar.

<b>• Solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M)</b>	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (VWR Prolabo, Radnor, PA, EE.UU)	2,6 ml
Agua destilada hasta 100 ml	

### Método

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es un ensayo ampliamente empleado en el área médica para detección y/o diagnóstico inmunoenzimático de anticuerpos específicos en muestras de suero. Implica la reacción de un complejo anticuerpo-enzima con un antígeno que se mantiene inmóvil sobre una superficie sólida. En este caso se ha empleado un ELISA indirecto, en el que el sistema de detección emplea dos anticuerpos, uno primario dirigido contra el antígeno (Als3-N, Hwp1-N y Met6) y uno secundario conjugado a una enzima (POX) que va dirigido contra el anticuerpo primario.

Los ensayos de ELISA se realizaron en placas de vinilo de 96 pocillos (Corning Costar, NY, EE.UU.). En primer lugar, se fijó el antígeno a la superficie de la placa añadiendo 100 µl por pocillo de una solución de antígeno en tampón carbonato-bicarbonato sódico pH 9,6 con una concentración de Met6 1,25µg/ml o de 0,325µg/ml en el caso de Als3-N y Hwp1-N, y se incubó toda la noche a 4°C. Una vez finalizada la incubación, se retiró la primera solución y se procedió al lavado con PBS a razón de 200 µl/pocillo. Se vació de nuevo la placa para el posterior bloqueo de los puntos libres de la superficie de cada pocillo mediante la adición de 200 µl de PBS-BSA 1%. Se incubó 1 h a 37°C o durante toda la noche a 4°C. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo y se añadió 100 µl de suero problema diluido en PBS-BT a los pocillos, y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Después se vació la placa y se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 a razón de 200  $\mu$ l/pocillo, sacudiendo la placa entre lavados. Se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de conjugado anti-IgG humano marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluido en PBS-BT (1:1000), y se volvió a incubar 1 h a 37°C. Al igual que al finalizar la incubación anterior, se vació y se realizaron tres lavados de las placas añadiendo 200  $\mu$ l/pocillo de PBS-Tween 20. Luego se añadió 100  $\mu$ l/pocillo de la solución de revelado y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. Por último, se detuvo la reacción mediante la adición de 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 0,5M, y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas ELISA (Microplate Autoreader, Bio-Tek Instruments, modelo Elx80i). Los datos se recogieron con el programa informático Gen5 (BioTek Instruments, Inc.).

### **3.5.2. Titulación en “tablero de ajedrez” (Checkerboard)**

La concentración adecuada de los diferentes antígenos a fijar en las placas y la dilución de los sueros problema utilizados en los ensayos se determinaron previamente mediante experimentos de titulación en tablero de ajedrez o ELISA checkerboard.

El método consiste en fijar el antígeno en diluciones seriadas con una concentración de partida de 10  $\mu$ g/ml de tampón carbonato-bicarbonato sódico (pH=9,6), en columnas de izquierda a derecha de la placa, mientras que el suero problema se ensaya en diluciones seriadas partiendo de 1:100, en filas de arriba abajo (figura 3.2.). Tras una segunda incubación con el anticuerpo  $\alpha$ -IgG humana conjugado a POX y la adición posterior del sustrato de revelado, como se ha descrito en el apartado 3.5.1., se procedió a la lectura de la absorbancia a 490nm con el espectrofotómetro. Tras completar el protocolo ELISA con los antígenos frente a un suero positivo y otro negativo, se escogieron la concentración de antígeno y de suero óptimas para cada caso, correspondientes al pocillo en el que la relación entre las absorbancias derivadas de suero positivo/negativo era mayor, es decir, donde se aprecia la mejor relación señal/ruido.

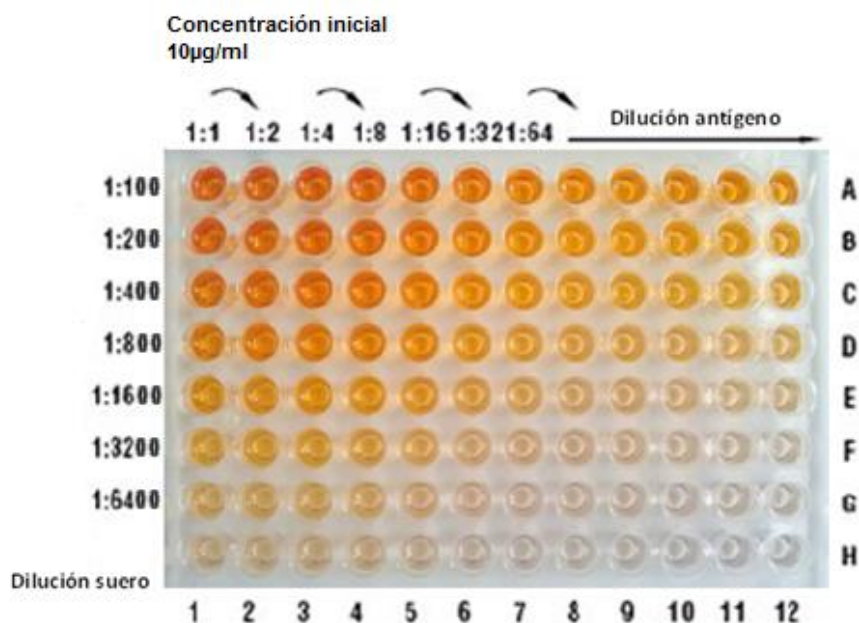


Figura 3.2. Esquema de Titulación en “tablero de ajedrez”.

### 3.5.3. Selección de sueros positivos y negativos

Como control del ensayo y para normalizar los resultados de las diferentes placas se eligieron un suero control positivo y otro negativo para cada uno de los tres antígenos empleados, y se incluyeron en cada placa de ensayo. Los valores de absorbancia registrados para los sueros en cada placa de ELISA se dividían entre la absorbancia obtenida por el suero control negativo, obteniendo de esta forma un valor normalizado de “absorbancia relativa”. Por otro lado, cada suero fue ensayado por triplicado, tomando como resultado final la media de los tres valores obtenidos.

### 3.5.4. Determinación del punto de corte o “cut-off “

El punto de corte o “cut-off” nos permite diferenciar entre los sueros positivos y negativos. Se estableció este punto de corte como el valor medio de las absorbancias relativas obtenidas en los sueros pertenecientes al grupo 3 (grupo control), más 2 veces la desviación estándar. Así, aquellos sueros con un valor de absorbancia relativa mayor que el punto de corte, se consideraron positivos, mientras que los que presentaban valores más bajos se consideraron negativos. Así mismo, este método solo fue utilizado

como referencia previa, ya que el punto de corte óptimo fue establecido mediante la construcción de las curvas ROC para cada antígeno (apartado 3.6.2.3.).

## **3.6. Tratamiento estadístico**

### **3.6.1. Valoración de la utilidad diagnóstica**

Para evaluar la utilidad diagnóstica de la técnica ELISA se calcularon los índices estadísticos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y la eficacia para cada uno de los antígenos utilizados.

La Sensibilidad (S) es la capacidad para identificar los resultados verdaderamente positivos, es decir, que son correctamente identificados por la prueba diagnóstica que se está evaluando, por lo tanto, proporciona la probabilidad de que pacientes con CI den un resultado positivo. La Especificidad (E) es la proporción de verdaderos negativos correctamente identificados por la técnica a evaluar, proporcionando la probabilidad de que pacientes sin CI den un resultado negativo.

Para determinar la probabilidad de que con el ensayo obtengamos un diagnóstico correcto, que es lo que interesa en la práctica clínica, se utilizan los valores predictivos. El Valor Predictivo Positivo (VPP), es la proporción de pacientes con resultado positivo que son correctamente diagnosticados, es decir, la probabilidad de que los sujetos con resultados positivos realmente estén infectados. En cambio, el Valor Predictivo Negativo (VPN), es la probabilidad de que pacientes con resultado negativo no presenten la infección. Por último, la Eficacia o Precisión (A) indica la probabilidad de que la prueba clasifique correctamente a los pacientes.

Para calcular estos valores, se empleó la tabla de contingencia y las fórmulas detalladas en la figura 3.3. y la tabla 3.2. respectivamente.

		Método de referencia		
		Positivo	Negativo	$\Sigma$
Método alternativo	Positivo	Verdaderos positivos a	Falsos positivos b	a + b
	Negativo	Falsos negativos c	Verdaderos negativos d	c + d
$\Sigma$		a + c	b + d	Total

**Figura 3.3.** Tabla de contingencia empleada para el estudio de la utilidad diagnóstica.

**Tabla 3.2.** Parámetros estadísticos y fórmulas empleadas en el estudio de la utilidad diagnóstica.

Parámetros estadísticos	Fórmula
<b>Sensibilidad</b>	$S (\%) = [a/(a+c)] * 100$
<b>Especificidad</b>	$E (\%) = [d/(b+d)] * 100$
<b>Valor Predictivo Positivo</b>	$VPP (\%) = [a/(a+b)] * 100$
<b>Valor Predictivo Negativo</b>	$VPN (\%) = [d/(c+d)] * 100$
<b>Eficacia</b>	$A (\%) = [(a+d)/(a+b+c+d)] * 100$

Se realizó también una comparación estadística de las absorbancias relativas de los sueros del grupo 1 frente a los grupos controles 2 y 3 y del grupo control 2 frente al grupo control 3. Para esta comparación se utilizaron los métodos estadísticos ANOVA y t-test de Student con el programa informático GraphPad Prism6. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$ .

### 3.6.2. Curvas ROC

Las curvas ROC sirven para conocer el rendimiento global de una prueba diagnóstica mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC). También permite la comparación entre pruebas y la determinación del punto de corte óptimo para cada una de ellas.



La curva ROC se construye con los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para distintos puntos de corte de la prueba, que se representan en una gráfica X,Y donde X es (1-especificidad) e Y la sensibilidad. Ambos ejes abarcan valores entre 0 y 1, correspondiendo al rango 0% - 100%. A modo de referencia, en todo gráfico de curva ROC se traza una línea desde el punto 0,0 al punto 1,1, llamada diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea ND).

### **3.6.2.1. Evaluación de la capacidad discriminativa de un test diagnóstico**

La capacidad discriminativa de un test diagnóstico se refiere a su habilidad para distinguir entre pacientes sanos y enfermos. Para ello, el parámetro a estimar es el área bajo la curva ROC (AUC, Area Under the Curve), medida única e independiente de la prevalencia de la enfermedad en estudio. El valor AUC refleja la suficiencia del test para discriminar pacientes con y sin la enfermedad a lo largo de todo el rango de puntos de corte posibles. El eje Y del gráfico de curva ROC corresponde a la proporción de verdaderos positivos sobre el total de pacientes enfermos (sensibilidad), y el eje X corresponde a la proporción de falsos positivos sobre el total de sujetos sanos (1-especificidad). Así, un gráfico de curva ROC ilustra la “proporción de verdaderos positivos” (eje Y) versus la “proporción de falsos positivos” (eje X) para cada punto de corte de un test diagnóstico cuya escala de medición es continua (Cerde & Cifuentes, 2012).

Un test diagnóstico se considera no-discriminativo si su curva ROC coincide con la línea de no-discriminación, la cual posee  $AUC = 0,50$ . A medida que el AUC de un test diagnóstico se acerca al valor 1,00 (test diagnóstico perfecto), mayor será su capacidad discriminativa (Cerde & Cifuentes, 2012).

### **3.6.2.2. Comparación de la capacidad discriminativa de los tests diagnósticos**

Para que sea posible comparar la capacidad discriminativa de los tests diagnósticos, estos deben ser medidos simultáneamente, aplicados sobre los mismos sujetos y contrastados frente el mismo estándar diagnóstico de referencia (*gold standard*). Verificados estos requisitos, para comparar la capacidad discriminativa de los tests

diagnósticos deben compararse sus respectivas AUC, siendo más discriminativo la prueba con mayor AUC (Cerde & Cifuentes, 2012).

### 3.6.2.3. Determinación del punto de corte óptimo

El punto de corte óptimo de una escala continua es aquel que presenta el mayor índice de Youden, calculado según la fórmula (sensibilidad + especificidad - 1). Gráficamente, éste corresponde al punto de la curva ROC más cercano al ángulo superior-izquierdo del gráfico (punto 0,1), es decir, más cercano al punto del gráfico cuya sensibilidad = 100% y especificidad = 100%. El índice de Youden identifica el punto de corte que determina la sensibilidad y especificidad más alta conjuntamente, sin embargo, dicho punto de corte no necesariamente coincide con la sensibilidad y la especificidad más altas que podría alcanzar el test, que generalmente se obtienen con puntos de corte diferentes (Cerde & Cifuentes, 2012).

### 3.6.3. Concordancia entre técnicas

Se evaluó la concordancia entre los resultados obtenidos con la técnica de diagnóstico ensayada y el método de referencia mediante el índice Kappa (K). El índice o coeficiente Kappa evalúa la correlación entre dos o más métodos de diagnóstico. Landis y Koch (Landis & Koch, 1977) propusieron unos intervalos para clasificar el grado de acuerdo en función del resultado Kappa (tabla 3.3.). En todos los valores descritos se ha utilizado como indicador de incertidumbre el intervalo de confianza del 95% (IC 95%).

**Tabla 3.3.** Valoración del índice Kappa

<b>Kappa</b>	<b>Grado de concordancia</b>
<b>&lt;0</b>	Nulo
<b>0 - 0,2</b>	Bajo
<b>0,2 - 0,4</b>	Intermedio
<b>0,4 - 0,6</b>	Moderado
<b>0,6 - 0,8</b>	Bueno
<b>0,8 - 1</b>	Muy bueno

#### **3.6.4. Capacidad diagnóstica de la combinación de técnicas**

Con el fin de aprovechar la capacidad diagnóstica de las diferentes pruebas ensayadas, se analizaron los resultados obtenidos para cada uno de los test, ensayos ELISA, detección de beta-glucano (BDG) e IFI para la detección de CAGTA, combinándolos entre ellos. Para ello, se consideró como paciente positivo aquel cuyo resultado fuera positivo al menos para una de las técnicas ensayadas, mientras que un paciente se consideró negativo cuando lo era para todas las pruebas.

#### **3.7. Selección de epítopos *in silico***

En determinados casos, la inmunización con proteínas completas puede no ser la mejor opción, teniendo que recurrir a la inmunización con péptidos sintéticos. Con el fin de evitar posibles reacciones cruzadas y mejorar la capacidad inmunogénica del compuesto utilizado a modo de vacuna, se seleccionó un epítipo para cada una de las proteínas Als3, Hwp1 y Met6.

A continuación, se indican los criterios más importantes recomendados en la literatura a la hora de diseñar un buen antígeno peptídico.

##### **3.7.1. Longitud de la secuencia**

Las secuencias muy cortas generan anticuerpos con una mayor especificidad, pero es menos probable que se encuentren expuestas en la estructura de la proteína nativa. Por el contrario, cuanto más larga sea la secuencia, menos específico será el anticuerpo resultante, pero aumentará la probabilidad de reconocimiento de la proteína nativa. Por ello, es importante buscar el equilibrio entre estos dos aspectos, siendo lo habitual el uso de secuencias de entre 10 y 20 aminoácidos. Travassos y Taborda proponen péptidos de 12 o más aminoácidos, ya que este es el tamaño requerido para las moléculas MHC II de las células presentadoras de antígenos (Travassos & Taborda, 2017).

### **3.7.2. Exposición de los epítomos**

Es importante que la secuencia peptídica que vayamos a seleccionar se encuentre en una región expuesta, y por lo tanto accesible, de la proteína. Para ello es necesario estudiar tres aspectos:

#### **Secuencias hidrófilas**

Como norma general, las proteínas nativas presentan residuos hidrófilos en la superficie, mientras que los hidrófobos suelen mantenerse en el interior de la estructura.

#### **Estructura secundaria**

El análisis de la estructura secundaria de la proteína nos ayudará a seleccionar una secuencia potencialmente expuesta e inmunogénica, así como a evitar regiones complejas e inaccesibles como podrían ser las conformaciones en hélice alfa o láminas beta.

#### **Extremo N- o C-terminal**

Los extremos de la secuencia peptídica, tanto el N- como el C-terminal, suelen estar generalmente expuestos en las conformaciones nativas, aun así, es necesario comprobarlo con programas informáticos de predicción de epítomos.

### **3.7.3. Epítomos lineales vs conformacionales**

Los epítomos lineales son aquellos formados por una serie sucesiva de aminoácidos dentro de la secuencia de la proteína, mientras que los conformacionales están compuestos por secuencias de aminoácidos no contiguas procedentes de distintas regiones polipeptídicas que se solapan al plegarse la estructura proteica en su conformación nativa.

Los anticuerpos anti-péptidos suelen dirigirse a epítomos lineales, ya que es muy difícil que un péptido de tan corta longitud presente una estructura secundaria que se ajuste a la que formaría el epítomo conformacional.

#### 3.7.4. Características de los residuos de la secuencia

Respecto a los aminoácidos que componen la secuencia seleccionada, conviene tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- Es necesario añadir una cisteína (al extremo N-terminal si el péptido se deriva del extremo C-terminal de la proteína y viceversa), para su posterior conjugación a otro péptido o a una proteína portadora.
- Evitar las cisteínas internas en la secuencia peptídica (pueden sustituirse por serinas).
- Evitar una glutamina o asparagina en el extremo N-terminal, así como, una prolina o glicina en el extremo C-terminal.
- Evitar múltiples serinas o prolinas en la misma secuencia (no más de tres residuos), así como múltiples glutaminas para evitar la formación de puentes de hidrógeno entre péptidos.
- Evitar largas cadenas de residuos hidrofóbicos. La solubilidad del péptido se puede mejorar cambiando su tamaño y/o añadiendo 1-2 aminoácidos hidrofílicos en el extremo N- o C-terminal.
- Evitar el tripéptido Arginina-Glicina-Aspartato (motivo RGD), sitios de unión a moléculas pequeñas, regiones biológicamente activas y sitios de modificación postraducciona, ya que pueden enmascarar el sitio de reconocimiento de anticuerpos.

Para el diseño de un péptido inmunogénico hemos recurrido al programa informático de predicción de epítomos Bepipred 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>) (<http://tools.iedb.org/bcell/>), así como el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para comprobar las posibles homologías de estos epítomos con otras especies, tanto dentro del género *Candida*, como con otros

hongos, e incluso reacciones cruzadas con proteínas intrínsecas del ratón (*Mus musculus*) o del ser humano (*Homo sapiens*).

### **3.8. Construcción del péptido antigénico y conjugación a KLH**

Una vez seleccionados los tres epítopos, se construyó un único péptido complejo, al que denominamos 3P, incluyendo secuencias “li key” (LRMKLPKS) que se añaden en el extremo N-terminal de cada epítipo para mejorar la presentación del antígeno, y espaciadores glicina-prolina (GPGPG) entre los tres epítopos para evitar la unión entre ellos (Hurtgen & Hung, 2017).

Cuando los péptidos son demasiado pequeños para inducir una respuesta inmune por sí mismos, es necesario conjugarlos a una proteína portadora o carrier capaz de estimular los linfocitos T colaboradores e inducir la activación del sistema inmunológico, en nuestro caso se utilizó la proteína KLH. A esta construcción con KLH la denominamos 3P-KLH.

La síntesis y purificación del péptido complejo conjugado a KLH (3P-KLH) fue encargada a la casa LifeTein LLC (Somerset, NJ, EE.UU.).

### **3.9. Experimentación animal**

Se realizó un ensayo previo a la inmunización para comprobar la reactividad de los péptidos en ELISA, tanto de forma individual como en combinación. Se ensayó el suero de 4 pacientes del grupo 1 y de 4 pacientes del grupo 3. Cada suero fue ensayado por triplicado, tomando como resultado final la media de los tres valores obtenidos. Los péptidos fueron ensayados en diferentes concentraciones para determinar la mejor relación señal/ruido, en este caso la mayor diferencia entre las medias de ambos grupos.

**Material**

El péptido 3P-KLH se utilizó en un experimento de inmunización para evaluar su potencia inmunogénica en un modelo murino, así como su capacidad protectora frente a una infección intravenosa posterior por *C. albicans*. El objetivo de este experimento es obtener una respuesta inmunológica con producción de anticuerpos con capacidad protectora frente a la candidiasis invasora.

**3.9.1. Estimación del tamaño muestral**

Se diseñó un estudio cuantitativo caso-control en el que el grupo experimental de ratones se inmunizó con un péptido que incluye secuencias inmunogénicas de las proteínas Als3, Hwp1 y Met6 de *C. albicans* conjugado a KLH (3P-KLH), mientras que los controles solo se inmunizaron con KLH. Para conocer el número mínimo de animales necesario para determinar el efecto inmunoprotector del péptido se utilizó la Calculadora de Tamaño muestral GRANMO de la Universidad de Castilla-La Mancha – UCLM (<https://www.uclm.es › media › Files › ComitéEticaExperimentacionAnimal>). Para el cálculo del tamaño muestral se seleccionaron los siguientes parámetros:

- Nivel de confianza (Riesgo alfa): se eligió un  $\alpha=0.05$ , que corresponde a un nivel de confianza del 95%, esta es la probabilidad de que la supervivencia del ratón sea real y no debida al azar para el tamaño muestral calculado.
- Tipo de contraste: generalmente se opta por el contraste bilateral.
- Riesgo beta: se refiere a la potencia del análisis, normalmente al 0.2 (significa una potencia del 80%).
- Número de grupos: 2, grupo experimental y grupo control.
- Desviación estándar común (STD): como se realizó el cálculo en función de las medias, se seleccionó la desviación estándar, en nuestro caso STD= 1, ya

que la supervivencia se comprobaría todos los días y podemos asumir que va a ser igual para ambos grupos.

- Diferencia mínima a detectar entre dos grupos: como nuestra hipótesis de partida es que la inmunización con el péptido va a aumentar la supervivencia de los ratones, se planteó la hipótesis de que la respuesta al péptido será del doble (2).
- Proporción prevista de pérdidas de seguimiento: hace referencia a errores experimentales, muerte de los animales, inyecciones fallidas, etc. Se estimaron unas pérdidas del 50%, que es una proporción de  $50/100=0.5$ .

Medias : Análisis de la varianza

Riesgo Alfa:  0.05  0.10  Otro

Tipo de contraste:  unilateral  bilateral

Riesgo Beta:  0.20  0.10  0.05  0.15  Otro

Número de grupos:

Desviación estándar común:

Diferencia mínima a detectar entre dos grupos:

Proporción prevista de pérdidas de seguimiento:

26/06/2020 12:42:28 Análisis de la varianza (Medias)

Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan 8 sujetos en cada grupo para detectar una diferencia mínima de 2 entre dos grupos, asumiendo que existen 2 grupos y una desviación estándar de 1. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 50%.

**Figura 3.4.** Captura del cálculo del tamaño muestral en la herramienta Calculadora de Tamaño muestral GRANMO – UCLM.

Para estudiar la carga fúngica en los órganos de los ratones, se utilizaron 3 ratones adicionales por grupo, siendo este el número mínimo para desestimar la aleatoriedad. Teniendo en cuenta estos cálculos, se formaron 2 grupos de 11 ratones, 8 de los cuales sirvieron para estudiar la supervivencia en el modelo de infección y los otros 3 para



estudiar la carga fúngica en los órganos de los ratones. Se utilizaron un total de 22 ratones BALB/c hembras de unas 8 semanas de edad (18-20 g) y los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de los servicios generales de investigación de la UPV/EHU (SGIker).

### **3.9.2. Protocolo de inmunización**

- Día 0: Se realizaron pequeñas punciones en la cola de los ratones para la primera obtención de muestras de sangre (10-50  $\mu$ l). Los ratones fueron inmunizados con una primera inyección subcutánea (aguja 26G) conteniendo 50  $\mu$ l de péptido (11 $\mu$ g) conjugado con KLH homogeneizado con 50  $\mu$ l de Alhydrogel (Aluminium Hydroxide Gel 2%, Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark) como adyuvante. Y a los ratones del grupo control se les inyectó KLH homogeneizado con Alhydrogel en una cantidad equivalente.

- Día 21: Segunda inyección subcutánea (aguja 26G) de 100  $\mu$ l de péptido conjugado a KLH con Alhydrogel como adyuvante. Al grupo control se le administró nuevamente KLH homogeneizado con Alhydrogel. Segundo muestreo de sangre de la cola de los ratones.

- Día 42: Tercer muestreo de sangre.

### **3.9.3. Determinación de anticuerpos en suero de ratón**

La determinación de anticuerpos específicos de la sangre obtenida se realizó mediante ELISA y los resultados se leyeron en un lector de placas ELISA a 490 nm (Microplate Autoreader, Bio-Tek Instruments, modelo Elx80i). Para la realización de los ensayos ELISA se siguió el protocolo del apartado 3.5. La fijación de la secuencia peptídica en los pocillos de las placas de vinilo se realizó a una concentración de 0,625  $\mu$ g/ml y los sueros se ensayaron a una dilución de 1/200.

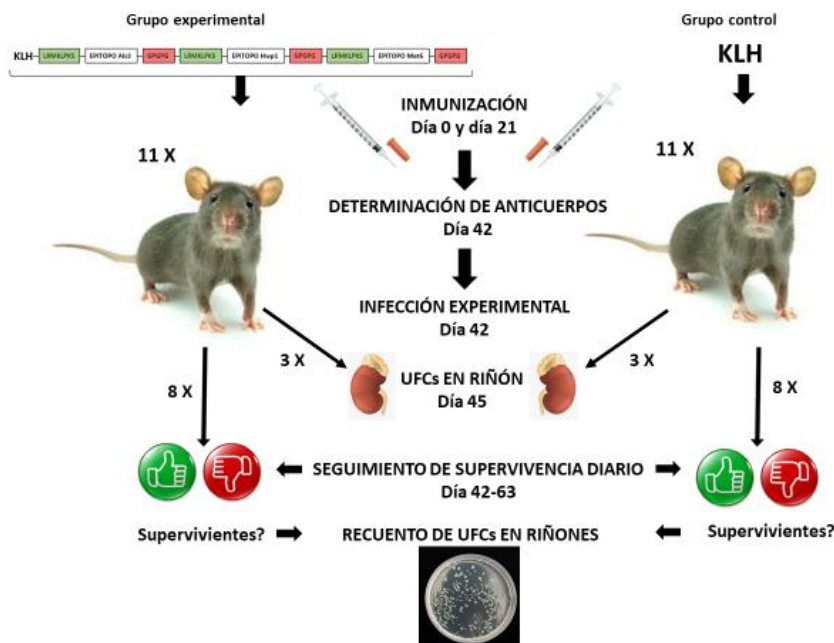
#### **3.9.4. Determinación de carga fúngica**

Para determinar la carga fúngica en órganos, se sacrificaron por dislocación cervical 3 ratones de cada grupo, y ambos riñones fueron extraídos en condiciones asépticas. Los riñones se pesaron y se homogeneizaron en PBS estéril y se sembraron alícuotas de 100  $\mu$ l de diluciones seriadas en agar YPD con 50  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. Las placas se incubaron a 24°C durante 48 h. Se realizó el recuento de colonias de *C. albicans* para estimar la carga fúngica en los órganos de los ratones expresada como UFC/mg peso húmedo de riñón.

#### **3.9.5. Infección intravenosa experimental con *C. albicans* y seguimiento**

Una vez verificada la respuesta inmunológica en el grupo experimental, se procedió a inocular *C. albicans* por vía IV a través de la vena lateral de la cola de los ratones. Siguiendo la cronología del protocolo de inmunización del apartado 3.9.2., se realizaron las siguientes acciones:

- Día 42: Inoculación de los ratones de los grupos experimental y control por vía intravenosa con  $3 \times 10^5$  blastosporas de *C. albicans* en 100  $\mu$ l de suero salino. Seguimiento diario de la supervivencia de los ratones hasta el día 63.
- Día 45: Eutanasia mediante dislocación cervical de 3 ratones de cada grupo para determinar la carga fúngica en riñones.
- Día 63: Los ratones supervivientes tras 21 días de la infección, se sacrificaron mediante dislocación cervical y se estimó la carga fúngica en riñones.



**Figura 3.5.** Representación esquemática del proceso llevado a cabo para determinar la capacidad inmunoprotectora de la secuencia peptídica diseñada.

### 3.10. Aspectos éticos

Los protocolos experimentales de esta tesis fueron revisados y aprobados por los correspondientes comités de la Comisión de Ética en la Investigación y Docencia de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea.

El Comité de Ética de Investigación con Seres Humanos (CEISH) informó favorablemente la utilización de las muestras anonimizadas almacenadas como colección registrada en el ISCIII (C.0005025) bajo la responsabilidad y custodia de la Dra. Moragues para los fines que vienen siendo utilizados por su grupo de investigación (CEISH/216RM/2013/MORAGUES).

El Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) y el Comité de Ética en la Investigación con Agentes Biológicos y organismos modificados genéticamente (CEIAB), así como el Servicio de Ganadería de la Diputación Foral de Bizkaia, aprobaron la realización del proyecto titulado “Capacidad protectora de compuestos peptídicos de *Candida albicans* frente a la candidiasis invasora en modelo murino” (CEEA/M20/2019/097 y CEIAB/M30/2019/102).

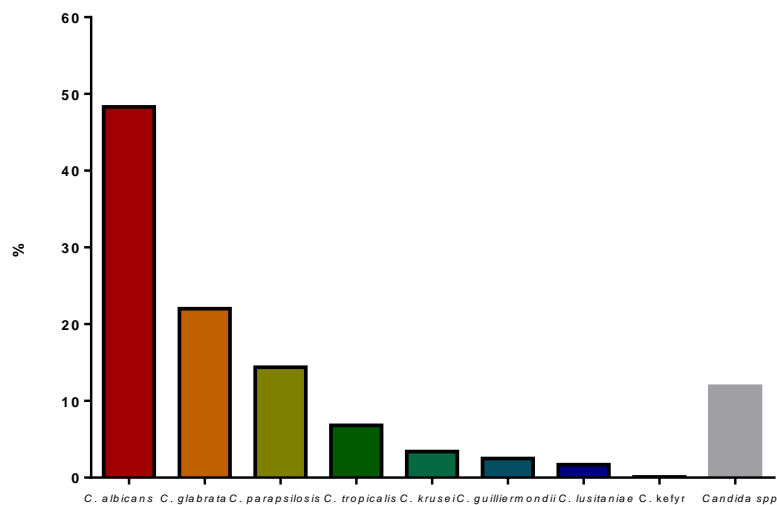
## 4. Resultados



#### 4.1. Grupos de pacientes y especies responsables de la infección

Los 297 pacientes, todos ellos con factores de riesgo para sufrir una infección fúngica invasora, se distribuyeron en 3 grupos. Grupo 1 (G1): 126 pacientes con candidiasis invasoras probadas; grupo 2 (G2): 66 controles con infecciones fúngicas causadas por otros hongos (*Aspergillus* spp., *Pneumocystis*, *Scedosporium*, *Cryptococcus*, *Conidiobolus*, *Purpureocillium*); grupo 3 (G3): 105 controles negativos, pacientes sin evidencia clínica o microbiológica de enfermedad fúngica invasora (EFI).

En la figura 4.1. se muestra la distribución de especies causantes de CI en el grupo 1, donde *C. albicans* es la especie predominante del género, siendo responsable del 48% de las infecciones, seguida por *C. glabrata* (22%), *C. parapsilosis* (14%), *C. tropicalis* (7%) y otras especies minoritarias. En un 12% de los pacientes se desconoce la especie responsable de la CI (*Candida* spp.).



**Figura 4.1.** Distribución de especies del género *Candida* responsables de la infección en los pacientes del grupo 1.

En la figura 4.2. se presenta la distribución de especies causantes de la EFI en el grupo 2. En el 59% de los pacientes *Aspergillus* spp. fue el agente infeccioso responsable. *Pneumocystis* spp. con un 24% y *Scedosporium* spp. con un 7,6% fueron respectivamente las siguientes especies más aisladas en el grupo 2. En un 1,5% de los pacientes se desconoce la especie responsable de la infección (IFI).

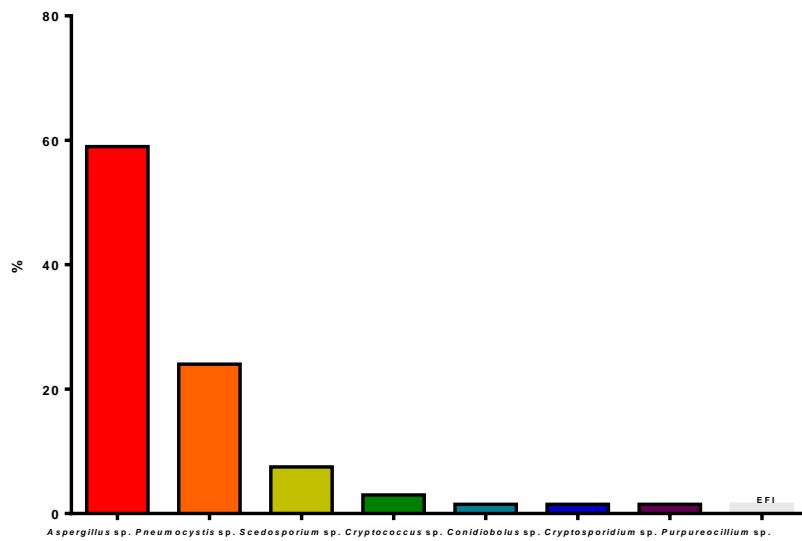


Figura 4.2. Distribución de especies responsables de la infección en los pacientes del grupo 2.

## 4.2. Evaluación de la capacidad diagnóstica de la detección de CAGTA

Se determinó el título CAGTA de un suero como la última dilución del suero que registrase reacción positiva en toda la superficie de la pared celular de los tubos germinales de *C. albicans* después de eliminar los anticuerpos que reaccionaban con la superficie de las blastosporas. En la bibliografía se considera un resultado positivo para títulos de anticuerpos anti-micelio en dilución igual o mayor a 1/160 (Moragues et al., 2004; Laín et al., 2007a).

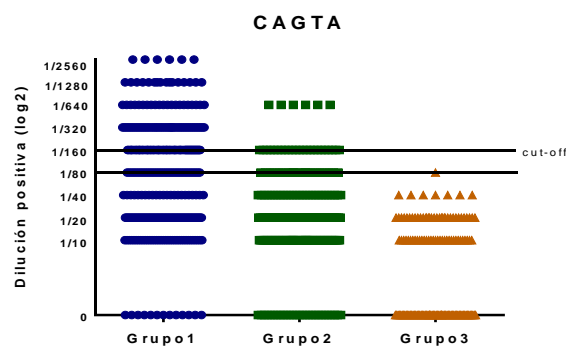
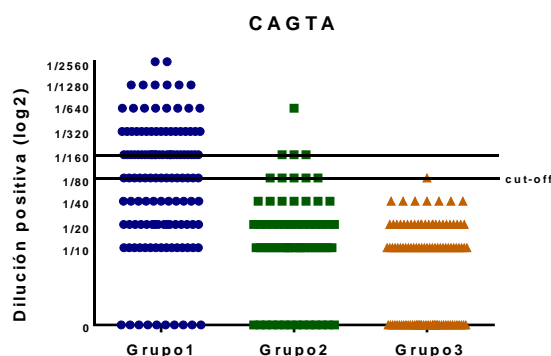


Figura 4.3. Distribución de los títulos CAGTA en todos los sueros de los pacientes en los 3 grupos de ensayo.



**Figura 4.4.** Distribución del título máximo de CAGTA en suero para cada paciente en los 3 grupos de ensayo.

La media geométrica de los títulos de CAGTA de los sueros de los pacientes del grupo G1 es muy superior a las medias de los otros dos grupos de pacientes y la diferencia con estos grupos control, pacientes con otras infecciones fúngicas (G2) o pacientes sin evidencia de infección fúngica (G3), eran estadísticamente significativas,  $p < 0,001$  (tabla 4.1.).

**Tabla 4.1.** Media geométrica de los títulos máximo de CAGTA para cada paciente en los 3 grupos y valores de p de la comparación entre grupos (significación estadística  $p < 0,05$ ).

Biomarcador	G1	G2	G3	p		
				G1- G2	G1- G3	G2- G3
CAGTA	66,64	11,64	5,22	< 0,001	< 0,001	0,05

\*G1: Grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3.

A la vista de estas diferencias entre grupos, se calcularon los índices de capacidad diagnóstica de la prueba (tabla 4.2.). Se realizaron los cálculos con dos puntos de corte, 1/160 y 1/80. A pesar de que el punto de corte más utilizado para la detección de CAGTA es 1/160, Martínez-Jiménez y colaboradores proponen el uso de 1/80 como punto de corte alternativo (Martínez-Jiménez et al., 2015), por ello, en nuestro estudio se compararon los resultados obtenidos con ambos puntos de corte. La técnica de detección de CAGTA ofrece buenos índices de utilidad diagnóstica a excepción de la sensibilidad, la cual no es muy alta (47-59%).



**Tabla 4.2.** Utilidad diagnóstica de la detección de CAGTA en función del punto de corte seleccionado, 1/80 [CAGTA (80)] o 1/160 [CAGTA (160)].

Punto de corte	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)
<b>CAGTA (80)</b>	59	94	88	76	79
<b>CAGTA (160)</b>	47	98	94	71	76

\*S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; A: eficacia.

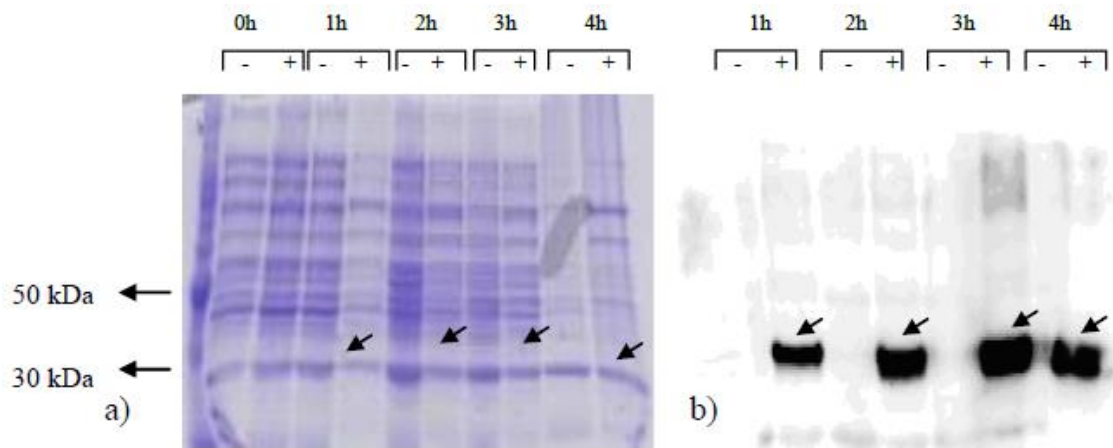
Es interesante resaltar la alta especificidad y VPP de la detección de CAGTA para el diagnóstico de la CI, sin embargo, la detección por IFI (inmunofluorescencia indirecta) presenta problemas de objetividad y automatización. Con el fin de soslayar estos inconvenientes de la técnica, se optó por desarrollar una metodología alternativa, como los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para detectar anticuerpos específicamente dirigidos contra las proteínas recombinantes Als3-N, Hwp1-N y Met6 de *C. albicans*. Estas proteínas habían sido identificadas entre los principales antígenos reconocidos por los CAGTA, siendo además las primeras para las que se detectaban anticuerpos específicos en etapas tempranas del proceso infeccioso en un modelo animal de candidiasis invasora en conejo (Sáez-Rosón, Sevilla & Moragues, 2014). Para ello hubo que producir y purificar las citadas proteínas previamente.

### **4.3. Desarrollo de pruebas ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a proteínas de *C. albicans***

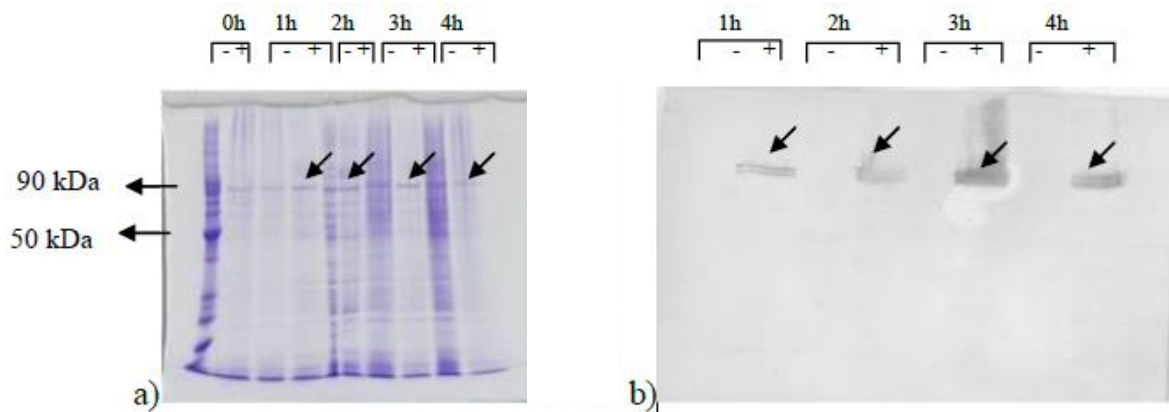
#### **4.3.1. Inducción de las proteínas recombinantes Hwp1-N y Met6**

La producción de las proteínas recombinantes Hwp1-N y Met6 en los cultivos de bacterias de *E. coli* previamente transformadas con su respectivo plásmido recombinante e inducidas con IPTG se comprobó mediante electroforesis. Como las tinciones de Coomassie no fueron concluyentes (Panel a) de la figura 4.5. y 4.6.) hubo que recurrir a la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal anti-HSVtag que reveló la presencia de las proteínas con el peso molecular esperado (Hwp1-N 30 kDa y Met6 86 kDa) en los extractos de los clones respectivos. Con el fin de obtener el máximo

rendimiento, la incubación se prolongó 4 h en presencia del inductor antes de proceder a la extracción y purificación de las proteínas recombinantes Hwp1-N y Met6.



**Figura 4.5.** Proceso de inducción de la proteína Hwp1-N. Extractos celulares separados por SDS-PAGE. Las muestras se tomaron cada hora durante 4 horas (0h, 1h, 2h, 3h, 4h) a partir de cultivos bacterianos sin IPTG (-) o inducidos con IPTG (+). Tinción con azul de Coomassie (a) y su correspondiente inmunodetección con anti-HSVtag (b).

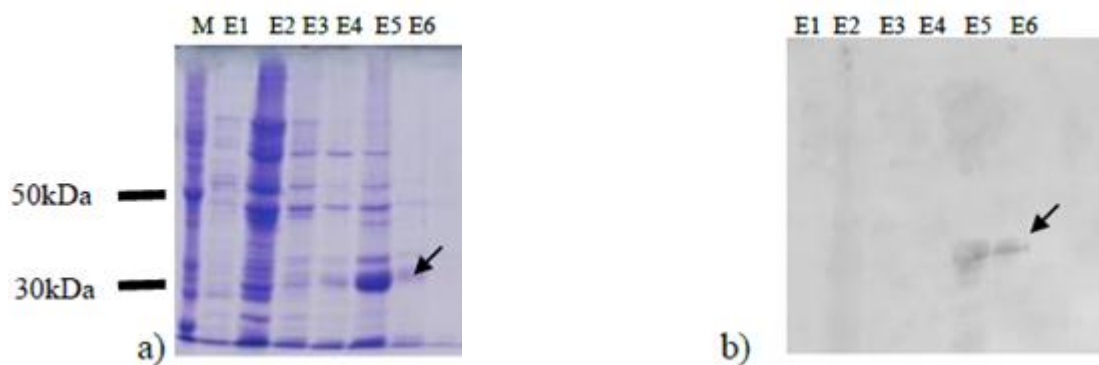


**Figura 4.6.** Proceso de inducción de la proteína Met6. Extractos celulares separados por SDS-PAGE. Las muestras se tomaron cada hora durante 4 horas (0h, 1h, 2h, 3h, 4h) a partir de cultivos bacterianos sin IPTG (-) o inducidos con IPTG (+). Tinción con azul de Coomassie (a) y su correspondiente inmunodetección con anti-HSVtag (b).

### 4.3.2. Purificación de las proteínas recombinantes Hwp1-N y Met6

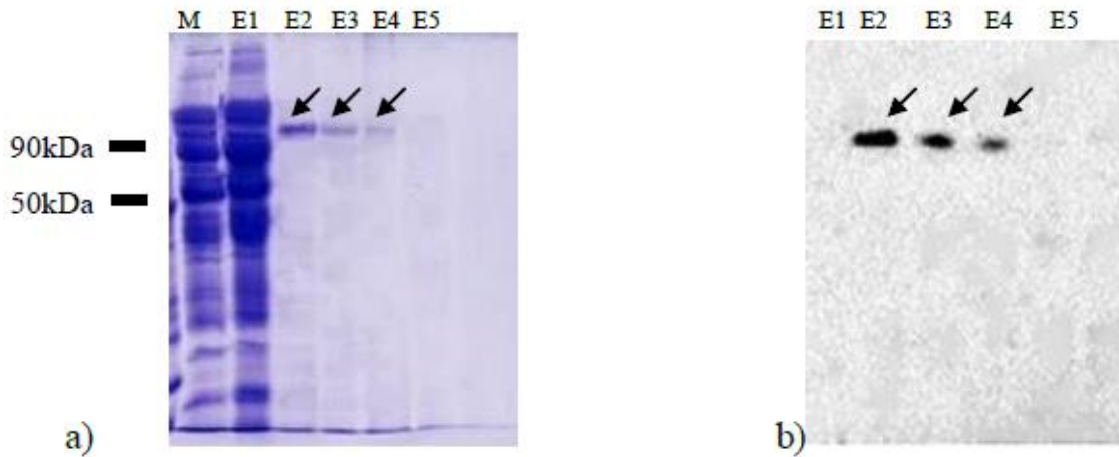
Una vez producidas las proteínas se procedió a la purificación de las mismas mediante cromatografía de afinidad. Se recogieron 5-6 fracciones de eluidos (E1-E6) de 5ml cada uno. Estas muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y se tiñeron con azul Coomassie. En geles paralelos se realizó un análisis con el anticuerpo monoclonal anti-HSVtag y con esta información se seleccionaron las fracciones que contenían la proteína de interés purificada, con el menor contenido de otras proteínas contaminantes.

En las figuras 4.7. y 4.8. se muestra un ejemplo de la composición de las fracciones a lo largo del proceso de purificación de las proteínas Hwp1-N y Met6 respectivamente. Se puede observar que las fracciones van perdiendo proteínas acompañantes y enriqueciéndose en la proteína seleccionada.



**Figura 4.7.** Evaluación de la purificación de la proteína Hwp1-N por cromatografía de afinidad. M: extracto crudo; E: Fracciones eluidas. Panel a) tinción con Coomassie. Panel b) inmunodetección con anti-HSVtag.

En la figura 4.7.a) se observa el gel con la tinción de azul de Coomassie donde se distingue en las fracciones E5 y E6 una banda de mayor intensidad correspondiente con el tamaño esperado de la proteína Hwp1-N. Aunque en el eluido E5, la banda de la proteína deseada tiene mayor intensidad que el resto de las bandas, se observan demasiados contaminantes por lo que se decidió utilizar solo el eluido E6.



**Figura 4.8.** Evaluación de la purificación de la proteína Met6 por cromatografía de afinidad. M: extracto crudo; E: Fracciones eluidas. Panel a) tinción con Coomassie. Panel b) inmunodetección con anti-HSVtag.

En la figura 4.8.a) se observa una tinción de azul de Coomassie donde se distingue en las fracciones E2, E3 y E4 una banda de mayor intensidad correspondiente con el tamaño esperado de la proteína Met6 sin mucha intensidad de otras proteínas acompañantes por lo que se escogieron los eluidos E2, E3 y E4 para concentrar la proteína.

### 4.3.3. Puesta a punto de las condiciones de ensayo

La proteína Als3-N ya estaba disponible en el laboratorio y por tanto no fue necesaria su obtención a escala preparativa.

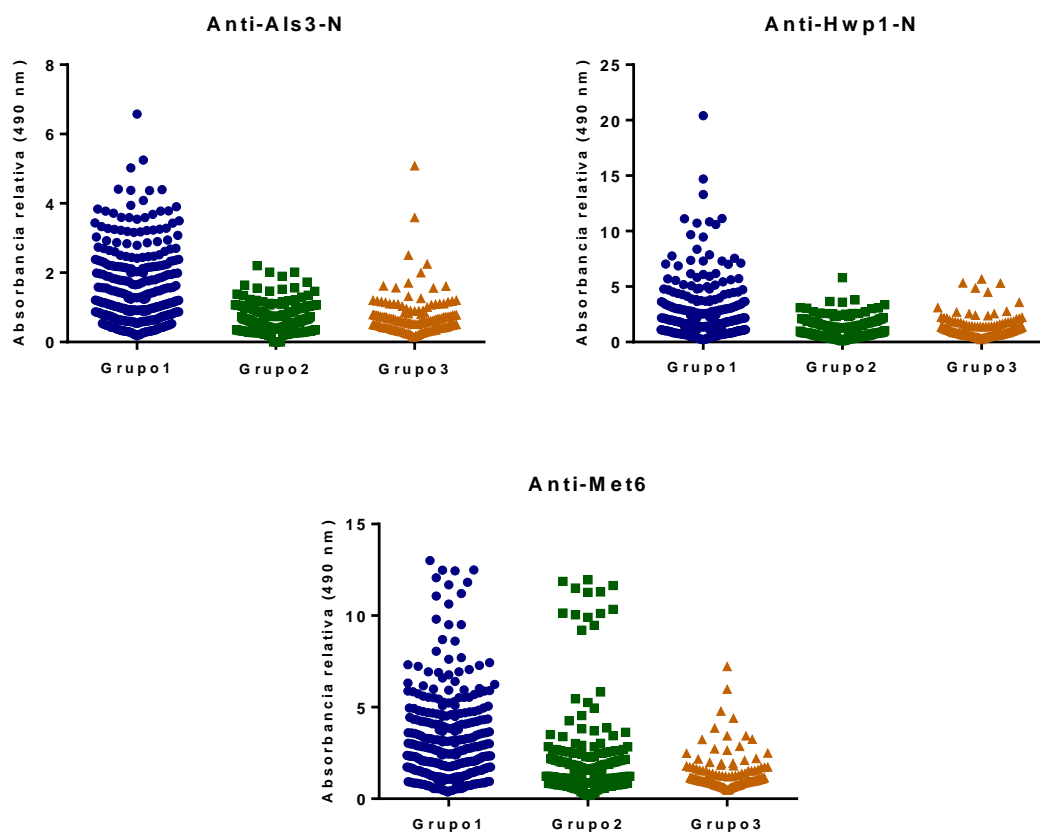
En primer lugar, se establecieron las mejores condiciones de ensayo para cada ELISA mediante una prueba de titulación en tablero de ajedrez. En la tabla 4.3. se indican la concentración de la solución de antígeno para su fijación en las placas de microtitulación (100  $\mu$ l/pocillo), la dilución de los sueros a ensayar y la dilución del anticuerpo secundario para obtener el mejor rendimiento en cada caso, es decir una mejor relación señal/ruido.

**Tabla 4.3.** Condiciones seleccionadas para el ensayo ELISA de los sueros con cada antígeno.

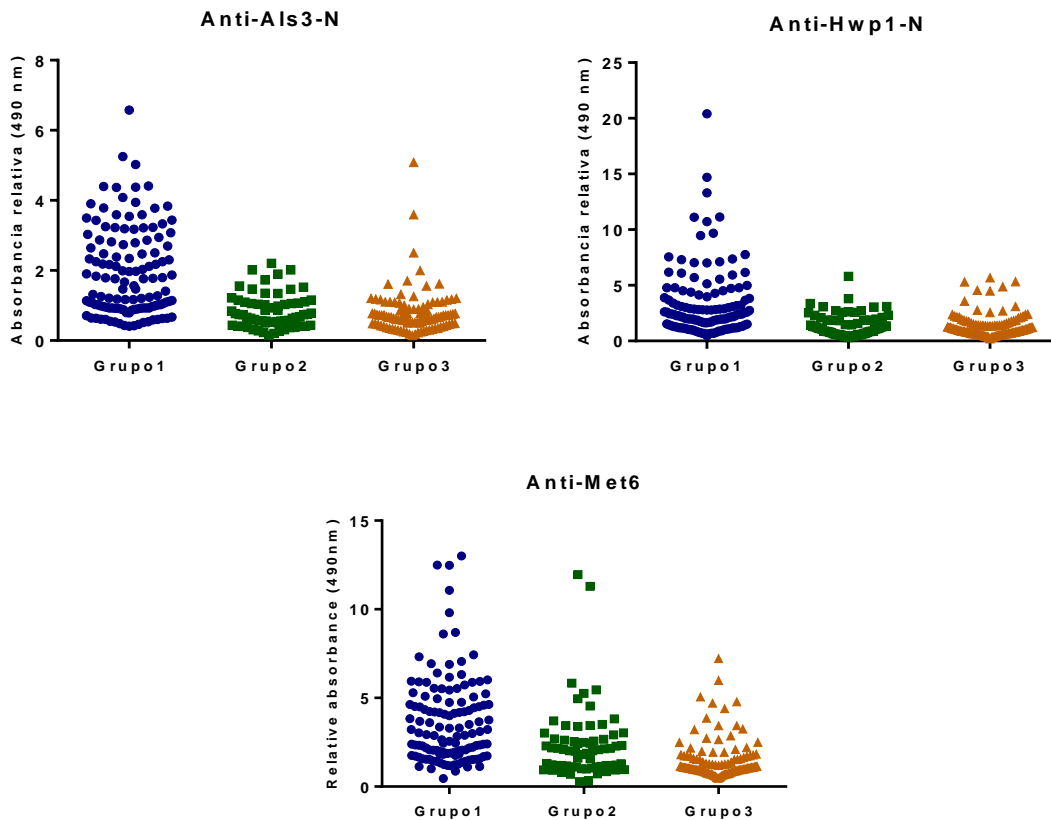
Antígeno	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Dilución del suero	Dilución del conjugado
Als3-N	0,325	1/200	1/1000
Hwp1-N	0,325	1/400	1/1000
Met6	1,25	1/100	1/1000

#### 4.4. Evaluación de la capacidad diagnóstica de la detección de anticuerpos frente a Als3-N, Hwp1-N y Met6

La figura 4.9. muestra los valores de absorbancia relativa obtenidos para todos los sueros ensayados en los 3 grupos de pacientes mediante las pruebas ELISA anti-Als3-N, anti-Hwp1-N y anti-Met6.

**Figura 4.9.** Distribución de los valores de absorbancia relativa de todos los sueros estudiados en los 3 grupos de pacientes para cada ensayo ELISA.

Debido a que en los grupos 1 y 2 se han analizado un número variable de sueros de cada paciente mientras que en el grupo 3 solo había uno o dos sueros por paciente se reorganizaron los datos teniendo en cuenta sólo el valor más alto entre los sueros de cada paciente.



**Figura 4.10.** Distribución de los resultados para el suero con valor máximo de absorbancia relativa de cada paciente en los 3 grupos para cada ensayo ELISA.

Como se muestra en la tabla 4.4., en todos los casos, las medias de absorbancia relativa de los sueros del grupo 1 fueron más altas que las registradas en los dos grupos control (grupo 2 y grupo 3). Para los tres antígenos, las diferencias entre las medias de las absorbancias relativas registradas en el grupo 1 con respecto a las de los grupos 2 y 3 fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). En contraste, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los grupos 2 y 3, salvo en el caso de la proteína Met6, cuyos resultados en el grupo de otras EFI no candidiásicas (G2) son superiores a los del grupo 3 (sin EFI) de forma estadísticamente significativa.

**Tabla 4.4.** Valores medios de absorbancia relativa de los sueros con título máximo de cada paciente en los 3 grupos estudiados y valores de p de la comparación entre grupos (significación estadística  $p < 0,05$ ).

Biomarcador	G1	G2	G3	p		
				G1- G2	G1- G3	G2- G3
Als3-N	1,935±1,255	0,831±0,481	0,796±0,644	< 0,001	<0,001	0,705
Hwp1-N	3,36±3,086	1,462±1,022	1,420±1,115	<0,001	<0,001	0,802
Met6	3,688±2,468	2,402±2,061	1,558±1,189	<0,001	<0,001	<0,001

\*G1: Grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3.

#### 4.4.1. Determinación del punto de corte óptimo

Con el fin de evaluar la capacidad diagnóstica de la detección de anticuerpos por ELISA, en primer lugar, se calculó el índice Youden para obtener el punto de corte de mayor rendimiento.

**Tabla 4.5.** Utilidad diagnóstica e índice de Youden para diferentes puntos de corte de la ELISA anti-Als3-N. Se resalta en verde el punto de corte con mayor índice de Youden.

Puntos de corte (absorbancia relativa)	S	E	Youden
0,25	1,000	0,041	0,041
0,5	0,960	0,269	0,229
0,75	0,849	0,585	0,434
0,8	0,833	0,649	0,482
0,86	0,833	0,673	0,506
0,9	0,810	0,702	0,511
1	0,690	0,725	0,416
1,1	0,627	0,801	0,428
1,2	0,579	0,860	0,439
1,23	0,563	0,877	0,441
1,3	0,540	0,883	0,423
1,4	0,532	0,901	0,432
1,5	0,508	0,912	0,420
1,6	0,500	0,930	0,430
1,7	0,492	0,942	0,434
1,8	0,452	0,953	0,406
1,9	0,437	0,953	0,390
2	0,405	0,965	0,370
2,1	0,397	0,977	0,373

2,2	0,357	0,977	0,334
2,3	0,341	0,982	0,324
2,4	0,310	0,982	0,292
2,5	0,294	0,982	0,276
2,6	0,286	0,988	0,274
2,7	0,270	0,988	0,258
2,8	0,254	0,988	0,242

\*S: sensibilidad; E: especificidad

El punto de corte óptimo de absorbancia relativa para las pruebas ELISA anti-Als3-N es 0,9, con un índice Youden de 0,511, y una sensibilidad del 81% y una especificidad del 70% (tabla 4.5.).

**Tabla 4.6.** Utilidad diagnóstica e índice de Youden para diferentes puntos de corte de la técnica ELISA anti-Hwp1-N. Se resalta en verde el punto de corte con mayor índice de Youden.

Puntos de corte (absorbancia relativa)	S	E	Youden
0,4	1,000	0,047	0,047
0,8	0,937	0,327	0,264
1,2	0,802	0,520	0,322
1,6	0,722	0,696	0,418
1,7	0,698	0,713	0,412
1,8	0,675	0,731	0,406
1,89	0,659	0,772	0,431
1,9	0,643	0,778	0,421
2	0,587	0,789	0,377
2,1	0,571	0,801	0,373
2,2	0,540	0,825	0,364
2,3	0,516	0,842	0,358
2,4	0,492	0,860	0,352
2,5	0,468	0,865	0,334
2,6	0,444	0,889	0,333
2,7	0,437	0,901	0,337
2,8	0,413	0,918	0,331
2,9	0,365	0,918	0,283
3	0,349	0,918	0,267
3,1	0,325	0,936	0,261
3,2	0,317	0,942	0,259
3,3	0,302	0,942	0,243



<b>3,4</b>	0,302	0,947	0,249
<b>3,5</b>	0,294	0,947	0,241
<b>3,6</b>	0,294	0,953	0,247
<b>3,7</b>	0,278	0,953	0,231
<b>3,8</b>	0,278	0,953	0,231
<b>3,9</b>	0,262	0,959	0,221
<b>4</b>	0,254	0,959	0,213
<b>4,1</b>	0,254	0,959	0,213
<b>4,2</b>	0,246	0,959	0,205
<b>4,3</b>	0,238	0,959	0,197
<b>5</b>	0,175	0,977	0,151

\*S: sensibilidad; E: especificidad

En el caso de las pruebas ELISA anti-Hwp1, el punto de corte que presenta el índice de Youden más elevado (0,431) es 1,89, el cual ofrece una sensibilidad del 66% y una especificidad del 77% (tabla 4.6.).

**Tabla 4.7.** Utilidad diagnóstica e índice de Youden para diferentes puntos de corte de la prueba ELISA anti-Met6. Se resalta en verde el punto de corte con mayor índice de Youden.

<b>Puntos de corte (absorbancia relativa)</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>Youden</b>
<b>0,5</b>	0,992	0,018	0,010
<b>1</b>	0,984	0,298	0,282
<b>1,5</b>	0,865	0,550	0,415
<b>1,52</b>	0,865	0,556	0,421
<b>1,6</b>	0,817	0,591	0,408
<b>1,7</b>	0,802	0,608	0,410
<b>1,8</b>	0,770	0,643	0,413
<b>1,9</b>	0,730	0,661	0,391
<b>2</b>	0,706	0,684	0,391
<b>2,1</b>	0,659	0,713	0,372
<b>2,2</b>	0,643	0,754	0,397
<b>2,3</b>	0,627	0,766	0,393
<b>2,4</b>	0,579	0,772	0,351
<b>2,5</b>	0,556	0,795	0,351
<b>2,6</b>	0,548	0,807	0,355
<b>2,7</b>	0,540	0,830	0,370
<b>2,8</b>	0,540	0,836	0,376
<b>2,9</b>	0,516	0,842	0,358

3	0,500	0,848	0,348
3,1	0,492	0,860	0,352
3,2	0,484	0,860	0,344
3,3	0,460	0,871	0,332
3,4	0,444	0,877	0,322
3,5	0,444	0,901	0,345
3,6	0,437	0,906	0,343
3,7	0,413	0,906	0,319
3,8	0,405	0,912	0,317
4	0,389	0,924	0,313
4,2	0,357	0,924	0,281
5	0,238	0,953	0,191

\*S: sensibilidad; E: especificidad

El mejor punto de corte para las pruebas ELISA anti-Met6 es 1,52, con un índice de Youden de 0,421, y una sensibilidad del 87% y una especificidad del 56% (tabla 4.7.).

#### 4.4.2. Determinación de la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos frente a Als3-N, Hwp1-N y Met6

Con los resultados obtenidos para los sueros con la absorbancia relativa más alta por paciente, se elaboraron las correspondientes tablas de contingencia y se evaluó su utilidad diagnóstica mediante el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficacia, cuyos valores se muestran en la tabla 4.8.

**Tabla 4.8.** Utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos frente a las proteínas recombinantes ensayadas.

Antígeno	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)
Als3-N	81	70	67	83	75
Hwp1-N	66	77	68	75	72
Met6	87	56	59	85	69

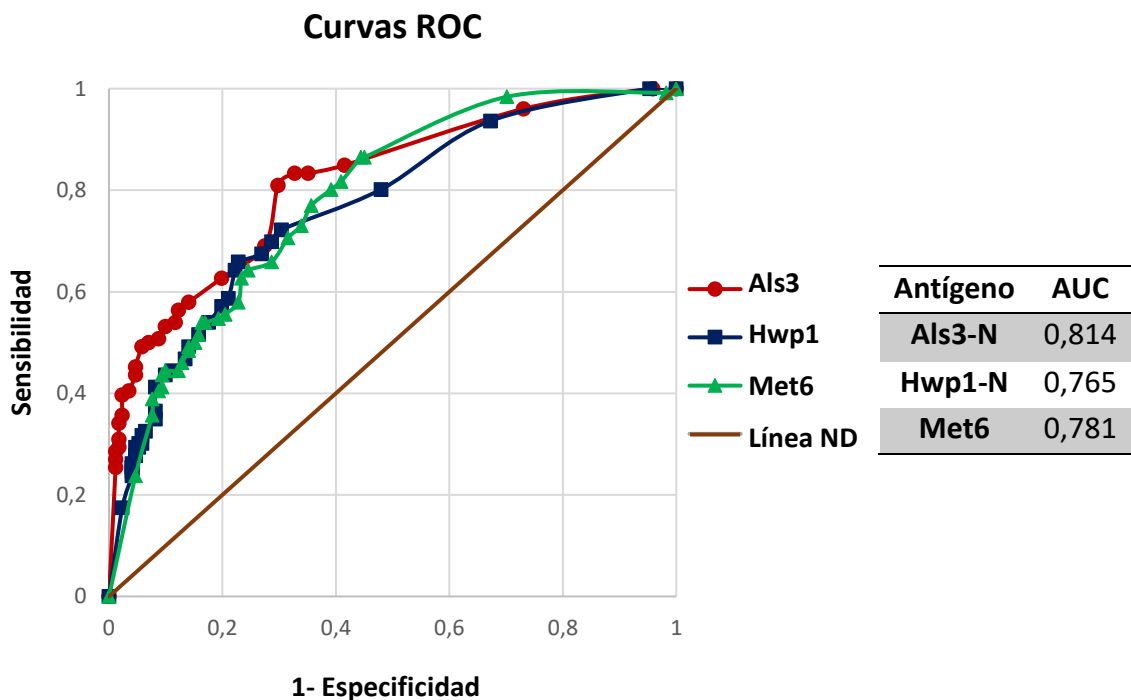
\*S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; A: eficacia.

La prueba de ELISA anti-Met6 es la que mayor sensibilidad ofrece, pero a su vez, es la menos específica. Anti-Hwp1-N, en cambio, es la prueba más específica de las tres, pero

la menos sensible. La prueba de detección de anticuerpos frente a Als3-N es la que mayor eficacia ofrece.

#### 4.4.2.1. Curvas ROC

Las curvas ROC son una representación gráfica para evaluar la capacidad diagnóstica de una prueba, y permiten comparar distintas técnicas basándose en su valor de área bajo la curva (AUC).

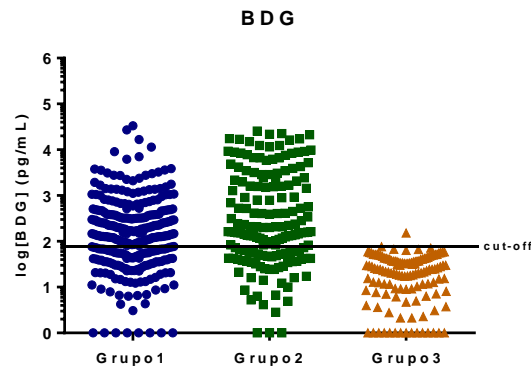


**Figura 4.11.** Curvas ROC y valores AUC para las pruebas ELISA anti-Als3-N, anti-Hwp1-N y anti-Met6.

La detección de anticuerpos anti-Als3-N muestra el mayor valor de AUC (0,814) en comparación con anti-Hwp1-N y anti-Met6, aunque presentan un valor similar de AUC (0,765 y 0,781 respectivamente), por lo que, atendiendo a este criterio, el ensayo ELISA anti-Als3-N es el que posee la mayor capacidad discriminativa de los tres antígenos estudiados (figura 4.11.).

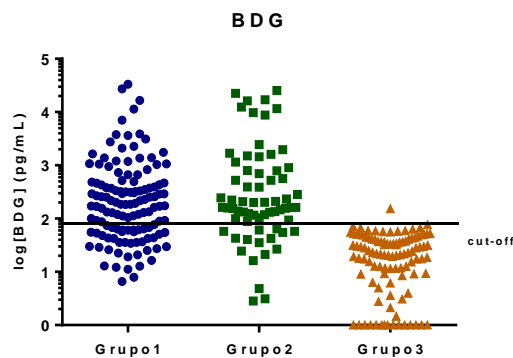
## 4.5. Evaluación de la capacidad diagnóstica de la detección de (1→3)-β-D-glucano

La figura 4.12. muestra los valores de concentración de BDG obtenidos para todos los sueros ensayados en los 3 grupos de pacientes.



**Figura 4.12.** Distribución de los valores de BDG para todos los sueros de los pacientes en los 3 grupos de ensayo.

Al igual que en los ensayos ELISA, se seleccionaron los datos del BDG atendiendo sólo al valor más alto entre los sueros de cada paciente (figura 4.13.) y con estos datos se calculó la media y la desviación estándar de los valores de BDG de los sueros de cada grupo de pacientes (tabla 4.9.).



**Figura 4.13.** Distribución de los valores máximos de BDG entre los sueros de cada paciente en los 3 grupos de ensayo.

**Tabla 4.9.** Valores medios de concentración de BDG (pg/ml) en suero considerando el valor más alto para cada paciente y valores de p de la comparación entre grupos (significación estadística  $p < 0,05$ ).

Biomarcador	G1	G2	G3	p		
				G1- G2	G1- G3	G2- G3
<b>BDG</b>	1196±4209	2211±5365	27,50±23,61	0,152	0,005	<0,001

\*G1: Grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3.

Los valores medios de BDG de los grupos 1 y 2 mostraron niveles elevados con diferencias significativas en relación al grupo 3, sin evidencia de EFI. Sin embargo, las diferencias entre el grupo 1 y el grupo 2 no fueron estadísticamente significativas, aunque los niveles de BDG en los pacientes con otras EFI fue muy superior al de los pacientes con candidiasis (tabla 4.9.).

**Tabla 4.10.** Utilidad diagnóstica de la detección de BDG para el diagnóstico de infecciones fúngicas en general (EFI) o sólo de candidiasis invasoras (CI).

Biomarcador	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)
<b>BDG (EFI)</b>	70	99	99	64	80
<b>BDG (CI)</b>	67	70	62	74	69

\*S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; A: eficacia.

Ya que el BDG es un marcador panfúngico, en la tabla 4.10. se muestran los resultados de la utilidad diagnóstica de la detección de BDG, tanto para la detección de EFI en general, como para la detección de CI. Mientras que los valores de sensibilidad son similares, la especificidad y el valor predictivo positivo caen drásticamente cuando consideramos solo las CI, sin tener en cuenta otras EFIs. De este modo, la detección de BDG para el diagnóstico de la CI podría ser útil solo en combinación con otras técnicas más específicas de la infección por *Candida*.

## 4.6. Concordancia entre las técnicas estudiadas y el hemocultivo

El índice Kappa expresa la concordancia entre dos pruebas diagnósticas. En la tabla 4.11. se muestra el índice Kappa de las técnicas estudiadas en nuestro trabajo con el hemocultivo, que actualmente constituye el *gold standard* en el diagnóstico de la CI.

**Tabla 4.11.** Concordancia entre las diferentes pruebas de ELISA, CAGTA y BDG con el hemocultivo.

Biomarcador	Kappa	Intervalo de confianza 95%
<b>CAGTA(80)</b>	0,553	(0,445 - 0,661)
<b>CAGTA(160)</b>	0,476	(0,375 - 0,577)
<b>Als3-N</b>	0,498	(0,385 - 0,609)
<b>Hwp1-N</b>	0,432	(0,319 - 0,546)
<b>Met6</b>	0,396	(0,291 - 0,501)
<b>BDG</b>	0,365	(0,251 - 0,479)

\*CAGTA(80): punto de corte 1/80; CAGTA(160): punto de corte 1/160.

El grado de acuerdo entre las pruebas ensayadas y el hemocultivo, fue moderado en el caso de CAGTA, ELISA anti-Als3-N y anti-Hwp1-N, e intermedio en el de la anti-Met6 y BDG.

## 4.7. Capacidad diagnóstica de las pruebas según la especie responsable de la infección

Se realizó un nuevo análisis de los datos para evaluar la sensibilidad de las pruebas ensayadas en función de la especie responsable de la CI en los pacientes del grupo 1.

**Tabla 4.12.** Proporción de casos detectados con cada prueba en función de la especie de *Candida* responsable de la infección en los pacientes del grupo 1.

Especie aislada	N	Als3-N(+)		Hwp1-N(+)		Met6(+)		BDG(+)		CAGTA(+) 1/80		CAGTA(+) 1/160	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C. albicans</i>	57	46	81%	39	68%	48	84%	44	77%	36	63%	35	61%
<i>C. glabrata</i>	26	21	81%	17	65%	23	88%	14	54%	20	77%	14	54%
<i>C. parapsilosis</i>	17	15	88%	12	71%	17	100%	10	59%	11	65%	6	35%
<i>C. tropicalis</i>	8	6	75%	4	50%	6	75%	4	50%	5	62%	3	37%
<i>C. krusei</i>	4	3	75%	2	50%	4	100%	2	50%	1	25%	0	0%
<i>C. guilliermondii</i>	3	2	67%	1	33%	2	67%	1	33%	0	0%	0	0%
<i>C. lusitaniae</i>	2	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	1	50%	1	50%
<i>C. kefyr</i>	1	1	100%	0	0%	1	100%	0	0%	1	100%	1	100%
<i>Candida spp.</i>	16	13	81%	11	69%	15	94%	10	62%	5	31%	4	25%
<b>Total</b>	<b>134</b>												

En esta tabla únicamente podremos analizar los resultados de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, ya que del resto de especies no están suficientemente representadas para poder sacar conclusiones. Los distintos ensayos reconocen las infecciones causadas por diferentes especies de *Candida* con un grado diferente de sensibilidad. En un análisis global podríamos decir que la detección de anticuerpos anti-Als3 y anti-Met6 muestra una sensibilidad mayor del 81% para las 3 especies más frecuentemente implicadas en la CI (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*). En contraste, la prueba anti-Hwp1 muestra una sensibilidad inferior y similar en la detección de las infecciones causadas por estas tres especies (65-71%).

El ensayo de BDG es más sensible en los casos de *C. albicans* (77%).

En el caso del ensayo CAGTA para un punto de corte 1/160, se obtuvieron bajos índices de sensibilidad, siendo la detección para *C. albicans* la más sensible con un 61%. Sin embargo, al bajar el punto de corte a 1/80 la sensibilidad aumenta considerablemente en todos los casos, salvo para las infecciones por *C. albicans*, en la que la sensibilidad se mantiene prácticamente igual.

## 4.8. Capacidad diagnóstica de la combinación de técnicas

Con el fin de aprovechar la capacidad diagnóstica de las diferentes pruebas ensayadas, se analizaron los resultados obtenidos para cada una de las pruebas de ELISA, la detección de CAGTA y de BDG, combinándolos entre ellos. Para ello, se consideró como paciente positivo aquel cuyo resultado fuera positivo al menos para una de las técnicas ensayadas, mientras que un paciente se consideró negativo cuando lo era para todas las pruebas.

**Tabla 4.13.** Utilidad diagnóstica de la combinación de las técnicas ensayadas y su concordancia con el hemocultivo.

Biomarcador	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)
Als3+Hwp1	85	61	61	85	71
Als3+Met6	94	43	55	89	64
Als3+BDG	91	50	57	89	68
Als3+CAGTA(80)	83	67	65	85	74
Als3+CAGTA(160)	81	69	66	83	74
Hwp1+Met6	90	47	56	87	65
Hwp1+BDG	87	55	59	85	69
Hwp1+CAGTA(80)	78	74	69	82	75
Hwp1+CAGTA(160)	75	76	70	80	75
Met6+BDG	96	43	53	94	66
Met6+CAGTA(80)	91	55	60	90	70
Met6+CAGTA(160)	91	56	61	90	71
BDG+CAGTA(80)	83	68	66	84	74
BDG+CAGTA(160)	76	70	61	80	72
Als3+Hwp1+Met6	93	38	52	88	61
Als3+Hwp1+BDG	93	44	55	89	65
Als3+Hwp1+CAGTA(80)	88	58	61	87	71
Als3+Hwp1+CAGTA(160)	87	60	62	87	72
Als3+Met6+BDG	97	35	52	94	61
Als3+Met6+ CAGTA(80)	94	43	55	90	64
Als3+Met6+ CAGTA(160)	94	43	55	90	65
Als3+BDG+CAGTA(80)	94	49	58	91	68
Als3+BDG+ CAGTA(160)	92	50	57	89	68
Hwp1+Met6+BDG	97	37	53	94	63
Hwp1+Met6+ CAGTA(80)	91	46	55	88	65
Hwp1+Met6+ CAGTA(160)	91	47	56	88	66
Hwp1+BDG+ CAGTA(80)	91	52	57	90	68
Hwp1+BDG+ CAGTA(160)	90	53	59	88	69



<b>Met6+BDG+ CAGTA(80)</b>	96	43	55	94	65
<b>Met6+BDG+ CAGTA(160)</b>	96	44	56	94	66
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG</b>	97	32	51	93	59
<b>Als3+Hwp1+Met6+ CAGTA(80)</b>	94	38	53	89	62
<b>Als3+Hwp1+Met6+ CAGTA(160)</b>	94	39	53	89	62
<b>Als3+Hwp1+ BDG+CAGTA(80)</b>	95	43	55	92	65
<b>Als3+Hwp1+ BDG+CAGTA(160)</b>	94	44	55	92	66
<b>Als3+Met6+ BDG+CAGTA(80)</b>	97	35	52	94	61
<b>Als3+Met6+ BDG+CAGTA(160)</b>	97	35	52	94	61
<b>Hwp1+Met6+BDG+ CAGTA(80)</b>	96	36	53	93	62
<b>Hwp1+Met6+BDG+ CAGTA(160)</b>	96	37	53	93	62
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG+ CAGTA(80)</b>	97	31	51	93	59
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG+ CAGTA(160)</b>	97	32	51	93	59

\*S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo;

A: eficacia; CAGTA(80): punto de corte 1/80; CAGTA(160): punto de corte 1/160.

Como se puede observar en la tabla 4.13. y comparando los resultados con los índices derivados de las pruebas individuales, los valores de sensibilidad se ven incrementados cuantas más combinaciones de técnicas realicemos, mientras que los de especificidad experimentan descensos. De hecho, no se observan datos de especificidad superiores al 60% en ninguno de los casos al combinar 3 o más técnicas, por lo que los mejores resultados se obtienen combinando únicamente dos técnicas. Aunque en las combinaciones con Met6 se obtienen valores de sensibilidad muy altos, los de especificidad son bastante bajos, lo que nos lleva a obtener valores de eficacia del 64-66%, o como mucho del 71% en combinación con CAGTA. Las mejores combinaciones son Als3+CAGTA, Hwp1+CAGTA y BDG+CAGTA(80) con eficacias del 74%, 75% y 74% respectivamente. Cabe destacar el elevado VPN en todas las combinaciones realizadas.

**Tabla 4.14.** Concordancia con el hemocultivo de las combinaciones de las diferentes pruebas de ELISA, CAGTA y BDG.

<b>Biomarcador</b>	<b>Kappa</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>
<b>Als3+Hwp1</b>	0,436	(0,328 - 0,544)
<b>Als3+Met6</b>	0,331	(0,236 - 0,425)
<b>Als3+BDG</b>	0,386	(0,286 - 0,486)
<b>Als3+CAGTA(80)</b>	0,488	(0,377 - 0,599)
<b>Als3+CAGTA(160)</b>	0,485	(0,373 - 0,596)
<b>Hwp1+Met6</b>	0,344	(0,246 - 0,442)
<b>Hwp1+BDG</b>	0,397	(0,293 - 0,509)

<b>Hwp1+CAGTA(80)</b>	0,506	(0,393 - 0,619)
<b>Hwp1+CAGTA(160)</b>	0,502	(0,388 - 0,615)
<b>Met6+BDG</b>	0,359	(0,266 - 0,451)
<b>Met6+CAGTA(80)</b>	0,433	(0,330 - 0,536)
<b>Met6+CAGTA(160)</b>	0,444	(0,341 - 0,548)
<b>BDG+CAGTA(80)</b>	0,493	(0,382 - 0,604)
<b>BDG+CAGTA(160)</b>	0,448	(0,335 - 0,560)
<b>Als3+Hwp1+Met6</b>	0,280	(0,190 - 0,371)
<b>Als3+Hwp1+BDG</b>	0,342	(0,247 - 0,438)
<b>Als3+Hwp1+CAGTA(80)</b>	0,440	(0,334 - 0,546)
<b>Als3+Hwp1+CAGTA(160)</b>	0,451	(0,344 - 0,558)
<b>Als3+Met6+BDG</b>	0,287	(0,202 - 0,372)
<b>Als3+Met6+CAGTA(80)</b>	0,332	(0,239 - 0,426)
<b>Als3+Met6+CAGTA(160)</b>	0,338	(0,244 - 0,432)
<b>Als3+BDG+CAGTA(80)</b>	0,395	(0,297 - 0,493)
<b>Als3+BDG+CAGTA(160)</b>	0,387	(0,288 - 0,486)
<b>Hwp1+Met6+BDG</b>	0,309	(0,222 - 0,397)
<b>Hwp1+Met6+CAGTA(80)</b>	0,345	(0,248 - 0,443)
<b>Hwp1+Met6+CAGTA(160)</b>	0,351	(0,253 - 0,449)
<b>Hwp1+BDG+CAGTA(80)</b>	0,408	(0,306 - 0,510)
<b>Hwp1+BDG+CAGTA(160)</b>	0,393	(0,291 - 0,495)
<b>Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	0,353	(0,261 - 0,445)
<b>Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	0,364	(0,271 - 0,458)
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG</b>	0,254	(0,173 - 0,336)
<b>Als3+Hwp1+Met6+CAGTA(80)</b>	0,287	(0,197 - 0,377)
<b>Als3+Hwp1+Met6+ CAGTA(160)</b>	0,293	(0,202 - 0,383)
<b>Als3+Hwp1+BDG+CAGTA(80)</b>	0,352	(0,258 - 0,445)
<b>Als3+Hwp1+BDG+CAGTA(160)</b>	0,356	(0,262 - 0,451)
<b>Als3+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	0,282	(0,197 - 0,366)
<b>Als3+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	0,287	(0,202 - 0,372)
<b>Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	0,291	(0,204 - 0,378)
<b>Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	0,297	(0,210 - 0,384)
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	0,249	(0,168 - 0,330)
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	0,254	(0,172- 0,336)

\*CAGTA(80): punto de corte 1/80; CAGTA(160): punto de corte 1/160.

Como era de esperar, la mejor correlación coincide con las combinaciones que alcanzaron los valores más altos de eficacia. Se compararon los datos de la tabla 4.14. con los resultados de la tabla 4.11., es decir, con los valores Kappa de las pruebas individuales. Todas las técnicas en combinación con CAGTA mejoraron su grado de concordancia con el hemocultivo, presentando valores Kappa cercanos a 0,5, a excepción de la combinación Met6+CAGTA (0,433-0,444). Hwp1+CAGTA(80) fue la combinación con mayor correlación con el hemocultivo (0,506), aun así sigue siendo un

valor Kappa inferior al de CAGTA(80) de manera individual, no así al resultado de CAGTA(160).

## 4.9. Capacidad diagnóstica de cada prueba en función del estado inmunológico de los pacientes

Existe una opinión bastante generalizada de que los pacientes inmunodeprimidos no desarrollarían niveles de anticuerpos detectables en pruebas serológicas. Dado que existía un grupo significativo de pacientes inmunodeprimidos (113) en nuestro estudio, se volvieron a analizar todos los datos obtenidos atendiendo al estado inmunológico de los pacientes, dividiéndolos en dos grupos: pacientes inmunocompetentes y pacientes inmunodeprimidos. A excepción de la prueba de detección de BDG, que de manera individual no varía en función del estado inmunológico del paciente, los datos del resto de técnicas se evaluaron de nuevo, e incluso se establecieron nuevos puntos de corte para cada grupo, como se muestra en la tabla 4.15.

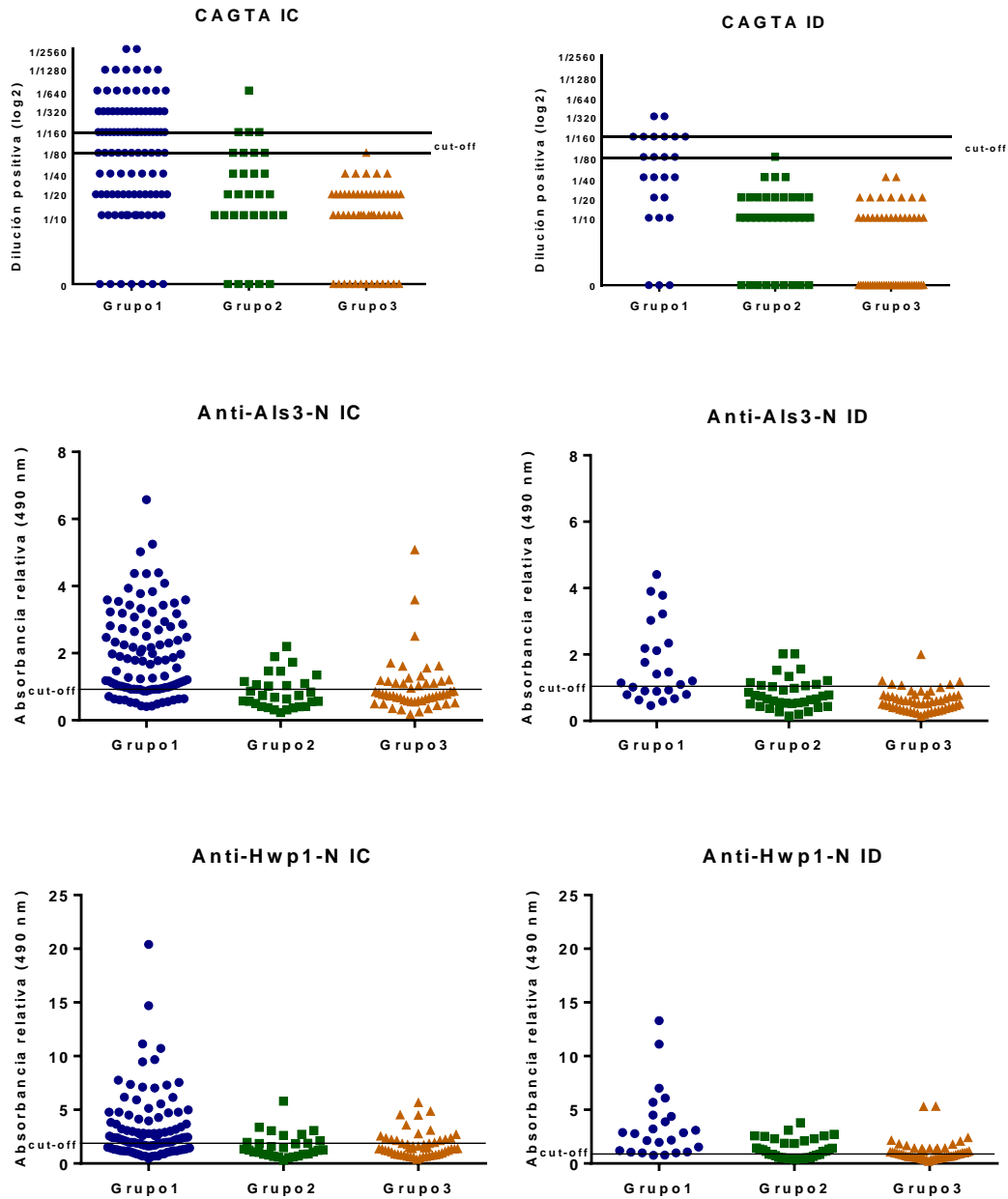
**Tabla 4.15.** Puntos de corte óptimos de las ELISA para pacientes inmunocompetentes (IC) e inmunodeprimidos (ID).

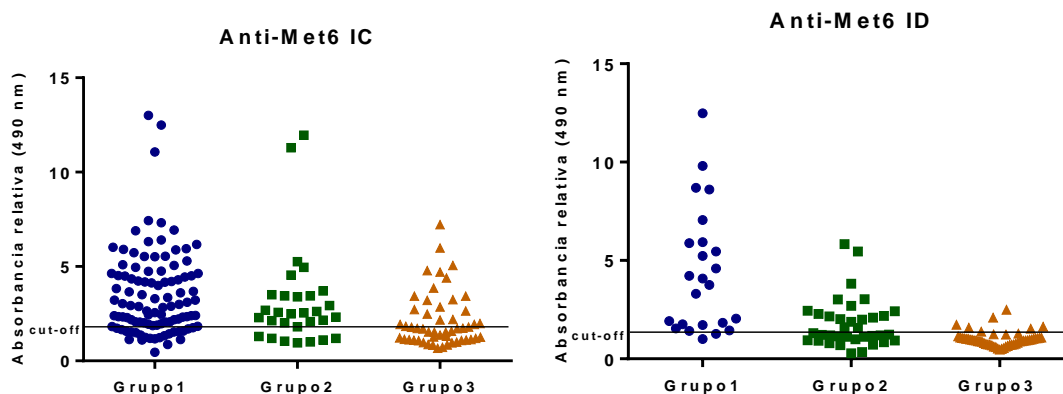
Antígeno	Puntos de corte	
	IC	ID
Als3-N	0,9	0,87
Hwp1-N	1,89	0,89
Met6	1,83	1,4

### 4.9.1. Capacidad diagnóstica de las técnicas en función del estado inmunológico de los pacientes

En las gráficas de la figura 4.14. se observa que los valores máximos de los sueros de los pacientes inmunocompetentes son superiores a los de los pacientes inmunodeprimidos. En general, un mayor número de valores se encuentran por encima del punto de corte

entre los pacientes inmunocompetentes del grupo 3 en comparación con los valores de los pacientes inmunodeprimidos. En la detección de CAGTA en pacientes inmunodeprimidos, solo se alcanzaron valores  $\geq 1/160$  en pacientes con CI del grupo 1.





**Figura 4.14.** Distribución de los valores máximos de títulos CAGTA y de absorbancia relativa entre los sueros de cada paciente en los 3 grupos de ensayo, en función de su nivel de competencia inmunológica: pacientes inmunocompetentes (IC) e inmunodeprimidos (ID).

En el caso de los pacientes inmunocompetentes (tabla 4.16.), las medias de absorbancia relativa y CAGTA de los pacientes del grupo 1 fueron superiores a las medias de los otros grupos en todas las pruebas diagnósticas. Las diferencias entre las medias de los grupos 1 y 3 fueron estadísticamente significativas en todos los casos, así como entre los grupos G1 y G2 a excepción de la ELISA anti-Met6.

**Tabla 4.16.** Media geométrica de los títulos de CAGTA y valores medios de absorbancia relativa de los sueros más altos de cada paciente inmunocompetente en los 3 grupos estudiados, y valores de p de la comparación entre grupos (significación estadística  $p < 0,05$ ).

Biomarcador	G1	G2	G3	Significación estadística (p)		
				G1- G2	G1- G3	G2- G3
<b>CAGTA</b>	76,15	18,40	8,39	0,0014	< 0,001	0,0098
<b>Als3-N</b>	1,991±1,274	0,853±0,51	0,987±0,813	< 0,001	< 0,001	0,419
<b>Hwp1-N</b>	3,313±3,073	1,614±1,144	1,729±1,172	<0,0036	< 0,001	0,668
<b>Met6</b>	3,526±2,273	3,13±2,577	2,131±1,438	0,418	< 0,001	0,0027

\*G1: Grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3.

En el caso de los pacientes inmunodeprimidos las medias de absorbancia de los pacientes del grupo 1 también fueron superiores a las medias de los otros grupos en todos los casos, y las diferencias estadísticamente significativas (tabla 4.17.).

**Tabla 4.17.** Media geométrica de los títulos de CAGTA y valores medios de absorbancia relativa de los sueros más altos de cada paciente inmunodeprimido en los 3 grupos estudiados, y valores de p de la comparación entre grupos (significación estadística  $p < 0,05$ ).

Biomarcador	G1	G2	G3	Significación estadística (p)		
				G1- G2	G1- G3	G2- G3
<b>CAGTA</b>	37,79	7,95	3,28	< 0,001	< 0,001	0,0079
<b>Als3-N</b>	1,698±1,169	0,813±0,461	0,609±0,333	< 0,001	< 0,001	0,0176
<b>Hwp1-N</b>	3,56±3,202	1,366±0,904	1,116±0,974	< 0,001	< 0,001	0,286
<b>Met6</b>	4,378±3,132	1,759±1,244	0,995±0,384	< 0,001	< 0,001	< 0,001

\*G1: Grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3.

Dado que existían diferencias significativas en los resultados para las diferentes pruebas, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos, se recalcularon los parámetros de valor diagnóstico para la CI en ambos grupos y se muestran para su comparación en la tabla 4.18.

**Tabla 4.18.** Utilidad diagnóstica de la detección de biomarcadores ensayados para pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos.

Biomarcador		S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)
<b>CAGTA (80)</b>	IC	61	89	87	65	73
	ID	50	98	86	88	88
<b>CAGTA (160)</b>	IC	50	95	93	60	70
	ID	33	100	100	85	86
<b>Als3-N</b>	IC	83	63	74	75	74
	ID	75	74	44	92	74
<b>Hwp1-N</b>	IC	66	71	74	62	68
	ID	75	49	29	88	55
<b>Met6</b>	IC	77	49	65	63	65
	ID	92	74	49	97	78
<b>BDG</b>	IC	68	76	78	68	71
	ID	62	65	33	87	65

\*S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; A: eficacia; CAGTA(80): punto de corte 1/80; CAGTA(160): punto de corte 1/160.

CAGTA es la prueba con mayor especificidad, sin embargo, los valores de sensibilidad son los más bajos tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. A pesar de su baja sensibilidad, CAGTA, con sus dos puntos de corte, es la prueba con mayor eficacia en pacientes inmunodeprimidos. La prueba ELISA anti-Als3-N es la que mayor sensibilidad muestra en pacientes inmunocompetentes (83%) entre las pruebas estudiadas. La prueba ELISA anti-Hwp1-N para pacientes inmunodeprimidos es la prueba con menor eficacia diagnóstica de todas las estudiadas, con un valor estimado de 55%. La prueba ELISA anti-Met6 parece la mejor para el diagnóstico de la CI en pacientes inmunodeprimidos, con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 74%.

**Tabla 4.19.** Concordancia con el hemocultivo de las diferentes pruebas de ELISA, CAGTA y BDG para pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos.

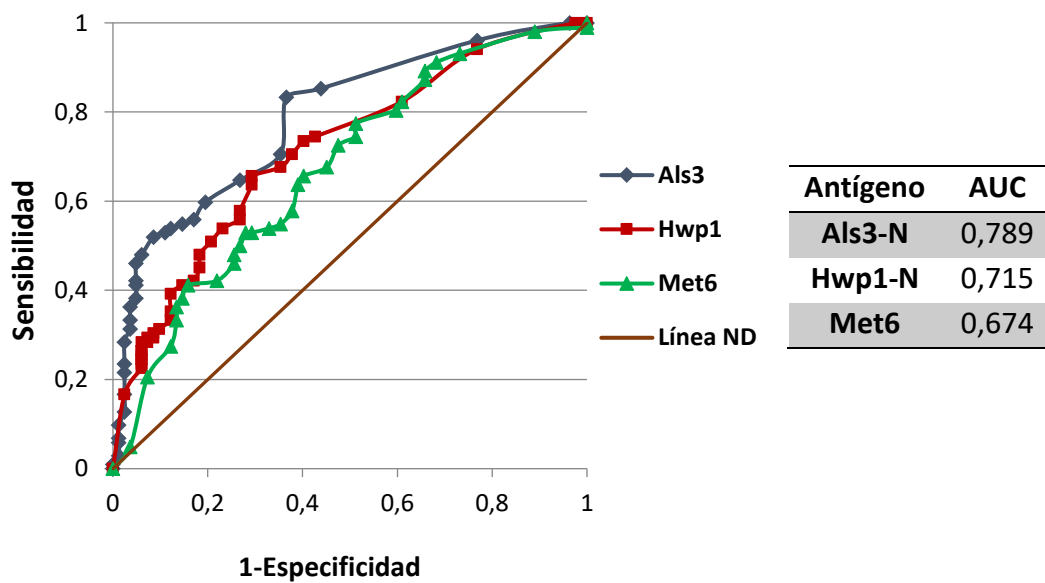
<b>Biomarcador</b>		<b>Kappa</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>
<b>CAGTA (80)</b>	<b>IC</b>	0,480	(0,344 - 0,617)
	<b>ID</b>	0,563	(0,388 - 0,738)
<b>CAGTA (160)</b>	<b>IC</b>	0,427	(0,301 - 0,553)
	<b>ID</b>	0,441	(0,288 - 0,593)
<b>Als3-N</b>	<b>IC</b>	0,475	(0,332 - 0,618)
	<b>ID</b>	0,391	(0,218 - 0,563)
<b>Hwp1-N</b>	<b>IC</b>	0,359	(0,216 - 0,503)
	<b>ID</b>	0,153	(0,013 - 0,294)
<b>Met6</b>	<b>IC</b>	0,268	(0,127 - 0,410)
	<b>ID</b>	0,499	(0,332 - 0,666)
<b>BDG</b>	<b>IC</b>	0,426	(0,283 - 0,569)
	<b>ID</b>	0,207	(0,041 - 0,373)

\*CAGTA(80): punto de corte 1/80; CAGTA(160): punto de corte 1/160.

En la tabla 4.19. podemos observar como la detección de CAGTA y la prueba ELISA anti-Als3-N son las técnicas para pacientes inmunocompetentes con mayor grado de acuerdo con el hemocultivo, con valores de Kappa de 0,480 y 0,475 respectivamente. La prueba CAGTA(80) también es la que mayor concordancia muestra con el hemocultivo en pacientes inmunodeprimidos con un índice Kappa de 0,563. La prueba ELISA anti-Met6 es la que menor índice Kappa obtiene para pacientes inmunocompetentes (0,268), sin

embargo, es la técnica, después de CAGTA(80), con mayor concordancia con el hemocultivo para pacientes inmunodeprimidos, 0,499. En estos últimos pacientes, la prueba de detección del BDG y la ELISA anti-Hwp1-N son las dos con peor correlación con el hemocultivo, presentando valores de índice Kappa 0,207 y 0,153 respectivamente.

#### 4.9.1.1. Curvas ROC

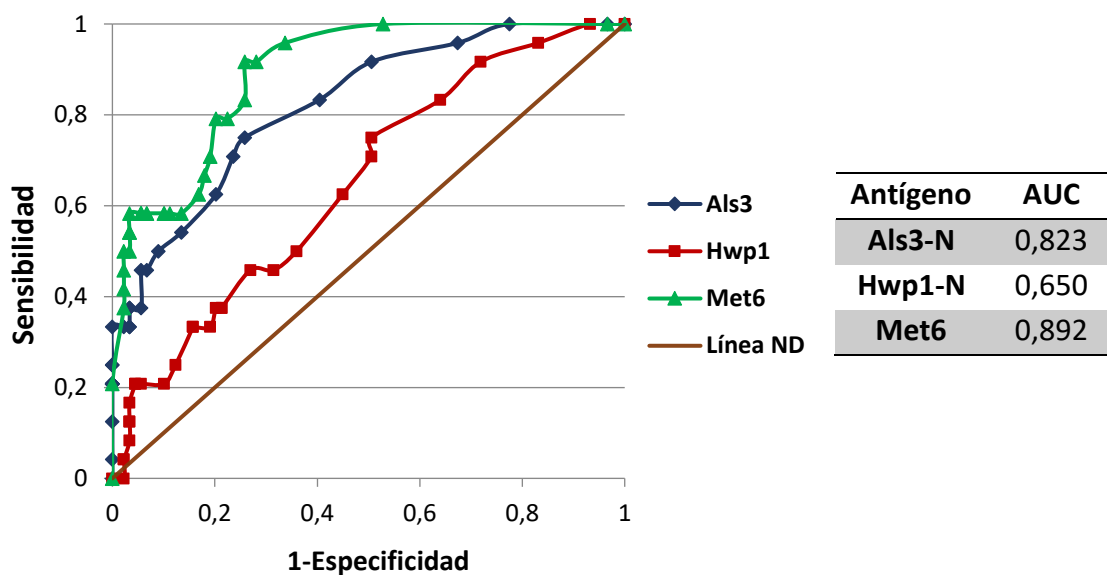


**Figura 4.15.** Curvas ROC y valor AUC (área bajo la curva) para las pruebas ELISA anti-Als3-N, anti-Hwp1-N y anti-Met6 en sueros de pacientes inmunocompetentes.

Comparando los valores AUC de la determinación de anticuerpos frente a los 3 antígenos en pacientes inmunocompetentes, la técnica ELISA anti-Als3-N tiene el valor más alto (0,789), y por tanto ofrece la mayor capacidad discriminadora, seguida por Hwp1-N y Met6.

Por el contrario, el análisis de estas pruebas en pacientes inmunodeprimidos reveló la mayor capacidad discriminadora en la detección de anti-Met6 (AUC 0,892), seguida por Als3-N y Hwp1-N (figura 4.16.).





**Figura 4.16.** Curvas ROC y valor de AUC para las pruebas ELISA anti-Als3-N, anti-Hwp1-N y anti-Met6 en sueros de pacientes inmunodeprimidos.

#### 4.9.1.2. Capacidad diagnóstica de la combinación de técnicas en función del estado inmunológico de los pacientes y concordancia con el hemocultivo

Dado que las pruebas mostraron diferente capacidad diagnóstica en función del estado inmunológico de los pacientes, se revisó el análisis de las diferentes combinaciones en los pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos por separado, siguiendo el mismo protocolo que en el apartado 4.6.

**Tabla 4.20.** Utilidad diagnóstica de la combinación de las técnicas ensayadas en pacientes inmunocompetentes y su concordancia con el hemocultivo.

Biomarcadores	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)	Kappa	Intervalo de confianza 95%
Als3+Hwp1	87	52	70	77	72	0,410	(0,272 - 0,548)
Als3+Met6	95	35	65	85	68	0,321	(0,200 - 0,441)
Als3+BDG	93	50	75	85	74	0,450	(0,317 - 0,583)
Als3+CAGTA(80)	89	60	73	82	76	0,503	(0,363 - 0,643)
Als3+CAGTA(160)	87	62	74	80	76	0,506	(0,364 - 0,647)
Hwp1+Met6	87	38	64	70	65	0,263	(0,133 - 0,392)
Hwp1+BDG	87	52	70	77	72	0,410	(0,272 - 0,548)
Hwp1+CAGTA(80)	77	65	73	70	72	0,424	(0,280 - 0,568)
Hwp1+CAGTA(160)	75	70	76	69	72	0,440	(0,295 - 0,584)
Met6+BDG	92	48	69	83	72	0,415	(0,282 - 0,547)

<b>Met6+CAGTA(80)</b>	86	51	69	75	71	0,387	(0,249 - 0,525)
<b>Met6+CAGTA(160)</b>	83	54	69	72	70	0,379	(0,239 - 0,520)
<b>BDG+CAGTA(80)</b>	84	72	79	77	79	0,567	(0,423 - 0,711)
<b>BDG+CAGTA(160)</b>	78	74	79	73	77	0,528	(0,383 - 0,672)
<b>Als3+Hwp1+Met6</b>	93	26	61	75	63	0,200	(0,089 - 0,312)
<b>Als3+Hwp1+BDG</b>	94	39	66	84	70	0,350	(0,226 - 0,474)
<b>Als3+Hwp1+CAGTA(80)</b>	91	49	69	82	72	0,416	(0,282 - 0,550)
<b>Als3+Hwp1+CAGTA(160)</b>	90	51	70	81	73	0,430	(0,294 - 0,565)
<b>Als3+Met6+BDG</b>	96	33	64	87	68	0,309	(0,193 - 0,425)
<b>Als3+Met6+CAGTA(80)</b>	95	34	64	85	68	0,311	(0,169 - 0,406)
<b>Als3+Met6+CAGTA(160)</b>	94	35	64	83	68	0,312	(0,192 - 0,433)
<b>Als3+BDG+CAGTA(80)</b>	94	46	69	86	73	0,424	(0,294 - 0,554)
<b>Als3+BDG+CAGTA(160)</b>	92	49	69	83	73	0,427	(0,294 - 0,560)
<b>Hwp1+Met6+BDG</b>	94	33	64	82	67	0,287	(0,169 - 0,406)
<b>Hwp1+Met6+CAGTA(80)</b>	89	37	64	73	66	0,271	(0,144 - 0,399)
<b>Hwp1+Met6+CAGTA(160)</b>	87	38	64	70	65	0,263	(0,133 - 0,392)
<b>Hwp1+BDG+CAGTA(80)</b>	91	50	69	82	73	0,428	(0,294 - 0,563)
<b>Hwp1+BDG+CAGTA(160)</b>	89	51	69	79	72	0,419	(0,282 - 0,555)
<b>Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	94	46	69	86	73	0,424	(0,294 - 0,554)
<b>Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	93	48	69	85	73	0,425	(0,294 - 0,557)
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG</b>	96	24	61	83	64	0,220	(0,115 - 0,325)
<b>Als3+Hwp1+Met6+CAGTA(80)</b>	95	26	61	81	64	0,222	(0,113 - 0,330)
<b>Als3+Hwp1+Met6+CAGTA(160)</b>	94	27	62	79	64	0,224	(0,112 - 0,336)
<b>Als3+Hwp1+BDG+CAGTA(80)</b>	95	35	65	85	68	0,323	(0,203 - 0,443)
<b>Als3+Hwp1+BDG+CAGTA(160)</b>	94	38	65	84	69	0,337	(0,214 - 0,461)
<b>Als3+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	97	32	64	90	68	0,307	(0,194 - 0,420)
<b>Als3+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	96	33	64	87	68	0,309	(0,193 - 0,425)
<b>Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	94	32	63	81	66	0,275	(0,157 - 0,392)
<b>Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	93	33	63	79	66	0,277	(0,157 - 0,396)
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	97	23	61	86	64	0,218	(0,116 - 0,320)
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	96	24	61	83	64	0,220	(0,115 - 0,325)

\*S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo;

A: eficacia; CAGTA(80): punto de corte 1/80; CAGTA(160): punto de corte 1/160.

Al igual que en las combinaciones de técnicas para todos los pacientes, las combinaciones dobles con CAGTA son las que mejores resultados ofrecen para pacientes inmunocompetentes (tabla 4.20.). Las mejores combinaciones son BDG+CAGTA y Als3+CAGTA, los cuales presentan una eficacia del 79% y 76%. Met6+CAGTA(80), a pesar de tener una alta sensibilidad (86%), tiene una eficacia del 71%, ya que la baja especificidad de la combinación (51%) impide una mayor capacidad diagnóstica. En este análisis, existen combinaciones triples con buenas eficacias (73%), pero aun así únicamente Als3+Hwp1+CAGTA(160) y Hwp1+BDG+CAGTA presentan una especificidad igual o mayor del 50%. Por lo que al igual que en las combinaciones

generales, las combinaciones dobles son las que mayor utilidad diagnóstica presentan, destacando las combinaciones con el ensayo CAGTA. Coincidiendo los mayores valores diagnósticos con una mayor concordancia con el hemocultivo, BDG+CAGTA(80) es la prueba con mayor correlación con el diagnóstico de referencia (Kappa= 0,567).

**Tabla 4.21.** Utilidad diagnóstica de la combinación de las técnicas ensayadas en pacientes inmunodeprimidos y su concordancia con el hemocultivo.

Biomarcador	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	A (%)	Kappa	Intervalo de confianza 95%
Als3+Hwp1	92	45	31	95	55	0,213	(0,086 - 0,340)
Als3+Met6	92	57	37	96	65	0,316	(0,171 - 0,462)
Als3+BDG	87	51	32	94	58	0,234	(0,097 - 0,372)
Als3+CAGTA(80)	83	73	45	94	75	0,432	(0,264 - 0,601)
Als3+CAGTA(160)	79	74	45	93	75	0,419	(0,248 - 0,590)
Hwp1+Met6	96	38	29	97	50	0,187	(0,072 - 0,301)
Hwp1+BDG	92	33	27	94	45	0,129	(0,022 - 0,236)
Hwp1+CAGTA(80)	92	48	32	96	58	0,239	(0,107 - 0,372)
Hwp1+CAGTA(160)	92	49	33	96	58	0,248	(0,115 - 0,382)
Met6+BDG	96	55	37	98	64	0,319	(0,179 - 0,460)
Met6+CAGTA(80)	92	74	49	97	78	0,499	(0,332 - 0,666)
Met6+CAGTA(160)	92	74	49	97	78	0,499	(0,332 - 0,666)
BDG+CAGTA(80)	75	65	37	91	67	0,291	(0,129 - 0,453)
BDG+CAGTA(160)	67	65	34	88	65	0,236	(0,071 - 0,400)
Als3+Hwp1+Met6	96	35	28	97	48	0,164	(0,055 - 0,273)
Als3+Hwp1+BDG	92	30	26	93	43	0,115	(0,012 - 0,218)
Als3+Hwp1+CAGTA(80)	92	44	31	95	54	0,205	(0,080 - 0,330)
Als3+Hwp1+CAGTA(160)	92	45	31	95	55	0,213	(0,086 - 0,340)
Als3+Met6+BDG	96	44	32	97	55	0,227	(0,103 - 0,351)
Als3+Met6+CAGTA(80)	92	57	37	96	63	0,316	(0,171 - 0,462)
Als3+Met6+CAGTA(160)	92	57	37	96	63	0,316	(0,171 - 0,462)
Als3+BDG+CAGTA(80)	87	51	32	94	58	0,234	(0,097 - 0,372)
Als3+BDG+CAGTA(160)	87	51	32	94	58	0,234	(0,097 - 0,372)
Hwp1+Met6+BDG	96	29	27	96	43	0,129	(0,030 - 0,228)
Hwp1+Met6+CAGTA(80)	96	38	29	97	50	0,187	(0,072 - 0,301)
Hwp1+Met6+CAGTA(160)	96	38	29	97	50	0,187	(0,072 - 0,301)
Hwp1+BDG+CAGTA(80)	92	33	27	94	45	0,129	(0,022 - 0,236)
Hwp1+BDG+CAGTA(160)	92	33	27	94	45	0,129	(0,022 - 0,236)
Met6+BDG+CAGTA(80)	96	55	37	98	64	0,319	(0,179 - 0,460)
Met6+BDG+CAGTA(160)	96	55	37	98	64	0,319	(0,179 - 0,460)
Als3+Hwp1+Met6+BDG	96	27	26	96	42	0,116	(0,021 - 0,210)
Als3+Hwp1+Met6+CAGTA(80)	96	35	28	94	47	0,143	(0,032 - 0,254)
Als3+Hwp1+Met6+CAGTA(160)	96	35	28	94	47	0,143	(0,032 - 0,254)
Als3+Hwp1+BDG+CAGTA(80)	92	30	26	93	43	0,115	(0,012 - 0,218)
Als3+Hwp1+BDG+CAGTA(160)	92	30	26	93	43	0,115	(0,012 - 0,218)
Als3+Met6+BDG+CAGTA(80)	96	44	32	97	55	0,227	(0,104 - 0,351)

<b>Als3+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	96	44	32	97	55	0,227	(0,104 - 0,351)
<b>Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	96	29	27	96	43	0,129	(0,030 - 0,228)
<b>Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	96	29	27	96	43	0,129	(0,030 - 0,228)
<b>Als3+Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(80)</b>	96	27	26	96	42	0,116	(0,021 - 0,210)
<b>Als3-Hwp1+Met6+BDG+CAGTA(160)</b>	96	27	26	96	42	0,116	(0,021 - 0,210)

\*S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; A: eficacia; CAGTA(80): punto de corte 1/80; CAGTA(160): punto de corte 1/160.

Las combinaciones de técnicas para el diagnóstico de la CI en pacientes inmunodeprimidos obtienen peores resultados que los registrados para los pacientes inmunocompetentes, como era de esperar, ya que 4 de las técnicas se basan en la detección de anticuerpos. Aun así, Als3+CAGTA continúa siendo una buena combinación diagnóstica con una eficacia del 75%. En contraste con los pacientes inmunocompetentes, la pareja Met6+CAGTA ofrece buenos resultados, siendo la combinación que mayor eficacia diagnóstica presenta (78%) y coincidiendo con el valor máximo de concordancia con el hemocultivo (0,499). En estos pacientes, la combinación de más de dos técnicas no ofrece ventajas diagnósticas.

#### **4.10. Selección de epítomos de las proteínas Als3-N, Hwp1-N y Met6**

Atendiendo primeramente a los criterios de selección de epítomos expuestos en el apartado 3.7., se seleccionó un determinante antigénico para cada una de las proteínas Als3-N, Hwp1-N y Met6 en base a diversos criterios como la accesibilidad superficial, la hidrofilia o hidrofobia, el hipotético carácter antigénico y por último la conformación espacial de la secuencia peptídica. Para determinar estos parámetros se usaron los recursos informáticos para la predicción de epítomos proporcionados por el portal “Immune Epitope Database and Analysis Resource”, que contiene una base de datos de epítomos conocidos y programas útiles para la detección de nuevos determinantes antigénicos en secuencias polipeptídicas de distintos organismos.

La exposición al solvente de la posible secuencia inmunogénica se estimó aplicando a cada residuo la escala establecida por Emini (Emini et al., 1985) para conocer su índice

de accesibilidad superficial. Siguiendo este criterio, existen más probabilidades de que un hexapéptido se encuentre accesible en la superficie cuando el valor del índice de accesibilidad es  $v \geq 1$ . Para estimar la estructura secundaria de un posible péptido antigénico se recurrió al algoritmo de Chou-Fasman (Chou & Fasman, 1978) que usa una escala de tendencia basada en la frecuencia con que aparecen los distintos aminoácidos en determinadas estructuras secundarias para predecir la estructura secundaria más probable que adoptará un péptido en función de su secuencia de aminoácidos. Para ponderar el carácter hidrofílico o hidrofóbico de la secuencia peptídica del posible determinante antigénico se usó el modelo de predicción de Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986), quién estableció una escala de hidrofilia para los aminoácidos en función de su tiempo de retención en una columna cromatográfica de fase reversa. Este método permite calcular un índice hidrofílico para heptapéptidos de secuencia variable y sugiere que aquellas secuencias peptídicas cuyo índice hidrofílico es un 25% mayor que el índice medio de la proteína se encuentran en la superficie de la misma, y por ello pueden ser dianas reconocidas por los anticuerpos. Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) desarrollaron un método semi-empírico basado en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos y su frecuencia de aparición en epítomos conocidos. La aplicación de este método a numerosas proteínas ha demostrado que este algoritmo sirve para predecir la presencia de determinantes antigénicos en las secuencias de las proteínas con una precisión del 75%.

Por último, Bepipred 2.0 es un método desarrollado para predecir la localización de epítomos lineales en las secuencias de las proteínas. La versión actualizada usa un algoritmo de “bosques aleatorios” que ha sido previamente entrenado con epítomos conocidos y secuencias no antigénicas obtenidas de las estructuras de numerosas proteínas cristalizadas. Según este método, aquellos residuos aminoácidos con valores superiores al umbral ( $v= 0.5$  por defecto) formarán parte de un determinante antigénico lineal.

Los epítomos seleccionados de las proteínas Als3-N, Hwp1-N y Met6 tienen una longitud de 16, 18 y 15 aminoácidos respectivamente. Se seleccionaron secuencias con

estructuras secundarias estables, es decir, con las mínimas variaciones estructurales posibles entre las disposiciones al azar (C), lámina beta (E) y hélice alfa (H).

#### 4.10.1. Als3-N

Se analizó la siguiente secuencia del extremo N-terminal de la proteína Als3 para la búsqueda de epítomos lineales:

```

1  DGTSASPGDT FTLNMPCVFK FTTSQTSVDL TAHGVKYATC QFQAGEEFMT FSTLTCTVSN
61  TLTP SIKA LGTVTLPLAF NVGGTGSSVD LEDSKCFTAG TNTVTFNDGG KKISINVDFF
121 RSNVDP KG YLDSRVIPS LNKVSTLFVA PQCANGYTSG TMGFANTYGD VQIDCSNIHV
181 GITKGLND WNYPVSSSEF SYTKTCSSNG IFITYKNVPA GYRPFVDAYI SATDVNSYTL
241 SYANEYTC

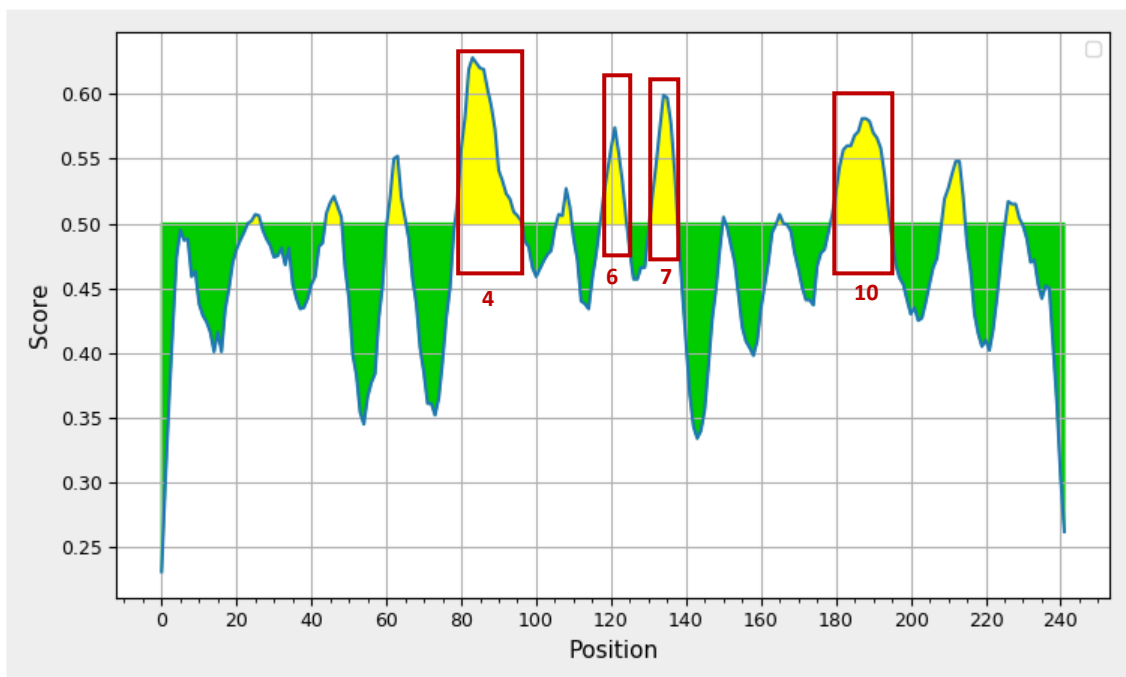
```

En la tabla 4.22. se muestran los determinantes antigénicos encontrados mediante el método Bepipred 2.0 y las características de estos. Esta predicción reveló doce péptidos potencialmente antigénicos.

**Tabla 4.22.** Predicción de epítomos lineales en la proteína Als3-N mediante Bepipred 2.0 y sus características.

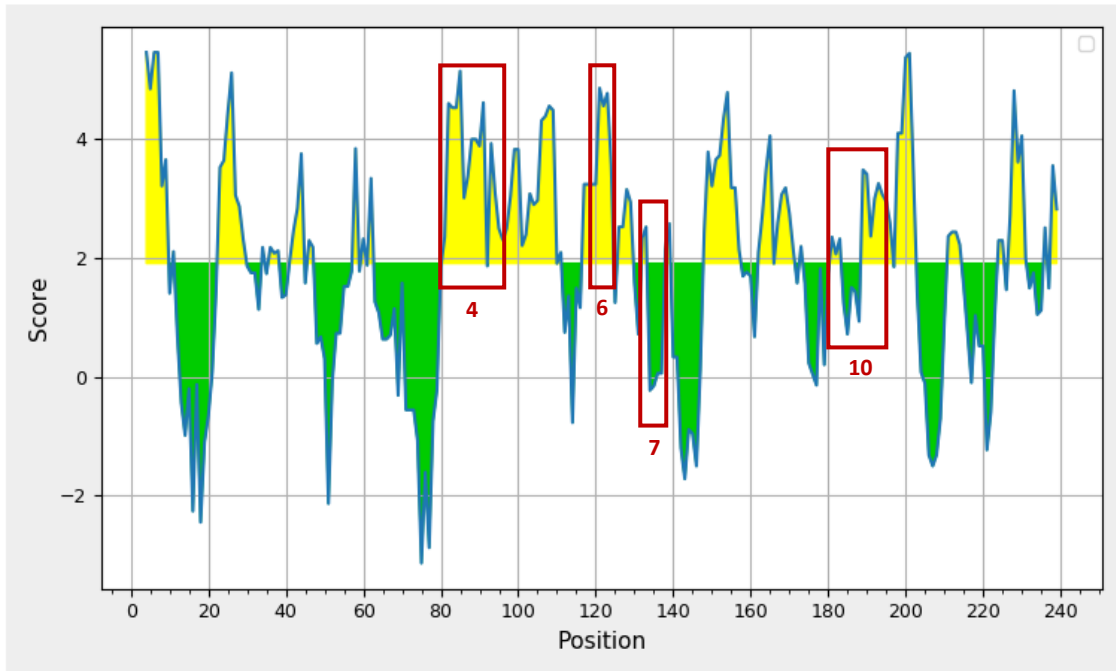
Nº	Inicio	Final	Secuencia	Longitud
1	24	27	SQTS	4
2	45	49	GEEFM	5
3	62	66	LTPSI	5
4	80	97	VGGTGSSVDLEDSKCFTA	18
5	107	110	GGKK	4
6	119	125	RSNVDPK	7
7	132	138	RVIPSLN	7
8	151	151	N	1
9	166	166	D	1
10	180	195	KGLNDWNYPVSSSEFS	16
11	210	215	KNVPAG	6
12	227	230	TDVN	4

De los doce péptidos encontrados únicamente 4 presentaron 7 o más residuos (nº 4, 6, 7 y 10). El resto de péptidos fueron descartados ya que se consideró que secuencias menores de siete residuos tendrían menos probabilidades de ser presentadas por las moléculas del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), además de ser menos específicas de una determinada proteína. El método de predicción de Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986) también utiliza una ventana de siete residuos para analizar la región de un epítipo, por lo que establecimos 7 residuos como límite inferior para seleccionar los péptidos.



**Figura 4.17.** Predicción de epítipos lineales en la proteína Als3-N mediante Bepipred 2.0. Se resalta con un cuadrado rojo la posición de los cuatro epítipos seleccionados.

A continuación, la secuencia de Als3-N fue sometida al análisis de Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986) para determinar el perfil hidrofílico de la misma (figura 4.18.).



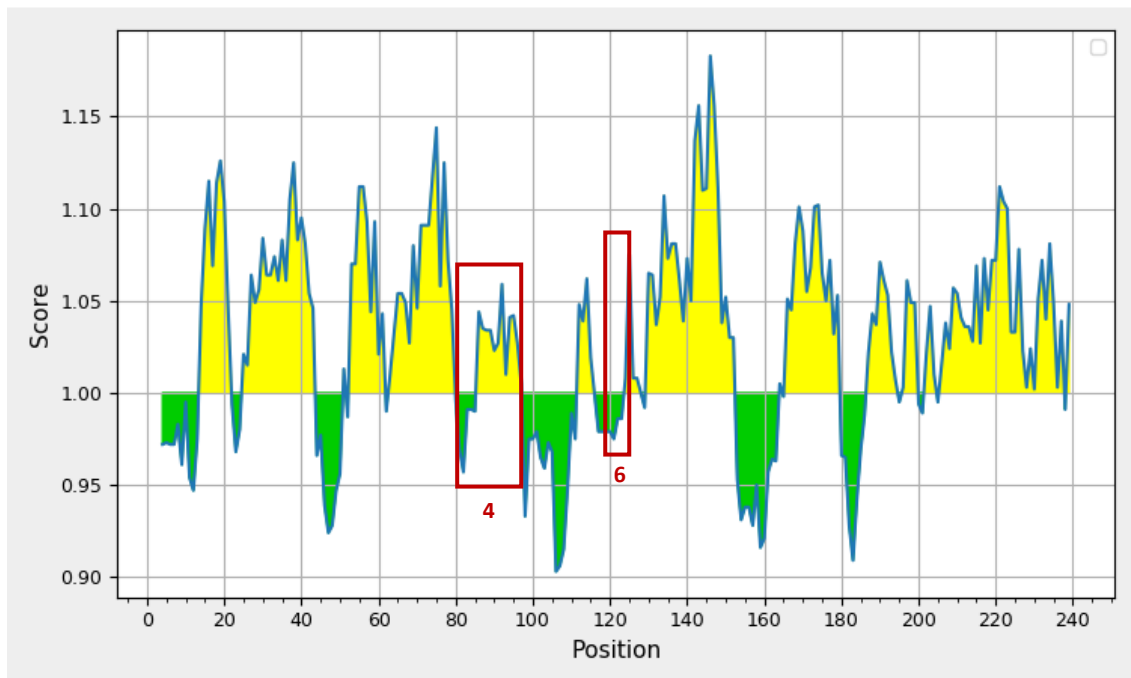
**Figura 4.18.** Representación gráfica de los valores de hidrofilia de la proteína Als3-N según el método Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986). Valor medio de la secuencia Als3-N 1,902. Coloreados en amarillo los segmentos hidrofílicos y en verde los segmentos hidrofóbicos. Se ha enmarcado la posición de los péptidos nº 4, 6, 7 y 10 identificados en el análisis Bepipred 2.0.

Para la determinación del carácter hidrofílico de la secuencia se estableció un umbral de 1,902, que es el valor medio de hidrofilia de la secuencia Als3-N. En la figura 4.18. se puede observar que los péptidos nº 4 y 6 se encuentran por encima del umbral establecido y tienen un valor medio de hidrofilia de 4,046 y 4,5 respectivamente, superando en más de un 25% al índice medio de la proteína, por lo que deberían estar expuestos en la superficie de la proteína. El péptido nº7 es hidrofóbico, ya que se encuentra totalmente por debajo del umbral y el péptido nº 10 presenta tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas, pero su valor medio no supera en un 25% el valor medio de hidrofilia de la proteína, por lo que ambos péptidos se alojarían en el interior de la proteína globular sin posibilidad de interacción con los anticuerpos.



Por consiguiente, los péptidos nº 7 y 10 fueron descartados como determinante antigénico por su carácter hidrofóbico. Además, el péptido nº10 ya ha sido utilizado en un estudio de inmunoprotección por Baer y colaboradores (Baer et al., 2012).

Posteriormente, se analizaron las características antigénicas de la secuencia N-terminal de la proteína Als3 mediante el método de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990).



**Figura 4.19.** Representación gráfica de los valores de potencia antigénica de la proteína Als3-N según el método propuesto por Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990). Se ha enmarcado la posición de los péptidos nº 4 y 6 identificados en el análisis Bepipred 2.0.

Como podemos apreciar en la figura 4.19., prácticamente la totalidad del péptido nº6 se encuentra por debajo del valor umbral 1 (coloreado de verde), ya que no dispone de residuos frecuentes en epítomos. Sin embargo, el péptido nº4 posee la mayoría de su secuencia por encima del umbral (coloreada de amarillo), puesto que de la posición 85 en adelante se encuentran los aminoácidos que suelen formar parte de los determinantes antigénicos. El valor medio de potencia antigénica para el péptido nº4 es 1,04.

A la vista de estos resultados se descartó el péptido nº6 y se optó por el péptido nº4 como péptido inmunogénico más idóneo, y se seleccionó la secuencia de aminoácidos FNVGGTGSSVDLEDSK. Se eliminaron los aminoácidos CFTA del extremo C-terminal del péptido 4, ya que era la zona menos antigénica de este y se añadieron los aminoácidos FN en el extremo N-terminal ya que con ellos el análisis Bepipred 2.0 mostraba un valor más alto de predicción de epítipo.

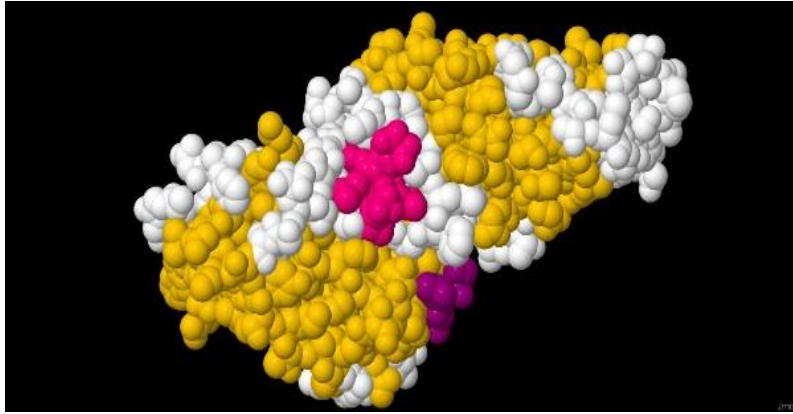
La región N-terminal de la adhesina Als3 de *Candida albicans* ha sido cristalizada y su estructura atómica fue resuelta en 2014 por Lin y colaboradores (Lin et al., 2014) y anotada en el banco de datos de proteínas como archivo 2LEB.pdb. En este caso, al tener los datos estructurales disponibles, no se usaron recursos informáticos de predicción para determinar la conformación espacial y el grado de exposición en superficie del péptido seleccionado. Se realizó un análisis con el programa informático Jmol, el cual permite observar la estructura tridimensional de las moléculas.

El péptido seleccionado se encuentra parcialmente incluido en la hélice alfa central que aparece coloreada de rosa en la figura 4.20. La parte restante del péptido está dispuesto al azar, en blanco.



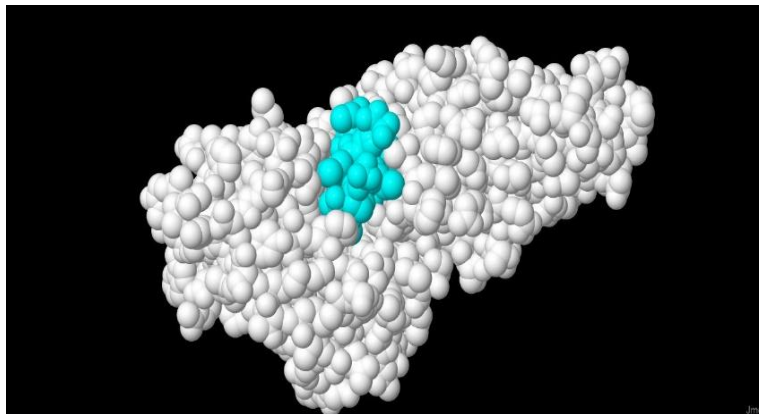
**Figura 4.20.** Esquema tridimensional de las estructuras secundarias de la proteína Als3-N mediante el programa Jmol.

En la figura 4.21., podemos apreciar como la parte superior de la hélice alfa aparece expuesta al solvente sin impedimento para la libre interacción entre ambos.



**Figura 4.21.** Representación tridimensional de todos los átomos de la proteína Als3-N con sus radios de van der Waals mediante el programa Jmol.

En la figura 4.22. se muestra la disposición espacial del péptido seleccionado como inmunogénico. A pesar de que una sección del péptido se encuentre oculto, una gran parte de él está expuesto en la superficie, lo que asegura la buena accesibilidad de esta región para la interacción con el solvente y los componentes del sistema inmunológico. Los datos estructurales expuestos permiten contrastar la fiabilidad de las predicciones anteriores con la conformación espacial de la proteína.



**Figura 4.22.** Estructura tridimensional de los átomos de la proteína Als3-N con sus radios de van der Waals representados mediante el programa Jmol. Los átomos coloreados en azul pertenecen al péptido seleccionado.

#### 4.10.2. Hwp1-N

En el caso de la proteína Hwp1, para la búsqueda de un determinante antigénico partimos de la siguiente secuencia del extremo N-terminal como diana:

```

1   MRLSTAQLIA IAYYMLSIGA TVPQVDGQGE TEEALIQKRS YDYYQEPCDD YPQQQQQQEP
61  CDYPQQQQQE EPCDYPQQ QPQEPCDYPQ QPQEPCDYPQ QPQEPCDYPQ QPQEPCDNPP
121 QPDVPCDNPP QPDVPCDNPP QP DIPCDN PPQPDIPCDN PPQPDQPDDN PPIPNIPTDW
181 IPNIPTDWIP DIPEKPTTPA TTPNIPATTT TSES SSSS SSSSSSTTPK TSASTTPESS
241 VPATTPNTSV PTTSESTTP ATSPESVVPV TSGSSILATT SESSSA PA TTPNTSVPTT
301 TTETKSSSTP LTTTTEHDTT VVTVTSCSN

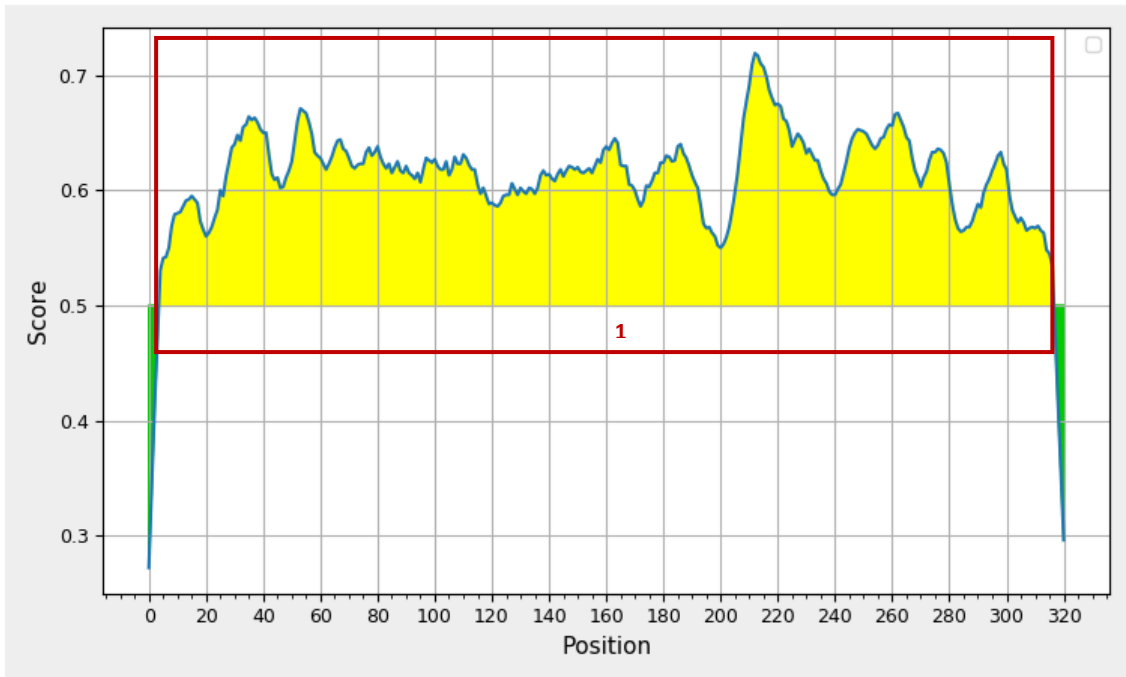
```

El análisis Bepipred 2.0 de Hwp1-N reveló un único epítipo, el cual abarca prácticamente la secuencia completa, de 313 residuos (tabla 4.23.).

**Tabla 4.23.** Predicción de los epítipos lineales en la proteína Hwp1-N mediante Bepipred 2.0 y sus características.

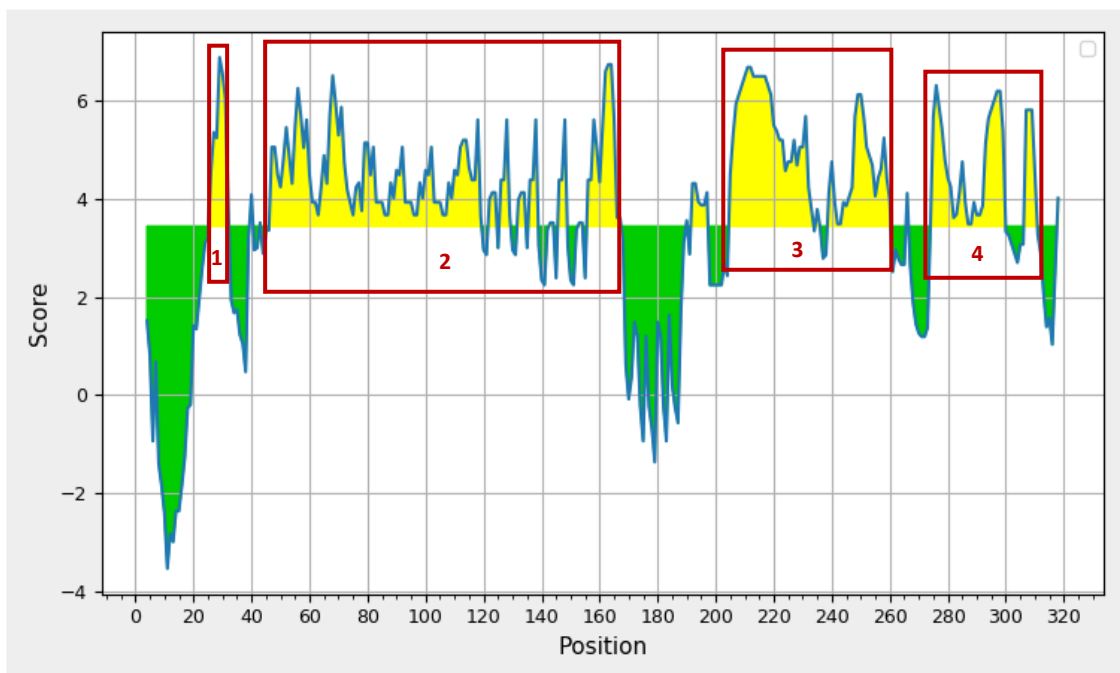
Nº	Inicio	Final	Secuencia	Longitud
1	5	317	TAQLIA IAYYMLSIGA TVPQVDGQGE TEEALIQKRS YDYYQEPCDD YPQQQQQQEP CDYPQQQQQE EPCDYPQQ QPQEPCDYPQ QPQEPCDYPQ QPQEPCDYPQ QPQEPCDNPP QPDVPCDNPP QPDVPCDNPP QP DIPCDN PPQPDIPCDN PPQPDQPDDN PPIPNIPTDW IPNIPTDWIP DIPEKPTTPA TTPNIPATTT TSES SSSS SSSSSSTTPK TSASTTPESS VPATTPNTSV PTTSESTTP ATSPESVVPV TSGSSILATT SESSSA PA TTPNTSVPTT TTETKSSSTP LTTTTEHDTT VVTVT	313

En este caso, no pudimos seguir la misma estrategia que habíamos utilizado con la proteína Als3-N para la selección de un determinante antigénico, ya que casi la totalidad de la secuencia está incluida como un único epítipo (figura 4.23.). Por ello, seleccionamos parte de la citada secuencia basándonos tanto en los criterios de selección del apartado 3.7.4. como en los recursos informáticos de predicción.



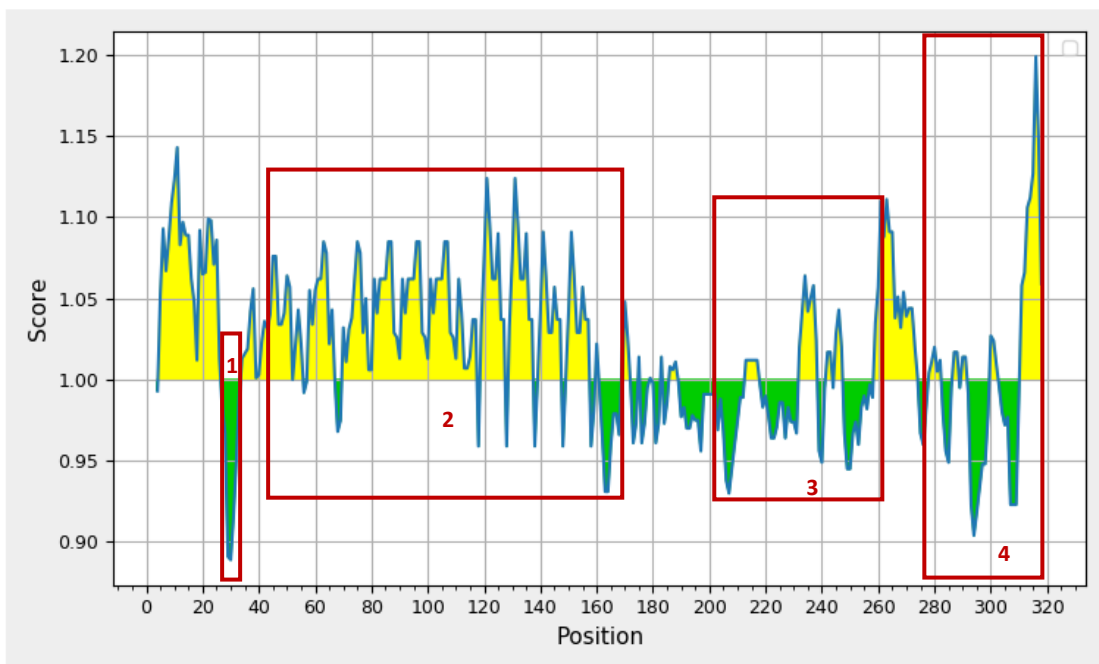
**Figura 4.23.** Predicción de epítomos lineales en la proteína Hwp1-N mediante Bepipred 2.0. Se resalta con un cuadrado rojo la posición del epítomo.

Se comenzó analizando la secuencia del péptido Hwp1-N por el método de Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986) para determinar la hidrofilia. El análisis muestra 4 regiones hidrofílicas en las que se obtuvieron valores de hidrofilia superiores al umbral 3,621, que es la media de hidrofilia del extremo N-terminal de la proteína Hwp1.



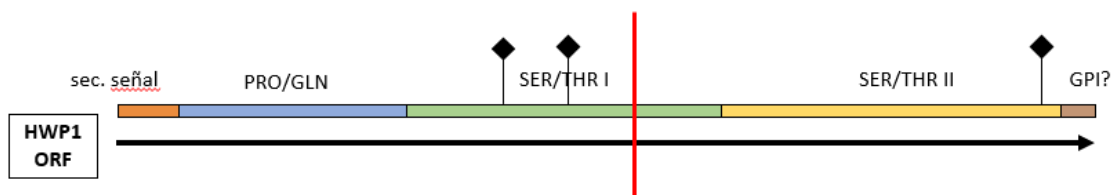
**Figura 4.24.** Representación gráfica de los valores de hidrofilia de Hwp1-N según el método Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986). En la imagen se remarca en rojo las 4 regiones hidrofílicas de la secuencia.

A continuación, se analizó el perfil antigénico de estas 4 regiones hidrofílicas de la secuencia N-terminal de la proteína Hwp1 mediante el método de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990).



**Figura 4.25.** Representación gráfica de los valores de potencia antigénica de Hwp1-N según el método propuesto por Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990). Se ha enmarcado la posición de las 4 regiones hidrofílicas.

El método de Kolaskar y Tangaokar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) predice valores de potencia antigénica por debajo del umbral en toda la región 1. Además, esta región contiene el péptido QGETEEALIQRSY, el cual ya ha sido utilizado en otro estudio de inmunoprotección frente a *Candida* por Hong Xin (Xin, 2016), por lo que fue descartada. Dado que las otras tres regiones (2, 3 y 4) contienen zonas potencialmente antigénicas nos apoyamos en el estudio de Staab y Sundstrom (Staab & Sundstrom, 1998), para reforzar nuestra selección.



**Figura 4.26.** Características estructurales de la secuencia completa de Hwp1 (Staab & Sundstrom, 1998). En la representación se muestra: el dominio rico en repeticiones prolina/glutamina, los 2 dominios ricos en repeticiones serina/treonina; y los sitios potenciales de N-glicosilación (asparagina-Xaa-serina) ◆ en los aminoácidos 241, 286 y 601. La línea roja delimita la secuencia Hwp1-N utilizada en nuestro estudio.

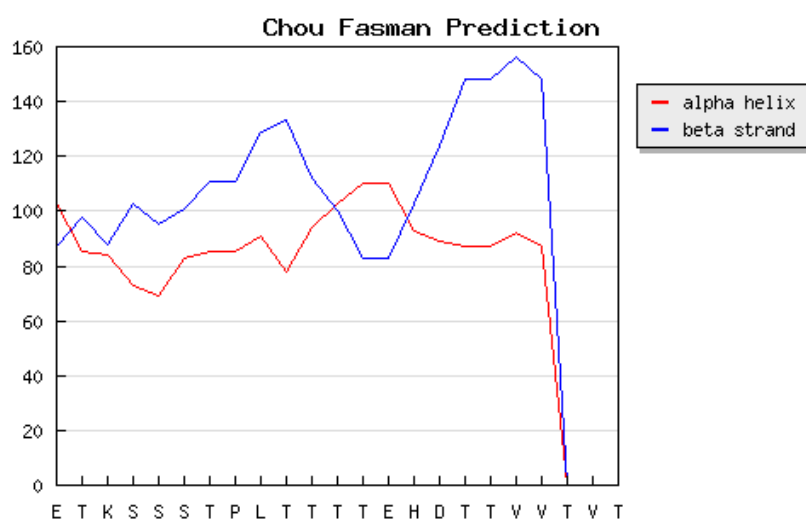
Staab y Sundstrom sugieren que el extremo N-terminal de la proteína Hwp1 es más antigénico y tiene menos probabilidades de ser glicosilado, pero también es una región rica en prolina y glutamina (región 2 en figura 4.25.). Resultó imposible seleccionar un péptido en esta región en el que no encontráramos 3 o más prolinas y/o glutaminas; por lo que, cumpliendo los criterios del apartado 3.7.4, esta región tuvo que ser descartada como posible determinante antigénico con el fin de evitar la formación de puentes de hidrógeno entre péptidos.

Las regiones 3 y 4 intercalan zonas potencialmente antigénicas (valores por encima del umbral) con otras zonas que no lo son, pero el extremo C-terminal de la región 4 registra el mayor pico de potencial antigénico en toda la secuencia Hwp1-N (figura 4.25.). Esta zona podría contener la secuencia ideal para determinante antigénico, por ello se seleccionó la secuencia ETKSSSTPLTTTTEHDTTVVT, al final de la región 4 (aas 295-317). Además, esta secuencia registró un valor de hidrofilia según el método de Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986) de 4,110, muy superior al valor de hidrofilia de la región 4 completa (1,929).

El epítipo seleccionado se encuentra en una región rica en residuos de serina y treonina; sin embargo, su secuencia no presenta más de 3 serinas, por lo que cumple el criterio de selección del apartado 3.7.4. A pesar de poseer muchas treoninas, esta secuencia no es una de las 3 zonas potenciales de N-glicosilación identificadas por Staab y Sundstrom (figura 4.26.).

El valor medio de potencia antigénica para nuestro epítipo es 1,01. A pesar de no ser un valor muy alto, como ya hemos comentado, esta secuencia registra el mayor pico de potencial antigénico en toda la proteína (figura 4.25.).

En el caso de la proteína Hwp1-N, no existen datos estructurales disponibles, por ello tanto la estructura espacial como su accesibilidad superficial se estimaron mediante métodos de predicción informática.



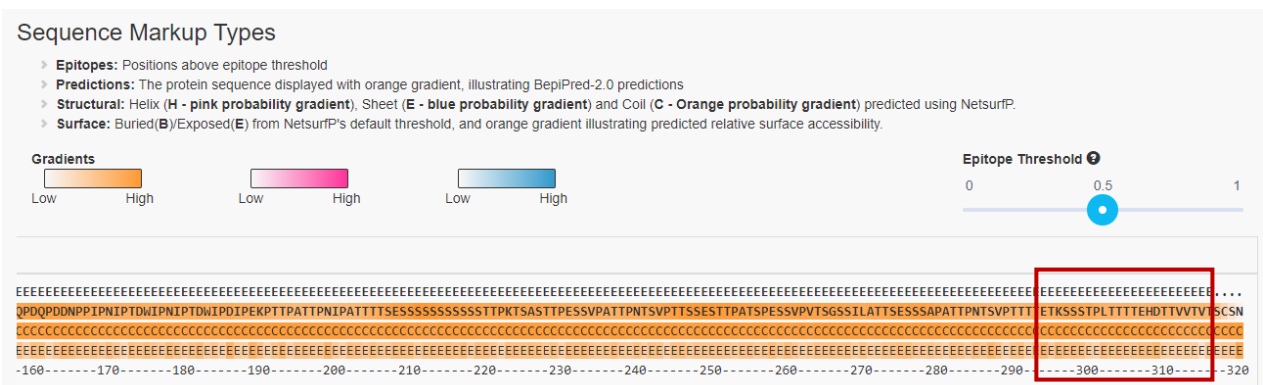
Chou-Fasman-Algorithm

	Pa	Pb	Pt	a	b	<Pa>	<Pb>	<Pt>	<pt>	St
1 E	144	51	74	H	B	103 *	87	103	4.62e-05	C
2 T	78	133	96	i	h	85	98	120	1.31e-04 *	C
3 K	121	73	101	h	b	84	88	132	1.01e-04 *	C
4 S	72	94	143	b	i	73	103 *	131	1.65e-04 *	C
5 S	72	94	143	b	i	69	95	133	7.37e-05	C
6 S	72	94	143	b	i	83	101 *	112	3.08e-05	E
7 T	78	133	96	i	h	85	111 *	100	7.36e-05	E
8 P	55	62	152	B	B	85	111 *	100	1.31e-05	E
9 L	130	117	59	H	h	91	129 *	86	3.38e-05	E
10 T	78	133	96	i	h	78	133 *	96	4.77e-05	E
11 T	78	133	96	i	h	94	112 *	90	3.86e-05	E
12 T	78	133	96	i	h	103 *	100 *	90	3.86e-05	C
13 T	78	133	96	i	h	110 *	83	102	3.89e-05	C
14 E	144	51	74	H	B	110 *	83	102	3.72e-05	C
15 H	112	83	95	h	i	93	103 *	108	7.91e-05 *	E
16 D	106	66	146	h	b	89	124 *	97	5.47e-05	E
17 T	78	133	96	i	h	87	148 *	73	1.38e-05	E
18 T	78	133	96	i	h	87	148 *	73	9.13e-06	E
19 V	97	164	50	i	H	92	156 *	61	1.03e-05	E
20 V	97	164	50	i	H	87	148 *	73	1.48e-05	E
21 T	78	133	96	i	h	0	0	0	0.00e+00	C
22 V	97	164	50	i	H	0	0	0	0.00e+00	C
23 T	78	133	96	i	h	0	0	0	0.00e+00	C

**Figura 4.27.** Predicción estructural del péptido seleccionado de la proteína Hwp1-N mediante el algoritmo de Chou-Fasman (Chou & Fasman, 1978) (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/MIX/>).



El algoritmo de Chou-Fasman (Chou & Fasman, 1978) (figura 4.27.) predice segmentos de estructura secundaria en lámina beta (E) para la secuencia seleccionada de la proteína Hwp1-N. Sin embargo, el análisis mediante BepiPred 2.0 predice una disposición estructural al azar (C) como se aprecia en la figura 4.28., donde también se muestra que la secuencia seleccionada aparece expuesta (E). Además, al someter el péptido seleccionado al método de Emini (Emini et al., 1985), la media de accesibilidad superficial es 1,812, lo que sugiere una alta probabilidad de que el péptido se encuentre accesible en la superficie de la proteína.



**Figura 4.28.** Resultado de la búsqueda de epítomos de la proteína Hwp1-N con la herramienta informática BepiPred 2.0. Se remarca en rojo la zona en la que se encuentra el epítomo seleccionado.

Tras la realización de los análisis de predicción previamente expuestos, se concluyó que el péptido elegido ETKSSSTPLTTTTEHDTTVVT es un buen candidato como determinante antigénico. Dado que la secuencia del péptido era demasiado larga en referencia a los criterios del apartado 3.7., se descartó incluir el extremo C-terminal (VVTVT) aumentando así la especificidad del anticuerpo resultante.

#### 4.10.3. Met6

Para la búsqueda de un determinante antigénico en la enzima Met6 se analizó la secuencia completa de la proteína:

1 MVQSSVLGFP RIGGQRELKK ITEAYWSGKA TVEELLAKGK ELREHNWKLQ QKAGVDIIPS  
 61 NDFSYYDQVL DLSLLFNA IPERYTKFDL APIDVLFAMG RGLQKKATET QAAVDVTALE  
 121 MVKWFDSNYH YVRPTFSHST EF KLNTAA GIKPVDEFNE AKALGVQTRP VILGPVSYLY  
 181 LGKADKDSL D LEPISLLPKI LPVYKELLQK LKEA GAEQ VQIDEPVLVL DLPEAVQSKF  
 241 KEAYDALVGA DVPELILTTY FGDVRPNLKA IENLPVAGFH FDFVRV PE QLDEVASILK  
 301 DGQTLSAGVV DGRNIWK TDF AKASAVVQKA IEKVGKDKVV VATSSSLLHT PVDLESET  
 361 KLDVIKDFW SFATQKLDEV VVIKNSVSGE DVSKQLEANA ASIKARSESS ITNDPKVQER  
 421 LTTINEALAT RKAAPER LTEQKAKYNL PLFPTTTIGS FPQTKDIRIN RNKFAKQIT  
 481 AEEYEFINK EIETVVRFQE EI GLDVLV HGEPERNM V QYFGEQLNGF AFTTNGWVQS  
 541 YGSRVVRPPI IVGDVSRPKA MTVKESVYAQ SITS KPMK GMLTGPVTIL RWSFPRDDVS  
 601 GKIQAQLGL ALRDEVNDLE GAGITVIQVD EPAIREGLPL RAGKER SD YLNWAAQSFR  
 661 VATSGVENST QIHSHFCYSD LDPNHIKALD ADVVSIEFSK KDDPNYIQEF SEYPNHIG  
 721 LGLFDIHSR IPSKQEFVSR IEEILKVYPA SKFWVNPDCG LKTRGWPEVK ESLTNMVEAA  
 781 KEFRAKY

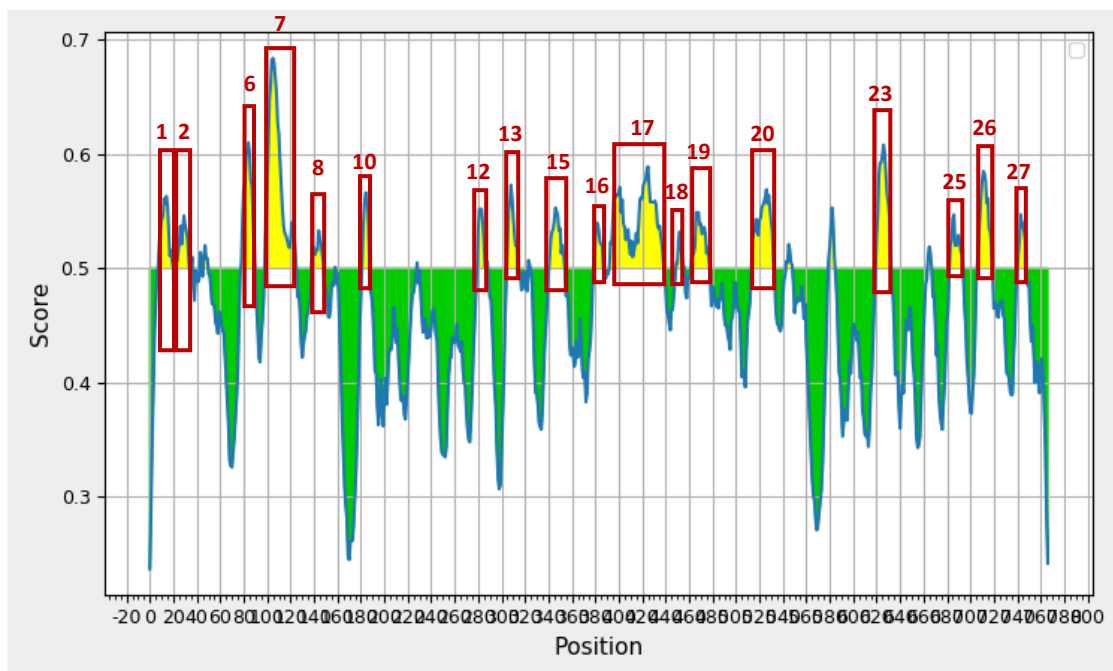
La tabla 4.24. muestra el resultado de la búsqueda de epítomos mediante el método Bepipred 2.0 y las características de éstos. La predicción mostró 27 determinantes antigénicos posibles.

**Tabla 4.24.** Predicción de los epítomos lineales en la proteína Met6 mediante Bepipred 2.0, y sus características

Nº	Inicio	Final	Secuencia	Longitud
1	8	20	GFPRIGGQRELKK	13
2	23	34	EAYWSGKATVEE	12
3	36	37	LA	2
4	44	45	EH	2
5	47	50	WKLQ	4
6	79	90	IPERYTKFDLAP	12
7	99	125	RGLQKKATETQAAVDVTALEMVKWFDS	27
8	139	149	EFKLNTAAGIK	11
9	159	159	A	1
10	182	188	KDSL DLE	7
11	229	229	A	1
12	281	289	PEQLDEVAS	9

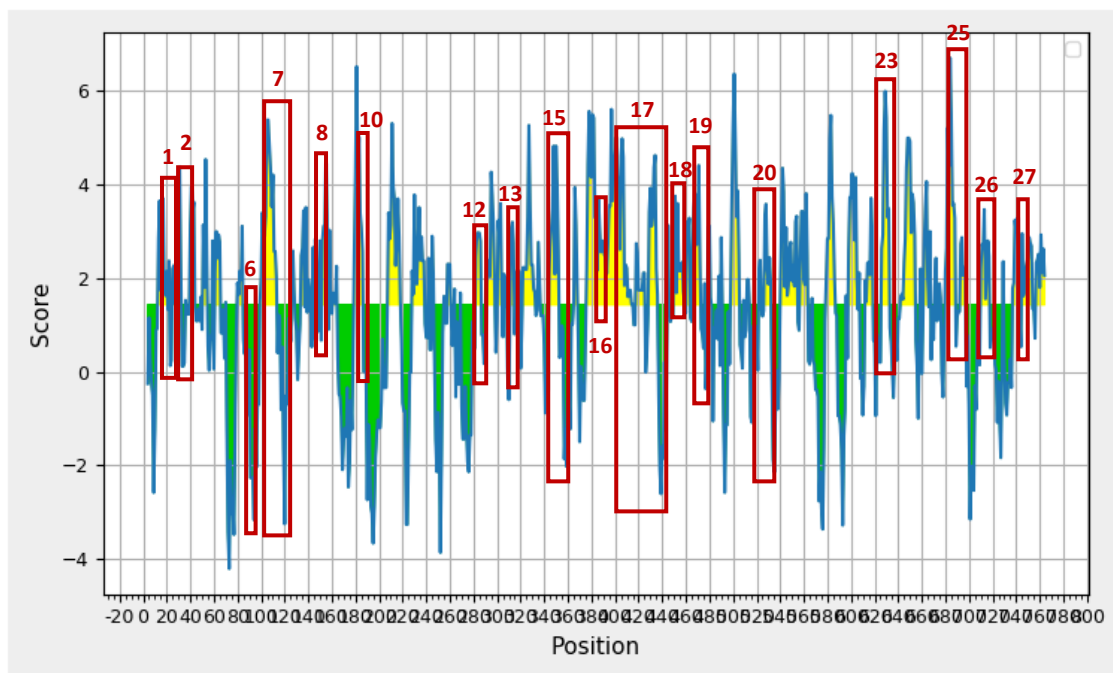
13	306	314	NIWKTDFAK	9
14	324	325	EK	2
15	342	355	TPVDLESETKLDAV	14
16	380	387	EDVSKQLE	8
17	394	439	KARSESSITNDPKVQERLTTINEALATRKAAFPERLTEQKAKYNLP	46
18	450	457	PQTKDIRI	8
19	463	478	AKGQITAEYEAFINK	16
20	515	533	GFAFTTNGWVQSYGSRVVR	19
21	544	549	PKAMTV	6
22	580	585	RDDVSG	6
23	621	633	GLPLRAGKERSDY	13
24	665	667	PNH	3
25	684	694	DDPNYIQEFSE	11
26	707	720	HSPRIPSKQEFVSR	14
27	741	748	LKTRGWPE	8

Al igual que se hizo para seleccionar un epítipo de Als3-N, de los 27 péptidos encontrados se seleccionaron únicamente los que tenían 7 o más residuos, reduciendo el número de opciones a 18, los cuales se muestran en la figura 4.29.



**Figura 4.29.** Predicción de epítipos lineales en la proteína Met6 mediante Bepipred 2.0. Se resalta con un cuadrado rojo la posición de los epítipos seleccionados.

Seguidamente, se analizó la secuencia de Met6 con el método de predicción de la hidrofilia de Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986).



**Figura 4.30.** Representación gráfica de los valores de hidrofilia de la proteína Met6 según el método Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986). Se ha enmarcado la posición de los péptidos nº 1, 2, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 26 y 27 identificados en el análisis Bepipred 2.0.

En la figura 4.30. se muestra el perfil hidrofílico de Met6. Se estableció el umbral en 1,431, siendo este el valor medio de hidrofilia de la proteína. Al ser una secuencia larga y tener una gran cantidad de péptidos, se estimó que una tabla con los valores de hidrofilia de cada péptido podría ayudar en la selección. La tabla 4.25. recoge el resultado:

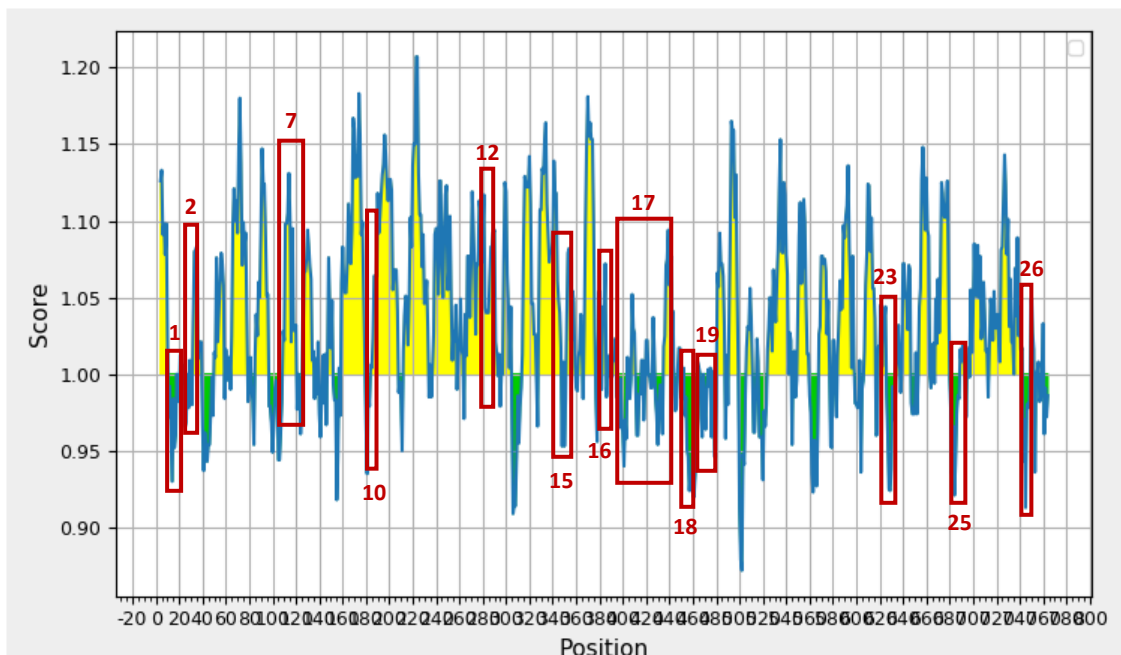
**Tabla 4.25.** Valores de hidrofilia de los péptidos de la proteína Met6 según el método Parker (Parker, Guo & Hodges, 1986).

Nº	Secuencia	Valores de hidrofilia
1	GFPRIGGQRELKK	2,494
2	EAYWSGKATVEE	2,638
6	IPERYTKFDLAP	1,548
7	RGLQKKATETQAAVDVTALEMVKWFDS	1,929
8	EFKLNTAAGIK	1,611

10	KDSLDE	3,086
12	PEQLDEVAS	2,910
13	NIWKDFAK	0,286
15	TPVDLESETKLDAV	3,439
16	EDVSKQLE	3,300
17	KARSESSITNDPKVQERLTTINEALATRKAAFFPERLTEQKAKYNLP	2,726
18	PQTKDIRI	2,879
19	AKGQITAEYEAFINK	2,466
20	GFAFTTNGWVQSYGSRVVR	1,712
23	GLPLRAGKERSDY	3,222
25	DDPNYIQEFSE	1,977
26	HSPRIPSKQEFVSR	2,509
27	LKTRGWPE	1,743

Se descartaron los péptidos nº 6, 8, 13, 20 y 27 porque su valor de hidrofilia no superó en más de un 25% el valor medio de hidrofilia de la proteína Met6. Quince péptidos continuaron siendo buenas opciones a determinante antigénico.

El análisis de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) determinó el perfil antigénico de la secuencia de la proteína Met6 (figura 4.31.).



**Figura 4.31.** Representación gráfica de los valores de potencia antigénica de Met6 según el método propuesto por Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990). Se ha enmarcado la posición de péptidos.

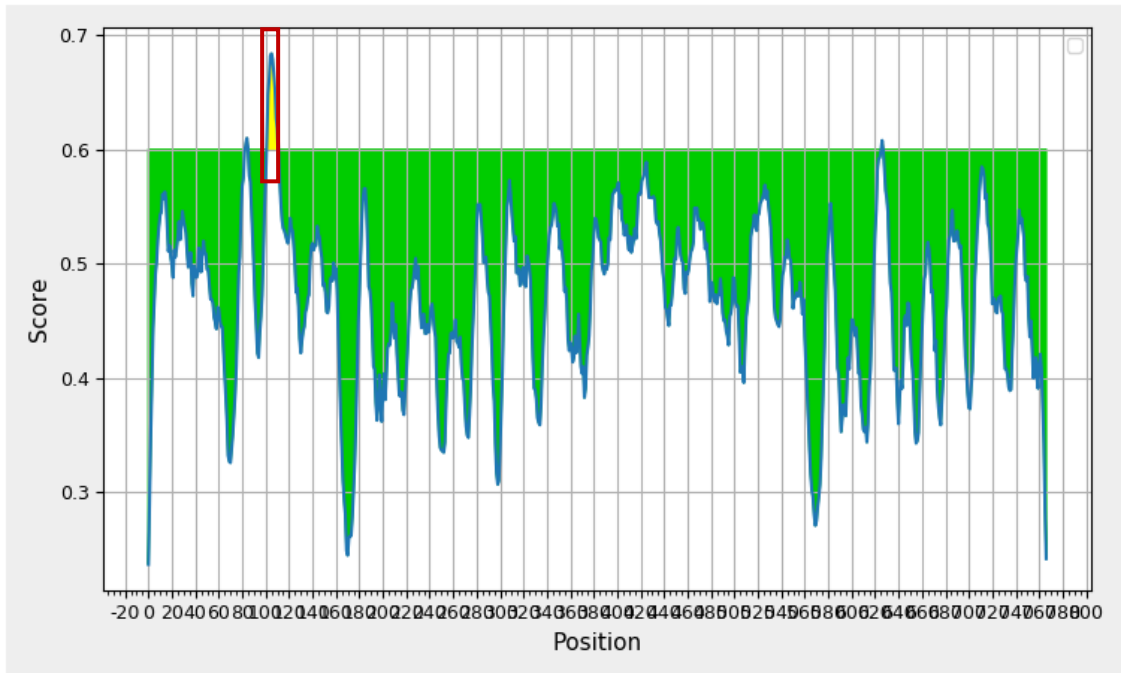
Al igual que hicimos con los valores de hidrofilia, se construyó una tabla con los valores de potencia antigénica de los péptidos para ayudar a la selección.

**Tabla 4.26.** Valores de potencia antigénica de los péptidos de la proteína Met6 según el método Kolaskar y Tangaokar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990).

Nº	Secuencia	Valores de potencia antigénica
1	GFPRI GGQRELKK	0,964
2	EAYWSGKATVEE	0,990
7	RGLQKKATETQAAVDVTALEMVKKWFDS	1,028
10	KDSL DLE	1,004
12	PEQLDEVAS	1,048
15	TPVDLESETKLDAV	1,005
16	EDVSKQLE	1,044
17	KARSESSITNDPKVQERLTTINEALATRKAAPPERLTEQKAKYNLP	0,992
18	PQTKDIRI	0,979
19	AKGQITAE EYAFINK	0,986
23	GLPLRAGKERSDY	0,973
25	DDPNYIQEFSE	1,003
26	HSPRIPSKQEFVSR	1,023

Los péptidos con valores de capacidad antigénica menores a 1 fueron excluidos de nuestra selección (nº 1, 2, 17, 18, 19 y 23). Además, el péptido nº 1 ya había sido estudiado por Hong Xin (Xin, 2016).

Aún seguían siendo muchos péptidos (7) tras haber sometido a la secuencia de Met6 a estos análisis predictivos, por lo que decidimos ser más exigentes con el determinante antigénico a elegir aumentando el valor límite de selección para epítopos lineales en el análisis Bepipred a 0,6, en lugar del valor anterior de 0,5.



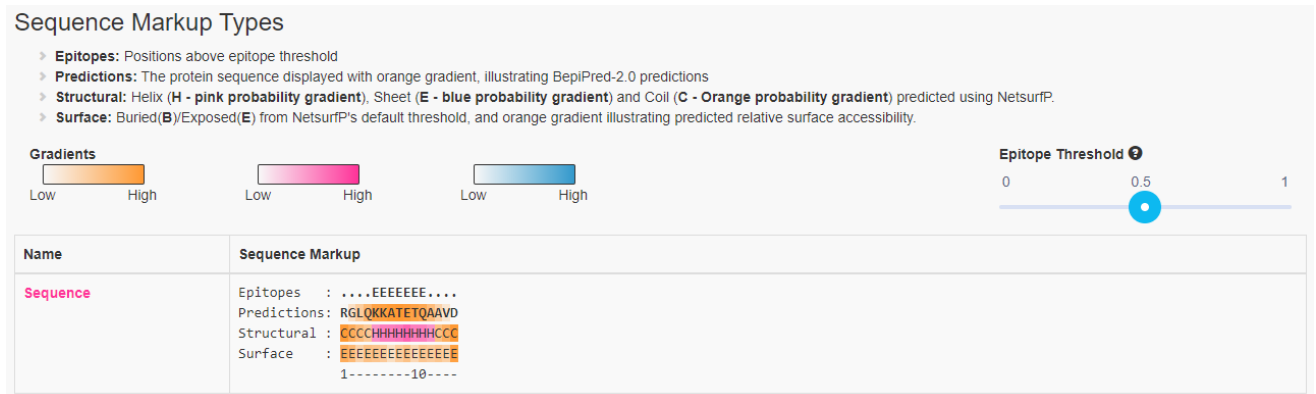
**Figura 4.32.** Predicción de epítomos lineales en la proteína Met6. Se resalta con un cuadrado rojo la posición del epítopo seleccionado.

Como se puede observar en la figura 4.32., solo uno de los epítomos (nº 7) resiste al aumento del umbral a 0,6, por lo que se seleccionó este péptido como determinante antigénico idóneo de la proteína Met6. Se descartó incluir el extremo C-terminal de la secuencia del péptido por ser la parte más hidrófoba de éste. La secuencia final elegida fue RGLQKKATETQAAVD.

La estructura de la proteína Met6 de *C. albicans* también ha sido resuelta por el grupo de D.K. Ubhi y J.D. Robertus. Sin embargo, estos autores no han sido capaces de cristalizar la proteína nativa y han tenido que sustituir algunos residuos de la secuencia por otros, con el fin de obtener una proteína que cristalice con mayor facilidad (Ubhi et al., 2011; Ubhi et al., 2014; Ubhi, Devinder & Robertus, 2015).

La secuencia del epítopo que nosotros hemos seleccionado es una secuencia que se modificó para facilitar la cristalización, por lo que desconocemos su estructura espacial. Según estos autores, el péptido seleccionado corresponde a un motivo estructural que forma un bucle expuesto al exterior en la superficie de la proteína tanto en la

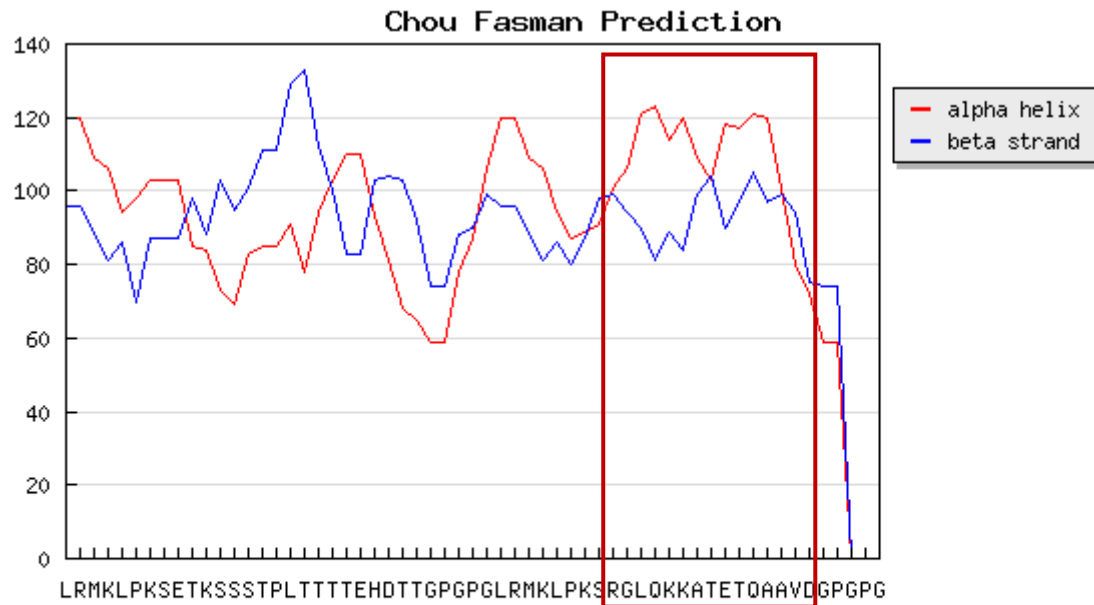
conformación abierta que adopta la proteína cuando no tiene ligandos unidos, como en la conformación cerrada que se observa tras la unión de los sustratos (Ubhi et al., 2011). Ya que la información estructural disponible es incompleta, se decidió acudir a la predicción informática en busca de información adicional que respaldara lo expuesto por D.K. Ubhi y colaboradores. Para ello, se analizó la conformación espacial y la accesibilidad superficial del epítipo mediante Bepipred 2.0.



**Figura 4.33.** Características del epítipo seleccionado de la proteína Met6 en la herramienta informática BepiPred 2.0.

El programa Bepipred 2.0 predice una pequeña estructura helicoidal (H) dentro de la secuencia seleccionada (figura 4.33.). Además, toda la secuencia del epítipo parece estar expuesta en la superficie.



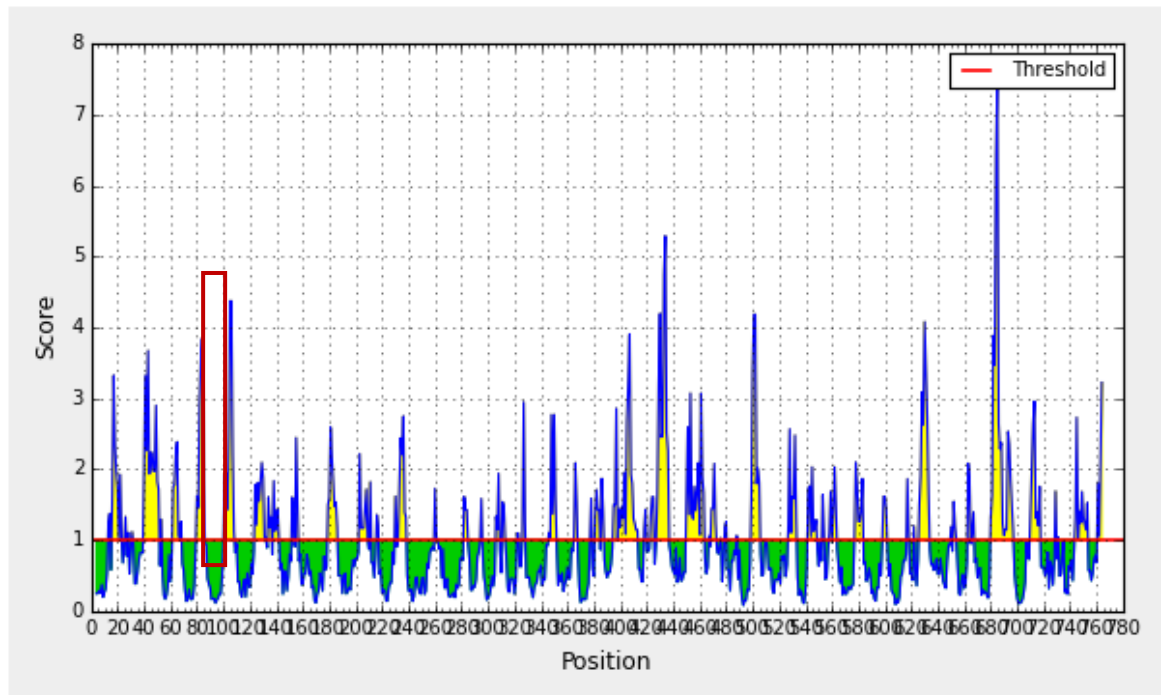


## Chou-Fasman-Algorithm

	Pa	Pb	Pt	a	b	<Pa>	<Pb>	<Pt>	<pt>	St
40 R	100	94	95	I	i	101 *	99	102	2.10e-05	H
41 G	64	87	156	B	i	106 *	94	103	8.96e-06	H
42 L	130	117	59	H	h	121 *	90	89	4.09e-05	H
43 Q	112	100	98	h	I	123 *	81	91	3.55e-05	H
44 K	121	73	101	h	b	114 *	89	91	1.75e-05	H
45 K	121	73	101	h	b	120 *	84	84	1.74e-05	H
46 A	139	79	66	H	i	109 *	99	83	3.94e-05	H
47 T	78	133	96	i	h	103 *	104 *	91	3.29e-05	C
48 E	144	51	74	H	B	118 *	90	83	1.30e-05	H
49 T	78	133	96	i	h	117 *	97	81	1.71e-05	H
50 Q	112	100	98	h	I	121 *	105 *	70	1.04e-05	H
51 A	139	79	66	H	i	120 *	97	82	1.03e-05	H
52 A	139	79	66	H	i	101 *	99	104	7.84e-05 *	H
53 V	97	164	50	i	H	80	94	126	8.81e-05 *	C
54 D	106	66	146	h	b	72	75	152	6.46e-05	C

**Figura 4.34.** Resultado de la predicción estructural del péptido seleccionado mediante el algoritmo de Chou-Fasman (Chou & Fasman, 1978) (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/MIX/>).

En la figura 4.34. podemos observar como el algoritmo de Chou-Fasman (Chou & Fasman, 1978) también coincide en su predicción de una estructura secundaria en hélice alfa (H) para la secuencia seleccionada de la proteína Met6.



Average: 1.000 Minimum: 0.075 Maximum: 7.530

**Figura 4.35.** Representación gráfica de los valores de accesibilidad superficial según la escala de Emini (Emini et al., 1985).

La media de accesibilidad superficial para el epítipo seleccionado según la escala de Emini (Emini et al., 1985) es 1,495. Este resultado apoya lo expuesto por el grupo de D. K. Ubhi de que el péptido se encuentra expuesto al solvente para la libre interacción con los componentes del sistema inmunológico.

#### 4.10.4. Caracterización de los epítipos seleccionados y construcción del péptido antigénico 3P-KLH

Una vez seleccionados los epítipos para cada una de las proteínas de *C. albicans* (Als3-N, Hwp1-N y Met6), se compararon las secuencias con las de sus proteínas homólogas de otras especies, tanto del género *Candida*, como otras especies fúngicas. Se encontraron homologías de secuencia con las proteínas de otras especies de *Candida* e incluso con proteínas de otras especies fúngicas, ya que son secuencias ortólogas. Estas homologías fueron aceptadas dado que su carácter antigénico podría generar la posible protección frente a otras infecciones fúngicas, además de la CI producida por *C. albicans*.

Paralelamente, se comprobó que no hubiese homologías de secuencia con proteínas del ratón y del ser humano puesto que, en caso de que las hubiera, nuestras secuencias podrían no ser reconocidas como componentes exógenos por el sistema inmunológico del ratón y del ser humano. Para realizar la comparación de las secuencias se utilizó el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

Con las secuencias seleccionadas y siguiendo el modelo de Hurtgen y Hung, se diseñó un péptido antigénico complejo, denominado 3P-KLH, cuya secuencia se muestra en la figura 4.36. Este péptido se utilizó como posible agente inmunoprotector en un modelo murino de candidiasis invasora experimental.



**Figura 4.36.** Diseño final del péptido complejo 3P-KLH utilizado para la inmunización de los ratones.

Posteriormente, se realizó una nueva predicción teórica de la actividad antigénica de la secuencia peptídica mediante el programa de reconocimiento de antígenos por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II humana, el cual es ofrecido por IEDB.

**Tabla 4.27.** Alelos del MHC II con alta afinidad de unión con los epítomos seleccionados.

Epítomos	Alelos del MHC II
<b>FNVGGTGSSVDLEDSK (Als3-N)</b>	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01
	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02
	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02
	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01
	HLA-DRB1*09:01
	HLA-DRB1*01:01
	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01
	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02
<b>ETKSSSTPLTTTTEHDTT (Hwp1-N)</b>	HLA-DRB1*07:01
	HLA-DRB1*09:01
	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01
	HLA-DRB1*04:01
	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02
	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02

<b>RGLQKKATETQAAVD (Met6)</b>	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02
	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02
	HLA-DRB1*01:01
	HLA-DRB4*01:01
	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01
	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02
	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01

Como se puede apreciar en la tabla 4.27., se muestra como los tres epítomos seleccionados muestran alta afinidad de unión por varios alelos del MHC de clase II. Este hecho apoya la selección de estos tres epítomos, ya que refuerza su potencial carácter inmunogénico y sugiere que la población humana favorecida por la posible inmunoprotección de esta vacuna sería mayor y más diversa.

Antes de proceder a la inmunización de los ratones se realizó una prueba mediante la técnica ELISA para comprobar la reacción de los sueros de 8 pacientes del grupo 1 y 8 del grupo 3 con los péptidos seleccionados de las proteínas y el péptido complejo 3P-KLH. Los resultados se muestran en la tabla 4.23.

**Tabla 4.28.** Respuesta de anticuerpos específicos frente a los péptidos antigénicos seleccionados. Los datos mostrados son la media de los valores de  $A_{490}$  en el ensayo ELISA y valores p de la comparación entre los grupos 1 y 3.

<b>Péptidos antigénicos</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Significación estadística (p)</b>
<b>Als3-N</b>	1,89	0,9	0,0004
<b>Hwp1-N</b>	2,63	1,05	0,0003
<b>Met6</b>	3,01	1,15	<0,0001
<b>3P-KLH</b>	2,56	1,22	0,0012

Tanto los 3 péptidos seleccionados, como el péptido complejo 3P-KLH muestran una mayor respuesta de anticuerpos específicos en los pacientes del grupo 1 que en los pacientes del grupo 3, y las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas en todos los casos.

### 4.11. Inmunización de ratones con 3P-KLH y efecto protector frente a la infección por *C. albicans*

El proceso de inmunización de los ratones se verificó mediante el seguimiento del desarrollo de anticuerpos frente al péptido inmunogénico 3P-KLH en los sueros animales en los días 0, 21 y 42. Los datos obtenidos en los respectivos ensayos ELISA se recogen en las tablas 4.29., 4.30. y 4.31.

**Tabla 4.29.** Respuesta de anticuerpos específicos en los sueros preinmunes de ratón de los grupos experimental y control obtenidos el día 0. Se muestran los valores de  $A_{490}$  en el ensayo ELISA para los diferentes ratones, así como el valor medio  $\pm$  DE para cada grupo.

Ratón	Día 0	
	G. control	G. experimental
1	0,271	0,126
2	0,173	0,166
3	0,183	0,205
4	0,211	0,112
5	0,128	0,198
6	0,189	0,119
7	0,146	0,176
8	0,152	0,212
9	0,232	0,191
10	0,177	0,163
11	0,185	0,172
	$\bar{X}$ 0,186 $\pm$ 0,04	$\bar{X}$ 0,167 $\pm$ 0,035

En la tabla 4.29. se muestran los datos de los sueros correspondientes al día 0, antes de la primera dosis del protocolo de inmunización. En este caso, las medias de absorbancia no mostraron diferencias significativas ( $p= 0,2561$ ) entre los grupos experimental y control.

El día 21 únicamente se sangraron 3 ratones por grupo, como control de seguimiento de la inmunización, y antes de proceder a la administración de una dosis de refuerzo. Los datos recogidos en la tabla 4.30. muestran en el grupo experimental un incremento

en la respuesta respecto a los valores basales, y la diferencia de las medias de absorbancia con el grupo control es estadísticamente significativa ( $p=0,016$ ).

**Tabla 4.30.** Respuesta de anticuerpos específicos en sueros de ratón de los grupos experimental y control a los 21 días, como respuesta a la primera inmunización con 3P-KLH. Se muestran los valores de  $A_{490}$  en el ensayo ELISA para los diferentes ratones, así como el valor medio  $\pm$  DE para cada grupo.

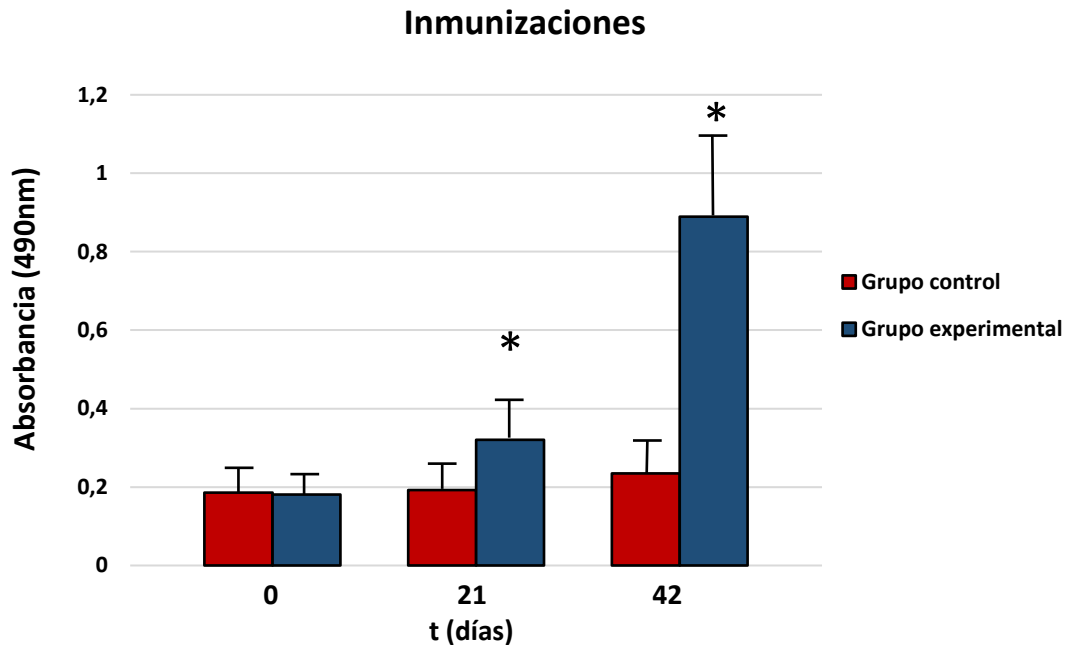
Día 21		
Ratón	G. control	G. experimental
1	0,248	0,324
7	0,176	0,294
10	0,153	0,344
	$\bar{x}$ 0,192 $\pm$ 0,05	$\bar{x}$ 0,321 $\pm$ 0,025

**Tabla 4.31.** Respuesta de anticuerpos específicos en sueros de ratón de los grupos experimental y control el día 42, como respuesta a la inmunización de recuerdo con 3P-KLH. Se muestran los valores de  $A_{490}$  en el ensayo ELISA para los diferentes ratones, así como el valor medio  $\pm$  DE para cada grupo.

Día 42		
Ratón	G. control	G. experimental
1	0,361	0,826
2	0,274	0,966
3	0,223	0,415
4	0,189	0,812
5	0,143	0,981
6	0,211	0,769
7	0,272	1,13
8	0,192	0,612
9	0,231	1,124
10	0,257	1,263
11	0,231	0,882
	$\bar{x}$ 0,235 $\pm$ 0,057	$\bar{x}$ 0,889 $\pm$ 0,24

Como se puede observar en la tabla 4.31., tras la dosis de refuerzo el nivel de anticuerpos en el grupo experimental registró un incremento notable y la diferencia entre su valor medio y el del grupo control resultó ser estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

En la figura 4.37. se muestra de forma gráfica la evolución de los niveles de anticuerpos de los ratones del grupo experimental como respuesta a la inmunización con el péptido 3P-KLH.



**Figura 4.37.** Representación gráfica de los valores medios de anticuerpos (Abs. 490 nm) durante el proceso de inmunización en el grupo experimental, con el grupo control como referencia. (\*) Los valores medios de anticuerpos en el grupo experimental muestran diferencias significativas con respecto a sus correspondientes grupos control ( $p < 0,05$ ).

#### 4.11.1. Carga fúngica en riñones

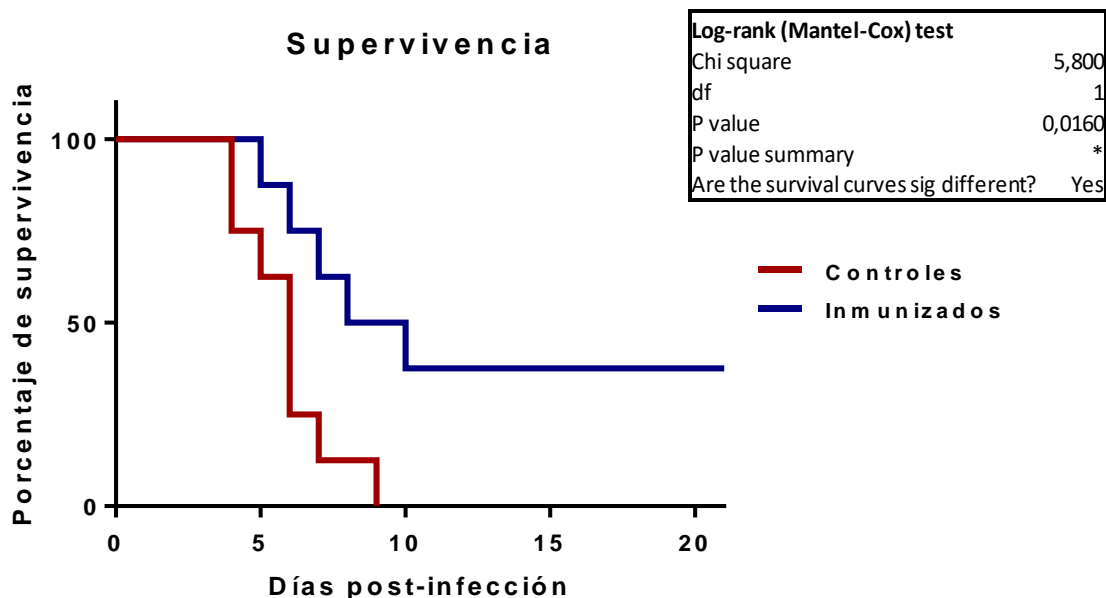
Una vez validada la presencia de anticuerpos específicos frente al péptido inmunogénico 3P-KLH, los ratones fueron infectados con *C. albicans* para evaluar el posible efecto inmunoprotector del péptido antigénico. Tres días después de la infección (día 45), se sacrificaron 3 ratones de cada grupo y se cuantificó la carga fúngica en ambos riñones de cada animal. Los resultados se muestran en la tabla 4.32., donde se puede apreciar que la media de carga fúngica en los riñones del grupo control fue casi 30 veces inferior a la del grupo control que no había sido inmunizado con 3P-KLH, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,0017$ ).

**Tabla 4.32.** Peso y carga fúngica (UFC/g) de los riñones de 3 ratones de cada grupo el día 45.

Ratón	Riñón	Grupo control		Grupo experimental	
		Peso (g)	Carga fúngica (UFC/g)	Peso (g)	Carga fúngica (UFC/g)
1	Izq.	0,14	4000000	0,21	523809
	Drcho.	0,14	6214285	0,2	35000
2	Izq.	0,18	6666666	0,18	66666
	Drcho.	0,18	555555	0,18	172222
5	Izq.	0,08	8500000	0,19	63157
	Drcho.	0,13	3923076	0,14	164285
		$\bar{X}$ 0,142	$\bar{X}$ 4976597	$\bar{X}$ 0,183	$\bar{X}$ 170857

#### 4.11.2. Registro de supervivencia en el modelo animal de infección por *C. albicans*

Además de la carga fúngica, para estudiar el efecto inmunoprotector del péptido 3P-KLH, se registró el tiempo de supervivencia de los 8 ratones restantes de cada grupo a lo largo de 21 días tras la infección (figura 4.38.).



**Figura 4.38.** Representación gráfica de la supervivencia de los ratones a la infección con *C. albicans*. El análisis Log-rank (Mantel-Cox) de la supervivencia en los grupos de ratones control y experimental mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos.



Los ratones del grupo control murieron en los 9 primeros días tras la infección con *C. albicans*, con una supervivencia media de 6 días. En el caso del grupo experimental, a los 21 días sobrevivieron 3 de los 8 ratones (37,5%) que lo componían. El análisis Log-rank (Mantel-Cox) de las gráficas de supervivencia de ambos grupos de ratones mostró que las diferencias eran estadísticamente significativas entre ellos ( $p=0,0017$ ) (figura 4.38.). Los 3 ratones que sobrevivieron a la infección experimental fueron sacrificados y se determinó la carga fúngica en los riñones.

**Tabla 4.33.** Peso y carga fúngica (UFC/g) de los riñones de los tres ratones supervivientes el día 63.

Ratones supervivientes	Riñón	Peso (g)	Carga fúngica (UFC/g)
<b>7</b>	lzq.	0,23	86956
	Drcho.	0,19	226315
<b>9</b>	lzq.	0,27	66666
	Drcho.	0,21	166666
<b>11</b>	lzq.	0,17	129411
	Drcho.	0,24	37500
		$\bar{X}$ 0,218	$\bar{X}$ 118919

Los valores medios de carga fúngica de la tabla 4.33. no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,528$ ) con respecto a la de los ratones del mismo grupo experimental en el día 45 y, en términos absolutos, estaba muy por debajo de la que presentaban los ratones del grupo control. Otro dato reseñable es que los ratones supervivientes 7 y 9 obtuvieron valores de  $A_{490}$  en el ensayo ELISA del día 42 superiores a la media de su grupo experimental, lo que nos sugeriría que sus niveles más altos de anticuerpos han ayudado a controlar el crecimiento de *C. albicans* en los riñones, y por tanto a alargar su supervivencia.

## 5. Discusión



Las levaduras son la cuarta causa de infección nosocomial en hospitales españoles, siendo *Candida* el género dominante (ESTUDIO EPINE-EPPS nº 29: 2018; Pemán & Salavert, 2013). *Candida albicans* es la especie más patógena del género y es considerada la causa más frecuente de las candidiasis, tanto superficiales como sistémicas (Coleman et al., 1997; Odds, 1988; Odds, 1994). Además, cabe destacar otras especies patógenas oportunistas del género *Candida* como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida guilliermondii* que también son responsables de causar infecciones invasivas (Pemán & Salavert, 2013). A esta lista hay que añadir *Candida auris*, una levadura multirresistente emergente cuyo aislamiento se realizó en 2009 en el conducto auditivo externo de un paciente en Japón (Lockhart et al., 2017).

El diagnóstico de la candidiasis invasora (CI) puede resultar complicado, debido fundamentalmente a la ausencia de síntomas específicos de la enfermedad y al hecho de que *Candida* es un comensal habitual en la piel y mucosas de individuos sanos, lo que dificulta la diferenciación entre la colonización de un tejido y el proceso de invasión fúngica. El hemocultivo es la prueba diagnóstica de referencia o gold estándar de la CI (De Pauw et al., 2008; Pappas et al., 2016), pero ofrece una baja sensibilidad (aprox. 50%) y puede tardar 24-48h en arrojar un resultado positivo. Un retraso de 12-24h en la instauración del tratamiento antifúngico puede llegar a doblar la mortalidad por candidemia (Garey et al., 2006), por lo que se hace necesario desarrollar nuevos tests diagnósticos y/o identificar factores de riesgo que permitan adelantar el tratamiento antifúngico específico.

Esta tesis pretende estudiar la utilidad clínica de la detección de anticuerpos específicos contra tres proteínas de la pared celular de *Candida albicans*, para el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora (CI). Para ello se desarrollaron sendos ensayos de ELISA para la adhesina Als3, la proteína micelial Hwp1, y la enzima metionina sintasa, Met6, y se determinaron los parámetros sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficacia de cada ensayo, tanto para pacientes inmunocompetentes como para pacientes inmunosuprimidos. Así mismo, en la última parte de la tesis se ha diseñado y obtenido un péptido inmunogénico derivado de las

proteínas Als3, Hwp1 y Met6 y se ha evaluado el posible efecto inmunoprotector de este péptido frente a la infección experimental por *C. albicans* en un modelo animal con ratones inmunocompetentes.

Para evaluar la capacidad diagnóstica de las diferentes pruebas de ELISA, se estudiaron un total de 627 sueros de 297 pacientes adultos con riesgo de sufrir una CI, de los cuales 126 presentaban candidiasis invasora probada por hemocultivos positivos. De este grupo, 57 pacientes (48% de los casos) presentaban una infección por *C. albicans*, siendo la especie con mayor número de casos; sin embargo, se cumple la tendencia de los últimos años de que cada vez son más frecuentes las infecciones por especies no-*albicans*, superando así el 50% de los casos de CI. *Candida glabrata* y *C. parapsilosis* han sido, en este orden, las siguientes especies más representadas.

El diagnóstico de la CI mediante la detección de anticuerpos específicos (CAGTA) frente a antígenos de la pared celular por una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) representa una buena opción predictiva por su capacidad para diferenciar entre la colonización y el proceso invasivo del hongo. Con esta técnica de inmunofluorescencia indirecta, que fue desarrollada en nuestro grupo de investigación (Moragues et al., 2004), en el presente estudio hemos verificado que los valores medios de los títulos de CAGTA para los pacientes con CI son significativamente superiores a los de los pacientes que no presentan infecciones fúngicas, e incluso a los de aquellos que presentan infecciones causadas por hongos diferentes de *Candida*. Así mismo, esta técnica presenta buenos índices de utilidad diagnóstica de forma global (sin atender al estado inmunológico de los pacientes), destacando una especificidad del 94% con 1/80 como punto de corte y del 98% con un punto de corte de 1/160. Por el contrario, en nuestro caso, la sensibilidad de la prueba (47% y 59%, con 1/160 y 1/80 como puntos de corte respectivamente) fue inferior en comparación a la obtenida por Moragues et al., quienes obtuvieron una sensibilidad del 78% con esta técnica y del 84% con su versión comercial *Candida albicans* IFA IgG (Moragues et al., 2004). No obstante, nuestro rango de sensibilidad está en concordancia con el publicado en estudios más recientes (Martínez-Jiménez et al., 2015, Parra-Sánchez et al., 2017). Aun así, los valores de sensibilidad de

la prueba mejoran cuando solo se consideran las infecciones por *C. albicans*, ya que los títulos de CAGTA se calculan frente a antígenos superficiales de los tubos germinales de esta especie de *Candida*.

Otro aspecto interesante a considerar en el diagnóstico de la CI es el estado inmunológico de los pacientes; de este modo, en nuestro estudio, la sensibilidad de la detección de CAGTA es claramente superior en pacientes inmunocompetentes que en pacientes inmunodeprimidos. Aunque 1/160 es el punto de corte recomendado para la detección de CAGTA (Moragues et al., 2004; Laín et al., 2007a), coincidiendo con Martínez-Jiménez et al., nuestros datos apoyan rebajar el punto de corte a 1/80 tanto en pacientes inmunocompetentes como en pacientes inmunodeprimidos, porque al bajar el punto de corte aumenta la sensibilidad del ensayo sin afectar casi a la especificidad del mismo. Esto es más evidente en pacientes inmunodeprimidos, ya que al reducir el punto de corte a 1/80, la sensibilidad de la prueba aumenta del 33% al 50%. Moragues et al., (2004) en un ensayo con 35 pacientes, en su mayoría inmunocompetentes, diagnosticados de CI por hemocultivo, recomendaban un punto de corte de 1/160 frente 1/320. Con los datos del presente estudio, basados en una muestra más numerosa, la recomendación sería rebajar a 1/80 el punto de corte para los pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos.

Con el fin de mejorar la capacidad diagnóstica de la detección de anticuerpos CAGTA, algunos autores han propuesto combinar esta prueba con la medida de los niveles BDG, y así han conseguido alcanzar una sensibilidad del 90,3% en pacientes críticos (León et al., 2012). Martínez-Jiménez et al. (Martínez-Jiménez et al., 2015) proponen la detección de anticuerpos CAGTA en combinación con beta-glucano para la vigilancia de pacientes con riesgo de CI, e indican que el elevado valor predictivo negativo (>99%) de esta combinación permitiría excluir la presencia de candidemia en pacientes con riesgo alto de CI y, en consecuencia, se podría interrumpir la administración innecesaria de antifúngicos en estos pacientes. En nuestro estudio también se observa una mejoría de la capacidad diagnóstica de la detección de anticuerpos CAGTA en combinación con la prueba del antígeno BDG, llegando a alcanzar una sensibilidad del 84% para pacientes inmunocompetentes. Estos resultados apoyan la utilidad de la detección de CAGTA en

pacientes con riesgo de sufrir una CI, sin embargo, el título de anticuerpos anti-micelio se determina de forma visual, con una interpretación subjetiva, lo que dificulta su estandarización y automatización en el laboratorio clínico.

Con el fin de soslayar los problemas de objetividad y automatización que presenta la detección de CAGTA mediante IFI, se optó por desarrollar ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). En nuestro grupo se habían identificado un conjunto de antígenos proteicos de *C. albicans* que eran reconocidos por los anticuerpos CAGTA de conejos infectados con este hongo (Sáez-Rosón, Sevilla & Moragues, 2014). Entre otros, podemos citar la proteína Hwp1 de la pared celular, la adhesina Als3, y las enzimas metionina sintasa Met6 y enolasa Eno1, coincidiendo en muchos casos con lo publicado por otros autores (Pitarch, Nombela & Gil, 2007; Pitarch, Nombela & Gil, 2014; Pitarch, Nombela & Gil, 2016). Estas proteínas, además, eran las primeras para las que se detectaban anticuerpos específicos en etapas tempranas del proceso infeccioso en el modelo animal de CI en conejo. La detección de anticuerpos frente a algunos de estos antígenos como marcadores de CI se ha ensayado en grupos reducidos de pacientes con resultados prometedores (Laín et al., 2007a; Laín et al., 2007b; Laín et al., 2008a; Laín et al., 2008b; Pitarch, Nombela & Gil, 2007; Pitarch, Nombela & Gil, 2016).

La familia de genes *ALS* de *C. albicans* codifica glicoproteínas de la superficie celular implicadas en la adhesión del microorganismo al hospedador. Dentro de esta familia, la proteína Als3 está implicada en la adhesión endotelial y epitelial; y su expresión es específica en los tubos germinales de *C. albicans* (Hoyer et al., 1998). Quynh y colaboradores (Quynh et al., 2007), demostraron que la adhesina Als3 se expresa de forma temprana en el proceso de invasión siendo responsable del daño celular en tejidos epiteliales orales, facilitando así la invasión a tejidos más profundos. En nuestras manos, el ensayo de ELISA anti-Als3-N para el diagnóstico de CI, ha alcanzado una sensibilidad del 81%, mucho mayor que la obtenida (41,7%) por Laín y colaboradores (Laín et al., 2008a) en ensayos similares con la misma proteína. Además, aunque la especificidad de nuestro ensayo es algo inferior al del estudio citado anteriormente, el resto de parámetros diagnósticos son mejores. Es posible que las diferencias entre ambos ensayos pudieran ser debidas a que en el estudio de Laín y col. solo 9 pacientes

presentaban infecciones por otras especies de hongos diferentes de *Candida*, a diferencia de los 66 pacientes de nuestro estudio, lo que podría explicar que hayamos obtenido una especificidad ligeramente inferior. La prueba ELISA anti-Als3 no muestra grandes diferencias en los valores diagnósticos cuando se dirige a pacientes inmunocompetentes o a pacientes inmunodeprimidos, siendo, como se podría esperar, ligeramente más sensible para pacientes inmunocompetentes y más específica para pacientes inmunodeprimidos.

Hwp1 es una proteína de la pared celular de *Candida* implicada en la adhesión y desempeña un papel crucial en el apareamiento, el desarrollo normal de hifas, la adhesión entre células para la formación de la biopelícula, la unión al huésped y la virulencia (Staab et al., 1999). Los resultados publicados por Laín y colaboradores (Laín et al., 2007a) sobre la utilidad de Hwp1-N como antígeno para el diagnóstico de candidiasis invasora muestran discrepancias con los resultados presentados en esta tesis. Aunque la especificidad muestra valores similares en ambos trabajos, el resto de índices diagnósticos obtuvieron valores más elevados en el estudio de Laín y colaboradores. Del mismo modo que en el caso anterior del antígeno Als3-N, estas diferencias pueden deberse al escaso número de pacientes con infecciones fúngicas no producidas por hongos del género *Candida*. Esta diferencia, en principio, afectaría de forma directa a la especificidad de la prueba, pero en este caso, es el parámetro que menos varía entre ambos estudios. El hecho de tener un mayor número de pacientes con otras enfermedades fúngicas invasoras (EFI) hace que, para conseguir una buena especificidad, establezcamos un punto de corte más alto con el fin de evitar los posibles falsos positivos correspondientes a las infecciones por otros hongos no *Candida*. Esta subida del punto de corte afectaría directamente a la sensibilidad, reduciendo su valor, y de forma indirecta al resto de parámetros de la prueba. En cuanto a los resultados obtenidos según el estado inmunológico de los pacientes, la prueba ELISA anti-Hwp1 muestra mejor capacidad diagnóstica para pacientes inmunocompetentes, ya que para pacientes inmunodeprimidos la especificidad y el valor predictivo positivo de la prueba son muy bajos. Sin embargo, presenta buenos valores de sensibilidad (75%) y valor predictivo negativo (88%) para pacientes inmunodeprimidos. Desde un punto de vista clínico estos datos resultan muy interesantes, ya que el alto valor predictivo negativo de



la prueba sirve de apoyo para descartar una posible candidemia en un paciente inmunodeprimido con riesgo de CI.

La metionina sintasa (Met6) es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo a partir de tetrahidrofolato a homocisteína para producir metionina y es una proteína esencial para el crecimiento y el desarrollo de *C. albicans* (Suliman, Appling & Robertus, 2007). Mientras que la metionina sintasa en mamíferos es dependiente de cobalamina, en los hongos es independiente de esta vitamina. Se ha detectado la presencia de esta proteína tanto en extractos de blastosporas como de micelios de *C. albicans* y se ha podido comprobar su presencia en capas profundas de la pared celular de las blastosporas, mientras que en el caso de los tubos germinales se localiza en la superficie (Sáez-Rosón et al., 2014). La prueba de ELISA anti-Met6 para el diagnóstico de CI en nuestro grupo de pacientes, muestra una sensibilidad superior (87%) y una especificidad (56%) inferior a las publicadas en otros estudios similares con la misma proteína, como los de Pitarch y colaboradores (Pitarch, Nombela & Gil, 2007), 60% y 82% respectivamente, o Clancy y colaboradores (Clancy et al., 2008) 65% y 83% respectivamente. Así mismo, a diferencia de nuestra tesis, Clancy y colaboradores únicamente formaron 2 grupos de estudio, pacientes con CI y pacientes sin evidencias de CI, lo que evita posibles reacciones cruzadas por otras infecciones fúngicas, y en consecuencia se obtiene una especificidad más alta. En cambio, en el estudio de Pitarch y colaboradores sí formaron un tercer grupo de pacientes, pero este no era exclusivo para pacientes con otras EFI, sino para pacientes con enfermedades de base similares donde también se agrupan infecciones no producidas por hongos. Además, la proteína Met6 que utilizan en este ensayo está producida en *Pichia pastoris*, con una cola c-myc y 6xHis, lo que podría explicar la diferencia de resultados. La proteína Met6 también se expresa en mamíferos y otros hongos, por lo que el antígeno Met6 puede ser reconocido por anticuerpos producidos en pacientes con infección por *Candida* spp. así como por hongos de otros géneros, dándose una reacción cruzada que reduciría la especificidad del ensayo. En nuestro estudio hemos verificado que la diferencia de los valores medios de absorbancia relativa de los grupos 1 y 2 en pacientes inmunocompetentes no es estadísticamente significativa. En pacientes inmunodeprimidos, en cambio, aunque la respuesta de anticuerpos es menos intensa, las reacciones cruzadas parecen no tener

tanto peso y los valores medios de absorbancia sí son estadísticamente diferentes entre estos dos grupos lo que se traduce en valores de especificidad superiores (74%) y un elevado VPN (97%).

Con el fin de establecer y comparar la capacidad discriminadora de las diferentes pruebas ELISA desarrolladas, se construyeron curvas ROC y se calculó el área bajo la curva (AUC) para cada caso. La detección de anticuerpos anti-Als3-N alcanzó el valor AUC más alto (AUC 0,789) entre los pacientes inmunocompetentes, comparable al publicado por Wang y colaboradores (Wang et al., 2020) para la detección de manano (AUC 0,81), aunque superado por la detección de anticuerpos anti-manano (AUC 0,87). Esta técnica de diagnóstico presenta una mayor especificidad y por lo tanto un mayor AUC que las estudiadas en esta tesis para pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, no contemplan la posibilidad de infección por otros hongos que no sea CI lo que podría resultar en una desviación que no está reflejada en los índices diagnósticos por la composición de la muestra estudiada en lo que respecta al agente causal de la infección. León y colaboradores (León et al., 2012) evaluaron el diagnóstico de CI mediante la determinación de BDG y la detección de anticuerpos CAGTA, y con un sistema estadístico basado en árboles de clasificación y regresión conocido como CART, obtuvieron un valor de AUC 0,78, similar al obtenido en nuestro estudio para la prueba ELISA anti-Als3-N. En el caso de pacientes inmunodeprimidos, la prueba con mayor rendimiento fue la detección de anticuerpos anti-Met6 (AUC 0,892). Pitarch y colaboradores (Pitarch, Nombela & Gil, 2007), obtuvieron un valor de AUC similar (0,87), aunque ligeramente inferior al nuestro, con este mismo antígeno y también para pacientes inmunodeprimidos.

En la literatura existen referencias a ensayos de detección de anticuerpos frente a otros antígenos con resultados dispares, algunos de los cuales se han comercializado, pero sin alcanzar un uso generalizado para el diagnóstico de la CI. Na y Song (Na & Song, 1999) describieron un ensayo ELISA para la detección de anticuerpos contra las Sap de *C. albicans*. Este test no mejora la capacidad diagnóstica de las pruebas estudiadas en nuestro trabajo. La sensibilidad y especificidad del test fueron respectivamente del 70% y 76%, además de que el tamaño muestral fue menor.

Entre los ensayos que se han comercializado se encuentra el test Syscan3® (Rockeby Biomed Ltd., Daglish, WA, Australia), que utiliza una mezcla de antígenos citoplasmáticos, con la enzima enolasa (Eno1) como antígeno predominante, para la detección de anticuerpos anti-*Candida* mediante un ELISA (Philip et al., 2005). Este test no ha conseguido buenos índices diagnósticos en pacientes inmunodeprimidos, salvo en el valor predictivo negativo, 93%. En el caso de los pacientes inmunocompetentes los resultados son mejores, con una sensibilidad del 74% y una especificidad del 75%. Aun así, no ofrece mejores resultados que los que hemos obtenido en esta tesis. Además, presenta un número muy bajo de pacientes con EFI no producida por *Candida* sp. (6 de los 369 pacientes en total), lo que evita las posibles reacciones cruzadas y muestra una especificidad más alta de la que nos encontraríamos en la práctica clínica habitual. Laboratorios Vircell S.L. (Granada, España) también ha desarrollado una prueba comercial Candida Enolasa ELISA IgG Kit basada en la detección de anticuerpos anti-Eno1. La utilidad diagnóstica del test en un estudio prospectivo llevado a cabo con 42 pacientes con CI (23 de ellos inmunocompetentes y 19 inmunodeprimidos) y 56 pacientes control mostró buenos resultados de sensibilidad y especificidad, 82,6% y 78,6% respectivamente para los pacientes inmunocompetentes y 78,9% y 89,3% para los sujetos inmunodeprimidos (Laín et al., 2007b). Sin embargo, este estudio vuelve a no tener en cuenta las infecciones por otros hongos que no sean *Candida* y el tamaño muestral es bastante reducido. En el año 2008, Pitarch y colaboradores determinaron la utilidad diagnóstica de un ELISA basado en la detección de anticuerpos frente a la Eno-1 clonada en *Pichia pastoris*. Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos para los pacientes inmunocompetentes fueron del 67% y 96%; y para los pacientes inmunodeprimidos, del 74% y 91% (Pitarch et al., 2008). A pesar de que obtuvieron valores de especificidad muy altos en todos los casos, los valores de sensibilidad no lo fueron tanto. La prueba ELISA para pacientes inmunodeprimidos fue la que mostró mayor sensibilidad, pero no logra superar al ensayo ELISA anti-Met6 de nuestro estudio. Como técnicas alternativas de apoyo al diagnóstico de la CI, están comercializadas la detección en suero de manano y anticuerpos anti-manano (Platelia Candida antigen and antibody, Bio-Rad) y la detección de betaglucano (BDG; Fungitell, Assoc. Cape Cod). Un estudio de Sendid y colaboradores (Sendid et al., 2004) con la prueba comercializada Platelia *Candida* Ag® (Bio-Rad) mostró una sensibilidad del 85%, una especificidad del

95%, un valor predictivo positivo del 79% y un valor predictivo negativo del 97%. A pesar de los buenos índices diagnósticos, los grupos de pacientes diseñados en este ensayo están muy descompensados, con 26 pacientes con candidiasis probadas y 118 pacientes control, de los cuales únicamente 10 de ellos presentaban infecciones por hongos no pertenecientes al género *Candida*. Este desbalance en los grupos de pacientes puede alterar los índices diagnósticos al otorgar tanto peso a los pacientes control.

En nuestro estudio, los resultados de utilidad diagnóstica de la prueba de detección de BDG fueron los esperados, ya que al ser un marcador panfúngico, las diferencias entre los valores medios del grupo 1 y el grupo 2 no fueron estadísticamente significativas. Y en esta línea, las medias de BDG en los grupos 1 y 2 mostraron diferencias significativas en relación al grupo 3, pacientes sin evidencias de EFI. La especificidad (99%) y el valor predictivo positivo (99%) fueron muy altos para el diagnóstico de EFI, pero inferiores, 70% y 62% respectivamente, cuando el objetivo era diagnosticar CI. Ostrosky-Zeichner y colaboradores (Ostrosky-Zeichner et al., 2005) realizaron un estudio multicéntrico para valorar la capacidad diagnóstica de la prueba del BDG. Obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad similares a los obtenidos en esta tesis tanto para el diagnóstico de EFI como para el diagnóstico específico de CI.

En este ensayo diagnóstico se estudió también la concordancia de las técnicas utilizadas con el hemocultivo, como *gold standard* o técnica de referencia. La prueba de detección de BDG fue la que menor grado de acuerdo mostró con el hemocultivo (0,365), como era de esperar, ya que es un marcador panfúngico y por ello también detecta las EFI de los pacientes del grupo 2. La prueba de detección de anticuerpos CAGTA (80) fue la técnica diagnóstica con mayor correlación con el *gold standard* (0,553), aun así, el grado de concordancia sigue siendo moderado. La prueba con menor correlación con el hemocultivo en pacientes inmunocompetentes fue la ELISA anti-Met6 (0,268); no obstante, fue la segunda que mayor grado de concordancia presenta para pacientes inmunodeprimidos (0,499), solo detrás de CAGTA (80), el cual muestra un valor Kappa de 0,563. Salvo estas dos técnicas, el resto de pruebas presenta mayor correlación con el hemocultivo al trabajar con pacientes inmunocompetentes, incluso la prueba de detección del BDG, la cual no depende del estado inmunológico de los pacientes. Así,

CAGTA (80) es la prueba con mayor grado de acuerdo con el hemocultivo tanto para pacientes inmunocompetentes como para pacientes inmunodeprimidos.

Los resultados de concordancia con el hemocultivo de las diferentes pruebas desarrolladas son paralelos a los índices diagnósticos de cada prueba. Así, podemos considerar la detección de CAGTA, estableciendo 1/80 como punto de corte en concreto, como la mejor prueba de las estudiadas en este trabajo para el diagnóstico de la CI en pacientes inmunocompetentes. En pacientes inmunodeprimidos, en cambio, la prueba con mejores índices diagnósticos para la CI es la ELISA anti-Met6.

Por otro lado, teniendo en cuenta la compleja composición antigénica de *C. albicans*, es muy probable que los pacientes infectados respondan a varios biomarcadores simultáneamente. Por lo tanto, con el fin de mejorar el diagnóstico, se analizó la utilidad diagnóstica de la combinación de resultados de las 5 pruebas estudiadas, detección de CAGTA, ELISA anti-Als3-N, ELISA anti-Hwp1-N, ELISA anti-Met6 y detección de BDG. La combinación de los resultados de los ensayos ELISA mejoró la sensibilidad en todas las combinaciones respecto a los ensayos individuales, alcanzando valores superiores sin necesidad de combinar más de 2 pruebas. Aunque la sensibilidad aumentó en todos los casos, el valor de especificidad descendía cuantas más pruebas se combinaban, por lo que las combinaciones de más de 2 pruebas no resultaron ventajosas. Las combinaciones Als3+CAGTA, Hwp1+CAGTA y BDG+CAGTA resultaron ser las más ventajosas para el diagnóstico de CI tanto de forma global como para pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos la combinación de pruebas recomendada sería Met6+CAGTA160, ya que mejora la sensibilidad individual de las pruebas y mantiene una alta especificidad y eficacia (74% y 78% respectivamente). Clancy y colaboradores (Clancy et al., 2008) desarrollaron un ensayo ELISA múltiple formado por un panel de 15 antígenos, entre los que se encuentran la Eno1, Met6 y Pgc1, y con los que obtuvieron unos valores de sensibilidad y especificidad excelentes, 96,6% y 95,6% respectivamente. No obstante, es un ensayo llevado a cabo únicamente con 60 pacientes con CI y 24 pacientes control, y con apenas pacientes inmunodeprimidos. Además de la ausencia de un tercer grupo de pacientes con otras infecciones fúngicas que reduciría la especificidad de la prueba, más aún al ser una

combinación de 15 antígenos, Clancy y colaboradores realizaron el cálculo de los índices diagnósticos mediante un modelo predictivo de regresión de análisis multivariante. Con este método obtuvieron un valor muy elevado de especificidad, pero estos resultados no son comparables a los de nuestro estudio al haber empleado un modelo estadístico diferente para calcular los índices diagnósticos.

De todas formas, los resultados de utilidad diagnóstica deben interpretarse con reservas, ya que es conocido que la técnica de referencia, el hemocultivo, tiene una sensibilidad reducida (50%) para el diagnóstico de la candidiasis invasora (Clancy & Nguyen, 2013; Garey et al., 2006). De este modo, es posible que algunos sueros de pacientes en los grupos 2 y 3 muestren valores de anticuerpos anti-*Candida* relativamente elevados debido a la presencia de una candidiasis no detectable por hemocultivo, o que haya pasado desapercibida en un caso de infección mixta con otros hongos o bacterias.

Otro aspecto destacable en este estudio es que los anticuerpos de los sueros de los pacientes infectados por especies no-*albicans* del género *Candida*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* reaccionan con proteínas específicas de *C. albicans*. Este fenómeno de reacción cruzada ya se ha observado por otros autores (Clancy et al., 2008). Es más, en este estudio, en algunos casos, hemos obtenido mejores índices diagnósticos para la detección de la CI causada por *C. glabrata* y *C. parapsilosis* que para las infecciones causadas por la propia *C. albicans*. Así, los valores de sensibilidad más elevados se obtuvieron con las pruebas ELISA anti-Als3-N y anti-Met6 en pacientes infectados por *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, superando una sensibilidad del 81% en estos casos. El ensayo de anticuerpos CAGTA (80) también ofrece una sensibilidad del 77% para las infecciones producidas por *C. glabrata*, la cual también supera la sensibilidad para *C. albicans* (63%). Estas reacciones cruzadas pueden considerarse de utilidad clínica, ya que hoy en día se observa que la suma de infecciones por especies no-*albicans* ya está superando a *C. albicans*. Sin embargo, esta reacción cruzada no nos indica frente a qué especie nos encontramos, lo cual puede ser una desventaja terapéutica y pronóstica debido a la posible resistencia de estas especies a algunos antifúngicos y su asociación en algunos casos con una morbilidad y mortalidad más elevadas. Una posible

solución a este problema podría ser la búsqueda dentro de los diferentes antígenos, de epítomos característicos de especie, y diseñar con éstos una prueba diagnóstica más específica que permita su discriminación (Pitarch, Nombela & Gil, 2007).

Otro objetivo importante en el manejo de las enfermedades infecciosas es prevenirlas y la estrategia que presenta mayor efectividad para su consecución es la vacunación (Ito et al. 2009). Además del papel de la determinación de CAGTA en el diagnóstico de la CI, algunos autores (Zaragoza et al., 2009a; Zaragoza et al., 2009b) sugieren la posibilidad de utilizar estos anticuerpos como marcadores pronósticos en pacientes críticos ingresados en la UCI. Zaragoza y col. (Zaragoza et al., 2009b) han descrito una relación entre la presencia de títulos elevados de anticuerpos CAGTA con una disminución significativa de la tasa de mortalidad (22,7% en pacientes CAGTA positivos vs 61,2% en pacientes CAGTA negativos), especialmente en pacientes que presentaban títulos crecientes de anticuerpos y que estaban siendo sometidos a un tratamiento antifúngico. Esta disminución en la tasa de mortalidad sugiere la consideración de un posible papel inmunoprotector de estos anticuerpos frente a la CI, así los antígenos identificados por los CAGTA podrían constituir la base para el desarrollo futuro de vacunas frente a esta infección (Pitarch, Nombela & Gil, 2007). Hay varias proteínas de *C. albicans* que actualmente están siendo evaluadas como candidatas para una posible vacuna, y algunas como la adhesina Als3 están en fase de ensayo clínico para la candidiasis vulvovaginal recurrente (Moragues et al., 2014). Esta vacuna, llamada NDV-3A y desarrollada por NovaDigm Therapeutics se encuentra en fase II de ensayo clínico, en la que ha demostrado su eficacia y seguridad en la protección frente a la candidiasis vaginal recurrente, reduciendo la frecuencia de episodios vulvovaginales durante 12 meses en mujeres menores de 40 años (Edwards Jr. et al., 2018). Aun así, la protección frente a la candidiasis invasora no está resuelta y la búsqueda de nuevas proteínas candidatas para vacunación continúa (Hernández et al., 2010; Vialas et al., 2012). En este sentido, es interesante resaltar que hay estudios muy recientes en modelo animal que han conseguido protección frente a la CI, mediante inmunización activa con péptidos antigénicos, o pasiva con anticuerpos protectores, incluso en ratones inmunosuprimidos (Xin, 2016).

A la vista de que los pacientes con CI incluidos en este estudio habían desarrollado anticuerpos frente a Als3, Hwp1 y Met6, se diseñó un péptido conteniendo secuencias potencialmente inmunogénicas de estas proteínas y se realizaron ensayos de inmunoprotección en un modelo de infección sistémica por *C. albicans* en ratones Balb/c. En muchas ocasiones, la inmunización con proteínas completas puede no ser la mejor opción ya que pueden inducir posibles reacciones cruzadas. Por otro lado, se ha demostrado que las secuencias peptídicas inmunogénicas con múltiples epítomos diseñadas *in silico* pueden inducir niveles relevantes de anticuerpos neutralizantes en modelo murino (Sesterhenn et al., 2020).

Para la elección de los epítomos de las 3 proteínas, se estudiaron la estructura, accesibilidad superficial, hidrofilia y potencia antigénica tanto de la estructura completa como la de los posibles epítomos, seleccionando para cada proteína el que presentaba la mejor combinación de estas características. La secuencia peptídica se construyó según el modelo de Hurtgen y Hung (Hurtgen & Hung, 2017) y se utilizó KLH como proteína portadora. Los epítomos son motivos estructurales cuyo bajo peso molecular generalmente impide que sean inmunogénicos por sí mismos, por lo que requieren la ayuda de una proteína portadora para estimular una respuesta del sistema inmune en forma de producción de anticuerpos. El gran tamaño y los numerosos epítomos de KLH generan una respuesta inmune sustancial, y la abundancia de residuos de lisina para acoplar haptenos permite una alta proporción hapteno/proteína portadora, lo que aumenta la probabilidad de generar anticuerpos específicos. Con el fin de aumentar la eficacia y potenciar la capacidad inmunogénica de nuestro péptido sintético, se añadió el adyuvante aluminico Alhydrogel (Brenntag Biosector). En ensayos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de estudio, se utilizó el adyuvante incompleto de Freund (IFA), el cual induce una fuerte y duradera respuesta IgG. Sin embargo, se ha demostrado que IFA puede generar efectos secundarios en los ratones tales como irritación local, inflamación, necrosis, granulomas dolorosos persistentes, abscesos y quistes en la zona de inyección (Han et al, 2016), por lo que su uso fue descartado. Además, los adyuvantes basados en sales de aluminio son los únicos aprobados para el uso en vacunas humanas por las agencias regulatorias de Estados Unidos y Europa (Spellberg et al., 2008).



Se determinó la eficacia del péptido diseñado como agente inmunoprotector en un modelo murino de CI. Antes de la primera dosis de inmunización, los niveles de anticuerpos específicos de los grupos experimental y control no mostraron diferencias significativas. Aunque la primera dosis provocó un incremento en los niveles de anticuerpos en el grupo experimental, fue necesaria una dosis de refuerzo para registrar un incremento notable de anticuerpos, que resultó, además, estadísticamente significativo con respecto a los niveles basales y a los del grupo control.

Una vez inmunizados, los ratones fueron infectados con *C. albicans* por vía intravenosa y se analizó la supervivencia durante 21 días en comparación con el grupo control. Los ratones del grupo control tuvieron una supervivencia media de 6 días, no superando ninguno de ellos los 9 días, mientras que en el grupo experimental, sobrevivieron el 37,5% de los ratones que lo componían. Lin y colaboradores, en un estudio similar, obtuvieron el mismo porcentaje de supervivencia inmunizando los ratones con rAls3-N y Alhydrogel como adyuvante. No obstante, utilizaron dosis mucho mayores, de 300 µg de antígeno, a diferencia de los 11µg que utilizamos en nuestro ensayo. Además, Lin y colaboradores (Lin et al., 2009) infectaron los ratones con una dosis menor,  $2 \times 10^5$  *C. albicans* SC 5314. Luo y colaboradores (Luo et al., 2011) en su estudio de inmunización con rHyr1p-N más Alhydrogel, compararon diferentes dosis de antígeno (1-33 µg), obteniendo mayores tasas de supervivencia en ratones con las dosis más elevadas. Aun así, fueron necesarias dosis de 33 µg para conseguir una tasa de supervivencia equivalente a la de nuestro ensayo. Esta observación podría resultar interesante para futuros estudios de inmunidad con nuestra secuencia peptídica. Si además tenemos en cuenta que Luo y colaboradores emplearon para la infección una cepa de *C. albicans* (*C. albicans* 15563) menos virulenta que la SC 5314, podemos concluir que el péptido diseñado en nuestro estudio mostró mayor capacidad protectora frente a la CI en comparación con las proteínas ensayadas por estos autores. Estos datos refuerzan el uso de epítomos inmunogénicos en lugar de fragmentos completos de proteínas para la inmunización.

La mayor capacidad inmunoprotectora del péptido diseñado también se pudo verificar al cuantificar la carga fúngica en los riñones de los ratones a los 3 días de la infección,

resultando ésta casi 30 veces inferior en los ratones inmunizados frente a los controles. Este valor fue muy superior a 10 y 16 veces registrados en los ensayos de Lin et al. (2009) y Luo et al. (2011) respectivamente. Además, la carga fúngica de los 3 ratones supervivientes tras 21 días de infección fue similar a la registrada en los ratones sacrificados del grupo experimental el día 3 tras la infección, y coincide con el hecho de que dos de estos tres ratones supervivientes registraron concentración de anticuerpos por encima de la media del grupo experimental, y el tercero de ellos en la media. Podríamos pensar que una mayor concentración de anticuerpos ayudó a la supervivencia y que esto daría pie a desarrollar experimentos donde se obtengan niveles más altos de anticuerpos protectores.

En este sentido, Xin y Cutler (Xin & Cutler, 2011), en sus ensayos de inmunización basados en células dendríticas, construyeron 6 glicoconjugados formados por epítomos de proteínas de *C. albicans* más  $\beta$ -1,2-manotriosa. Los ratones inmunizados con los glicoconjugados  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Fba,  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Hwp1 y  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Met6 lograron protección inducida frente a la CI con cargas fúngicas reducidas en los riñones. Los conjugados  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Fba y  $\beta$ -(Man)<sub>3</sub>-Met6, además, obtuvieron porcentajes de supervivencia de ratones infectados superiores a los de nuestro estudio. Aunque estos resultados son prometedores, no podemos compararlos directamente con los de nuestro ensayo, ya que el modelo de inmunización es diferente y, además, el adyuvante completo de Freund (CFA) utilizado no podría aplicarse en seres humanos.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, podemos concluir que la prueba de detección de anticuerpos CAGTA, además de los problemas inherentes de objetividad y automatización, no llega a alcanzar el rendimiento esperado de manera individual, pero sí es una buena opción en combinación con otro biomarcador para el diagnóstico de la CI. La detección de anticuerpos específicos frente a la proteína Als3-N ha mostrado resultados prometedores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la CI tanto en pacientes inmunocompetentes como en pacientes inmunosuprimidos. La prueba de ELISA anti-Hwp1-N ofrece buenos resultados diagnósticos en pacientes inmunocompetentes, mientras que la prueba de ELISA anti-Met6 es más adecuada en pacientes inmunosuprimidos. La técnica ELISA, como herramienta diagnóstica, presenta

varias ventajas frente al hemocultivo. Por un lado, se obtiene un resultado más rápido; su realización solo requiere unas tres horas en contraste con los 2-3 días mínimamente necesarios para obtener un resultado en el hemocultivo. Además, debido a la fácil estandarización, y con un marcador adecuado, la técnica ELISA podría ser muy útil como una herramienta de vigilancia en pacientes con riesgo de EFI. En la actualidad, diferentes autores apoyan la detección de biomarcadores por ELISA como complemento al hemocultivo para el diagnóstico y seguimiento de la CI, permitiendo comprobar la eficacia de un tratamiento antifúngico. Por último, el BDG es un buen marcador para la detección de EFI, pero no alcanza gran eficacia para el diagnóstico de la CI en concreto, aunque puede ser útil en combinación con otros marcadores.

El péptido inmunogénico 3P-KLH derivado de las proteínas Als3-N, Hwp1-N y Met6 ha resultado útil como antígeno protector frente a la CI experimental en modelo murino. Las secuencias seleccionadas para cada una de estas proteínas e incorporadas en el péptido complejo diseñado, generaron una respuesta específica capaz de reducir en gran medida la invasión de *C. albicans* en los riñones de los ratones y alargar la supervivencia en el grupo de animales inmunizados. Los resultados de inmunoprotección obtenidos son esperanzadores, y consideramos que de cara al futuro sería interesante comprobar si aumentando la dosis y/o el número de inmunizaciones se podrían mejorar los resultados. Así mismo, dado que la CI es una infección que afecta principalmente a personas inmunodeprimidas, resultaría muy interesante estudiar modelos de inmunoprotección en ratones inmunosuprimidos.

## 6. Conclusiones



1. La prueba de detección de anticuerpos antimicelio de *C. albicans* (CAGTA) presenta una utilidad diagnóstica limitada para diagnóstico de candidiasis invasora (CI), con valores de sensibilidad moderados. Sin embargo, destaca por su alta especificidad, con índices superiores al 90%.
2. Los resultados obtenidos en la prueba de detección de CAGTA apoyan rebajar el punto de corte de 1/160 a 1/80 tanto pacientes inmunocompetentes como en pacientes inmunodeprimidos.
3. La detección de  $\beta$ -(1-3)-D-Glucano (BDG) es un buen biomarcador para revelar enfermedades fúngicas invasoras (EFI), pero por sí sola, no ofrece buenos índices diagnósticos en los casos de CI.
4. El ensayo ELISA para la detección de anticuerpos anti-Als3 presenta mejores resultados diagnósticos de CI en pacientes inmunocompetentes en comparación con las ELISA anti-Hwp1 y anti-Met6. En cambio, en pacientes inmunodeprimidos anti-Met6 es el ensayo ELISA con mejores índices de utilidad diagnóstica.
5. La combinación de los resultados de los ensayos ELISA mejora la sensibilidad en todas las combinaciones respecto a los ensayos individuales. A pesar de que la sensibilidad aumenta en todos los casos, como normal general, la especificidad desciende cuantas más pruebas se combinan, por lo que las combinaciones de más de 2 pruebas no resultan ventajosas para el diagnóstico de la CI.
6. La detección de BDG y CAGTA (1/80) es la combinación que ofrece los mejores resultados para el diagnóstico de CI en pacientes inmunocompetentes. En cambio, para pacientes inmunodeprimidos, la combinación de la prueba ELISA anti-Met6 con la prueba de detección de CAGTA es la que presenta los mejores índices de utilidad diagnóstica.

7. El método de predicción de epítomos *in silico* ha resultado muy útil para construir un péptido complejo inmunogénico con secuencias seleccionadas de Als3, Hwp1 y Met6, conjugado a KLH (3P-KLH), con capacidad para inducir la producción de anticuerpos específicos en ratones.
  
8. La inmunización de ratones con el péptido complejo 3P-KLH protege frente a la candidiasis invasora, reduciendo 30 veces la carga fúngica en riñones y aumentando la supervivencia hasta el 37,5%.

## 7. Bibliografía





1. Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J. R., Schaller, M., de Groot, P., ... Hube, B. (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 688-694. doi:10.1074/jbc.M509297200
2. Almeida, R.S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., ... Hube, B. (2008). The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog*, 4:e1000217
3. Almeida, R.S., Wilson, D., & Hube, B. (2009). *Candida albicans* iron acquisition within the host. *Fems Yeast Research*, 9(7), 1000-1012. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00570.x
4. Arancia, G., Stringaro, A., Crateri, P., Torosantucci, A., Ramoni, C., Urbani, F., ... Cassone, A. (1998). Interaction between human interleukin-2-activated natural killer cells and heat-killed germ tube forms of *Candida albicans*. *Cellular Immunology*, 186(1), 28-38. doi:10.1006/cimm.1998.1285
5. Arendorf, T., Bredekamp, B., Cloete, C., & Sauer, G. (1998). Oral manifestations of HIV infection in 600 south african patients. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 27(4), 176-179.
6. Arvanitis, M., Anagnostou, T., Fuchs, B.B., Caliendo, A.M., & Mylonakis, E. (2014). Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 490-526. doi:10.1128/CMR.00091-13
7. Ashman, R.B., Fulurija, A. and Papadimitriou, J.M. (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

8. Azie, N., Neofytos, D., Pfaller, M., Meier-Kriesche, H.U., Quan, S.P., & Horn, D. (2012). The PATH (prospective antifungal therapy) alliance® registry and invasive fungal infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73, 293-300.
9. Bacci, A., Montagnoli, C., Perruccio, K., Bozza, S., Gaziano, R., Pitzurra, L., ... Romani, L. (2002). Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *Journal of Immunology*, 168(6), 2904-2913. doi:10.4049/jimmunol.168.6.2904
10. Baer, E., Gadiator, A., Bastidas, S., Roschitzki, B., Acha-Orbea, H., Oxenius, A., & LeibundGut-Landmann, S. (2012). A novel th cell epitope of *Candida albicans* mediates protection from fungal infection. *Journal of Immunology*, 188(11), 5636-5643. doi:10.4049/jimmunol.1200594
11. Baillie, G.S., & Douglas, L.J. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*, 48, 671-679.
12. Bao, J. R., Master, R.N., Azad, K.N., Schwab, D.A., Clark, R.B., Jones, R.S., ... Shiera, K.L. (2018). Rapid, accurate identification of *Candida auris* by using a novel matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) database (library). *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4), UNSP e01700-17. doi:10.1128/JCM.01700-17
13. Barnett, J.A., Payne, R.W., & Yarrow, D. (2000). Yeasts: Characteristics and identification (3<sup>rd</sup> ed). *Cambridge University Press*.
14. Barnett, J. A., Payne, W., & Yarrow, D. (1990). Yeast characteristics and identification (2<sup>nd</sup> ed). *Cambridge University Press, Cambridge*.
15. Berkhout, C.M. (1923). De schimmelgeslachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *torula*. 1-71.
16. Betz, M., & Fox, B.S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*, 146, 108-113.

17. Beucher, B., Marot-Leblond, A., Billaud-Nail, S., Oh, S.H., Hoyer, L.L., & Robert, R. (2009). Recognition of *Candida albicans* Als3 by the germ tube-specific monoclonal antibody 3D9.3. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 55, 314-323.
18. Boniche, C., Rossi, S.A., Kischkel, B., Barbalho, F.V., D'Aurea-Moura, A.N., Nosanchuk, J.D., ... Taborda, C.P. (2020). Immunotherapy against systemic fungal infections based on monoclonal antibodies. *Journal of Fungi*, 6, 31. doi:10.3390/jof6010031
19. Bozza, S., Montagnoli, C., Gaziano, R., Rossi, G., Nkwanyuo, G., Bellocchio, S., & Romani, L. (2004). Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine*, 22(7), 857-864. doi:10.1016/j.vaccine.2003.11.031
20. Braun, B.R., & Johnson, A.D. (2000). TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, 155, 57-67.
21. Brena, S., Omaetxebarria, M.J., Elguezabal, N., Cabezas, J., Moragues, M.D., & Pontón, J. (2007). Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infect Immun*, 75, 3680-3682.
22. Bromuro, C., Torosantucci, A., Chiani, P., Conti, S., Polonelli, L., & Cassone, A. (2002). Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infection and Immunity*, 70(10), 5462-5470. doi:10.1128/IAI.70.10.5462-5470.2002
23. Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martínez-Pomares, L., ... Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*, 196, 407-412.
24. Burnie, J., & Matthews, R. (2004). Genetically recombinant antibodies: New therapeutics against candidiasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(2), 233-241. doi:10.1517/eobt.4.2.233.26327

25. Calderone, R.A. (1993). Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol*, 1(2), 55-8. doi:10.1016/0966-842x(93)90033-n
26. Calderone, R.A. (2002). *Candida* and candidiasis. 3rd ed. *American Society for Microbiology Press*.
27. Calderone, R.A., & Clancy, C.J. (2012). *Candida* and candidiasis. *ASM Press, Washington, DC*.
28. Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327-335. doi:10.1016/S0966-842X (01)02094-7
29. Casadevall, A., Cassone, A., Bistoni, F., Cutler, J.E., Magliani, W., Murphy, J. W., ... Romani, L. (1998). Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: An ongoing dilemma or an unnecessary dispute?. *Med Mycol*, 36, 95-105.
30. Casanova, M., Cervera, A.M., Gozalbo, D., & Martínez, J.P. (1997). Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun*, 65(10), 4360-4.
31. Cassone, A. (2008). Fungal vaccines: Real progress from real challenges. *Lancet Infectious Diseases*, 8(2), 114-124. doi:10.1016/S1473-3099(08)70016-1
32. Castillo, L., Martínez, A.I., Garcera, A., Elorza, M.V., Valentín, E., & Sentandreu, R. (2003). Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: The repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan. *Yeast*, 20, 973-983.
33. Cerdá, J., & Cifuentes, L. (2012). Using ROC curves in clinical investigation. theoretical and practical issues. *Revista Chilena De Infectología*, 29(2), 138-141.
34. Chaffin, W.L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 495-544.

35. Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martínez, J.P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 130-180.
36. Chen, S.C., Slavin, M.A., & Sorrell, T.C. (2011). Echinocandin antifungal drugs in fungal infections A comparison. *Drugs*, 71(1), 11-41. doi:10.2165/11585270-000000000-00000
37. Chen, S.C.A., & Sorrell, T.C. (2007). Antifungal agents. *Medical Journal of Australia*, 187(7), 404-409. doi:10.5694/j.1326-5377.2007.tb01313.x
38. Choi, J., Ko, H., Kim, J., Lee, H., Han, S., Chun, S., & Im, S. (2001). Platelet-activating factor-induced early activation of NF-kappa B plays a crucial role for organ clearance of *Candida albicans*. *Journal of Immunology*, 166(8), 5139-5144. doi:10.4049/jimmunol.166.8.5139
39. Chou P.Y., Fasman G.D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 47:45-148. doi: 10.1002/9780470122921.ch2.
40. Chu, W.S., Magee, B.B., & Magee, P.T. (1993). Construction of a Sfil macrorestriction map of *Candida albicans* genome. *J Bacteriol*, 175, 6637-6651.
41. Clancy, C.J., & Nguyen, M.H. (2013). Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: How nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clinical Infectious Diseases*, 56(9), 1284-1292. doi:10.1093/cid/cit006
42. Clancy, C.J., Nguyen, M., Cheng, S., Huang, H., Fan, G., Jaber, R.A., ... Nguyen, A.H. (2008). Immunoglobulin G responses to a panel of *Candida albicans* antigens as accurate and early markers for the presence of systemic candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1647-1654. doi:10.1128/JCM.02018-07

43. Cleves, A.E., Cooper, D.N., Barondes, S.H., & Kelly, R.B. (1996). A new pathway for protein export in *saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, *133*, 1017-1026.
44. Coleman, D.A., Oh, S.H., Zhao, X., Zhao, H., Hutchins, J.T., Vernachio, J.H., ... Hoyer, L.L. (2009). Monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als3 that immunolabel fungal cells in vitro and in vivo and block adhesion to host surfaces. *J Microbiol Methods*, *78*, 71-78.
45. Coleman, D., Sullivan, D., Bennett, D., Moran, G., Barry, H., & Shanley, D. (1997). Candidiasis: The emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *Aids*, *11*(5), 557-567. doi:10.1097/00002030-199705000-00002
46. Correia, A., Lermann, U., Teixeira, L., Cerca, F., Botelho, S., da Costa, R.M., ...Pais, C. (2010). Limited role of secreted aspartyl proteinases Sap1 to Sap6 in *Candida albicans* virulence and host immune response in murine hematogenously disseminated candidiasis. *Infection and Immunity*, *78*(11), 4839-4849. doi:10.1128/IAI.00248-10
47. Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A., & Booth, N.A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: Identification of eight plasminogenbinding proteins. *Mol Microbiol*, *47*, 1637-1651.
48. Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(2), 380-407. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
49. Cutler, J.E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, *45*, 187-218.
50. Cutler, J.E., Deepe, G.S., Jr., & Klein, B.S. (2007). Advances in combating fungal diseases: Vaccines on the threshold. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(1), 13-28. doi:10.1038/nrmicro1537

51. De Bernardis, F.M., Graziani, S., Tirelli, F., & Antonopoulou, S. (2018). *Candida* vaginitis: Virulence, host response and vaccine prospects. *Med Mycol*, 56(suppl\_1), 26-31. doi:10.1093/mmy/myx139
52. De Bernardis, F., Boccanera, M., Adriani, D., Spreghini, E., Santoni, G., & Cassone, A. (1997). Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infection and Immunity*, 65(8), 3399-3405. doi:10.1128/IAI.65.8.3399-3405.1997
53. De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., & Klis, F.M. (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast*, 20, 781-796.
54. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P., Stevens, D.A., Edwards, J.E., Calandra, T., ... Bennett, J.E. (2008). Revised definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of Cancer/Invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clinical Infectious Diseases*, 46(12), 1813-1821. doi:10.1086/588660
55. Deepe, G. (1997). Prospects for the development of fungal vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 585-&. doi:10.1128/CMR.10.4.585
56. Deva, R., Ciccoli, R., Kock, L., & Nigam, S. (2001). Involvement of aspirin-sensitive oxylipins in vulvovaginal candidiasis. *FEMS Microbiology Letters*, 198(1), 37-43. doi:10.1016/S0378-1097(01)00114-8
57. d'Ostiani, C., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., ... Romani, L. (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. *Journal of Experimental Medicine*, 191(10), 1661-1673. doi:10.1084/jem.191.10.1661



58. Edwards Jr, J.E. (2012). Fungal cell wall vaccines: An update. *Journal of Medical Microbiology*, 61(7), 895-903. doi:10.1099/jmm.0.041665-0
59. Edwards Jr, J.E., Schwartz, M.M., Schmidt, C.S., Sobel, J.D., Nyirjesy, P., Schodel, F., ... Hennessey Jr, J.P. A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. (2018). *Clin Infect Dis*. 66(12):1928-1936. doi: 10.1093/cid/ciy185.
60. Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., & Eisenhaber, F. (2004). A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol*, 337, 243-253.
61. Emini E.A., Hughes J.V., Perlow D.S., Boger J. (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*, 55(3):836-9. doi: 10.1128/JVI.55.3.836-839.1985.
62. ESTUDIO EPINE-EPPS nº 29: 2018.  
<https://www.epine.es/docs/public/reports/esp/2018%20EPINE%20Informe%20Espa%C3%B1a.pdf>
63. Ernst, J.F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146, 1763-1774.
64. Feldmesser, M. (2005). Prospects of vaccines for invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 43(7), 571-587. doi:10.1080/13693780500402138
65. Fernández-Arenas, E., Molero, G., Nombela, C., Díez-Orejas, R., & Gil, C. (2004). Low virulent strains of *Candida albicans*: Unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics*, 4, 3007-3020.

66. 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.
67. Fidel, P. L. J., & Cutler, J. E. (2011). Prospects for development of a vaccine to prevent and control vaginal candidiasis. *Curr Infect Dis Rep*, *13*, 102-107.
68. Fonzi, W. (1999). PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3-and beta-1,6-glucans. *Journal of Bacteriology*, *181*(22), 7070-7079. doi:10.1128/JB.181.22.7070-7079.1999
69. Fortún, J. (2011). Antifungal therapy update: New drugs and medical uses. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *29*, 38-44. doi:10.1016/S0213-005X(11)70042-8
70. Fourie, R., Ells, R., Swart, C. W., Sebolai, O. M., Albertyn, J., & Pohl, C.H. (2016). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interaction, with focus on the role of eicosanoids. *Frontiers in Physiology*, *7*, 64. doi:10.3389/fphys.2016.00064
71. Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C.F., & Ghannoum, M.A. (1997). Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology*, *143*(2), 331-40. doi:10.1099/00221287-143-2-331
72. Fukazawa, Y., & Kagaya, K. (1997). Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol*, *35*, 87-99.
73. Gantner, B.N., Simmons, R.M., & Underhill, D.M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J*, *24*, 1277-1286.

74. Garey, K., Rege, M., Pai, M., Mingo, D., Suda, K., Turpin, R., & Bearden, D. (2006). Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: A multi-institutional study. *Clinical Infectious Diseases*, 43(1), 25-31. doi:10.1086/504810
75. Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), E1-E4. doi:10.1038/jid.2013.1
76. Garzon, S., Marquis, G., Montplaisir, S., Kurstak, E., & Benhamou, N. (1989). Antigenic structure of *Candida albicans*. en: Kurstak E (ed.). *Immunology of Fungal Diseases. Immunology Series. Nueva York, Marcel Dekker*, 3-36.
77. Ghaleb M, Hamad M, Abu-Elteen KH. (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(1):26-33. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02032.x
78. Ghannoum, M.A., Burns, G.R., Elteen, K.A., & Radwan, S.S. (1986). Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infect Immun*, 54, 189-193.
79. Glee, P.M., Masuoka, J., Ozier, W.T., & Hazen, K.C. (1996). Presence of multiple laminin and fibronectin-binding proteins in cell wall extract of *Candida albicans*: Influence of dialysis. *J Med Vet Mycol*, 34, 57-61.
80. Gonçalves, B., Ferreira, C., Alves, C.T., Henriques, M., Azeredo, J., & Silva, S. (2016). Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(6), 905-927. doi:10.3109/1040841X.2015.1091805
81. González-Hernández, L.A., Andrade-Villanueva, J.F., Jave-Suárez, L.F., & Bravo-Cuellar, A. (2011). Cellular immunology: the T helper 17 cells (Th-17). *Rev Med MD*. 2.3(4):223-227.

82. Gow, N.A. (1994). Growth and guidance of fungal hypha. *Microbiology*, 140(12), 3193-205. doi:10.1099/13500872-140-12-3193
83. Gow, N.A., & Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*, 15, 406-412.
84. Gow, N.A., Netea, M.G., Munro, C.A., Ferwerda, G., Bates, S., Mora-Montes, H.M., ... Kullberg, B.J. (2007). Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis*, 196, 1565-1571.
85. Gozalbo, D., Roig, P., Villamón, E., & Gil, M.L. (2004). *Candida* and candidiasis: The cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 4, 117-135.
86. Gustafson, K.S., Vercellotti, G.M., Bendel, C.M., & Hostetter, M.K. (1991). Molecular mimicry in *Candida albicans*. role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J Clin Invest*, 87, 1896-1902. doi:10.1172/JCI115214
87. Han, L., Xue, J., Wang, L., Peng, K., Zhang, Z., Gong, T., & Sun, X. (2016). An injectable, low-toxicity phospholipid-based phase separation gel that induces strong and persistent immune responses in mice. *Biomaterials*, 105, 185-194. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.08.007
88. Han, Y., Riesselman, M., & Cutler, J. (2000). Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infection and Immunity*, 68(3), 1649-1654. doi:10.1128/IAI.68.3.1649-1654.2000
89. Han, Y., & Cutler, J. (1995). Antibody-response that protects against disseminated candidiasis. *Infection and Immunity*, 63(7), 2714-2719. doi:10.1128/IAI.63.7.2714-2719.1995
90. Han, Y., Kozel, T., Zhang, M., MacGill, R., Carroll, M., & Cutler, J. (2001). Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against

- experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *Journal of Immunology*, 167(3), 1550-1557. doi:10.4049/jimmunol.167.3.1550
91. Held, J., Kohlberger, I., Rappold, E., Grawitz, A. B., & Haecker, G. (2013). Comparison of (1 → 3)-beta-D-glucan, Mannan/Anti-mannan antibodies, and cand-tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1158-1164. doi:10.1128/JCM.02473-12
92. Hernáez, M., Ximenez-Embun, P., Martínez-Gomáriz, M., Gutiérrez-Blázquez, M.D., Nombela, C., & Gil, C. (2010). Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 73(7), 1404-1409. doi:10.1016/j.jprot.2010.02.008
93. Hernando, F.L., Calvo, E., Abad, A., Ramírez, A., Rementeria, A., Sevilla, M.J., & Pontón, J. (2007). Identification of protein and mannoprotein antigens of *Candida albicans* of relevance for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Int Microbiol*, 10, 103-108.
94. Hromatka, B., Noble, S., & Johnson, A. (2005). Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4814-4826. doi:10.1091/mbc.E05-05-0435
95. Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M., Scherer, S. (1998). *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*, 33(6):451-9. doi: 10.1007/s002940050359. PMID: 9644209.
96. Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., & Schäfer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: Cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*, 174(5), 362-74. doi:10.1007/s002030000218

97. Huffnagle, G., & Deepe, G. (2003). Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 344-350. doi:10.1016/S1369-5274(03)00089-4
98. Hull, C.M., & Johnson, A.D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, 285, 1271-1275.
99. Hull, C.M., Raisner, R.M., & Johnson, A.D. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, 289(5477), 307-310.
100. Hurley, R., & De Louvois, J. (1979). *Candida* vaginitis. *Postgraduate medical journal*, 55(647), 645-647. doi:0032-5473/79/0900-0645\$02.00
101. Hurtgen, B.J., & Hung, C. (2017). Rational design of T lymphocyte epitope-based vaccines against coccidioides infection. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1625, 45-64. doi:10.1007/978-1-4939-7104-6\_4
102. Hwang, C., Rhie, G., Oh, J., Huh, W., Yim, H., & Kang, S. (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology-Sgm*, 148, 3705-3713. doi:10.1099/00221287-148-11-3705
103. Ito, J.I., Lyons, J.M., Diaz-Arevalo, D., Hong, T.B., & Kalkum, M. (2009). Vaccine progress. *Medical Mycology*, 47, S394-S400. doi:10.1080/13693780802552614
104. Jackson, A.P., Gamble, J.A., Yeomans, T., Moran, G.P., Saunders, D., Harris, D., ... et al. (2009). Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res*, 19, 2231-2244.
105. Jacobsen, I.D., Wilson, D., Wachtler, B., Brunke, S., Naglik, J.R., & Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10, 85-93.

106. Janeway, C.A., Traveres, P., Walport, M., & Shlomchick, M.J. (2003). Inmunobiología. el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. *Elsevier-Masson, 2nd ed*
107. Jansons, V.K., & Nickerson, W.J. (1970). Chemical composition of chlamydo spores of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 104, 922-932.
108. Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., ... Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7329-7334.
109. Jong, A.Y., Chen, S.H., Stins, M.F., Kim, K.S., Tuan, T.L., & Huang, S.H. (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*, 52, 615-622.
110. Kaloklein, A., & Witkin, S. (1990). Prostaglandin-E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 58(1), 260-262. doi:10.1128/IAI.58.1.260-262.1990
111. Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Muller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., ... Klis, F.M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol*, 35, 601-611.
112. Kennedy, M., & Volz, P. (1985). Ecology of *Candida albicans* gut colonization - inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal-tract by bacterial antagonism. *Infection and Immunity*, 49(3), 654-663. doi:10.1128/IAI.49.3.654-663.1985
113. Kerridge, D., Odds, F.C., & Vaden-Bossche, H. (1993). Dimorphic fungi in biology and medicine. *1st Ed. Plenum Press*.
114. Kim, H., Kim, S., Ko, H., Choi, J., Kim, K., Oh, S., ... Im, S. (2008). Nitric oxide plays a key role in the platelet-activating factor-induced enhancement of resistance

- against systemic candidiasis. *Immunology*, 124(3), 428-435. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02795.x
115. Kirsch, D.R., Kelly, R., & Kurtz, M.B. (1990). The genetics of *Candida*. *CRC Press, 1st ed.*
116. Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 26, 239-256.
117. Kolaskar, A.S. & Tongaonkar, P.C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.*;276(1-2):172-4. doi: 10.1016/0014-5793(90)80535-q.
118. Kozel, T. (1996). Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(1), 34-+. doi:10.1128/CMR.9.1.34
119. Kozel, T. (1998). Complement activation by pathogenic fungi. *Research in Immunology*, 149(4-5), 309-320. doi:10.1016/S0923-2494(98)80755-4
120. Kretschmar, M., Hube, B., Bertsch, T., Sanglard, D., Merker, R., Schroder, M., ... Nichterlein, T. (1999). Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun*, 67, 6637-6642.
121. Kumamoto, C.A. (2008). Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nature Reviews Microbiology*, 6(9), 667-673. doi:10.1038/nrmicro1960
122. Kunkel, S., Spengler, M., May, M., Spengler, R., Larrick, J., & Remick, D. (1988). Prostaglandin-E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene-expression. *Journal of Biological Chemistry*, 263(11), 5380-5384.
123. Kurtzman, C.P., Fell, J.W., & Boekhout, T. (2011). The yeasts, a taxonomic study. *Elsevier, Amsterdam*.



124. Laforce-Nesbitt, S.S., Sullivan, M.A., Hoyer, L.L., & Bliss, J.M. (2008). Inhibition of *Candida albicans* adhesion by recombinant human antibody single-chain variable fragment specific for Als3p. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54, 195-202.
125. Laín, A., Elguezabal, N., Amutio, E., Fernández de Larrinoa, I., Dolores Moragues, M., & Pontón, J. (2008a). Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. *Clinical & Developmental Immunology*, 721950. doi:10.1155/2008/721950
126. Laín, A., Elguezabal, N., Brena, S., García-Ruiz, J.C., del Palacio, A., Moragues, M. D., & Pontón, J. (2007a). Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein I. *Bmc Microbiology*, 7, 35. doi:10.1186/1471-2180-7-35
127. Laín, A., Elguezabal, N., Dolores Moragues, M., García-Ruiz, J.C., del Palacio, A., & Pontón, J. (2008b). Contribution of serum biomarkers to the diagnosis of invasive candidiasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 8(3), 315-325. doi:10.1586/14737159.8.3.315
128. Laín, A., Moragues, M.D., García Ruiz, J.C., Mendoza, J., Camacho, A., del Palacio, A., & Pontón, J. (2007b). Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(3), 318-319. doi:10.1128/CVI.00396-06
129. Lan, C., Rodarte, G., Murillo, L., Jones, T., Davis, R., Dungan, J., ... Agabian, N. (2004). Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1451-1469. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04214.x
130. Landis, J., & Koch, G. (1977). Measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174. doi:10.2307/2529310

131. Larriba, G., & Calderone, R.A. (2008). Heterozygosity and loss of heterozygosity in *Candida albicans*. in G. san-blas, & R. A. calderone (eds.). *Pathogenic Fungi. Insight in Molecular Biology (1st Ed.)*, Portland, OR, USA: Horizon Press., 35-68.
132. Lee, S., Zheng, N., Clavijo, M., & Nussenzweig, M. (2003). Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infection and Immunity*, 71(1), 437-445. doi:10.1128/IAI.71.1.437-445.2003
133. León, C., Ruiz-Santana, S., Saavedra, P., Castro, C., Úbeda, A., Loza, A., ... Farinas, O. (2012). Value of beta-D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Medicine*, 38(8), 1315-1325. doi:10.1007/s00134-012-2616-y
134. Leroy, O., Gangneux, J., Montravers, P., Mira, J., Gouin, F., Sollet, J., ... AmarCand Study Grp. (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Critical Care Medicine*, 37(5), 1612-1618. doi:10.1097/CCM.0b013e31819efac0
135. Lin, J., Oh, S., Jones, R., Garnett, J.A., Salgado, P.S., Rusnakova, S., ... Cota, E. (2014). The peptide-binding cavity is essential for Als3-mediated adhesion of *Candida albicans* to human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(26), 18401-18412. doi:10.1074/jbc.M114.547877
136. Lin, L., Ibrahim, A.S., Xu, X., Farber, J.M., Avanesian, V., Baquir, B., ... Spellberg, B. (2009). Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *Plos Pathogens*, 5(12), e1000703. doi:10.1371/journal.ppat.1000703
137. Liu, H. (2001). Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 4, 728-735.

138. Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, *90*, 939-949.
139. Lockhart, S.R., Daniels, K.J., Zhao, R., Wessels, D., & Soll, D.R. (2003). Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, *2*, 49-61.
140. Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., & Soll, D.R. (2002). In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics*, *162*, 737-745.
141. Lockhart, S.R., Etienne, K.A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N.P., ... Litvintseva, A.P. (2017). Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*, *64*(2), 134-140. doi:10.1093/cid/ciw691
142. Loo, S., & Rine, J. (1994). Silencers and domains of generalized repression. *Science*, *264*, 1768-1771.
143. López-Ribot, J. (2005). *Candida albicans* biofilms: More than filamentation. *Current Biology*, *15*(12), R453-R455. doi:10.1016/j.cub.2005.06.020
144. Louie, A., Stein, D.S., Zack, J.Z., Liu, W., Conde, H., Fregeau, C., ... Drusano, G.L. (2011). Dose range evaluation of mycograb C28Y variant, a human recombinant antibody fragment to heat shock protein 90, in combination with amphotericin B-desoxycholate for treatment of murine systemic candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(7), 3295-3304. doi:10.1128/AAC.01324-10
145. Loza, E., Planes, A., & Rodríguez-Creixems, M. (2003). Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica en "procedimientos en microbiología clínica". E. Cercenado y R. Cantón (Eds.) SEIMC,
146. Luo, G., Ibrahim, A.S., French, S.W., Edwards Jr., J.E., & Fu, Y. (2011). Active and passive immunization with rHyr1p-N protects mice against hematogenously

- disseminated candidiasis. *Plos One*, 6(10), e25909.  
doi:10.1371/journal.pone.0025909
147. Maesaki, S., Hossain, M.A., Sasaki, E., Hashiguchi, K., Higashiyama, Y., Yoshitsugu, Y., ... Kohno, S. (1999). The future of antifungal agents. non azole antifungal agents. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 40, 157-161.
148. Magee, P. (2007). Genome structure and dynamics in *Candida albicans*. in C. d' enfert, & B. hube (eds.). *Candida Comparative and Functional Genomics (1st Ed.)*. Whimondam, UK: Caister Accademic Press., 7-26.
149. Makihira, S., Nikawa, H., Tamagami, M., Hamada, T., & Samaranayake, L.P. (2002). Differences in *Candida albicans* adhesion to intact and denatured type I collagen in vitro. *Oral Microbiol Immunol*, 17, 129-131.
150. Marchetti O., Lamoth F., Mikulska M., Viscoli C., Verweij P., Bretagne S., European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups (2012) ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 47:846-854.
151. Mansour, M., & Levitz, S. (2002). Interactions of fungi with phagocytes. *Current Opinion in Microbiology*, 5(4), 359-365. doi:10.1016/S1369-5274(02)00342-9
152. Marodi, L., Schreiber, S., Anderson, D.C., MacDermott, R.P., Korchak, H.M., & Johnston, J.R.B. (1993). Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferongamma. increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest*, 91, 2596-2601.
153. Martchenko, M., Alarco, A., Harcus, D., & Whiteway, M. (2004). Superoxide dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 456-467. doi:10.1091/mbc.E03-03-0179

154. Martínez, A.I., Castillo, L., Garcera, A., Elorza, M.V., Valentín, E., & Sentandreu, R. (2004). Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology*, *150*, 3151-3161.
155. Martínez-Jiménez, M.C., Muñoz, P., Valerio, M., Alonso, R., Martos, C., Guinea, J., & Bouza, E. (2015). *Candida* biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(8), 2354-2361. doi:10.1093/jac/dkv090
156. Martínez, J.P., Gil, M., López-Ribot, J., & Chaffin, W. (1998). Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(1), 121-+. doi:10.1128/CMR.11.1.121
157. Masuoka, J., & Hazen, K.C. (1999). Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells. *Glycobiology*, *9*, 1281-1286.
158. Matthews, R., & Burnie, J. (1988). Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, *26*(3), 459-463. doi:10.1128/JCM.26.3.459-463.1988
159. Matthews, R., & Burnie, J. (2005). Human recombinant antibody to HSP90: A natural partner in combination therapy. *Current Molecular Medicine*, *5*(4), 403-411. doi:10.2174/1566524054022594
160. Mayer, F.L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, *4*, 119-128.
161. Meri, T., Hartmann, A., Lenk, D., Eck, R., Wurzner, R., Hellwage, J., ... Zipfel, P. (2002). The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infection and Immunity*, *70*(9), 5185-5192. doi:10.1128/IAI.70.9.5185-5192.2002

162. Meyer, J., Harder, J., Gorogh, T., Weise, J., Schubert, S., Janssen, D., & Maune, S. (2004). Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic *Candida* infection. *Anticancer Research*, *24*(2B), 1025-1030.
163. Miller, S.E., & Finnerty, W.R. (1979). Aged-related physiological studies comparing *Candida albicans* chlamyospores to yeasts. *Can J Microbiol*, *25*, 765-772.
164. Mitsutake, K., Kohno, S., Miyazaki, T., Maesaki, S., & Koga, H. (1994). Detection of *Candida* enolase antibody in patients with candidiasis. *J Clin Lab Anal*, *8*, 207-210.
165. Montagnoli, C., Sandini, S., Bacci, A., Romani, L., & La Valle, R. (2004). Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis. *Med Mycol*, *42*, 319-324.
166. Montagnoli, C., Bozza S., Bacci A., Gaziano R., Mosci P., Morschhauser J., ... Romani L. (2003). A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity. *Eur J Immunol*. *33*: 1193-1204
167. Montagnoli, C., Bacci, A., Bozza, S., Gaziano, R., Mosci, P., Sharpe, A., & Romani, L. (2002). B7/CD28-dependent CD4(+)CD25(+) regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *Journal of Immunology*, *169*(11), 6298-6308. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6298
168. Moragues, M.D., Rementeria, A., Sevilla, M.J., Eraso, E., & Quindós, G. (2014). *Candida* antigens and immune responses: Implications for a vaccine. *Expert Rev Vaccines*, *13*, 1001-1012.
169. Moragues, M., Ormaetxebarria, M., Elguezabal, N., Sevilla, M., Conti, S., Polonelli, L., & Pontón, J. (2003). A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. *Infection and Immunity*, *71*(9), 5273-5279. doi:10.1128/IAI.71.9.5273-5279.2003

170. Moragues, M., Ortiz, N., Iruretagoyena, J., García-Ruiz, J., Amutio, E., Rojas, A., ... Emeterio, J. (2004). Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(2), 83-88.
171. Morgan, J., Meltzer, M., Plikaytis, B., Sofair, A., Huie-White, S., Wilcox, S., ... Teutsch, S. (2005). Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: A case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 26(6), 540-547. doi:10.1086/502581
172. Morrell, M., Fraser, V., & Kollef, M. (2005). Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: A potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3640-3645. doi:10.1128/AAC.49.9.3640-3645.2005
173. Mullick, A., Elias, M., Picard, S., Bourget, L., Jovcevski, O., Gauthier, S., ... Gros, P. (2004). Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. *Infection and Immunity*, 72(10), 5868-5876. doi:10.1128/IAI.72.10.5868-5876.2004
174. Mullis, K. (1990). Target amplification for dna analysis by the polymerase chain-reaction. *Annales De Biologie Clinique*, 48(8), 579-582.
175. Munro, C.A., & Richard, M.L. (2012). The cell wall: Glycoproteins, remodeling, and regulation. in Calderone, A., Clancy, Cornelius J. (ed.), *Candida and Candidiasis* (2nd ed., pp. 197). Washington: ASM Press. doi:10.1128/9781555817176
176. Naglik, J.R., Challacombe, S.J., & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 400-428. doi:10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003

177. Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., & Gow, N.A.R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*.
178. Niewerth, M., & Korting, H. (2001). Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*, 44(9-10), 361-367. doi:10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x
179. Nobile, C.J., Andes, D.R., Nett, J.E., Smith, F.J., Yue, F., Phan, Q.T., ... Mitchell, A. P. (2006). Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog*, 2:e63.
180. Odds, F.C. (1988). *Candida and candidosis*. London: Bailliere Tindall,
181. Odds, F.C. (1994). Presidential addresss - *candida-albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32, 1-8.
182. Odds, F., Brown, A., & Gow, N. (2003). Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11(6), 272-279. doi:10.1016/S0966-842X(03)00117.
183. Ollert, M.W., Wadsworth, E., & Calderone, R.A. (1990). Reduced expression of the functionally active complement receptor for iC3b but not for C3d on an avirulent mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 58, 909-913.
184. Olsen, I. (1974). Denture stomatitis. occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol Scand*, 32(5), 329-333.
185. Ostrosky-Zeichner, L, Alexander, B.D., Kett, D.H., Vázquez, J., Pappas, P.G., Saeki, F., ... Rex, J.H. (2005). Multicenter Clinical Evaluation of the (1→3) β-D-Glucan Assay as an Aid to Diagnosis of Fungal Infections in Humans. *Clinical Infectious Diseases*, 41(5), 654–659. doi:10.1086/432470
186. Pappas, P.G., Kauffman, C.A., Andes, D.R., Clancy, C.J., Marr, K.A., Ostrosky-Zeichner, L., ... Sobel, J.D. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), 409-417. doi:10.1093/cid/civ1194



187. Parker J.M., Guo D., Hodges R.S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, 25(19):5425-32. doi: 10.1021/bi00367a013.
188. Parkins, M.D., Sabuda, D.M., Elsayed, S., & Laupland, K.B. (2007). Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 613-618. doi:10.1093/jac/dkm212
189. Parra-Sánchez, M., Zakariya-Yousef Breval, I., Castro Méndez, C., García-Rey, S., Loza Vázquez, A., Úbeda Iglesias, A., ... CAVA Trem Study Grp. (2017). *Candida albicans* germ-tube antibody: Evaluation of a new automatic assay for diagnosing invasive candidiasis in ICU patients. *Mycopathologia*, 182(7-8), 645-652. doi:10.1007/s11046-017-0125-9
190. Pemán, J., Canton, E., Gobernado, M., & Spanish ECMM Working Grp Candidaem. (2005). Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: Results of a 2-year multicentre study in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24(1), 23-30. doi:10.1007/s10096-004-1267-5
191. Pemán, J., & Salavert, M. (2013). Epidemiology and prevention of nosocomial invasive infections by filamentous fungi and yeasts. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(5), 328-341. doi:10.1016/j.eimc.2013.02.002
192. Pemán, J. & Zaragoza, R. (2012). Combined use of nonculture-based lab techniques in the diagnosis and management of critically ill patients with invasive fungal infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(11), 1321-1330. doi: 10.1586/ERI.12.128

193. Pemán, J., Zaragoza, R., Quindós, G., Alkorta, M., Cuétara, M.S., Camarena, J.J., ... Study Grp *Candida Albicans* Germ. (2011). Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. *Bmc Infectious Diseases*, *11*, 60. doi:10.1186/1471-2334-11-60
194. Perruccio, K., Bozza, S., Montagnoli, C., Bellocchio, S., Aversa, F., Martelli, M., ... Romani, L. (2004). Prospects for dendritic cell vaccination against fungal infections in hematopoietic transplantation. *Blood Cells Molecules and Diseases*, *33*(3), 248-255. doi:10.1016/j.bcmd.2004.08.011
195. Pfaller, M.A., & Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem.. *Clin Microbiol Rev*, *20*, 133-163.
196. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Ellis, D., Tullio, V., ... Global Antifungal Surveillance Grp. (2010). Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(4), 1366-1377. doi:10.1128/JCM.02117-09
197. Pfaller, M.A., Andes, D.R., Diekema, D.J., Horn, D.L., Reboli, A.C., Rotstein, C., ... Azie, N.E. (2014). Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004-2008. *Plos One*, *9*(7), e101510. doi:10.1371/journal.pone.0101510
198. Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., ... Filler, S. G. (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*, *5*:e64
199. Pichová, I., Pavlíčková, L., Dostál, J., Dolejší, E., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Weber, J., & ...Souček, M. (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*,

- Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. *The FEBS Journal*, 268(9), 2669-2677. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02152.x
200. Pitarch, A., Abian, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C., & Gil, C. (2004). Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics*, 4, 3084-3106.
201. Pitarch, A., Díez-Orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sánchez, M., Gil, C., & Nombela, C. (2001). Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics*, 1, 550-559.
202. Pitarch, A., Jiménez, A., Nombela, C., & Gil, C. (2006). Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics*, 5(1), 79-96.
203. Pitarch, A., Jiménez, A., Nombela, C., & Gil, C. (2008). Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics Clin Appl*, 2, 596-618.
204. Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2010). Proteomics, a new challenge for clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28, 489-491.
205. Pitarch, A., Pardo, M., Jiménez, A., Pla, J., Gil, C., Sánchez, M., & Nombela, C. (1999). Two dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis*, 20, 1001-1010.
206. Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2007). Reliability of antibodies to *Candida* methionine synthase for diagnosis, prognosis and risk stratification in systemic candidiasis: A generic strategy for the prototype development phase of proteomic

- markers. *Proteomics Clinical Applications*, 1(10), 1221-1242.  
doi:10.1002/prca.200601036
207. Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2014). Serum antibody signature directed against *Candida albicans* Hsp90 and enolase detects invasive candidiasis in non-neutropenic patients. *Journal of Proteome Research*, 13(11), 5165-5184.  
doi:10.1021/pr500681x
208. Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2016). Seroprofiling at the *Candida albicans* protein species level unveils an accurate molecular discriminator for candidemia. *Journal of Proteomics*, 134, 144-162. doi:10.1016/j.jprot.2015.10.022
209. Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol*, 25, 78-82.
210. Pontón, J., Ormaetxea, M.J., Elguezal, N., Álvarez, M., & Moragues, M.D. (2001). Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med Micol*, 39, 101S-110S.
211. Pontón, J., del Palacio, A. (2007). Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections. *Revista Iberoamericana de Micología*. Sep;24(3):181-186. DOI: 10.1016/s1130-1406(07)70041-4.
212. Pontón, J. (2009). Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis. *Revista Iberoamericana De Micología*, 26(1), 8-14. doi:10.1016/S1130-1406(09)70003-8
213. Poulain, D., Slomianny, C., Jouault, T., Gomez, J.M., & Trinel, P.A. (2002). Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun*, 70, 4323-4328.
214. Poulain, D., & Jouault, T. (2004). *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: Elements for a decisive crosstalk. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4), 342-349. doi:10.1016/j.mib.2004.06.011

215. Presterl, E., Lassnigg, A., Mueller-Uri, P., El-Menyawi, I., & Graninger, W. (1999). Cytokines in sepsis due to *Candida albicans* and in bacterial sepsis. *European Cytokine Network*, 10(3), 423-429.
216. Quindós, G., Eraso, E., López-Soria, L.M., & Ezpeleta, G. (2012) Invasive Fungal Disease: Conventional or molecular mycological diagnosis?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30 (9), 560-571. doi: 10.1016/j.eimc.2011.10.018
217. Quindós, G. (2014). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana De Micología*, 31(1), 42-48. doi:10.1016/j.riam.2013.10.001
218. Quynh, P., Carter, M., Yue, F., Donald, S., Michael, R., William, W., ... Scott, F. (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*, 5(3), e64.
219. Ramage, G., VandeWalle, K., López-Ribot, J.L., & Wickes, B.L. (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.
220. Ramage, G., Saviile, S., Thomas, D., & López-Ribot, J. (2005). *Candida* biofilms: An update. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633-638. doi:10.1128/EC.4.4.633-638.2005
221. Ramsey, H., Morrow, B., & Soll, D.R. (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.
222. Rhein, J., Bahr, N.C., Morawski, B.M., Schutz, C., Zhang, Y., Finkelman, M., ... Boulware DR. (2014). Detection of High Cerebrospinal Fluid Levels of (1→3)-β-d-Glucan in Cryptococcal Meningitis. *Open Forum Infect Dis*.1(3):105. doi:10.1093/ofid/ofu105.

223. Richardson, M.D., & Warnock, D.W. (2003). Superficial candidosis: Fungal infection. *Malden: Blackwell Publishing*.
224. Roitt, I., Delves, P., Martin, S., & Burton, D. (2008). Inmunología. fundamentos. *Editorial Médica Panamericana, 11th ed.*
225. Romani, L. (2002). Innate immunity against fungal pathogens. In R. A. Calderone, & L.R. Cihlar (Eds.), *Fungal pathogenesis: Principles and clinical applications* (1st ed., pp.401). New York, EEUU: Marcel Dekker Inc.
226. Romani, L., Bistoni, F., & Puccetti, P. (2003). Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: The role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol*, 6, 338-343.
227. Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 4(1), 11-23. doi:10.1038/nri1255
228. Romani, L., Montagnoli, C., Bozza, S., Perruccio, K., Spreca, A., Allavena, P., ... Puccetti, P. (2004). The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *International Immunology*, 16(1), 149-161. doi:10.1093/intimm/dxh012
229. Rotrosen, D., Calderone, R.A., & Edwards, J.E.J. (1986). Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Rev Infect Dis*, 8, 73-85.
230. Rubio, M., Gil-Tomás, J., Benito-Ruesca, R., Ramírez de Ocáriz, I., & Navarro-Lucía, M. (2001). Micosis más frecuentes en nuestro medio. in: Pemán, J., Martín-Mazuleos, E., Rubio, M.C., editors. *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista Iberoamericana De Micología, Cap. 2*
231. Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentín, E., & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*, 6, 14-29.

232. Sáez-Rosón, A., Sevilla, M., & Moragues, M.D. (2014). Identification of superficial *Candida albicans* germ tube antigens in a rabbit model of disseminated candidiasis. A proteomic approach. *International Microbiology*, 17(1), 21-29. doi:10.2436/20.1501.01.204
233. San Millán, R., Ezkurra, P., Robert, R., Moragues, M.D., Quindós, G., & Pontón, J. (1996). Effect of monoclonal antibodies directed against *Candida albicans* cell wall antigens on the adhesion of the fungus to polystyrene. *Microbiology*, 142, 2271-2277.
234. Sánchez-Vargas, L.O., Ortiz-López, N.G., Villar, M., Moragues, M.D., Aguirre, J.M., Cashat-Cruz, M., ... Quindós, G. (2005). Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *J Clin Microbiol*, 43(8), 4159-4162.
235. Sánchez-Vargas, L.O., Ortiz-López, N.G., Villar, M., Moragues, M.D., Aguirre, J.M., Cashat-Cruz, M., ... Quindós, G. (2005). Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol.*, 22(2), 83-92.
236. Sarthy, A.V., McGonigal, T., Coen, M., Frost, D.J., Meulbroek, J.A., & Goldman, R.C. (1997). Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3 beta-glucosyltransferase. *Microbiology*, 143 (Pt 2), 367-376.
237. Sato, K., Yang, X., Yudate, T., Chung, J., Wu, J., Luby-Phelps, K., . . . Ariizumi, K. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38854-38866. doi:10.1074/jbc.M606542200
238. Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., & Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6), 365-77. doi:10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x

239. Schauer, F., & Hanschke, R. (1999). Zur taxonomie und ökologie der gattung candida: Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. *Mycoses*, (42), 12-21. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1999.tb04521.x>
240. Schneider, J., Unholzer, A., Schaller, M., Schafer-Korting, M., & Korting, H. (2005). Human defensins. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 83(8), 587-595. doi:10.1007/s00109-005-0657-1
241. Schofield, D., Westwater, C., & Balish, E. (2004). Beta-defensin expression in immunocompetent and immunodeficient germ-free and *Candida albicans*-monoassociated mice. *Journal of Infectious Diseases*, 190(7), 1327-1334. doi:10.1086/423856
242. Sendid, B., Jouault, T., Coudriau, R., Camus, D., Odds, F., Tabouret, M., Poulain, D. (2004). Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (1), 164-171. doi: 10.1128/jcm.42.1.164-171.2004
243. Sergeeva, M.G., Gonchar, M.V., Mevkh, A.T., & Varfolomeyev, S.D. (1997). Prostaglandin E2 biphasic control of lymphocyte proliferation: Inhibition by picomolar concentrations. *FEBS Lett*, 418, 235-238.
244. Sesterhenn F., Yang C., Bonet J., et al. (2020). De novo protein design enables the precise induction of RSV-neutralizing antibodies. *Science*, 368(6492):5051. doi:10.1126/science.aay5051
245. Sevilla, M., Robledo, B., Rementeria, A., Moragues, M., & Pontón, J. (2006). A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis. *Infection and Immunity*, 74(5), 3042-3045. doi:10.1128/IAI.74.5.3042-3045.2006



246. Sharma, G., Pai, K.M., Setty, S., Ramapuram, J.T., & Nagpal, A. (2009). Oral manifestations as predictors of immune suppression in a HIV-/AIDS-infected population in south India. *Clinical Oral Investigations*, 13(2), 141-148. doi:10.1007/s00784-008-0210-z
247. Sheperd, M., Poulter, R., & Sullivan, P. (1985). *Candida albicans*: Biology, genetics and pathogenicity. *Ann Rev Microbiol*, 39, 579-614.
248. Shepherd, M.G. (1988). Morphogenetic transformation of fungi. en: McGinnis M (ed.). *Current Topics in Medical Micology, Nueva York, Springer-Verlag*, 278-304.
249. Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., ... Edwards, J.E. Jr. (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 279, 30480-30489.
250. Shimizu, C., Kuriyama, T., Williams, D.W., Karasawa, T., Inoue, K., Nakagawa, K., & Yamamoto, E. (2008). Association of oral yeast carriage with specific host factors and altered mouth sensation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105(4), 445-451.
251. Singleton, D.R., Masuoka, J., & Hazen, K.C. (2001). Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *J Bacteriol*, 183, 3582-3588.
252. Singleton, D., Fidel, P., Wozniak, K., & Hazen, K. (2005). Contribution of cell surface hydrophobicity protein I (Csh1p) to virulence of hydrophobic *Candida albicans* serotype A cells. *FEMS Microbiology Letters*, 244(2), 373-377. doi:10.1016/j.femsle.2005.02.010
253. Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., & Soll, D.R. (1987). "Whiteopaque transition": A second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 169, 189-197.

254. Sobel, J., Faro, S., Force, R., Foxman, B., Ledger, W., Nyirjesy, P., ... Summers, P. (1998). Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *178*(2), 203-211. doi:10.1016/S0002-9378(98)80001-X
255. Sobel, J., & Rex, J. (2001). Invasive candidiasis: Turning risk into a practical prevention policy? *Clinical Infectious Diseases*, *33*(2), 187-190. doi:10.1086/321812
256. Soll, D. R. (2014). The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *Journal of Oral Microbiolog.* doi:10.3402/jom.v6.22993
257. Soll, D.R. (2004). Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: A unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays*, *26*, 10-20.
258. Soll, D.R., Morrow, B., & Srikantha, T. (1993). High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet*, *9*, 61-65.
259. Son, H.J., Sung, H., Park, S.Y., Kim, T., Lee, H.J., Kim, S.M., ... Kim, S.H. (2017). Diagnostic performance of the (1-3)- $\beta$ -D-glucan assay in patients with *Pneumocystis jirovecii* compared with those with candidiasis, aspergillosis, mucormycosis, and tuberculosis, and healthy volunteers. *PloS one*, *12*(11), e0188860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188860>
260. Spellberg, B. (2011). Vaccines for invasive fungal infections. *F1000 Medicine Reports*, *3*, 13. doi:10.3410/M3-13
261. Spellberg, B., Ibrahim, A.S., Lin, L., Avanesian, V., Fu, Y., Lipke, P., ... Edwards, J.E., Jr. (2008). Antibody titer threshold predicts anti-candidal vaccine efficacy even though the mechanism of protection is induction of cell-mediated immunity. *Journal of Infectious Diseases*, *197*(7), 967-971. doi:10.1086/529204

262. Staab, J.F., Bahn, Y.S., Tai, C.H., Cook, P.F., & Sundstrom, P. (2004). Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40737-40747. doi:10.1074/jbc.M406005200
263. Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., & Sundstrom, P. (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*, 283, 1535-1538.
264. Staab, J.F., Ferrer, C.A., & Sundstrom, P. (1996). Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6298-6305. doi:10.1074/jbc.271.11.6298
265. Staab, J., & Sundstrom, P. (1998). Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWPI of *Candida albicans*. *Yeast*, 14(7), 681-686. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199805)14:7<681::AID-YEA256>3.0.CO;2-8
266. Staib, P., & Morschhauser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*-an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50, 1-12.
267. Standiford, T., Kunkel, S., Rolfe, M., Evanoff, H., Allen, R., & Strieter, R. (1992). Regulation of human alveolar macrophage-derived and blood monocyte-derived interleukin-8 by prostaglandin-E2 and dexamethasone. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 6(1), 75-81. doi:10.1165/ajrcmb/6.1.75
268. Stevens, D.A. (2012). Advances in systemic antifungal therapy. *Clinics in Dermatology*, 30(6), 657-661. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.09.018
269. Strassmann, G., Patil-Koota, V., Finkelman, F., Fong, M., & Kambayashi, T. (1994). Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential

- deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Exp Med*, 180, 2365-2370.
270. Strockbine, N. A., Lagen, M. T., Zweibel, S. M., & Buckley, H. R. (1984). Identification and molecular weight characterization of antigens from *Candida albicans* that are recognized by human sera. *Infect Immun*, 43, 715-721. doi: 10.1128/IAI.43.2.715-721.1984
271. Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 12, 317-324.
272. Sui, X., Yan, L., & Jiang, Y. (2017). The vaccines and antibodies associated with Als3p for treatment of *Candida albicans* infections. *Vaccine*, 35(43), 5786-5793. doi:10.1016/j.vaccine.2017.08.082
273. Suliman, H.S., Appling, D.R., & Robertus, J.D. (2007). The gene for cobalamin-independent methionine synthase is essential in *Candida albicans*: A potential antifungal target. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467(2), 218-226. doi:10.1016/j.abb.2007.09.003
274. Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cellular Microbiology*, 4(8), 461-469. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00206.x
275. Sundstrom, P., & Aliaga, G.R. (1994). A subset of proteins found in culture supernatants of *Candida albicans* includes the abundant, immunodominant, glycolytic enzyme enolase. *J Infect Dis*, 169, 452-456.
276. Taiwo, O.O., Okeke, E.N., Jalo, P.H., & Danfillo, I.S. (2006). Oral manifestation of HIV/AIDS in plateau state indigenes, Nigeria. *West Afr J Med*, 25, 32-37. doi: 10.4314/wajm.v25i1.28242
277. Taylor, B.N., Hannemann, H., Sehnal, M., Biesecker, A., Schweizer, A., Rollinghoff, M., & Schroppel, K. (2005). Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model

- in mice. *Infection and Immunity*, 73(10), 7061-7063. doi:10.1128/IAI.73.10.7061-7063.2005
278. Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C.Y., Nichterlein, T., ... Naglik, J.R. (2006). Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol*, 296, 405-420.
279. Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., ... Cassone, A. (2005). A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 597-606. doi:10.1084/jem.20050749
280. Tortorano, A., Pemán, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C., Faure, O., ... ECMM Working Grp Candidaemia. (2004). Epidemiology of candidaemia in europe: Results of 28-month european confederation of medical mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23(4), 317-322. doi:10.1007/s10096-004-1103-y
281. Tran, P., Ahmad, R., Xu, J., Ahmad, A., & Menezes, J. (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(2), 263-270. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01659.x
282. Travassos, L.R., & Taborda, C.P. (2017). Linear epitopes of paracoccidioides brasiliensis and other fungal agents of human systemic mycoses as vaccine candidates. *Frontiers in Immunology*, 8, 224. doi:10.3389/fimmu.2017.00224
283. Turhan O., Ozhak-Baysan B., Zaragoza O., et al. (2017). Evaluation of MALDI-TOF-MS for the Identification of Yeast Isolates Causing Bloodstream Infection. *Clin Lab*, 63(4):699-703. doi:10.7754/Clin.Lab.2016.161101

284. Ubhi, D.K., & Robertus, J.D. (2015). The cobalamin-independent methionine synthase enzyme captured in a substrate-induced closed conformation. *Journal of Molecular Biology*, 427(4), 901-909. doi:10.1016/j.jmb.2014.12.014
285. Ubhi, D., Kago, G., Monzingo, A.F., & Robertus, J.D. (2014). Structural analysis of a fungal methionine synthase with substrates and inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 426(8), 1839-1847. doi:10.1016/j.jmb.2014.02.006
286. Ubhi, D., Kavanagh, K.L., Monzingo, A.F., & Robertus, J.D. (2011). Structure of *Candida albicans* methionine synthase determined by employing surface residue mutagenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 513(1), 19-26. doi:10.1016/j.abb.2011.06.002
287. Underhill, D.M. (2007). Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and nods. *Immunological Reviews*, 219, 75-87. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00548.x
288. Uppuluri, P., Khan, A., & Edwards, J.E. (2017). Current trends in candidiasis. in R. prasad (ed.), *Candida albicans: Cellular and molecular biology* (2nd ed., pp. 5-23). Cham, Suiza: Springer International Publishing, doi:10.1007/978-3-319-50409-4
289. Urban, C.F., Lourido, S., & Zychlinsky, A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, 8, 1687-1696.
290. van Burik, J.A., & Magee, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol*, 55, 743-72. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.743
291. van Deventer, A.H.J., Goessens, W.H., van Vliet, A.J., & Verbrugh, H.A. (1996). Anti-enolase antibodies partially protective against systemic candidiasis in mice. *Clin Microbiol Infect*, 2, 36-43.

292. van Deventer, A.J.M., van Vliet, H.J.A., Hop, W.C.J., & Goessens, W.H.F. (1994). Diagnostic value of anti-*Candida* enolase antibodies. *J Clin Microbiol*, *32*, 17-23.
293. Vassiliou, E., Jing, H., & Ganea, D. (2003). Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cellular Immunology*, *223*(2), 120-132. doi:10.1016/S0008-8749(03)00158-8
294. Vázquez, J. A., & Sobel, J. D. (2011). Candidiasis. in: Kauffman, C.A., Pappas, P.G., Sobel, J.D., Dismukes, W. *Essentials of Clinical Mycology 2nd Edition*. Springer, 167-227.
295. Vázquez-Torres, A., & Balish, E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev*, *61*, 170-192.
296. Vialas, V., Perumal, P., Gutiérrez, D., Ximénez-Embun, P., Nombela, C., Gil, C., & Chaffin, W.L. (2012). Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics*, *12*(14), 2331-2339. doi:10.1002/pmic.201100588
297. Vilanova, M., Teixeira, L., Caramalho, I., Torrado, E., Marqués, A., Madureira, P., ... Demengeot, J. (2004). Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. *Immunology*, *111*(3), 334-342. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01819.x
298. Vitkov, L., Krautgartner, W., Hannig, M., Weitgasser, R., & Stoiber, W. (2002). *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiology and Immunology*, *17*(1), 60-64. doi:10.1046/j.0902-0055.2001.00085.x
299. Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., & Edgerton, M. (2007). Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(1), 154-161. doi:10.1128/AAC.00478-06

300. Waechtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., & Hube, B. (2011). From attachment to damage: Defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *Plos One*, 6(2), e17046. doi:10.1371/journal.pone.0017046
301. Walsh, T.J., Hathorn, J.W., Sobel, J.D., Merz, W.G., Sánchez, V., Maret, S.M., ... Sliva, C. (1991). Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med*, 324, 1026-1031. doi: 10.1056/NEJM199104113241504
302. Wang, K., Luo, Y., Zhang, W., Xie, S., Yan, P., Liu, Y., ... Xie, L. (2020). Diagnostic value of *Candida* mannan antigen and anti-mannan IgG and IgM antibodies for *Candida* infection. *Mycoses*, 63(2), 181-188. doi:10.1111/myc.13035
303. Whiteway, M., & Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, 61, 529-553.
304. Wingard, J., & Leather, H. (2004). A new era of antifungal therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 10(2), 73-90. doi:10.1016/j.bbmt.2003.09.014
305. Wysong, D., Christin, L., Sugar, A., Robbins, P., & Diamond, R. (1998). Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infection and Immunity*, 66(5), 1953-1961. doi:10.1128/IAI.66.5.1953-1961.1998
306. Xin, H. (2016). Active immunizations with peptide-DC vaccines and passive transfer with antibodies protect neutropenic mice against disseminated candidiasis. *Vaccine*, 34(2), 245-251. doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.035
307. Xin, H., & Cutler, J.E. (2011). Vaccine and monoclonal antibody that enhance mouse resistance to candidiasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(10), 1656-1667. doi:10.1128/CI.05215-11



308. Yaman, G., Akyar, I., & Can, S. (2012). Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(1), 65-67. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.013
309. Yin, Q.Y., de Groot, P.W., de Jong, L., Klis, F.M., & De Koster, C.G. (2007). Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 7, 887-896.
310. Zaragoza, R., Pemán, J., Quindós, G., Iruretagoyena, J.R., Cuétara, M.S., Ramírez, P., ... Pontón, J. (2009a). Clinical significance of the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibodies in critically ill patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(6), 592-595. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02794.x
311. Zaragoza, R., Pemán, J., Quindós, G., Iruretagoyena, J.R., Cuétara, M.S., Ramírez, P., ... Candida Albicans Germ Tube Antibody Detection in Critically Ill Patients Study Group. (2009b). Kinetic patterns of *Candida albicans* germ tube antibody in critically ill patients: Influence on mortality. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(10), 1527-1528. doi:10.1128/CVI.00183-09
312. Zhang, M., Bohlman, M., Itatani, C., Burton, D., Parren, P., St Jeor, S., & Kozel, T. (2006). Human recombinant antimannan immunoglobulin G1 antibody confers resistance to hematogenously disseminated candidiasis in mice. *Infection and Immunity*, 74(1), 362-369. doi:10.1128/IAI.74.1.362-369.2006
313. Zhao, X., Daniels, K.J., Oh, S.H., Green, C.B., Yeater, K.M., Soll, D.R., & Hoyer, L.L. (2006). *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology*, 152, 2287-2299. doi: 10.1099/mic.0.28959-0
314. Zhao, X., Oh, S.H., Cheng, G., Green, C.B., Nuessen, J.A., Yeater, K., ... Hoyer, L.L. (2004). ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans*

adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology*, *150*, 2415-2428. doi: 10.1099/mic.0.26943-0.

315. Zordan, R.E., Galgoczy, D.J., & Johnson, A.D. (2006). Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, *103*, 12807-12812. doi: 10.1073/pnas.0605138103



## 8. Anexos



**Tabla 8.1.** Características de los pacientes con candidiasis invasora probada (grupo 1).

Paciente (Nº de sueros)	Servicio Hospitalario	Factor predisponente	Estado inmunológico	Especie de <i>Candida</i>	CAGTA	Als3	Hwp1	Met6	BDG
1(4)	UCI		IC	<i>C. albicans</i>	640	3,588	10,717	11,070	1184,4
2(5)	UCI	Neumonía grave	IC	<i>Candida</i> sp.	10	1,173	2,457	1,531	1211,45
3(1)	Cirugía	Sepsis abdominal	IC	<i>Candida</i> sp.	20	3,230	1,626	2,065	119,63
4(1)	Medicina interna	Abscesos hepáticos	IC	<i>C. albicans</i>	20	1,118	2,741	2,826	7,93
5(4)	Digestivo	Prótesis dental, cáncer de páncreas	ID	<i>C. glabrata</i>	80	0,906	1,081	5,450	375,46
6(2)	Nefrología Vascular	DM mal controlada, vasculopatía, fiebre, úlceras por presión	ID	<i>C. parapsilosis</i>	0	0,930	11,116	1,714	28,83
7(1)	Cardiología	DM, cardiópata	IC	<i>C. tropicalis</i>	10	0,926	2,383	4,636	34,44
8(4)	Cirugía	Intervención quirúrgica	IC	<i>C. albicans</i>	80	4,081	7,759	13,012	170,97
9(4)	UCI		IC	<i>C. albicans</i>	160	1,099	3,828	2,187	256,84
10(1)	Medicina interna		IC	<i>C. glabrata</i>	160	2,642	2,592	3,218	76,63
11(3)	UCI		IC	<i>C. albicans</i>	1280	2,250	7,546	5,901	134,6
12(1)	Cirugía		IC	<i>C. glabrata</i>	160	3,080	20,404	1,430	460,66
13(2)	Medicina interna	Aneurisma	IC	<i>C. albicans</i>	160	0,927	2,419	4,168	663,24
14(2)	UCI	Neumonía	IC	<i>C. glabrata</i>	160	3,216	14,700	4,626	3873
15(3)	Hematología	Linfoma de Burkitt gástrico con QT, perforación intestinal	ID	<i>Candida</i> sp.	40	1,202	2,130	1,761	431,05
16(1)	X		IC	<i>C. albicans</i>	10	0,933	1,315	1,869	382,39
17(1)	Medicina interna	Artritis de cadera postprótesis	IC	<i>Candida</i> sp.	320	2,864	4,986	2,183	87,04
18(2)	Digestivo	Diverticulitis esofágica	IC	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	320	2,253	2,928	12,494	317,05
19(5)	Cirugía		IC	<i>C. albicans</i>	320	2,172	3,651	2,393	321,76
20(18)	Hematología	Neumonía, LLC	ID	<i>C. tropicalis</i>	20	0,892	0,988	1,444	193,62
21(2)	Cirugía		IC	<i>C. albicans</i>	320	3,193	4,782	2,018	42,52
22(2)	Reanimación		IC	<i>C. albicans</i>	40	0,973	1,176	1,129	219,47
23(1)	Reanimación		IC	<i>C. albicans</i>	20	0,422	0,703	1,831	73,9
24(1)	Reanimación	Prótesis cadera	IC	<i>C. parapsilosis</i>	160	1,584	5,622	1,557	126,98
25(1)	Reanimación		IC	<i>C. parapsilosis</i>	160	2,333	7,120	1,823	291,54
26(4)	Medicina interna	DM	IC	<i>C. lusitaniae</i>	640	2,943	5,546	4,743	1038
27(3)	Reanimación		IC	<i>C. albicans</i>	1280	4,395	7,023	4,294	1377,65
28(1)	Traumatología	Prótesis	ID	<i>C. glabrata</i>	0	0,529	0,877	1,499	26,09
29(2)	UCI	Perforación duodenal	IC	<i>C. parapsilosis</i>	80	0,641	3,221	7,426	27,3
30(1)	UCI	Shock séptico, Catéter venoso central	IC	<i>C. albicans</i>	320	1,030	1,122	4,445	2104
31(4)	UCI		IC	<i>C. parapsilosis</i>	160	1,467	2,184	1,888	267,14
32(1)	UCI	DM, sepsis	IC	<i>C. albicans</i>	160	0,409	1,059	2,219	57,25
33(2)	Medicina interna	Pancreatitis grave, abscesos abdominales	IC	<i>C. glabrata</i>	80	0,875	1,853	1,733	64,13
34(4)	Nefrología	Insuficiencia renal, diálisis, Prostatitis, orquiepididimitis	ID	<i>C. albicans</i>	160	4,407	5,696	8,611	371,16
35(2)	Reanimación		IC	<i>C. parapsilosis</i>	0	1,167	1,291	1,541	68,08

36(1)	Medicina interna/UCI		IC	<i>C. guilliermondi</i>	0	1,790	1,307	1,366	6,58
37(4)	Digestivo	Sepsis abdominal	IC	<i>C. glabrata</i>	80	2,306	3,976	5,090	33275
38(4)	UCI	Sepsis abdominal , Enf. Cronh	ID	<i>C. albicans</i>	10	0,466	0,983	1,265	735,54
39(1)	Reanimación		IC	<i>Candida sp.</i>	20	0,553	1,638	2,288	333,69
40(2)	Digestivo		IC	<i>Candida sp.</i>	10	0,538	1,109	0,872	16,36
41(1)	Oncología/ Reanimación	Paciente oncológico	ID	<i>C. tropicalis</i>	40	0,590	0,753	1,550	12,95
42(1)	Cirugía		IC	<i>C. albicans</i>	160	3,494	2,593	2,928	51
43(2)	Geriatría		IC	<i>C. glabrata</i>	20	0,990	0,832	1,760	92,47
44(1)	Medicina interna		IC	<i>C. albicans</i>	320	2,470	3,009	1,572	20,78
45(1)	Reumatología	Prótesis	IC	<i>C. albicans</i>	160	1,056	1,961	4,339	104,32
46(2)	Medicina interna/UCI	Abscesos hepáticos múltiples, sepsis	ID	<i>C. parapsilosis</i>	20	1,075	2,422	1,529	1368,35
47(1)	Cirugía	Perforación intestinal, sepsis abdominal, cáncer de colon	ID	<i>C. albicans</i>	40	3,220	1,973	1,414	253,11
48(3)	Hematología	Linfoma gástrico	ID	<i>C. parapsilosis</i>	80	1,146	3,877	4,595	43,71
49(1)	Medicina interna	Sepsis	IC	<i>C. parapsilosis</i>	10	0,928	1,724	4,500	56,6
50(4)	Hematología	LMA	ID	<i>C. tropicalis</i>	10	0,629	0,774	1,007	60,61
51(1)	UCI	Sepsis	IC	<i>C. albicans</i>	0	0,518	0,673	0,456	12,2
52(3)	UCI	Catéter venoso central	IC	<i>C. parapsilosis</i>	80	1,207	2,812	4,498	61,17
53(1)	Cirugía		IC	<i>C. albicans</i>	10	3,940	6,155	3,037	156,83
54(1)	UCI		IC	<i>C. glabrata</i>	0	0,605	0,700	1,239	319,96
55(2)	Medicina interna		IC	<i>C. glabrata</i>	80	1,014	1,173	2,058	25,15
56(1)	Reanimación		IC	<i>C. tropicalis</i>	40	1,023	1,002	1,167	61,8
57(1)	X		IC	<i>C. albicans</i>	1280	3,588	4,518	4,762	184,33
58(1)	Reanimación		IC	<i>C. guilliermondi</i>	160	0,635	1,269	1,192	162,89
59(1)	Medicina interna		IC	<i>C. albicans</i>	320	3,777	1,445	2,340	168,3
60(3)	Reanimación	Catéter venoso central	ID	<i>C. albicans</i>	160	3,438	2,159	3,354	112,36
61(1)	UCI		IC	<i>C. albicans</i>	160	1,670	2,908	1,103	3788,3
62(1)	Medicina interna		IC	<i>C. tropicalis</i>	80	1,799	2,560	1,587	1760,5
63(1)	Cirugía	Hepatectomía, cáncer de hígado	ID	<i>C. parapsilosis</i>	80	0,671	3,225	5,230	252,7
64(3)	UCI		IC	<i>C. krusei</i>	80	1,254	1,371	1,695	1633
65(1)	Medicina interna	Paciente oncológico	ID	<i>C. guilliermondi</i>	0	1,099	3,087	3,755	22,49
66(1)	X		IC	<i>C. albicans</i>	160	0,428	1,679	1,335	1390,6
67(1)	Medicina interna		IC	<i>C. krusei</i>	160	0,804	0,623	2,777	31,92
68(6)	Cirugía	Perforación gástrica	IC	<i>C. albicans</i>	160	0,613	1,707	2,349	3125
69(5)	Cirugía		IC	<i>C. albicans</i>	2560	1,902	2,872	4,515	667,06
70(3)	Cirugía		IC	<i>C. glabrata</i>	1280	3,428	9,474	4,178	171,72
71(2)	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	<i>C. glabrata</i>	160	3,333	1,206	2,443	382,85
72(1)	Medicina interna		IC	<i>C. albicans</i>	0	0,918	1,962	1,651	2760,4
73(1)	Medicina interna		IC	<i>Candida sp.</i>	80	1,277	1,961	4,233	60,98
74(2)	Medicina interna		IC	<i>C. glabrata</i>	640	2,120	7,359	2,878	256,66
75(1)	X	Cáncer de páncreas	ID	<i>C. albicans</i>	160	1,407	13,294	8,694	11352
76(8)	Digestivo	Hepatitis C, cirrosis descompensada	IC	<i>C. albicans</i>	160	1,137	1,986	3,110	3625

<b>77(6)</b>	UCI	Pancreatitis grave, ingreso prolongado	IC	<i>C. albicans</i>	20	1,184	0,661	1,134	313,06
<b>78(2)</b>	Reanimación	Catéter venoso central	IC	<i>C. glabrata</i>	160	1,834	3,670	2,893	16611
<b>79(4)</b>	Medicina interna	Neoplasia vesical	ID	<i>C. albicans</i>	160	2,117	2,861	3,312	12,74
<b>80(1)</b>	Cirugía		IC	<i>C. parapsilosis</i>	640	2,474	1,418	6,410	201,55
<b>81(3)</b>	Urología		IC	<i>C. glabrata</i>	1280	5,026	4,777	6,890	55
<b>82(4)</b>	UCI	Sepsis	IC	<i>Candida sp.</i>	320	2,717	10,488	6,371	159,23
<b>83(1)</b>	Digestivo		IC	<i>C. albicans</i>	2560	0,990	4,712	1,232	830,72
<b>84(3)</b>	Hematología	Neutropenia febril, Lesión hepática	ID	<i>Candida sp.</i>	160	2,184	2,780	4,083	120,31
<b>85(6)</b>	Reanimación	Perforación intestinal, sepsis abdominal	IC	<i>C. albicans</i>	320	2,792	2,614	5,057	2262
<b>86(1)</b>	Reanimación		IC	<i>Candida sp.</i>	20	0,973	1,147	3,676	130,43
<b>87(1)</b>	Oncología	Paciente oncológico con pnoneumotorax	ID	<i>C. glabrata</i>	0	0,792	1,048	1,825	35,61
<b>88(1)</b>	UCI		IC	<i>C. albicans</i>	160	1,976	0,900	2,559	53,11
<b>89(9)</b>	UCI	Neumonía cavitada grave, colitis ulcerosa	ID	<i>Candida sp.</i>	20	3,786	7,002	4,218	27161
<b>90(2)</b>	Medicina interna/UCI	Ictericia obstructiva	IC	<i>Candida sp.</i>	160	1,369	2,692	1,670	47,96
<b>91(3)</b>	UCI	Sepsis abdominal	IC	<i>C. parapsilosis</i>	40	2,178	3,401	5,940	1016,5
<b>92(3)</b>	Cirugía		IC	<i>C. parapsilosis</i>	320	3,546	1,865	6,021	465,64
<b>93(12)</b>	UCI	Pancreatitis grave, ingreso prolongado	IC	<i>C. glabrata</i>	160	2,501	2,286	5,875	462,75
<b>94(1)</b>	UCI	Pancreatitis grave, catéter venoso central	IC	<i>C. parapsilosis</i>	320	2,868	5,928	2,323	11,2
<b>95(2)</b>	UCI	Carcinoma vesical, cistoprostatectomía	ID	<i>C. albicans</i>	320	1,471	1,531	5,886	1076,7
<b>96(1)</b>	Cirugía		IC	<i>Candida sp.</i>	10	4,378	6,185	4,131	35,76
<b>97(2)</b>	Reanimación/ Medicina interna		IC	<i>C. albicans</i>	320	0,869	3,185	6,313	951,45
<b>98(3)</b>	UCI	Sepsis, prótesis de cadera	IC	<i>C. glabrata</i>	640	0,707	11,130	2,333	294,63
<b>99(3)</b>	Cirugía	Neumonía	IC	<i>C. albicans</i>	320	4,370	1,895	3,834	128,55
<b>100(4)</b>	Reanimación	Pancreatitis grave	IC	<i>C. glabrata</i>	40	1,234	1,763	2,646	185,43
<b>101(4)</b>	UCI		IC	<i>C. albicans</i>	320	3,251	4,142	3,608	485,94
<b>102(1)</b>	UCI	Ingreso prolongado	IC	<i>C. albicans</i>	40	0,903	2,265	2,388	7052
<b>103(3)</b>	Medicina interna	Prótesis cadera	IC	<i>C. albicans</i>	160	1,319	4,279	3,504	525
<b>104(5)</b>	UCI	Paciente oncológico, neumonía, ingreso prolongado	ID	<i>C. albicans</i>	320	2,342	6,087	9,811	393,33
<b>105(1)</b>	Medicina interna	DM, osteomielitis crónica	IC	<i>Candida sp.</i>	320	6,580	2,776	5,726	48,17
<b>106(5)</b>	Reanimación	Sepsis abdominal, isquemia colon, colectomía	IC	<i>C. tropicalis</i>	640	1,652	1,892	4,961	92,53
<b>107(5)</b>	Reanimación		IC	<i>C. krusei</i>	10	1,774	1,508	3,657	307,15
<b>108(1)</b>	Oncología	Paciente oncológico	ID	<i>C. albicans</i>	10	1,020	2,884	1,923	29,75
<b>109(6)</b>	Medicina interna	Paludismo, fallo multiorgánico	IC	<i>C. glabrata</i>	320	5,249	3,083	7,318	494,6
<b>110(3)</b>	Medicina interna		IC	<i>C. glabrata</i>	320	2,414	2,565	5,688	219,83
<b>111(3)</b>	Medicina interna		IC	<i>C. glabrata</i>	1280	2,441	3,083	4,768	388,97
<b>112(1)</b>	Medicina interna		IC	<i>C. glabrata</i>	640	1,765	1,272	1,966	36,54
<b>113(1)</b>	Reanimación		IC	<i>C. albicans</i>	320	2,030	2,267	3,296	100,56



<b>114(4)</b>	UCI	Carcinoma páncreas, nefrectomía, pancreatoclectomía	ID	<i>C. albicans</i>	160	0,794	1,194	5,937	289,94
<b>115(1)</b>	Cirugía	Perforación duodenal	IC	<i>C. albicans</i>	20	0,484	0,898	5,548	217,29
<b>116(4)</b>	Reanimación	Perforación duodenal, sepsis abdominal	IC	<i>C. albicans</i>	10	0,636	1,183	2,998	172,95
<b>117(2)</b>	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	<i>Candida sp.</i>	0	1,993	0,708	4,205	517,84
<b>118(6)</b>	Cirugía	Paciente oncológico	ID	<i>C. albicans</i>	40	3,901	2,174	12,487	185,8
<b>119(2)</b>	Digestivo	Pancreatitis grave	IC	<i>C. albicans</i>	160	3,840	2,094	5,522	133,33
<b>120(4)</b>	Cirugía	Pancreatitis grave	IC	<i>C. lusitanae</i>	10	2,698	9,680	5,296	1065,2
<b>121(2)</b>	Medicina interna	Paciente oncológico	ID	<i>C. glabrata</i>	80	3,028	4,504	2,041	43,2
<b>122(1)</b>	UCI		IC	<i>Candida sp.</i>	40	0,606	1,996	2,058	63,23
<b>123(4)</b>	Digestivo	Pancreatitis grave, cirrosis	IC	<i>C. krusei</i>	20	0,953	1,921	2,404	55,49
<b>124(1)</b>	UCI		IC	<i>C. parapsilosis</i>	80	3,174	5,128	5,532	1057
<b>125(7)</b>	UCI/ Reanimación		IC	<i>C. albicans</i>	20	2,737	4,784	6,163	228,69
<b>126(1)</b>	Digestivo	Catéter venoso central	IC	<i>C. albicans</i>	640	0,920	0,479	2,450	19,16
<b>127(2)</b>	Cirugía	Colitis isquémica	IC	<i>C. albicans</i>	20	0,931	2,398	1,942	331,32
<b>128(2)</b>	Medicina interna	Paciente oncológico, quimioterapia	ID	<i>C. parapsilosis</i>	160	1,764	4,390	7,055	290,62
<b>129(1)</b>	Cirugía	Colecistitis perforada	IC	<i>C. albicans</i>	10	1,562	2,390	2,063	89,7
<b>130 (1)</b>	Hematología	VIH	ID	<i>Candida sp.</i>	20	1,079	1,632	1,525	316,1

Con una X se indican los datos clínicos que no pudieron ser conseguidos.

Tabla 8.2. Características de los pacientes con otras infecciones fúngicas (grupo 2).

Paciente (Nº de sueros)	Servicio Hospitalario	Factor predisponente	Estado inmunológico	Especie	CAGTA	Als3	Hwp1	Met6	BG
1(1)	X		IC	<i>Conidiobolus</i> sp.	20	1,900	3,359	1,190	2,82
2(4)	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	40	0,735	1,581	2,498	244,17
3(1)	Medicina interna		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	20	0,404	0,885	1,812	21,17
4(1)	Neumología		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,307	0,292	0,960	207,99
5(2)	Otorrinolaringología		IC	<i>Scedosporium</i> sp.	0	0,407	0,656	1,039	16,18
6(1)	Neumología		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,562	0,875	2,015	162,96
7(1)	UCI	Neumonía, asma	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	20	0,500	1,078	3,388	87,54
8(2)	Medicina interna		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	40	0,419	1,159	1,646	43,34
9(1)	Medicina interna		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	0	0,229	0,789	5,253	63,90
10(2)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	<i>Purpureocillium</i> sp.	0	0,438	0,450	0,692	57,57
11(1)	UCI	Intervención quirúrgica	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	80	2,329	3,367	5,279	70,50
12(1)	UCI	Intervención quirúrgica	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	40	1,040	1,227	2,564	4,85
13(12)	Hematología	LNH, VIH	ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	10	0,439	2,296	0,930	9787,4
14(4)	Neumología	EPOC	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,376	5,805	2,319	388,21
15(5)	Medicina interna	VIH	ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	20	1,057	0,792	1,119	25543
16(1)	Medicina interna	Artritis reumatoide, tratamiento con metotexate	ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	10	0,527	1,895	0,276	8381,0
17(1)	Neumología	EPOC	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,372	1,086	3,446	135,76
18(1)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Scedosporium</i> sp.	0	0,214	0,291	0,897	10,05
19(9)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	<i>Scedosporium</i> sp.	20	1,342	2,581	1,235	563,19
20(1)	Medicina interna		ID	<i>Aspergillus</i> sp.	0	0,274	0,186	0,621	0,00
21(1)	Neumología	Neumonía	IC	<i>Scedosporium</i> sp.	0	1,021	1,232	1,007	116,34
22(17)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	<i>Aspergillus</i> sp.	20	1,001	0,972	2,296	45,36
23(1)	Medicina interna		ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	10	0,397	1,002	1,429	3309,0
24(2)	Neumología	EPOC	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	20	0,580	1,279	2,081	156,26
25(1)	Medicina interna		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	40	1,350	3,048	11,294	24,50
26(1)	Neumología		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	40	0,559	0,551	3,5041	42,72
27(3)	Medicina interna		IC	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,410	0,747	4,665	226,82
28(4)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	80	0,669	0,698	4,628	193,24
29(1)	Medicina interna	Fibrosis pulmonar	ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	40	0,554	0,496	1,188	2456,4
30(6)	UCI	Sepsis, EPOC	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	640	2,205	1,534	11,956	8823,3
31(7)	UCI	EPOC	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	160	1,564	1,889	10,33	1436,45
32(1)	X	VIH, Hepatitis C	ID	<i>Aspergillus</i> sp.	80	0,874	1,146	1,284	40714
33(5)	Hematología	LNH	ID	<i>Cryptococcus</i> sp.	20	0,742	0,855	1,189	406,48
34(4)	Hematología	LNH	ID	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,412	1,112	0,721	161,09
35(6)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,734	1,340	2,925	201,72

36(1)	Hematología	LMA	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	10	0,603	1,286	2,178	283,79
37(3)	Medicina interna	Linfoma	ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	10	0,398	0,304	1,027	583,60
38(3)	Neumología	Asma	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	20	1,460	2,623	4,541	26,61
39(5)	Medicina interna		IC	<i>Pneumocystis sp.</i>	0	1,060	1,022	1,107	22422
40(1)	UCI		IC	<i>Aspergillus sp.</i>	160	1,653	2,360	2,876	159,23
41(1)	UCI	EPOC, sepsis	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	10	0,660	0,436	2,421	902,70
42(1)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	20	1,350	2,116	3,438	48,74
43(3)	Neumología	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	80	1,468	1,718	2,849	162,48
44(1)	X	VIH	ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	20	0,276	0,562	0,347	1509,2
45(4)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	160	0,844	1,819	2,675	57,79
46(1)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	0	0,397	2,638	3,144	98,00
47(3)	Medicina interna	VIH	ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	20	0,639	0,736	0,988	1610,8
48(5)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	80	1,621	2,258	2,602	236,61
49(1)	Neumología		IC	<i>Cryptococcus sp.</i>	10	0,640	0,598	2,542	55,02
50(5)	Neumología	VIH	ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	10	0,930	1,351	2,018	4851,5
51(1)	UCI	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	10	0,685	0,622	2,289	12371
52(1)	Medicina interna	VIH	ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	20	0,983	1,160	1,222	525,00
53(1)	Alergología		IC	<i>Aspergillus sp.</i>	10	1,677	1,715	1,641	0,00
54(5)	Neumología	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	160	0,412	3,063	4,959	4178,4
55(2)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	10	0,872	0,692	3,709	792,28
56(1)	Medicina interna		ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	20	0,771	1,436	0,938	1684,3
57(1)	Medicina interna		IC	<i>Aspergillus sp.</i>	0	0,563	0,863	1,189	16978
58(1)	Cirugía	EPOC, tratamiento con corticoides	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	0	0,751	0,653	1,882	11576
59(4)	UCI	VIH	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	0	0,353	1,175	6,119	895,54
60(14)	Hematología	LMA, neutropenia	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	40	2,016	3,800	5,836	209,90
61(5)	Hematología	LNH	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	10	0,861	2,583	2,697	221,81
62(1)	Hematología	Leucopenia, agranulocitosis	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	0	0,509	0,835	1,991	102,98
63(1)	Hematología	Paciente oncológico	ID	<i>Aspergillus sp.</i>	40	1,068	1,337	2,443	697,83
64(3)	Medicina interna	VIH	ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	10	1,560	2,531	1,307	100000
65(4)	Medicina interna		IC	<i>Pneumocystis sp.</i>	80	1,732	1,975	1,299	17500
66(5)	Medicina interna	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	160	1,160	2,715	2,137	154,19
67(4)	UCI	VIH	ID	<i>Cryptococcus sp.</i>	20	1,102	1,873	2,091	42,53
68(3)	Hematología	LMA	ID	X	10	0,540	2,715	3,019	525,00
69(2)	Hematología	PTT	ID	<i>Pneumocystis sp.</i>	0	0,153	0,444	1,114	1451,0
70(1)	Hematología		ID	<i>Aspergillus sp.</i>	0	0,664	0,527	1,568	145,52
71(2)	Medicina interna	Intervención quirúrgica	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	80	1,096	1,478	2,151	523,40
72(1)	Medicina interna		IC	X	0	0,439	1,535	1,360	6,32
73(2)	Neumología	EPOC	IC	<i>Aspergillus sp.</i>	80	0,526	0,557	5,456	795,70

<b>74(3)</b>	Hematología	LMA	ID	<i>Aspergillus</i> sp.	10	0,567	0,571	1,602	118,13
<b>75(1)</b>	UCI	VIH	ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	0	0,268	0,385	0,839	233,74
<b>76(1)</b>	Hematología	LMA	ID	<i>Aspergillus</i> sp.	40	1,028	0,851	2,286	17,23
<b>77(1)</b>	Medicina interna	EPOC, púrpura de Schönlein-Henoch en tratamiento con corticoides	ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	0	0,292	1,870	0,739	20,47
<b>78(1)</b>	Neumología	VIH	ID	<i>Pneumocystis</i> sp.	0	0,275	1,230	0,757	43,61

Con una X se indican los datos clínicos que no pudieron ser conseguidos.

**Tabla 8.3.** Características de los pacientes del grupo control (grupo 3)

Paciente (Nº de sueros)	Servicio Hospitalario	Factor predisponente	Estado inmunológico	CAGTA	Als3	Hwp1	Met6	BG
1(1)	UCI	Sepsis, TEP	IC	0	1,089	0,658	1,109	0
2(1)	Hematología	LLA	ID	10	1,099	0,547	1,043	30,05
3(2)	Hematología	LMA	ID	20	0,609	0,835	0,944	55,8
4(1)	Medicina interna		IC	20	0,769	3,101	1,258	40,91
5(1)	Digestivo	Colecistitis	IC	40	0,610	1,483	1,265	44,89
6(1)	Medicina interna	EPOC	IC	20	0,853	1,345	1,518	63,31
7(2)	UCI		IC	10	1,706	2,127	1,721	20,19
8(1)	UCI	Neumonía	IC	0	0,724	1,415	1,247	24,89
9(2)	Hematología	LMA	ID	0	0,624	0,869	0,970	59,22
10(1)	UCI	LES	IC	0	0,545	0,790	2,193	2,77
11(1)	Medicina interna	Sepsis	IC	20	1,185	2,233	1,791	29,19
12(2)	Hematología	LLC	ID	0	0,226	0,423	0,803	67,19
13(1)	Neumología	Infección respiratoria	IC	10	1,159	2,751	1,188	15,32
14(1)	Neumología	Nódulo en vidrio	IC	0	0,250	0,485	0,863	11,61
15(2)	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	10	2,500	2,543	3,232	37,17
16(1)	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	0	0,350	4,542	4,702	18,27
17(1)	UCI	Tuberculosis pulmonar	IC	20	0,797	1,712	3,961	50,2
18(1)	UCI	Absceso pulmonar	IC	10	0,810	0,884	3,212	1,46
19(1)	UCI		IC	10	0,634	2,693	1,563	20,19
20(2)	Hematología	LMA	ID	0	0,403	0,679	0,934	51,86
21(1)	Medicina interna	EPOC	IC	0	1,662	4,636	2,605	12,71
22(1)	Medicina interna	VIH	ID	80	0,401	0,332	1,424	259,29
23(1)	Hematología		IC	10	0,725	1,873	0,835	33,9
24(1)	Hematología	TASPE	ID	0	0,426	1,817	0,718	0
25(1)	UCI	Púrpura Schonlein Henoch	IC	0	1,003	5,295	0,510	11,86
26(1)	Neumología	Neumonía, EPOC	IC	20	0,176	1,518	2,487	152,7
27(1)	Neumología	Infección respiratoria	IC	20	0,575	1,871	1,129	12,53
28(1)	Hematología	LMA	ID	40	0,392	1,046	1,535	41,34
29(1)	Hematología	LPA	ID	0	0,464	1,220	0,924	15,45
30(1)	Medicina interna	Neumonía	IC	40	0,483	1,367	7,221	59,37
31(2)	UCI	Neumonía	IC	10	1,614	2,549	1,732	27,96
32(1)	Medicina interna		IC	0	0,667	0,392	0,663	2,12
33(3)	UCI	EPOC	IC	20	0,517	0,612	0,723	43
34(1)	Neumología		IC	0	0,349	0,793	0,960	0
35(1)	Hematología	LMA	ID	10	1,104	1,060	1,087	0
36(2)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	0	0,352	0,365	0,887	3,98
37(1)	UCI		IC	20	0,780	0,753	2,170	32,17
38(1)	Endocrinología		IC	0	1,316	0,844	0,998	0
39(1)	UCI	Shock hemorrágico, ingreso prolongado	IC	20	1,560	1,223	4,777	58,52

40(1)	X	Artritis Reumatoide	IC	0	0,724	1,183	1,089	0
41(1)	Endocrinología	Sepsis abdominal	IC	20	1,613	1,602	0,848	23,13
42(1)	Medicina interna	EPOC	IC	80	0,556	1,052	1,224	17,389
43(1)	Medicina interna	Enf. Crohn en tratamiento con azatioprina	ID	0	0,719	1,128	0,686	21,77
44(1)	Hematología	Neutropenia febril	ID	0	0,509	1,391	2,089	17,37
45(1)	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	20	0,756	1,759	1,149	17,89
46(1)	UCI		IC	20	1,090	1,613	1,536	3,61
47(1)	Medicina interna	EPOC	IC	40	1,258	5,670	3,238	48,99
48(1)	Medicina interna	Infección respiratoria	IC	10	0,958	1,380	2,853	46,84
49(2)	Hematología	LMA, neutropenia	ID	20	0,730	0,956	1,231	36,01
50(1)	Hematología	LLA	ID	0	0,545	0,567	0,863	0
51(1)	UCI		IC	10	1,100	0,682	4,391	12,65
52(2)	Hematología	LMA	ID	0	0,894	0,994	1,081	43,64
53(1)	UCI	Pancreatitis grave	IC	10	0,680	0,961	3,437	0
54(1)	Medicina interna	EPOC	IC	40	1,100	2,222	5,981	20,33
55(2)	Hematología	LNH	ID	10	0,305	0,377	0,657	50,56
56(2)	Hematología	LNH	ID	0	0,905	0,425	0,703	36,75
57(1)	Hematología	Neutropenia febril	ID	20	0,278	0,189	0,589	0
58(1)	Medicina interna	Dehiscencia de anastomosis post-quirúrgica	IC	20	0,437	1,381	1,934	21,56
59(1)	Hematología	LMA	ID	10	0,287	2,151	1,383	0
60(2)	Hematología	LH	ID	10	0,594	0,529	0,765	29,54
61(2)	Hematología	LNH	ID	0	1,174	0,906	0,885	6,16
62(1)	Reanimación	Obesidad mórbida	IC	40	1,164	1,955	3,434	37,92
63(2)	Hematología	LLA	ID	0	0,739	0,584	0,975	22,78
64(2)	Hematología	LMA	ID	0	0,527	0,881	0,969	31,35
65(2)	Hematología	LMA	ID	10	0,456	0,729	0,727	49,22
66(1)	Hematología	LMA	ID	0	0,252	0,723	0,889	0
67(1)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	10	0,770	0,649	1,632	40,29
68(1)	Hematología		IC	20	0,510	0,659	2,496	3,09
69(1)	Medicina interna		IC	20	0,577	2,141	1,696	19,26
70(1)	Neumología	Neumonía	IC	10	0,343	4,498	1,116	9
71(1)	UCI	Sepsis	IC	160	1,070	1,508	5,884	67,09
72(1)	Hematología	LNH	ID	20	0,671	1,064	0,980	55,66
73(1)	UCI	Sepsis	IC	0	0,505	1,222	0,466	11,53
74(2)	Hematología	LNH	ID	0	0,777	0,987	1,043	30,19
75(1)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	0	0,332	0,500	0,523	20,81
76(1)	UCI	Aplasia medular	ID	0	1,069	1,261	1,067	43,51
77(1)	Hematología	LH	ID	0	0,603	0,510	0,716	0
78(1)	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	10	0,144	0,808	0,618	36,8
79(1)	Neumología	EPOC	IC	0	0,724	1,449	1,373	8,46
80(3)	Hematología	LMA	ID	10	0,786	1,659	0,935	71,13

<b>81(1)</b>	Reanimación	Perforación gástrica	IC	20	3,592	3,568	3,858	0
<b>82(1)</b>	UCI	Sepsis	IC	10	0,486	0,750	1,700	12,8
<b>83(1)</b>	UCI	Pancreatitis grave	IC	0	1,200	0,719	5,050	50,98
<b>84(1)</b>	Hematología	LMA	ID	0	0,892	2,068	1,055	33,11
<b>85(1)</b>	Hematología	LNH	ID	0	1,202	5,333	1,279	19,54
<b>86(2)</b>	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	20	0,581	0,569	0,975	66,4
<b>87(1)</b>	Hematología	SMD	ID	0	0,480	1,380	1,018	24,34
<b>88(1)</b>	Reanimación	Perforación intestinal	IC	10	1,030	1,339	2,722	56,35
<b>89(1)</b>	Reanimación	Infección quirúrgica	IC	0	0,673	2,360	1,522	76,5
<b>90(1)</b>	Reanimación	Neumonía	IC	10	0,847	1,341	1,080	17,6
<b>91(1)</b>	Hematología	LNH	ID	0	1,996	1,775	1,139	21,5
<b>92(1)</b>	Medicina interna	Insuficiencia cardíaca, infección respiratoria	IC	0	0,347	0,689	1,065	9,15
<b>93(1)</b>	Hematología	LLA	ID	0	0,188	0,318	0,618	33,61
<b>94(1)</b>	Medicina interna	Infección respiratoria	IC	0	0,769	2,366	0,941	9,15
<b>95(1)</b>	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	0	0,235	0,458	0,761	57,38
<b>96(1)</b>	Reanimación	Sepsis	IC	10	0,308	1,741	1,826	50,31
<b>97(3)</b>	Hematología	LMA	ID	10	0,793	1,437	1,015	27,99
<b>98(1)</b>	Hematología	LMA	ID	0	0,323	2,411	1,016	32,41
<b>99(1)</b>	Hematología	LNH	ID	10	0,571	0,637	1,042	9,21
<b>100(1)</b>	Nefrología	Insuficiencia renal crónica	IC	20	5,085	0,644	1,933	35,85
<b>101(1)</b>	Hematología	Bronconeumonía bilateral	ID	20	0,505	0,628	0,727	5
<b>102(1)</b>	Medicina interna	Neumonía	IC	10	0,683	4,860	1,987	11,7
<b>103(1)</b>	UCI		IC	20	3,120	2,820	7,637	6,5
<b>104(1)</b>	Hematología	LH	ID	0	0,667	0,788	0,941	9,32
<b>105(1)</b>	UCI	EPOC	IC	0	0,489	1,123	1,300	18,49
<b>106(1)</b>	Hematología		ID	0	0,373	0,993	0,823	0
<b>107(1)</b>	X	Infección urinaria	IC	20	0,861	1,213	2,649	31,6
<b>108(1)</b>	Reanimación	Sepsis abdominal	IC	0	0,739	0,863	1,786	52,1
<b>109(1)</b>	Hematología	LMA	ID	0	0,287	0,550	0,873	16,09
<b>110(1)</b>	Hematología	Mieloma Múltiple	ID	0	0,262	1,435	0,544	33,75
<b>111(1)</b>	Hematología		IC	20	0,400	0,343	0,891	20,6
<b>112(1)</b>	Hematología		IC	10	0,298	1,131	1,577	0,2
<b>113(1)</b>	Hematología	Aplasia medular	ID	0	0,594	0,620	1,737	6,33

Con una X se indican los datos clínicos que no pudieron ser conseguidos.

## CERTIFICATION OF ANALYSIS

Product Name: KLH-CG-99

Lot No: C190517-SF712940

Quantity of peptide: 8.4mg

Quantity of carrier protein: 8.4mg

Coupling agent: SMCC

Product Concentration: 2.8mg/ml

Product volume: 3ml

Appearance: White Powder

The Buffer before Lyophilization: PH7.4 PBS

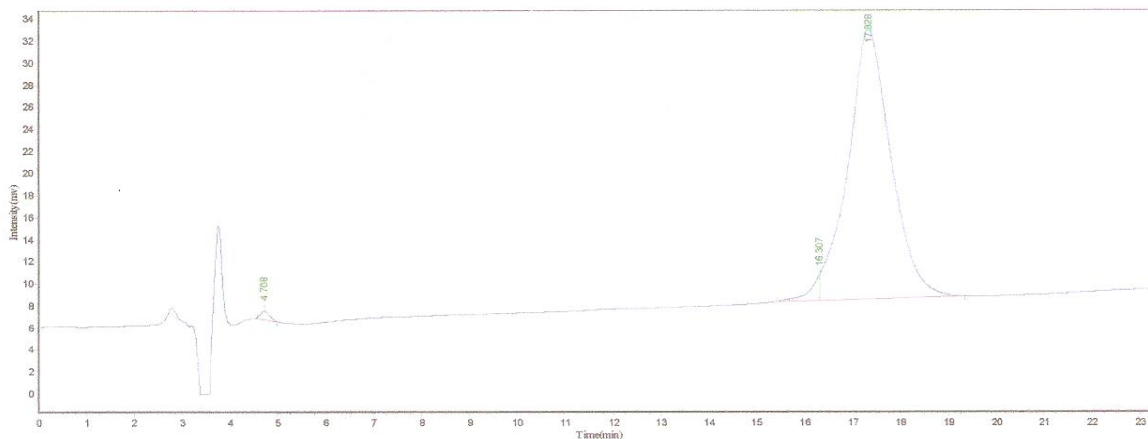
Application Notes: dissolve Peptide-KLH into 0.5ml 8M Urea, then dilute with D. D. water



### HPLC REPORT

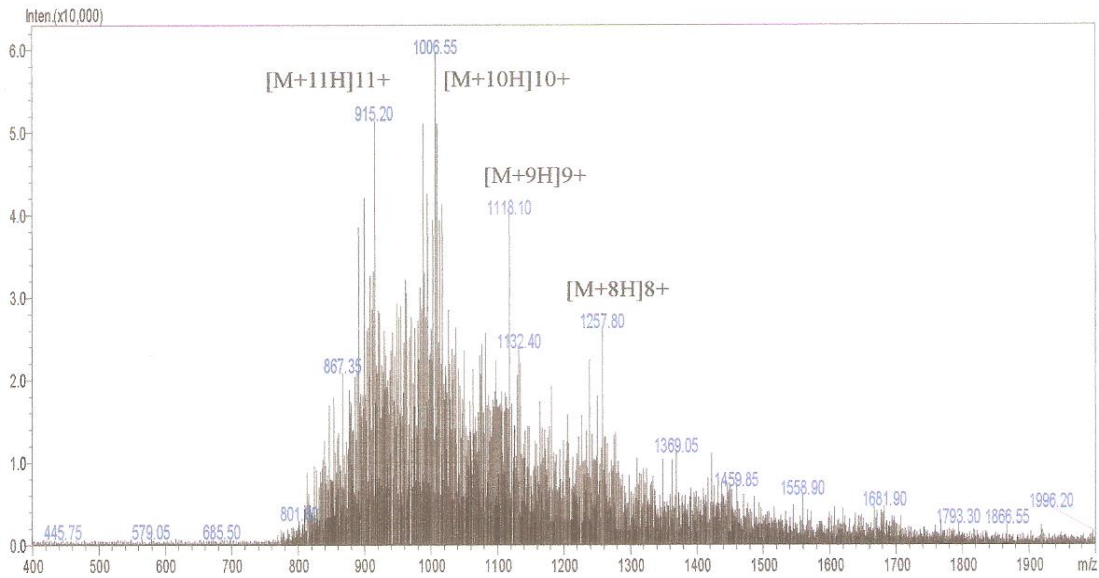
**Sample Description:**

Structure : # Peptide 1 CG-99  
 Number : 0200046  
 Lot # : LT19008-LT712940  
 Column : 4.6mm\*250mm, KLM PS/DVB  
 Mobile Phase : A=0.1% TFA/Acetonitrile,  
 : B=0.1%TFA/water,  
 Gradient : A B  
 0.01min 20% 80%  
 25min 60% 40%  
 25.1min 100% 0%  
 30.0min STOP  
 Flow rate : 1.0ml/min  
 Wavelength : 220nm  
 Volume : 5ul



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	4.708	726.843	9166.402	0.5895
2	16.307	2322.687	31386.418	2.0185
3	17.328	24471.836	1514394.250	97.3920
<b>Total</b>				<b>100.0000</b>

**Mass Spectrometry Report**



Sample: 712940

MW: 10055.58

Item	Parameter	Item	Parameter
Probe:	ESI	Probe bias:	+4.5kv
Nebulizer Gas Flow:	1.5L/min	Detector:	1.5kv
CDL:	-20.0v	T.Flow:	0.2ml/min
CDL Temp:	250°C	B.conc:	50%H2O50%ACN
Block Temp:	200°C		









Las infecciones nosocomiales se han incrementado en las últimas décadas, y las levaduras del género *Candida* ocupan el cuarto lugar entre los agentes etiológicos identificados. Los pacientes con deficiencias inmunológicas tienen un alto riesgo de sufrir una candidiasis invasora (CI), aunque el uso profiláctico de fluconazol ha desviado la incidencia a pacientes con otras características: cirugía gastrointestinal, ingreso prolongado en UCI, antibioterapia de amplio espectro, catéter venoso central, diabetes y neonatos de bajo peso. El hemocultivo, método diagnóstico de CI de referencia, ofrece una baja sensibilidad (aprox. 50%) y puede tardar 24-48h en mostrar un resultado positivo. Un retraso de 12-24h en el tratamiento antifúngico puede doblar la mortalidad por candidemia, por lo que se requieren nuevos tests diagnósticos o identificar factores de riesgo que permitan adelantar el tratamiento antifúngico específico. Nuestro Grupo de Estudio de la Infección Fúngica Invasora (GEIFI) se centra en los métodos de diagnóstico y prevención de la CI, así como en la mejora de su tratamiento, y ha desarrollado una técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos específicos (CAGTA) frente a antígenos de la pared celular de los tubos germinales de *C. albicans* asociados al proceso invasivo del hongo. Se han identificado varios antígenos de *C. albicans* reconocidos por los CAGTA, entre los que podemos citar hyphal wall protein (Hwp1), agglutinin-like sequence 3 (Als3) o methionine synthase (Met6). Estos antígenos reconocidos por CAGTA podrían constituir la base para el desarrollo futuro de vacunas frente a esta infección, y algunos como la Als3 están en fase de ensayo clínico para la candidiasis vulvovaginal recurrente. Esta tesis pretende evaluar la utilidad diagnóstica de los antígenos Hwp1, Als3 y Met6, producidos de forma recombinante, para el diagnóstico de la CI mediante la detección de anticuerpos específicos. De forma paralela, se estudia el posible efecto protector de dichos antígenos como vacuna frente a la CI.

Se ha determinado la presencia de anticuerpos frente a los antígenos Hwp1, Als3 y Met6, mediante ensayos ELISA, así como niveles de CAGTA y la concentración de beta-glucano (BDG) en sueros de 297 pacientes diagnosticados de infección fúngica invasora y controles, todos ellos con factores de riesgo para sufrir una CI. Se determinó la utilidad diagnóstica de las distintas pruebas por separado y en combinación. La detección de CAGTA presentó valores de sensibilidad moderados, sin embargo, destaca por su alta especificidad >90%, y mejoraba su rendimiento global rebajando el punto de corte de 1/160 a 1/80, tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. El ensayo ELISA anti-Als3 presentó mejores resultados diagnósticos en pacientes inmunocompetentes en comparación con los ELISA anti-Hwp1 y anti-Met6. Por el contrario, en pacientes inmunodeprimidos la detección de anticuerpos anti-Met6 mostró los mejores índices de utilidad diagnóstica. La combinación de resultados de BDG y CAGTA (1/80) alcanzó el mejor rendimiento para el diagnóstico de CI en pacientes inmunocompetentes. En cambio, para pacientes inmunodeprimidos, la mejor combinación fue la de la prueba ELISA anti-Met6 con la detección de CAGTA.

Dado que los pacientes con CI desarrollaban anticuerpos frente a los antígenos Hwp1, Als3 y Met6, se diseñó un experimento de inmunización frente a la CI en modelo murino, basado en estas proteínas. Se seleccionó, para cada uno de ellos, una secuencia de 15-18 aminoácidos contenida en epítopos de modelos teóricos, y se construyó un péptido complejo (3P-KLH) con espaciadores glicina-prolina (GPGPG) y secuencias key li (LRMKLPKS) para mejorar la presentación de los epítopos, y conjugado a KLH como proteína transportadora. Los ratones fueron inmunizados con dos dosis de 3P-KLH, separadas 21 días, y el grupo control solo recibió KLH. Veintiún días después de la segunda inmunización se procedió a la inoculación intravenosa de los ratones con levaduras de *C. albicans*. En comparación con el grupo control, cuya media de supervivencia fue 6 días, en los ratones inmunizados con 3P-KLH la carga fúngica en riñones fue 30 veces inferior y a los 21 días de seguimiento se registró una supervivencia del 37,5%.