

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN DE ADHESINAS Y
MARCADORES ANTIGÉNICOS DE LA SUPERFICIE
CELULAR DE *CANDIDA ALBICANS***

Memoria para optar al título de Doctora
en Químicas
presentada por Dña. Pilar Sepúlveda Sanchis
Valencia, 6 de Julio de 1995



Vº Bº
Directores del trabajo

Jose Pedro Martínez

Manuel Casanova

Jose Miguel Nogueira

UMI Number: U607180

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607180

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 8027
DATA 5.10.95

SIGNATURA
394.T.D
Nº LIBIS: Ri.18640825

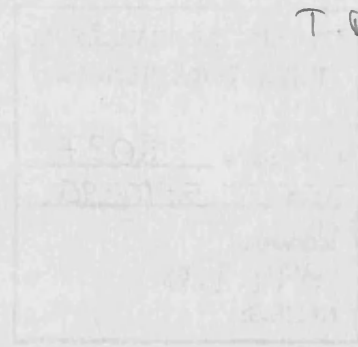
↳ Químicas

30 cms.

Químicas

394

T.O



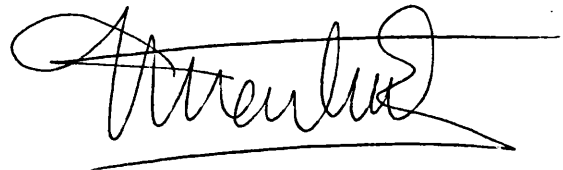
**CARACTERIZACIÓN DE ADHESINAS Y
MARCADORES ANTIGÉNICOS DE LA SUPERFICIE
CELULAR DE *Candida albicans***



JOSE PEDRO MARTÍNEZ GARCÍA, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA,

CERTIFICA: que Dña. Pilar Sepúlveda Sanchis ha realizado en este departamento el trabajo titulado "CARACTERIZACIÓN DE ADHESINAS Y MARCADORES ANTIGÉNICOS DE LA SUPERFICIE CELULAR DE *Candida albicans*" que presenta para optar al título de Doctora en Químicas.

Y para que así conste, extiende el presente certificado en Valencia, a seis de julio de mil novecientos noventa y cinco.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jose Pedro Martínez García', written over a horizontal line.

Jose Pedro Martínez García

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las personas que de alguna forma han contribuido a la realización del presente trabajo.

A los Drs. Jose Pedro Martínez, Manuel Casanova y Jose Miguel Nogueira, como Directores de este trabajo, por el apoyo y estímulo que en todo momento me han brindado.

Al Dr. Daniel Gozalbo, por su inestimable y desinteresada ayuda en el diseño e interpretación de los experimentos de biología molecular y en la corrección de algunos apartados de esta memoria, y por su incomparable sentido del humor.

A la Dra. LaJean Chaffin del Departamento de Microbiología e Inmunología, Texas Tech University Health Sciences Center, por la cesión de la genoteca de ADNc utilizada.

Al Dr. Joaquín Timoneda y la Dra. Amelia Murgui del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València por su consejo y ayuda en la planificación de algunos experimentos y por la cesión de los anticuerpos frente a la molécula de colágeno tipo IV.

Al Dr. Carlos Monteagudo del Departamento de Patología de la Universitat de València por la cesión de los anticuerpos frente al receptor humano para laminina.

Al Dr. Juan Saus y a Fernando Revert del Instituto de Investigaciones Citológicas, por sus consejos y ayuda en la planificación de algunos experimentos.

A la Dra. Raquel San Juan por su amistad, sencillez y apoyo en los momentos difíciles.

A mis compañeras de laboratorio, M^a Carmen, Vicki e Inés, con las que he compartido momentos muy gratos a lo largo de todo este tiempo y en especial a Ana, la cual me ha brindado una inestimable ayuda en la realización de algunos experimentos.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad social, Ministerio de Sanidad y consumo por la cesión de una beca de investigación predoctoral, gracias a la cual ha sido posible la realización de este trabajo.

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a las subvenciones concedidas por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento), Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto número PM92-0246), y el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, Ministerio de Sanidad y Consumo (proyecto número 93/0801)

INDICE

I. INTRODUCCION

I.1. <i>Candida albicans</i> : características generales.....	1
I.2. La pared celular de <i>C. albicans</i> : características generales, composición química, estructura y función.....	2
I.3. Factores de virulencia en <i>Candida albicans</i>	3
I.3.1. Variación fenotípica.....	4
I.3.2. Formación de hifas.....	4
I.3.3. Hidrofobicidad de la superficie celular: interacciones de tipo fisico-químico en los procesos de reconocimiento y adhesión	6
I.3.4. Mimetismo molecular.....	7
I.3.5. Enzimas líticos.....	7
I.3.6 La adhesión como factor de virulencia.....	7
I.3.6.1. Receptores tipo integrina.....	8
I.3.6.2. Receptores tipo no-integrina.....	9
I.3.6.3. Receptores de fibrinógeno y otras proteínas séricas.....	9
I.3.6.4. Receptores de componentes de la matriz extracelular.....	9
I.4.- Modelo de los factores de virulencia de <i>Candida</i>	10
I.5.- Estrategias en el estudio de la adhesión.....	10
I.6.- Patología y diagnóstico de la candidiasis.....	11
I.6.1.- Amplificación del ADN de <i>Candida</i> por PCR.....	12
I.6.2.- Detección de metabolitos de <i>Candida</i>	12
I.6.3.- Detección de antígeno de <i>Candida</i>	12
I.6.3.1. Antígenos de la superficie celular.....	13
I.6.3.2. Manano de pared celular.....	14
I.6.3.3. Antígenos de membrana.....	15
I.6.3.4. Antígenos citoplásmicos.....	15
I.6.4.- Detección de anticuerpos A- <i>Candida</i>	16
I.7.- Objeto y justificación del trabajo.....	16

II. MATERIALES Y METODOS.

II.1.- Microorganismos.....	18
II.2.- Vectores y plásmidos.....	18
II.3.- Sueros de pacientes.....	18
II.4.- Medios de cultivo utilizados.....	19
II.5.- Condiciones de cultivo.....	19
II.6.- Solubilización de componentes de pared celular de ambas fases morfológicas (levadura y micelio) de <i>C. albicans</i>	20
II.7.- Determinación de la concentración de proteína.....	21
II.7.1. Método de Lowry et al. (1951)	21
II.7.2. Método de Bradford et al. (1976)	21
II.7.3. Lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 280 nm (A_{280}).....	21
II.7.4. Método del ácido bicinónico (BCA) (Smith et al., 1985).....	21
II.8.- Determinación de carbohidratos totales.....	22
II.9.- Electroforesis en geles de dodecilsulfato (SDS)-poliacrilamida.....	22
II.10.- Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.....	23

II.11.- Transferencia de los polipéptidos separados electroforéticamente en los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa.....	23
II.11.1. Método de Burnette(1981)	23
II.11.2. Método semi-seco (Semi-dry).....	23
II.12.- Tinción de proteínas en los soportes de nitrocelulosa.....	23
II.13.- Detección de glicoproteínas en los soportes de nitrocelulosa, mediante tinción con la lectina Concanavalina A.....	23
II.14.- Ensayo para la caracterización de la unión de fibrinógeno y laminina a componentes individuales de la superficie (pared) celular de <i>C. albicans</i>	24
II.15.- Inmunodetección de polipéptidos transferidos a membranas de nitrocelulosa.....	25
II.16.- Tratamientos químicos y enzimáticos.....	25
II.16.1. Tratamiento con Endo- β -N-acetil-glucosaminidasa H (Endo H).....	25
II.16.2. β -eliminación alcalina.....	26
II.16.3. Tratamiento con Endo H y β -eliminación alcalina.....	26
II.16.4. Tratamiento con colagenasa.....	26
II.17.- Inmumofluorescencia indirecta (IFI).....	26
II.18.- Adsorción de sueros a bolas de latex poliestireno.....	27
II.19.- Adsorción de antígeno a bolas de látex poliestireno.....	27
II.20.- Métodos de marcaje de anticuerpos.....	27
II.20.1. Marcaje con peroxidasa.....	28
II.20.2. Etiquetado con biotina.....	28
II.21.- E.L.I.S.A. (ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzimas).....	28
II.22.- Métodos cromatográficos.....	29
II.22.1. Cromatografía de intercambio iónico.....	29
II.22.2. Cromatografía de afinidad.....	30
II.22.3. Cromatografía de exclusión molecular.....	30
II.22.3.1. Cromatografía en Sephadex G-100.....	30
II.22.3.2. Cromatografía en Sephadex G-25 para la desalación de muestras... ..	30
II.23.- Generación de un anticuerpos policlonal frente a una especie proteica de 37 kDa asociada a la estructura de la pared celular de <i>C. albicans</i>	30
II.24.- Rastreo de una genoteca de cDNA con el PAb anti-37 kDa.....	31
II.25.- Purificación del ADN recombinante del bacteriófago λ gt11 mediante el sistema Magic™ Lambda Preps.....	32
II.26.- Amplificación y titulación de los clones recombinantes positivos.....	33
II.27.- Amplificación del ADN por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
II.28.- Preparación de lisados de péptidos de fusión codificados por lisógenos del bacteriofago λ gt11.....	34
II.28.1. Obtención de lisógenos de λ gt11 en la cepa de <i>E. coli</i> Y1089.....	34
II.28.2. Obtención de lisados de lisógenos.....	34
II.29.- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....	35
II.30.- Electroforesis del ADN en geles de agarosa.....	35
II.31.- Elución de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	35
II.32.- Ligamiento de fragmentos de ADN para construir moléculas (plásmidos) híbridas..	36
II.33. Transformación con ADN plásmidico.....	36
II.33.1. Preparación de células competentes.....	36
II.33.2. Transformación en <i>E. coli</i>	37
II.33.3. Selección de los transformantes.....	37
II.33.4. Análisis de los recombinantes por el sistema mini-prep.....	37

II.34.- Purificación de ADN plasmídico.....	38
II.35.- Obtención de ADN cromosomal de levaduras.....	39
II.36.- Marcaje no radiactivo de sondas.....	39
II.37.- Análisis de los fragmentos de restricción de ADN mediante hibriación con sondas...	39
II.37.1. Transferencia de las moléculas de ADN a filtros de Nylon (Southern).....	39
II.37.2. Hibridación ADN/ADN.....	40
II.38.- Obtención de ARN.....	40
II.39.- Análisis de las especies de ARN mediante hibridación con sondas marcadas.....	41
II.39.1. Electroforesis del ARN en geles de agarosa.....	41
II.39.2. Transferencia del ARN a filtros de Nylon (Northern).....	41
II.39.3. Hibridación con sondas no radiactivas y revelado.....	41
II.40.- Secuenciación del ADN.....	42
II.41.- Productos químicos y reactivos.....	42

III. RESULTADOS Y DISCUSION.

III.1.- Identificación de receptores de laminina presentes en la superficie celular de <i>C. albicans</i>	43
III.2.- Obtención y caracterización de un antisuero policlonal frente al receptor de 37 kDa para laminina.....	46
III.3.- Caracterización de dominios colagenosos en proteínas de la superficie celular de <i>C. albicans</i>	47
III.3.1.- Inmunofluorescencia indirecta.....	47
III.3.2.- Identificación de los componentes presentes en la estructura de la pared celular responsables de la reactividad frente a los anticuerpos anti-colágeno tipo-IV.....	48
III.3.3.- Efecto de tratamientos enzimáticos y químicos sobre la reactividad de los componentes presentes en los extractos de 2-ME frente a los anticuerpos anti-colágeno tipo-IV.....	49
III.4.- Análisis cromatográfico del material solubilizado de la superficie celular de <i>C. albicans</i> mediante tratamiento con 2-ME.....	52
III.5.- Clonación del cDNA que codifica para la p37.....	54
III.5.1. Genoteca de cDNA empleada para el rastreo.....	54
III.5.2. Antisueros policlonales empleados para el rastreo.....	54
III.5.3. Rastreo de la genoteca de cDNA.....	54
III.5.4. Análisis de los clones recombinantes positivos.....	55
III.5.5. Subclonación del clon PS1 en un vector plasmídico (pGEM-T).....	56
III.5.6. Caracterización del clon PS1.....	57
III.5.6.1. Southern blot.....	57
III.5.6.2. Northern blot.....	57
III.5.6.3. Secuenciación del ADNc.	57
III.6. Estudio comparativo de componentes proteicos y manoproteico presentes en la pared celular de <i>C. albicans</i> de origen clínico.....	60
III.7. Detección de antígenos circulantes y de inmunoglobulinas frente a antígenos de <i>C. albicans</i> en suero humano.....	65
III.7.1. Detección de antígeno circulante en sueros de pacientes con candidiasis sistémica.....	66
III.7.2. Detección de anticuerpos específicos.....	68

III.7.3. Análisis por inmunotransferencia de la reactividad de sueros escogidos frente a diferentes preparaciones antigénicas.....	71
III.7.4. Reactividad de los sueros frente a antígeno-látex	73
III.8. Conclusiones.....	75
IV. BIBLIOGRAFÍA.....	78

I. INTRODUCCIÓN

I.1. *Candida albicans*: características generales.

C. albicans es un hongo polimórfico clasificado dentro del orden Cryptococcales incluido en la clase Deuteromycotina u hongos imperfectos, en base a su modo de reproducción asexual, morfología, ciclo de vida y fisiología. *C. albicans* puede crecer principalmente por gemación (fase de levadura) o mediante la emisión de tubos germinativos o hifas (fase de micelio) dependiendo de factores ambientales (pH, temperatura) y nutricionales, aunque también se han detectado otras dos morfologías, la pseudo-hifa de apariencia similar a la hifa pero con una génesis diferente, y las clamidosporas que podrían representar un fenotipo característico de la fase estacionaria, o incluso un fenotipo terminal de la forma de levadura (Winner y Hurley, 1964; Miller y Finnerty, 1979; Shannon, 1981).

Esta especie se encuentra ampliamente difundida en la Naturaleza, hallándose presente frecuentemente como comensal inócuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal, y en el intestino de los hombres y otros animales de sangre caliente, aunque bajo determinadas condiciones ambientales puede manifestar carácter patógeno oportunista. En este contexto, *C. albicans* está emergiendo en los últimos años como uno de los principales agentes causales de infecciones hospitalarias. Tanto es así que los datos del National Nosocomial Surveillance System (NNSS) de los Estados de América sitúan a este microorganismo como el cuarto agente causante de infecciones sistémicas nosocomiales.

Las infecciones producidas por *C. albicans* se denominan genéricamente candidiasis, y pueden dividirse en dos categorías. En la primera se incluyen infecciones de la mucosa

oral y vaginal, que en ocasiones presentan un carácter crónico, mientras que en la segunda se encuentran manifestaciones mucho más graves como la miocarditis candidiásica y las septicemias agudas. La incidencia de este último tipo de manifestación patológica ha aumentado notablemente en las últimas dos décadas, debido a la concurrencia de una serie de factores muy variados como la utilización de pautas inmunosupresoras intensivas, la terapia masiva con antibióticos, la alimentación parenteral, el empleo de prácticas quirúrgicas y maniobras terapéuticas y diagnósticas agresivas y determinadas actitudes como la drogodependencia, siendo la candidiasis una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo los individuos afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Edwards *et al.*, 1978; Glew *et al.*, 1975; Hart *et al.*, 1969; Meunier-Carpentier *et al.*, 1981; Parker *et al.*, 1976; Rifkin *et al.*, 1967; Seeling, 1966).

El problema sanitario que representan las infecciones producidas por *Candida*, en particular las formas de tipo sistémico, es la razón que explica que en la actualidad existan muchos grupos de investigación, no sólo a nivel internacional sino también nacional, que trabajan con dicho hongo. Ello ha conducido a un notable incremento en el número de publicaciones científicas sobre facetas muy variadas de la biología y patogenicidad de *C. albicans* y especies relacionadas. En este contexto, se han publicado excelentes trabajos de revisión sobre la patogenicidad (Odds, 1985, 1987, 1988, 1994), ciclo celular y variabilidad fenotípica (Soll, 1984, 1992), aspectos inmunológicos y diagnóstico serológico de las candidiasis (Jones, 1990; Rogers y Balish, 1980), tratamiento quimioterápico (Speller, 1980), estructura y función de la pared celular (Cassone, 1989), interacciones del hongo

con el hospedador (Calderone y Braun, 1991; Cutler, 1991; Hostetter, 1994b; Kennedy, 1987), y aspectos clínicos y de laboratorio de las infecciones fúngicas en individuos inmunodeprimidos (Musial *et al.*, 1988).

I.2. La pared celular de *C. albicans*: características generales, composición química, estructura y función.

Las células de los hongos, al igual que la de otros organismos como bacterias y plantas, están recubiertas por una estructura rígida, denominada pared celular, que protege al protoplasto frente a los cambios de presión osmótica en el medio externo y, además, confiere a la célula su forma característica. De aquí se deduce el importante papel que la pared celular juega en la morfogénesis celular, aspecto éste que presenta un interés especial en el caso de los hongos dimórficos. Además, la pared celular actúa como soporte de antígenos superficiales específicos, que son característicos de la célula y que juegan un papel importante en el reconocimiento durante las diversas interacciones celulares (Ballou y Raschke, 1974; Calderone y Braun, 1991; Cassone, 1989; Sentandreu *et al.*, 1991a, b; Sharon, 1975). Esta última función tiene un especial significado en *C. albicans*, como ya se discutirá más adelante.

La composición química de la pared celular de *C. albicans* ha sido estudiada en detalle por diferentes investigadores (Chattaway *et al.*, 1968; Kessler y Nickerson, 1959; Shepherd, 1987; Sullivan *et al.*, 1983) que han encontrado que la pared de este hongo se compone principalmente de polisacáridos del tipo glucano y manano, y cantidades menores de quitina y lípidos.

La quitina forma parte del soporte esquelético de la pared celular de muchos hongos filamentosos, encontrándose en menor pro-

porción en las levaduras, donde su significado estructural es menos evidente. En *C. albicans*, la quitina es un componente minoritario de la pared celular (Chattaway *et al.*, 1968; Kessler y Nickerson, 1959) siendo su proporción mayor en la fase micelial que en la levaduriforme (Chattaway *et al.*, 1968; Elorza *et al.*, 1983). Los glucanos, son los componentes microfibrilares mayoritarios de la pared celular de *C. albicans* (Cassone *et al.*, 1979; Sullivan *et al.*, 1983), constituyendo el 47% del peso seco de la misma (Elorza *et al.*, 1983; Gopal *et al.*, 1984). Finalmente, el manano, nombre genérico que recibe la porción carbohidrato de las manoproteínas, representa el segundo polisacárido mayoritario de la pared celular de *C. albicans*, comprendiendo del 20 al 23% del contenido polisacárido total de la pared celular de este hongo (Sullivan *et al.*, 1983). Las manoproteínas de los hongos levaduriformes son aquellas glicoproteínas que contienen del 15 al 90% de manosa en peso (Cohen y Ballou, 1981), y forman el material amorfo de la pared, rellenando el espacio existente entre los polímeros microfibrilares. Además de aminoácidos y manosa (Ballou, 1976; Haworth *et al.*, 1941), estas macromoléculas contienen pequeñas cantidades de N-acetilglucosamina y fosfato (Casanova y Chaffin, 1991b; Slodki, 1962). En general, la estructura de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* es similar a la de *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet, 1985; Suzuki, 1981). De acuerdo con el modelo más aceptado y mejor estudiado que es el manano de *S. cerevisiae*, el 10% de la manosa presente en el polímero se encuentra en forma de oligosacáridos que se unen a la proteína mediante enlaces O-glicosídicos con los hidroxiaminoácidos serina o treonina (Nakajima y Ballou, 1974b; Sentandreu y Northcote, 1969), mientras que el 90% de la manosa formaría cadenas largas de unidades de polimánosa ligadas mediante enlaces N-

glicosídicos vía dos residuos de N-acetilglucosamina (Phaff, 1971), a una subunidad de asparagina de la cadena peptídica.

La pared celular juega un papel esencial en la práctica totalidad de los aspectos de la biología y la patogenicidad de *C. albicans*. Las distintas funciones y actividades biológicas en las que está involucrada la pared celular han sido atribuidas a alguno o algunos de sus componentes en concreto (Cassone, 1989), que se indican entre paréntesis tras la respectiva función biológica asignada a esta estructura; como son, (i) la morfogénesis y el crecimiento (quitina, glucano, manoproteínas), (ii) la protección osmótica (glucano, quitina), (iii) la protección frente a antimicóticos (manoproteínas, glucano), (iv) la de actuar como barrera de permeabilidad no selectiva (manoproteínas, glucano), (v) diferentes actividades enzimáticas (manoproteínas), (vi) fenómenos de adherencia (manoproteínas), (vii) interacción con ligandos del hospedador (manoproteínas), y (viii) la presentación de antígenos, inductores y moduladores de la respuesta inmune celular y humoral (manoproteínas, glucano). En este último aspecto cabe destacar la considerable atención que ha recibido el manano, debido a que es el principal constituyente con carácter antigénico, y en este sentido la especificidad de los serotipos A y B de este hongo (Hasenclever y Mitchell 1964a, b), viene conferida por peculiaridades estructurales de dicho componente (Kogan *et al.*, 1988; Sunayama, 1970; Suzuki y Usuyama, 1971).

Determinar el papel que juegan los componentes macromoleculares presentes en la pared celular, o de forma más genérica, en la superficie celular, de *C. albicans* en el establecimiento de un proceso patológico ha merecido la atención de varios grupos de investigación (Douglas, 1987a; Poulain *et al.*, 1985; Reiss, 1986), puesto que diferentes

propiedades, actividades y manifestaciones biológicas ligadas a la superficie de las células del hongo y moduladas por las moléculas presentes a este nivel como son, entre otras, la existencia de adhesinas, la hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) y la variación antigénica, han sido identificadas como factores de virulencia (Calderone y Braun, 1991; Cutler, 1991; Douglas, 1985, 1987a, b; Guentzel *et al.*, 1985; Hazen, 1990; Hazen y Hazen, 1988; Hostetter, 1994b; Poulain *et al.*, 1982, 1985). La expresión de adhesinas es a su vez un factor que modula la capacidad de las células de *C. albicans* para interactuar con y adherirse a diferentes tipos de superficies biológicas y/o inertes, y hay que tener presente que el requisito esencial para que tenga lugar una infección microbiana es, en último término, la adhesión del agente patógeno a los tejidos o células del hospedador. En consecuencia, este aspecto tiene una especial importancia en el contexto de *C. albicans* como organismo patógeno.

I.3. Factores de virulencia en *C. albicans*

Los factores de virulencia expresados por *C. albicans* varían en función de la vía de penetración del microorganismo en el hospedador, el estadio concreto del proceso infeccioso, y la naturaleza de la respuesta por parte del hospedador. Por otro lado, los atributos biológicos fúngicos necesarios para que tenga lugar la colonización o adhesión a los tejidos endoteliales no son los mismos que los responsables de la penetración a través del epitelio, y de hecho, ningún factor parece ser determinante exclusivo de la virulencia, ya que no todos se expresan en ninguna de las etapas o estadios de la infección (Cutler, 1991; Hostetter, 1994b; Odds, 1994).

Los factores de virulencia más importantes que pueden estar implicados en la invasión del hospedador por las células de *C. albicans* son

los siguientes: (i) elevada frecuencia de variabilidad fenotípica, (ii) formación de hifas o tubos germinativos, (iii) hidrofobicidad de la superficie celular (HSC), (iv) el mimetismo molecular (es decir la expresión de componentes superficiales que posean homología con moléculas del hospedador), (v) producción de exoenzimas hidrolíticos, y (vi) expresión de adhesinas y receptores superficiales para ligandos de los tejidos animales (Cutler, 1991; Odds, 1994).

Algunos de estos factores no se expresan en otras especies del género *Candida*, o bien difieren cualitativa o cuantitativamente de los encontrados en *C. albicans*, lo que podría relacionarse con una menor virulencia de dichas especies.

I.3.1. Variación fenotípica

C. albicans es capaz de invadir una gran diversidad de tejidos humanos, eludir en muchas ocasiones los tratamientos antifúngicos, así como el sistema inmunitario, e infectar un espectro amplio de huéspedes inmunocomprometidos. Si tenemos en cuenta que *C. albicans* es un organismo diploide, que carece de fase sexual (o ciclo meiótico), o al menos la misma no es conocida, es difícil imaginar el mecanismo mediante el cual este hongo puede obtener la diversidad genética que, aparentemente, es la base de su éxito biológico (Slutski *et al.*, 1985).

La respuesta a este problema pudiera hallarse en el descubrimiento de la capacidad que *C. albicans* tiene para expresar espontáneamente, tanto "in vitro" como "in vivo" y con una elevada frecuencia, diferentes fenotipos, los cuales pueden distinguirse fácilmente por la morfología de las colonias que se forman sobre un medio sólido adecuado (Martínez *et al.*, 1990; Slutski *et al.*, 1985, 1987; Soll *et al.*, 1987; Soll, 1992).

David Soll y colaboradores en la Universidad de Iowa han identificado tres sistemas de variación fenotípica en *C. albicans*, y sugieren que este hecho tendría extraordinarias implicaciones en la patogenicidad del hongo, ya que la variación fenotípica no es sólo un fenómeno de laboratorio, sino que también ocurre *in vivo*. Soll *et al.* (1987), estudiaron este fenómeno en 11 pacientes con candidiasis vaginal aguda, comprobando que en el lugar de la infección se detecta la variación fenotípica con una elevada frecuencia. Estas observaciones refuerzan la suposición inicial (Slutsky *et al.*, 1985) según la cual el fenómeno de la variación fenotípica podría jugar un papel importante en la manifestación del carácter patógeno, al conferir a la célula la capacidad para, (i) desarrollar resistencia a los agentes anti-fúngicos, (ii) invadir nuevos tejidos o localizaciones en el individuo infectado, (iii) detectar cambios desfavorables en las condiciones ambientales del organismo afectado, y (iv) evadir la acción del sistema inmunitario, al inducir cambios en la composición antigénica, probablemente a nivel de la superficie (pared) celular (Martínez *et al.*, 1990; Soll *et al.*, 1987; Soll, 1992).

I.3.2. Formación de hifas

La capacidad de *C. albicans* para crecer en forma de levadura o de micelio (dimorfismo) es una característica que se relaciona directamente con el carácter patógeno del hongo. El hecho de que la formación de micelio sea la única propiedad reproducible conocida que diferencia a *C. albicans* del resto de las especies del género *Candida*, ha inducido a muchos autores a establecer una relación entre dicha característica biológica y el marcado carácter patógeno de esta especie. Esta correlación se ha generalizado hasta el punto de considerar la aparición de formas de micelio en heces, orina, o frotis de la mucosa oral o vaginal como diagnóstico claro de candidiasis

(Odds, 1988). Hay que indicar que las formas de levadura y micelio se detectan simultáneamente en los tejidos infectados y algunos autores han implicado a la fase levaduriforme como la entidad más virulenta (Mardon *et al.*, 1975; Saltarelli *et al.*, 1975). No obstante, la presencia de la forma micelial está directamente relacionada con la aparición del proceso infeccioso, sobre todo en los cuadros de tipo sistémico o diseminado (Marrie y Costerton, 1981; Scherwitz, 1982).

Se han propuesto diferentes hipótesis para justificar el carácter invasivo de la forma micelial entre las que cabe mencionar (i) la mayor facilidad por parte de las hifas para penetrar en los tejidos, (ii) una mayor resistencia de los filamentos miceliales a la fagocitosis, principalmente por impedimentos de tipo estérico, y (iii) la aparición de cambios en las propiedades superficiales del micelio.

Ensayos de adherencia realizados "in vitro" entre células de *C. albicans* y células humanas de epitelio bucal han revelado que el grado de adherencia a las células del huésped está relacionado con la emisión del tubo germinativo (Kimura y Pearsall, 1978, 1980). En individuos sanos, las blastosporas de *C. albicans* pueden colonizar pliegues de la piel, las mucosas y el tracto gastrointestinal, pero en general muestran una escasa adherencia a los tejidos en estas determinadas localizaciones. Sin embargo, la emisión del tubo germinal por parte de la blastospora, se traduce en un incremento considerable de la capacidad de fijación de las células del hongo a las células animales. Este fenómeno ha sido observado en condiciones de laboratorio, pero se ha postulado que la formación de los tubos germinales sería un factor decisivo para inducir el proceso invasivo patológico "in vivo" (Sobel *et al.*, 1984).

Mediante observación al microscopio electrónico se ha puesto de manifiesto que la

ultraestructura de la pared celular experimenta cambios durante la transición morfológica de levadura a micelio (Cassone *et al.*, 1979; Scherwitz *et al.*, 1978). Además, el espesor de la pared de las hifas es aproximadamente la mitad del de la pared de las células levaduriformes. Sin embargo, la naturaleza química de los constituyentes de la pared (glucano, quitina y manano) es similar en ambas formas, aunque la proporción de los distintos polisacáridos y la composición proteica, así como la cinética de formación de los polímeros de la pared varían entre ambas morfologías (Chattaway *et al.*, 1968; Elorza *et al.*, 1983).

En este contexto, aunque apenas se han encontrado diferencias en lo que respecta al contenido en glucano y lípidos (Sheperd *et al.*, 1985; Sundaram *et al.*, 1981; Yamaguchi, 1974) ni a la composición de aminoácidos de las proteínas de la pared celular de ambas formas (Chaffin y Stocco, 1983), la pared de la forma micelial posee aproximadamente cuatro veces más quitina que la pared de las blastosporas, aumento que va acompañado simultáneamente por una notable reducción en la cantidad de manano (Chattaway *et al.*, 1968; Elorza *et al.*, 1983; Sheperd *et al.*, 1985; Sullivan *et al.*, 1983). Dado el alto poder inmunogénico del manano, el hecho de que la pared celular de la forma micelial presente un bajo contenido en este componente, sugiere que la adopción de esta morfología por parte del hongo tendría por objeto el evitar la formación masiva de anticuerpos por parte del huésped, facilitando así la expresión del carácter invasivo y patógeno de *C. albicans* (Elorza *et al.*, 1983; Rico *et al.*, 1982).

En cualquier caso, los estudios llevados a cabo hasta hoy día sugieren que existen pocas diferencias, en cuanto a composición de la pared se refiere, entre las dos morfologías del

hongo, habiéndose encontrado solamente algunas manoproteínas que parecen ser específicas de una u otra morfología (Casanova *et al.*, 1989, 1991; Fukayama y Calderone, 1991).

I.3.3. Hidrofobicidad de la superficie celular: interacciones de tipo físico-químico en los procesos de reconocimiento y adhesión

Las interacciones de tipo electrostático y las fuerzas hidrofóbicas que dependen en último término de las características físico-químicas de la superficie celular juegan un importante papel en los fenómenos de adhesión entre células y también en las interacciones entre las células y diversos sustratos inertes. En ambos casos las interacciones mediadas por carga eléctrica o hidrofobicidad se producen a largas distancias, por lo que desempeñan un papel fundamental en los estadios más iniciales de los fenómenos de adherencia. Por ser las mejor conocidas y jugar probablemente un papel más importante en los procesos de adhesión, seguidamente se comentarán aspectos relativos a las fuerzas hidrofóbicas. La hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) de *C. albicans* le permite al hongo adherirse a los materiales plásticos utilizados para fabricar catéteres, sondas y prótesis de muy diversa índole (Jacques *et al.*, 1986; Klotz *et al.*, 1985; Minagi *et al.*, 1985; Rotrosen *et al.*, 1986), motivo por el cual estos objetos pueden convertirse eventualmente en una vía importante a través de la cual el hongo puede invadir el organismo del hospedador, dando lugar a las formas más graves de la enfermedad que son las candidiasis de tipo sistémico o diseminado.

También parece que la HSC contribuye de modo importante a incrementar la capacidad de las células fúngicas para adherirse a los tejidos del huésped, aunque no sea el principal factor intrínseco de aquellas que interviene en

la adherencia del hongo a las células epiteliales (Hazen, 1989; Hazen *et al.*, 1991; Klotz y Penn, 1987; Macura, 1987), puesto que en dicho proceso participan varios mecanismos entre los que cabe destacar, además de las interacciones de tipo hidrofóbico, las de tipo electrostático y, las más importantes, aquellas que implican el reconocimiento específico entre las adhesinas existentes en la superficie de las células fúngicas y los receptores presentes en las células de los tejidos del organismo infectado (Calderone y Braun, 1991; Klotz y Penn, 1987). En este contexto se ha sugerido que las interacciones hidrofóbicas contribuirían a favorecer la formación y a preservar la integridad de los enlaces entre las adhesinas y sus receptores (Rotrosen *et al.*, 1986), ya que estos últimos sólo se establecen a cortas distancias, mientras que al ser capaces de interactuar a mayores distancias intercelulares y tener carácter reversible (Israelachvili y McGuiggan, 1988) las fuerzas de naturaleza hidrofóbica contribuirían a crear un entorno adecuado para incrementar el número de uniones entre adhesinas y receptores (Hazen, 1989).

En general, la superficie de las hifas es fuertemente hidrofóbica independientemente del estatus que posea la levadura a partir de la cual se ha originado dicha hifa (Hazen y Hazen, 1987; López-Ribot *et al.*, 1991, 1994), observación que es consustancial con el mayor carácter invasivo que aparentemente se ha atribuido al micelio. Sin embargo, y pese al reconocimiento que se ha hecho en todos estos estudios sobre el importante papel que la HSC parece jugar en diferentes aspectos de la biología y patogenicidad de *C. albicans*, son prácticamente desconocidas las bases fisiológicas y bioquímicas en las que reside esta propiedad de las células de *C. albicans*, si bien se han identificado una serie de componentes polipeptídicos de bajo-medio

peso molecular que se liberan de la pared celular de las células del hongo tras digestión enzimática con glucanasas o tratamiento con agentes reductores (2-mercaptoetanol), que podrían ser responsables del carácter hidrofóbico que eventualmente exhiben las células de *C. albicans* (Hazen *et al.*, 1990; López-Ribot *et al.*, 1991).

I.3.4. Mimetismo molecular

En teoría, la capacidad de un microbio para sintetizar o adquirir una cubierta superficial formada por moléculas que mimetizan componentes de los tejidos del hospedador, representa un factor de virulencia puesto que una cubierta de tal naturaleza haría que el patógeno fuese menos reconocible como algo extraño por los mecanismos defensivos del hospedador. Sólo hay alguna evidencia indirecta de que tal fenómeno pueda darse en *C. albicans*. El grupo de Jean-Marcel Senet (Robert *et al.*, 1991) ha encontrado que al poco tiempo de encontrarse en el torrente circulatorio, las células del hongo se recubren de plaquetas, las cuales interactúan con *C. albicans* a través de un receptor para fibrinógeno. La unión de las plaquetas es una respuesta del hospedador frente al hongo, pero el hecho de que dicha unión esté mediada por un receptor de aquél, permite especular que una gruesa capa de plaquetas representaría un excelente camuflaje ante los mecanismos defensivos del organismo infectado. Aunque es un área de estudio realmente interesante, el diseño de aproximaciones experimentales para verificar el papel del mimetismo molecular como factor de virulencia, no debe ser fácil.

I.3.5. Enzimas líticos

C. albicans y otras especies de *Candida* no secretan enzimas líticos con especificidad de sustrato tal y como ocurre en algunas bacterias, sino que secretan o expresan en su su-

perficie hidrolasas capaces de actuar sobre un amplio espectro de sustratos, lo que facilita la invasión de los distintos tipos celulares.

Entre los enzimas líticos de *C. albicans* se encuentran lipasas, fosfolipasas, una proteínasa y una fosfomonoesterasa ácida. De todas ellas la mejor caracterizada es la aspartil proteínasa, una enzima capaz de degradar superficies epiteliales y endoteliales y promover la penetración del hongo (Borg y Ruchel, 1988; Ganesan *et al.*, 1991). La existencia de dicha proteínasa en una célula es importante para su capacidad infectiva ya que se ha comprobado que mutantes deficientes en dicha enzima son menos virulentos que sus correspondientes cepas progenitoras (Ruchel, 1981; Kwon-Chung *et al.*, 1985.).

I.3.6. La adhesión como factor de virulencia

Numerosos estudios clínicos han sugerido una estrecha relación entre la adhesión y colonización in vivo con la consiguiente virulencia o patogenicidad. La correlación entre colonización e invasión indica que el potencial invasivo de las especies de *Candida* refleja su habilidad para unirse al huésped humano (Hostetter, 1994b).

Las interacciones adhesivas más importantes entre el organismo invasor y el huésped son las que se producen entre proteínas del hongo y la célula que se va a infectar, aunque existen otras en las que están implicadas diversas manoproteínas que reconocen una gran variedad de carbohidratos sobre células epiteliales, endoteliales o en grupos antigénicos de la sangre (interacciones tipo lectina).

Se ha descrito que las estrategias de adhesión en bacterias y eucariotas son diferentes (Beachey, 1981; Hostetter, 1994a). En las primeras, como es el caso de las especies de *Yersinia* (Fig.I.1, panel A), la interacción se produce entre carbohidratos o proteínas del

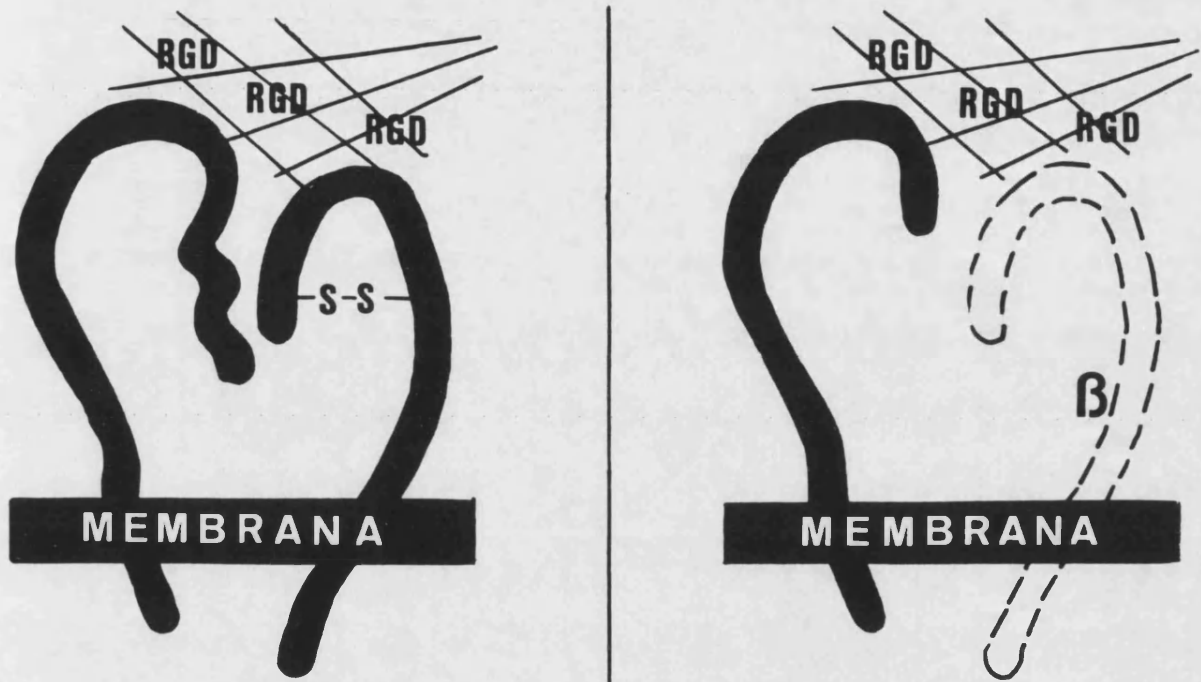


Fig.1.2. Dominios funcionales de las integrinas β_2 en células de mamíferos (izquierda) y posibles dominios funcionales en *C. albicans* (derecha).

huésped (p.ej integrinas $\beta 1$ receptoras de fibronectina) y moléculas de la superficie de la bacteria (invasina). Sin embargo en el caso de los eucariotas patógenos tales como *C. albicans*, los receptores se localizan en la superficie del hongo y median la adhesión por el reconocimiento de proteínas de la matriz extracelular (MEC) sintetizadas por el huésped (Fig I.1, panel B) (Calderone, 1993; Ruoslahti y Piersbacher, 1987)

Tanto en las interacciones proteína-proteína como en las tipo lectina, el microorganismo puede interaccionar con las células del huésped para iniciar la enfermedad y a pesar de las distinciones bioquímicas implicadas en cada una de ellas, existen algunos aspectos comunes a la adhesión de *Candida* que pueden resumirse en tres puntos:

1- Todas las proteínas adhesivas son proteínas de la superficie celular (a excepción del factor 6) y probablemente manoproteínas, como se demuestra por su susceptibilidad a varios enzimas proteolíticos tales como la Tripsina, Pronasa y Zimoliasa (Calderone y Braun., 1991). Las evidencias sugieren que las adhesinas residen en la capa fibrilar más externa (Yu *et al.*, 1994a).

2- Las células viables se adhieren más fácilmente que las células muertas por calor o formalina (Kimura y Pearsall, 1978; Sobel *et al.*, 1981), lo que sugiere que dichas proteínas son susceptibles a la desnaturalización por calor o por reactivos químicos.

3- Las hifas y pseudohifas poseen más capacidad adhesiva que las células levaduriformes del mismo aislado (Kimura y Pearsall, 1978; Samaranyake y McFarlane, 1982). Esto sugiere la existencia de un mayor número de estas moléculas en los tubos germinativos con respecto a las encontradas en células levaduriformes.

Por otro lado todos los factores de virulencia comentados anteriormente producen variables en el estudio de la adhesión. Además intervienen:

1- la especie de *Candida* que se estudie (Heindenreich, *et al*; 1985).

2- La superficie a la cual se adhiere (Rotrosen, *et al*; 1986).

3- Los componentes del medio de cultivo del hongo (Merkel 1992).

4- El tipo de ensayo empleado.

5- La especificidad del tipo de tejido puede además jugar un papel importante en el hecho de que existan diferentes mecanismos de adhesión y distintos tipos de ligando entre células epiteliales (Douglas, 1987, Brassart, *et al*; 1991) y endoteliales (Calderone, *et al*; 1988).

A continuación pasaremos a describir brevemente los tipos de interacción proteína-proteína encontrados en *C. albicans*.

II.3.6.1. Receptores tipo integrina

Las integrinas son heterodímeros formados por subunidades α y β que se expresan como proteínas transmembrana en una amplia gama de células animales incluidas las endoteliales y los leucocitos (Abelda y Buck, 1990; Hynes, 1992; Marcantonio y Hynes, 1988). Cada subunidad presenta un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxi-terminal, localizado intracitoplasmáticamente, que interacciona con el citoesqueleto (Fig.I.2). Las integrinas se agrupan en base a sus cadenas β (Hostetter, 1994a). Las cadenas α y β cooperan en el reconocimiento y unión de ligandos de integrina tales como el fibrinógeno, la fibronectina o la laminina en la MEC (Bednarczyk *et al.*, 1994). Muchos de estos ligandos se distinguen por su secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) (Ruoslahti y Piersba-

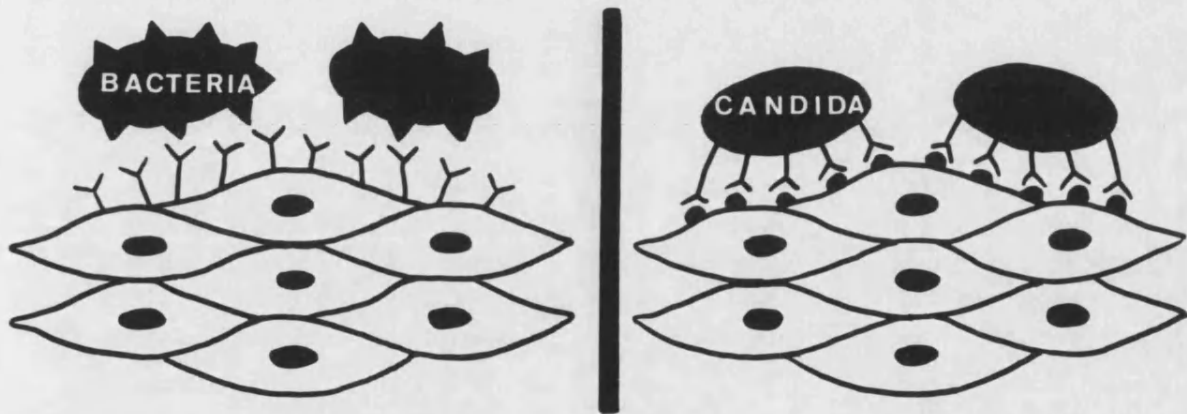


Fig.1.1.Mecanismos de adhesión e invasión en microorganismos procariotas (panel A) y eucariotas (panel B).

cher, 1987). En este contexto, cada vez son mayores las evidencias de que *C. albicans* se une a componentes de la matriz extracelular vía secuencias RGD, como se comentará más tarde. Además se han descrito proteínas en *C. albicans* que exhiben similitudes antigénicas y funcionales a los receptores para la proteína del complemento iC3b, denominados CR3 y CR4. Estos son conocidos como análogos de integrinas debido a su localización dentro de la familia de los supergenes de integrina (Hostetter *et al.*, 1990). La primera evidencia de la existencia de análogos de integrina en *C. albicans* la propusieron Heindeinreich, *et al.*, 1985, los cuales determinaron que los iC3b y C3d formaban rosetas con *C. albicans* tanto en forma de levadura como de micelio (Hostetter, 1994b).

La presencia de análogos de integrina en especies de *Candida* da luz a dos importantes correlaciones. En primer lugar, como las integrinas de células de mamífero reconocen secuencias RGD en los ligandos de la MEC, los análogos de integrina pueden mediar la adhesión por el mismo mecanismo bioquímico. En segundo lugar, la evidencia de unas relaciones significativas entre los análogos de integrina en levaduras y sus correspondientes células de mamífero, podrían aportar puntos de vista críticos en la evolución y función de estas proteínas eucariotas complejas.

I.3.6.2. Receptores tipo no-integrina

También se han identificado receptores de moléculas de la MEC de tipo no integrina, entre los que se encuentra el receptor de laminina humano de 67 kDa (67 LR) y su precursor de 37 kDa (37 LR), los cuales se unen a laminina con alta afinidad (Castronovo *et al.*, 1990, 1991 y Rao *et al.*, 1989). Además existen datos que apuntan hacia la existencia de otras proteínas de tipo no-integrina (Mercurio y Shaw, 1991), que poseen capacidad de unión a laminina. Este es el caso

de la elastina de 67 kDa, distinta de la anteriormente descrita (Mecham *et al.*, 1989), de la cranina (Smallheiser y Schwartz, 1987) y de los receptores de laminina presentes en los hepatocitos (Clement, *et al.*, 1990).

I.3.6.3. Receptores de fibrinógeno y otras proteínas séricas

C. albicans posee capacidad para unirse a fibrinógeno de forma específica así como a otras proteínas del suero humano, tales como la transferrina o la albúmina (Boulai, *et al.*, 1987; Page y Odds, 1988; Tronchin *et al.*, 1987). Además ha identificado una manoproteína de 58 kDa con actividad de unión a fibrinógeno tanto en células levaduriformes como miceliales (López-Ribot, *et al.*; 1992) y experimentos utilizando fibrinógeno marcado con 125 I han cuantificado la fuerte unión de ligando por parte de los tubos germinativos (Boulai, *et al.*; 1987) en comparación con las células crecidas en forma de levadura.

I.3.6.4. Receptores de componentes de la matriz extracelular

Los tejidos no están compuestos por células aisladas sino que estas se encuentran inmersas en la matriz extracelular (MEC), un entramado complejo que sirve de soporte a las células y determina la arquitectura de los tejidos. La MEC abunda en tejidos conectivos tales como la piel, cerebro, espina dorsal y huesos, en los que se encuentra calcificada, e interviene en el desarrollo, migración, formación y funcionamiento metabólico de las células que rodea. La MEC se encuentra principalmente compuesta por glicosaminoglicanos, en forma de proteoglicanos y proteínas fibrosas, que se agrupan en proteínas estructurales (colágeno, elastina) y adhesivas (fibronectina, laminina). En la interfase entre el epitelio y el tejido conectivo la ECM forma la lámina basal, una capa muy fina cuyo componente ma-

yoritario es la laminina, que juega un papel muy importante en el comportamiento celular.

Se han descrito una gran variedad de receptores en *C. albicans* de componentes de la MEC, entre los que cabe destacar los receptores para laminina (Bouchara *et al.*, 1990) y la unión a fibronectina (Skerl *et al.*, 1983) y a colágeno tipo IV (Klotz, 1990).

I.4. Modelo de los factores de virulencia de *Candida*

Todos los conocimientos anteriormente expuestos pueden unificarse en un modelo (Odds, 1994) en el cual la expresión de cada factor particular por parte del hongo sea de interés en un paso individual del proceso infeccioso (Fig.I.3). Así, en cada etapa, la capacidad de las células para crecer y diversificar su fenotipo juega un papel fundamental en el establecimiento de la infección.

I.5. Estrategias en el estudio de la adhesión

El aislamiento y/o identificación de proteínas de *C. albicans* implicadas en la adhesión (moléculas con actividad de unión a ligando, etc.) requiere un paso previo que consiste en solubilizarse ha realizado mediante el uso de diversas técnicas, las cuales han permitido solubilizar de forma individualizada los distintos componentes de la pared celular. En nuestro estudio dichos componentes fueron solubilizados con dos agentes solubilizantes como el 2-mercaptoetanol (2-ME), un agente reductor que libera componentes superficiales del hongo unidos mediante puentes disulfuro (Chaffin y Stocco, 1983), y a zimoliasa, una β -glucanasa capaz de romper la estructura de la pared celular, procediéndose finalmente al lisado de los protoplastos, obtenidos tras solubilización con Zimoliasa.

Una vez obtenidos los diferentes extractos antigénicos existen numerosas técnicas que

permiten aislar un determinado componente antigénico. La mayoría de ellas se basan en la separación de dicho componente por una característica particular de esa molécula que no posean el resto de especies del extracto. Uno de los métodos más utilizados es la cromatografía de afinidad. En este tipo de cromatografía se fijan a la matriz de una columna anticuerpos monoclonales o proteínas que actúan de ligando (C3b, fibronectina, etc.) y se eluyen mezclas complejas (suero, extractos antigénicos, etc), quedando retenido en la matriz el ligando o receptor correspondiente a la proteína fijada.

Otra de las técnicas empleadas es la inmunotransferencia (Towbin *et al.*, 1979), en el cual los ligandos de interés (fibrinógeno, laminina o GPIIb, GPIIIa) usados como sonda marcada o sin marcar junto con un anticuerpo dirigido hacia el ligando, reaccionan con extractos inmunotransferidos de *C. albicans*.

A pesar de esto, la unificación de las observaciones descritas para los distintos receptores siguiendo los métodos comentados anteriormente requiere estudios posteriores, ya que las proteínas caracterizadas a partir de estas metodologías, pueden tener múltiples sitios de unión a ligando; los datos indican que la laminina, C3b y el fibrinógeno se unen cada uno a una proteína de 60 kDa, pero hasta que no se tengan datos disponibles de secuenciación de estos receptores, no sabremos si se trata de una única proteína o de varias con pesos moleculares similares (Calderone, *et al.*; 1993). Por ello las futuras estrategias deberían centrarse en el aislamiento y caracterización de genes que codifican para estas proteínas.

La carencia de ciclo sexual en *C. albicans*, así como el carácter diploide de su genoma ha limitado la realización de estudios genéticos (Scherer y Magee, 1990), aunque actualmente se dispone de técnicas para el clonaje

ETAPA 1:

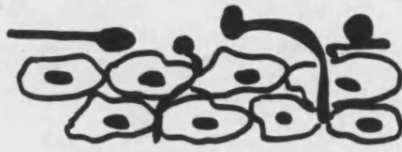
adhesión epitelial y colonización



Formación de tubos germinativos
Adhesinas
Hidrofobicidad

ETAPA 2:

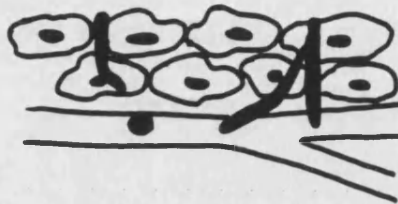
penetración epitelial



Formación de tubos germinativos
Adhesinas
Enzimas líticos

ETAPA 3:

invasión vascular y diseminación



Formación de tubos germinativos
Enzimas líticos

ETAPA 4:

adhesión endotelial y penetración a tejidos



Mimetismo molecular
Enzimas líticos

Fig.1.3. Esquema de los estadios de la infección por *Candida*. A la derecha de cada etapa se indican los posibles factores de virulencia involucrados.

de genes, cariotipado electroforético y disrupción génica desarrolladas para dicho hongo (Jenkinson *et al.*, 1988; Kurtz *et al.*, 1988; Rosenbluh *et al.*, 1985; Lott *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1988; Gow *et al.*, 1993b)

I.6. Patología y diagnóstico de las candidiasis

Las micosis producidas por *Candida* pueden clasificarse según la zona del cuerpo a la que infecten: las micosis superficiales que son rápidamente diagnosticadas y responden bien a la terapia y las micosis sistémicas que se caracterizan por una invasión interna de los órganos del cuerpo.

Las candidiasis superficiales más comunes son la oral y la vaginal y los síntomas suelen ser característicos pero no únicos y requieren la confirmación microbiológica. Como *Candida* es un comensal humano común, su aislamiento de zonas superficiales no es indicativo de infección en términos clínicos hasta que se asocia a un síntoma o signo característico del hongo.

El método de diagnóstico más común de dichas candidiasis consiste en un alto índice de sospecha clínica, empleo de cultivos en sangre (Musial *et al.*, 1988) y biopsia de tejidos infectados. Dependiendo de la modalidad, estas aproximaciones pueden perder sensibilidad, ser positivas solo en más avanzadas etapas de invasión y ser negativas en pacientes deprimidos.

La candidiasis sistémica o diseminada afecta principalmente a dos tipos de huéspedes: pacientes severamente inmunodeprimidos que poseen un tumor sólido o una alteración hematológica y que son granulocitopénicos debido a una terapia citotóxica y pacientes no oncológicos, especialmente aquellos que han sufrido una intervención cardíaca o abdominal (Fraser *et al.*, 1992 y Komshian *et al.*,

1989). En estos la respuesta inmune puede estar debilitada por una terapia corticosteroide. *C. albicans* es el responsable de más de la mitad de los casos de candidiasis diseminada.

La infección por especies de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* se asocia habitualmente a neutropenia, ya que son capaces de colonizar conductos gastrointestinales. Por el contrario, la infección por *C. parasilopsis* esta adaptada para colonizar la piel y se encuentra frecuentemente cuando existe un catéter central. La mortalidad asociada a candidiasis diseminada es alta, habiéndose publicado un porcentaje que oscila desde un 57% a un 79%. (Fraser *et al.*, 1992 y Meunier-Carpentier *et al.*, 1981). La razón de esta elevada mortalidad es la dificultad que se encuentra para hacer el diagnóstico, la cual surge por dos vías: el problema de distinguir entre la colonización clínicamente insignificante e infección invasiva (Greenfield *et al.*, 1983) y el riesgo de la quimioterapia antifúngica (Jones 1980).

Los hemocultivos siguen dando solo resultados positivos en un porcentaje bajo de los casos, a pesar de que últimamente se han mejorado los medios de cultivo incrementándose el aislamiento de especies de *Candida* de la sangre respecto a los medios que existían anteriormente, lo que permite un diagnóstico más eficaz (Hopwood y Warnock, 1987).

Aunque algunas infecciones fúngicas responden bien a medidas tales como la mejora nutricional del huésped o a una eliminación de factores favorecedores de la infección, en el caso de la candidiasis es más común el uso de antifúngicos como medida de tratamiento (Fox, 1993).

Aproximaciones al diagnóstico de la candidiasis

Así pues, el reto para métodos innovadores de laboratorio es aportar evidencias de la

infección lo más rápidamente posible, ya que la terapia antifúngica temprana es crítica para reducir la mortalidad en pacientes con candidiasis diseminada.

El siguiente esquema resume las modalidades de diagnóstico convencional y de laboratorio para la candidiasis invasiva.

DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

- Evaluación clínica.
- Detección fúngica.
- Identificación histopatológica de candidiasis invasiva

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

- Amplificación del DNA de *Candida* por PCR
 - Detección de metabolitos de *Candida*.
 - Detección de antígeno de *Candida*.
 - A) Antígenos de la superficie celular.
 - B)Manano de pared celular.
 - C)Antígenos de membrana.
 - D)Antígenos citoplásmicos.
 - Detección de anticuerpos A-*Candida*.
-

El alto índice de sospecha clínica debe ir acompañado de la biopsia del tejido infectado. El diagnóstico mediante detección histopatológica tiene la ventaja de que confirma inequívocamente la presencia de *Candida* y permite el empleo de terapias agresivas sin reservas relativas a la toxicidad. Sin embargo en la mayoría de los casos no es posible este tipo de tratamiento, por lo que los estudios actuales están dirigidos hacia métodos de diagnóstico que posean la sensibilidad alcanzada en

un laboratorio pero que puedan ser empleados en ambientes hospitalarios.

I.6.1 Amplificación del DNA de *Candida* por PCR

La escasa literatura descrita sobre la diagnosis de candidiasis diseminada basada en la detección de DNA (Fox *et al.*, 1989), indica que la detección de especies de *Candida* en sangre puede ser limitada por la rápida eliminación de los microorganismos de la circulación sanguínea o las dificultades al emplear la técnica de PCR en muestras clínicas. (Reiss *et al.*, 1993).

I.6.2. Detección de metabolitos de *Candida*

Se han investigado técnicas para detectar metabolitos producidos por especies de *Candida* que normalmente no se encuentran en el suero humano, como por ejemplo manosa y D-arabinitol. La sensibilidad en cromatografía de gas-líquido para estos compuestos es del 39% y 26%-45%, respectivamente (De Repentigny *et al.*, 1985 y Bougnoux *et al.*, 1990). Esta técnica no es suficientemente sensible para fines clínicos, además de que la cromatografía gas-líquido es una técnica engorrosa para ser realizada en laboratorios hospitalarios.

I.6.3. Detección de antígenos de *Candida*

La estructura antigénica de *Candida albicans* se ha estudiado fundamentalmente por dos razones, la caracterización de antígenos útiles para mejorar la identificación de especies de *Candida* o cepas de *Candida albicans* y la identificación de antígenos para el diagnóstico de la infección. (Escuro *et al.*, 1989; Reboli *et al.*, 1993; Strockbine *et al.*, 1984).

Los antígenos útiles para aplicaciones serológicas se identifican por aglutinación con antisuero obtenido contra componentes de la

superficie celular, mientras que los empleados para diagnosticar infecciones profundas suelen ser antígenos citoplásmicos siempre que el huésped pueda provocar una respuesta humoral suficiente cuando las células del hongo son destruidas por el huésped (Herent *et al.*, 1992; Nelson *et al.* 1991), lo que puede no ocurrir en individuos inmunodeprimidos.

I.6.3.1. Antígenos de la superficie celular

La pared celular de *C. albicans* no es una estructura antigénicamente constante sino dinámica, y varía en respuesta a condiciones de crecimiento tanto *in vivo* como *in vitro* (Nelson, 1991).

La variabilidad antigénica de la superficie celular se relaciona con el manano y con diferencias antigénicas entre cepas virulentas y avirulentas de *C. albicans* (Poulain *et al.*, 1979). La extracción de componentes de la superficie celular ha permitido el estudio de los componentes antigénicos mediante otras técnicas inmunológicas. Existe un gran número de técnicas destinadas a la extracción de antígenos de la pared celular. Estas incluyen el calentamiento para solubilizar mananos (Peat *et al.*, 1961), el tratamiento con NaOH (Cassone *et al.*, 1978), la solubilización de componentes lipídicos con cloroformo y metanol (Chattaway *et al.*, 1968), el tratamiento con agentes reductores como el ditiotritol o β -mercaptoetanol (Chaffin y Stocco, 1983), la utilización de enzimas (Gopal *et al.*, 1968; Sundstrom *et al.*, 1985) o el uso de detergentes.

Desde el punto de vista de utilización de antígenos en pruebas serológicas, la técnica más útil es aquella que libera los componentes de la pared celular sin modificar sus características antigénicas. Las extracciones con ditiotritol o β -mercaptoetanol, al reducir los puentes disulfuro de las proteínas, producen

la liberación de proteínas y de polisacáridos de las capas superficiales de la pared celular.

Para una caracterización global se procedió al marcaje con biotina (Casanova *et al.*, 1992a) de las células levaduriformes intactas etiquetándose los componentes proteicos principales de la superficie celular. Posteriormente se llevó a cabo la extracción química con β -mercaptoetanol y enzimática con Zimoliasa de estos y finalmente se separaron en geles de SDS-Poliacrilamida, transfiriéndose a papel de nitrocelulosa sobre el cual se detectaron utilizando el complejo extravidin-peroxidasa.

En los extractos obtenidos con tratamiento con 2-ME a partir de blastosporas y de blastosporas germinadas se pudieron detectar unas 21 bandas proteicas con masas moleculares entre >650 y 13 kDa. Aunque había bastantes bandas comunes para ambas morfologías, algunos componentes se detectaron de forma exclusiva en una de ellas (Casanova *et al.*, 1992a).

Las proteínas solubilizadas mediante extracción con Zimoliasa a partir de células de ambas morfologías previamente tratadas con 2-ME también se resolvieron mediante la separación electroforética dando lugar a un complejo conjunto cuyo rango de pesos moleculares osciló entre 650 y 13 kDa. Además de bandas comunes para ambas morfologías del hongo, también se pudieron observar constituyentes específicos de forma en los materiales obtenidos mediante digestión con Zimoliasa (Casanova *et al.*, 1991).

Estos resultados coinciden en gran parte con los obtenidos en la extracción de componentes de la superficie celular de cada una de las cepas procedentes de aislados clínicos crecidas en forma de blastosporas y blastosporas germinadas.

El interés que implica la detección de antígenos específicos de las células miceliales es grande, por la utilidad potencial que dichas observaciones pueden tener en el diseño de métodos específicos para el diagnóstico y seguimiento de las infecciones producidas por *C. albicans*, especialmente en las formas diseminadas o invasivas (Pontón *et al.*, 1990).

1.6.3.2. Manano de pared celular

Entre los antígenos que circulan durante la infección con *C. albicans* se encuentran los carbohidratos superficiales de la pared celular, que constituyen una familia de heteromananos. Las manoproteínas de la pared celular existen como complejos inmunes que se disocian antes de la detección de antígenos glucídicos y estos son estables y resistentes a la ebullición, pH ácido y tratamiento con proteasas. Además son lábiles al tratamiento con periodato y se unen a la Concanavalina A.

Utilizando antisueros adsorbidos con distintas cepas de *C. albicans* (Hasenclever *et al.*, 1961), se descubrieron mediante aglutinación dos serotipos que se denominaron A y B. Aunque la mayor parte de los antígenos son comunes, el serotipo B tiene uno o más antígenos que no están presentes en el serotipo A. La existencia de un tercer serotipo, el C, ha sido descrito por algunos autores (Tsuchiya *et al.*, 1974 y Muller *et al.*, 1969), pero se encuentra muy poco estudiado en la actualidad.

Diversos autores (Sunayama, 1970; Suzuki y Usuyama, 1971) han demostrado que las diferencias antigénicas entre los serotipos A y B se encuentran en los mananos, habiéndose sugerido que la longitud de las cadenas laterales y la extensión de los enlaces podrían ser los responsables de estas diferencias en la reactividad. Además, (Shibata *et al.*, 1986) se han comparado los mananos de la fase micelial y levaduriforme, observándose

que durante la filamentación se produce la supresión de una serie de enzimas relacionadas con la biosíntesis del manano, lo que da lugar a la formación de mananos que presentan una estructura menos compleja y de menor especificidad antigénica.

Históricamente el serotipo A ha sido considerado el predominante entre las cepas causantes de candidiasis y resultados entre 1961 y 1980 indican la prevalencia del 70-90%. Recientes estudios indican la prevalencia de la infección oral con cepas del serotipo B respecto al serotipo A en pacientes con S.I.D.A. Por ello, no se pueden establecer correlaciones definitivas entre los serotipos y el tipo de candidiasis.

Seguido de la disociación de los complejos inmunes mediante cualquiera de los tratamientos citados que preservan la estructura del manano, este puede ser detectado en suero por R.I.A, E.L.I.S.A o R.P.L.A. Estos métodos dependen de la disociación de los complejos inmunes en los especímenes clínicos, lo que hace difícil comparar curvas estándar de manano expresado en nanogramos por mililitro, complicando así la interpretación del test. (Reiss *et al.*, 1993).

Existen tres factores que complican la detección del manano en el suero: en primer lugar se observan con frecuencia cantidades cercanas al límite inferior de detección de la mayoría de las técnicas serológicas, lo que hace necesario el empleo de técnicas de E.L.I.S.A. o R.I.A. En segundo lugar gran parte del manano circulante está ligado a IgG específica, incluyendo en individuos inmunodeprimidos, y debe ser disociado de ella antes de que pueda detectarse el antígeno. En tercer lugar el manano a menudo es eliminado de la circulación muy poco después de su introducción (Hopwood *et al.*, 1987).

Por todo lo descrito anteriormente puede comprenderse la importancia de *C. albicans*, y especialmente de la pared celular, en el diagnóstico de la candidiasis. Se han realizado numerosos estudios de caracterización de dicha pared así como de los procesos de diferenciación celular en el paso de levadura a micelio (Casanova *et al.*, 1990).

I.6.3.3. Antígenos de membrana

Los componentes antigénicos de las membranas de *Candida* se encuentran poco estudiados y su utilización en el diagnóstico serológico de la candidiasis diseminada no parece muy interesante, ya que la reactividad de los pacientes con candidiasis es mayor contra antígenos citoplásmicos que contra antígenos de membrana (Walsh *et al.*, 1991).

I.6.3.4. Antígenos citoplásmicos.

Los extractos citoplásmicos pueden servir de marcadores para la detección de candidiasis invasiva.

En la mayor parte de los trabajos (Pontón *et al.*, 1990) dichos antígenos son obtenidos por rotura mecánica de la célula levaduriforme tras eliminar los restos insolubles por centrifugación. Debido a ello, algunos de los antígenos encontrados pueden no pertenecer al citoplasma, y como los contaminantes provienen fundamentalmente de la pared celular, la obtención de protoplastos ha permitido obtener extractos citoplásmicos libres de antígenos de pared. Entre estos antígenos y debido a su fácil solubilización, el manano suele ser el contaminante mayoritario, habiéndose recurrido a su eliminación mediante el empleo de cromatografía de afinidad utilizando concanavalina A.

Se han descrito muchos antígenos citoplásmicos, aunque solo unos pocos son de interés diagnóstico (Mohart *et al.*, 1994) y la mayoría permanecen sin asociar a componen-

tes específicos del hongo (Nelson *et al.*, 1991).

En la actualidad dos de ellos son descritos como antígenos inmunodominantes, una proteína de 48 kDa de actividad enolasa y otra de 90 kDa que es un producto de degradación de una proteína "heat shock" (Walsh *et al.*, 1991). La Enolasa es un enzima de la ruta glicolítica producida por todas las especies de *Candida*. Esta enzima se encuentra presente en muchos pacientes de cáncer con candidiasis diseminada. Su detección requiere múltiples muestras de suero y aunque es un buen marcador de invasión profunda incluso en los casos de fungemia indetectable, no hay una previsión para la disociación de complejos inmunes solubles que contengan enolasa, lo que puede sesgar la sensibilidad del test. (Reiss *et al.*, 1993).

Además destacan otros antígenos con actividades enzimáticas, tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa, induciéndose una respuesta de anticuerpos contra esta última durante la infección (Pontón *et al.*, 1990).

Aunque el interés diagnóstico de la detección del antígeno principal del citoplasma puede verse limitado por algunos problemas, su determinación podría tener interés pronóstico ya que se ha observado (Matthews *et al.*, 1988) que los pacientes que no sobreviven a la infección por *Candida* no presentan anticuerpos contra este antígeno o disminuye su título durante la infección, mientras que el título aumenta en los pacientes que se recuperan de la infección. Estos anticuerpos podrían además proteger a los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica o con S.I.D.A de las infecciones diseminadas por *Candida*.

La detección de estos antígenos mediante pruebas de aglutinación de partículas de látex poliestireno (Lemieux *et al.*, 1990 y Herent

et al., 1992) presenta la ventaja de su rapidez y facilidad de realización. Sin embargo, la interpretación de la prueba puede ser difícil ya que no existe un título de antígeno que permita discriminar claramente a los individuos con infección sistémica por *Candida* (Matthews *et al.*, 1988).

Además se han descrito numerosos casos en los que la detección de antígeno falla irremediablemente en el diagnóstico de la candidemia (Phillips *et al.*, 1990 y Ruchel *et al.*, 1989).

I.6.4. Detección de anticuerpos anti-*Candida*

La mayor parte de los pacientes con candidiasis sistémica producen anticuerpos precipitantes frente a extractos antigénicos citoplásmicos y de superficie. La detección de anticuerpos contra este antígeno es más específica que la detección de anticuerpos anti-manano y su cuantificación demostró que los títulos de anticuerpos eran superiores en pacientes con candidiasis diseminada que en pacientes con candidiasis superficial, infecciones bacterianas o personas sanas (Au-Joung *et al.*, 1985).

Puede considerarse que para la detección de anticuerpos la técnica más ampliamente utilizada es el inmunoensayo enzimático (E.L.I.S.A.), debido a su sensibilidad y especificidad (Zoller *et al.*, 1991), aunque no se descartan otros como el inmunoblot (Ishiguro *et al.*, 1992) o la aglutinación con bolas de látex poliestireno (Baley *et al.*, 1985; Fung *et al.*, 1986; Gentry *et al.*, 1983).

En todas ellas cuando se han realizado estudios que incluyen tanto pacientes hospitalizados con y sin candidiasis, como controles sanos, la mayoría de ellos han mostrado una especificidad variable y ha sido prácticamente imposible determinar un título de anticuerpos

que sea indicativo de la infección por *C. albicans*, por lo que para cada tipo de ensayo habrá que establecer un punto de corte que discrimine entre pacientes sanos y enfermos. La detección de anticuerpos anti-micelio puede ser de utilidad en el diagnóstico y seguimiento de la infección por *C. albicans* (Regulez *et al.*, 1992).

Con todo lo expuesto anteriormente queda claro que ninguna técnica descrita hasta el momento es lo suficientemente sensible y precisa como para emplearla aislada del resto y que constituya una prueba fidedigna.

Sería muy útil disponer de una prueba sensible y específica para diagnosticar candidiasis invasiva en pocos minutos tras la evaluación de los pacientes. El mejor criterio para analizar la utilidad de una prueba si el tratamiento se inicia al obtener una prueba positiva y se suspende cuando la prueba es negativa. Hasta que se desarrollen técnicas que cumplan este criterio, debemos trabajar lo mejor posible con las que tenemos actualmente; en el caso de la candidiasis invasiva, las pruebas pueden que no sean tan deficientes como se refiere habitualmente.

I.7. Objeto y justificación del trabajo

Los estudios que se describen en esta Memoria están incluidos dentro de una línea de investigación que nuestro grupo viene desarrollando en los últimos años sobre la caracterización de componentes de la superficie (pared) celular en *C. albicans*, con posible papel en la virulencia (receptores para ligandos de los tejidos animales) y que pudieran tener una utilidad potencial como marcadores antigenicos específicos para el diagnóstico de las candidiasis.

En consecuencia, y teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos comentados previamente, los objetivos planteados en el presente trabajo fueron los siguientes:

1) Caracterizar tanto a nivel bioquímico (aislamiento, purificación, obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos) como funcional (clonación de los genes correspondientes) componentes proteicos y glicoproteicos presentes en la superficie celular de *C. albicans* que pudieran modular la interacción de las células fúngicas con ligandos de la matriz extracelular de los tejidos animales, centrándose específicamente en la laminina.

2) Llevar a cabo un estudio comparativo de la composición antigénica asociada a la pared celular tanto en una cepa de referencia como en diferentes cepas de *C. albicans* de origen clínico creciendo a 28°C y 37°C, con objeto de definir marcadores antigénicos que se expresen de forma generalizada.

3) Analizar la respuesta del sistema inmune frente a los antígenos presentes en la pared celular del hongo, bajo diferentes enfoques. Por un lado se procedería a detectar anticuerpos (IgG) específicos en individuos con candidiasis diagnosticada mediante criterios microbiológicos clásicos, y por otro se intentaría poner de manifiesto la presencia de dichas moléculas como antígenos circulantes, utilizando con esta finalidad anticuerpos previamente obtenidos frente a las mismas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Microorganismos

En el presente estudio se ha utilizado como cepa de referencia un aislamiento de *C. albicans* procedente de la American Type Culture Collection (ATCC 26555, serotipo A). Otras cepas de origen clínico también examinadas fueron aisladas de diferentes localizaciones y muestras patológicas de individuos afectados de candidiasis. La relación de estas cepas se muestra en la Tabla II.1. Todos los aislamientos de *C. albicans* se conservaron a -70°C previa resuspensión en glicerol, en el caso de almacenamiento prolongado.

TABLA II.1. Relación de las cepas de *C. albicans* analizadas. El número de orden indicado ha sido utilizado consistentemente en experimentos subsiguientes con objeto de facilitar la identificación de la cepa correspondiente.

Nº de orden	Nº de identificación	Aislada a partir de
1	ATCC26555	CM
2	105688	Sangre
3	104851	Orina
4	104682	Sangre
5	36985	Orina
6	032878	Heces
7	105671	Sangre
8	24248	Sangre
9	104011	EG
10	30259	Heces
11	105719	Espudo
12	24249	Orina
13	32714	ET
14	32216	Jugo gástrico
15	105805	Sangre
16	24250	Sangre
17	106203	Espudo
18	106199	Espudo

CM: candidiasis mucocutánea, EG: exudado glandular, ET: exudado traqueal.

Para la obtención y purificación de plásmidos se empleó la cepa de *Escherichia coli* JM109 que posee una elevada eficiencia de transformación. Como cepa hospedadora de

los clones recombinantes del bacteriófago λ gt11 se empleó la cepa Y1090 de *E. coli*, mientras que para la obtención de lisógenos se empleó la cepa Y1089 de *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1990).

II.2. Vectores plasmídicos

La subclonación se llevó a cabo en el plásmido comercial pGEM-T (Promega). Este vector es apropiado para el clonaje de productos de PCR ya que posee en sus extremos 3' terminales una timina adicional. Esto incrementa notablemente la eficiencia de la ligación del producto de PCR al vector plasmídico, puesto que los "brazos" de T ligan con los extremos cohesivos del producto de PCR que poseen una desoxiadenosina, adicionada por la polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) en cada extremo 3'.

El vector pGEM-T contiene el promotor de las ARNpolimerasas de T7 y SP6 flanqueando un sitio de clonaje múltiple, dentro de la región codificadora para un α -péptido de la β -galactosidasa. Así la inactivación insercional del α -péptido permite la identificación de los clones recombinantes mediante un rastreo de color en placas. Además la región de clonaje múltiple es única y contiene sitios de restricción *Pst*I, *Sal*I y *Apa*I, entre otros.

II.3. Sueros de pacientes

Los sueros de los pacientes aquejados de candidiasis así como de otros grupos de población fueron suministrados por el Hospital Clínico Universitario de Valencia y el Instituto Valenciano de Oncología.

Los sueros se agruparon en 4 grupos en función de su procedencia: el grupo A que incluía las muestras de pacientes heroinómanos con lesiones cutáneas candidiásicas y pacientes que se encontraban severamente inmunodeprimidos con candidiasis diseminada, todos

ellos con hemocultivos positivos, el grupo B constituido por los sueros procedentes de pacientes con candidiasis superficial, el grupo C formado por las muestras obtenidas de individuos sanos que no poseían riesgo de desarrollar una infección invasiva y el grupo D en el que se agruparon los sueros de pacientes neutropénicos con alto riesgo de contraer una candidiasis pero con diagnóstico microbiológico (hemocultivo) negativo. El número de sueros incluido en cada grupo varió para los distintos bloques de experiencias; una información más detallada se incluye en los apartados correspondientes del capítulo de Resultados y Discusión.

Los pacientes fueron diagnosticados de candidiasis sistémica cuando se cumplía al menos uno de los siguientes criterios:

(a) Aislamiento repetido de *C. albicans* a partir de sangre (al menos 3 hemocultivos positivos).

(b) Aislamiento o visualización del hongo en muestras histopatológicas obtenidas por autopsia (necropsia) o biopsia.

II.4. Medios de cultivo utilizados

Las cepas de *C. albicans* se propagaron en el medio descrito por Lee *et al.* (1975), cuya composición en gramos por litro se describe a continuación: K_2HPO_4 (anhidro), 2,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; $(NH_4)_2SO_4$, 5 g; NaCl, 5 g; glucosa, 12,5 g; prolina, 0,5 g; biotina, 0,001 g. Una vez disueltos los diferentes componentes el pH final del medio se ajustó a un valor de 6,8.

La incubación se llevó a cabo en condiciones adecuadas para inducir el crecimiento en fase de levadura (blastoconidios) o la emisión de tubos germinativos o hifas (fase de micelio) según se describe en el próximo apartado. Durante la realización de experimentos y con objeto de disponer de los correspondientes aislamientos fisiológicamente activos, estos se

mantuvieron mediante resiembras periódicas en agar Sabouraud-dextrosa (BBL), con un pH final de 5,7.

Para algunos experimentos, las cepas de *C. albicans* se cultivaron en YPD, cuya composición en gramos por litro es la siguiente: extracto de levadura 1%, glucosa 2%, peptona 2%; pH 6,8.

El cultivo y el mantenimiento de las cepas Y1090 e Y1089 de *E. coli*, se realizó en medio LB líquido cuya composición en gramos por litro es: tripticasa-peptona, 10 g, extracto de levadura, 5 g, NaCl, 10 g; pH 7,2, o sólido mediante la adición de agar al 2%.

El mantenimiento de la cepa JM109 de *E. coli*, se realizó en placa de medio M-9. La composición en gramos por litro es: Na_2HPO_4 , 6 g, KH_2PO_4 , 3 g, NaCl, 0,5 g, NH_4Cl 1 g, agarosa, 15 g; pH 7,4. La mezcla se esterilizó en autoclave, se enfrió a 50°C y por cada litro se añadieron 2 ml de $MgSO_4$, 1M, 0,1 ml de $CaCl_2$, 1M, 10 ml de glucosa al 20% y 1 ml de tiamina-HCl, 1M. Este último compuesto selecciona la presencia del episoma F', necesaria para la producción de ADN de simple cadena (ADNs) y para la selección de color en dicha cepa. El cultivo en líquido se realizó en LB.

II.5. Condiciones de cultivo

Para obtener cultivos de células de *C. albicans* en fase levaduriforme, a partir de un cultivo de medio sólido de 12-18 h en agar Sabouraud-dextrosa (BBL), se inocularon aproximadamente 10 μg de células (peso seco) por ml de medio en matraces Erlenmeyer conteniendo medio de Lee (aproximadamente 1/3 del volumen total del matraz). A continuación los recipientes se incubaron a 28°C con agitación (200 r.p.m.) en incubadores orbitales (New Brunswick o Infors AG).

Relacionando la densidad óptica a 600 nm

en un espectrofotómetro Simadzu UV-160 con el peso seco de las células por ml de cultivo a partir de una curva patrón peso seco/densidad óptica previamente establecida, se valoró el crecimiento celular de estos cultivos, cuya fase exponencial se alcanzó a las 12-14 horas de incubación a una DO_{600} de 0,6 unidades. Seguidamente, las células fueron recogidas por centrifugación (3.000xg 10 min), lavadas dos veces con agua destilada estéril, resuspendiéndose por último en agua destilada estéril a una concentración de 1 mg de células (peso seco) por ml. La suspensión de células fue incubada a 28°C durante 3 h con agitación (200 r.p.m.) y seguidamente se almacenó a 4°C durante 72-96 horas (período de reposo metabólico). Las blastosporas sometidas a reposo metabólico se utilizaron para obtener cultivos en fase exponencial, inoculándolas (200 µg de células [peso seco] por ml) en medio de Lee, e incubándolas a continuación con agitación a 28°C (para obtener células en fase levaduriforme), o a 37°C (para inducir la formación de micelio). El método utilizado para obtener cultivos de blastosporas o blastosporas germinadas (micelio) es el descrito por Casanova *et al.* (1989).

Por otro lado los cultivos de la cepa Y1090 de *E. coli* tanto en fase sólida como en líquida se obtuvieron por incubación del microorganismo a 37°C en medio LB hasta la fase exponencial de crecimiento.

En experimentos de infección, el crecimiento de *E. coli* Y1090 así como la obtención de calvas de lisis del bacteriófago λ gt11, se realizó en medio LB-maltosa-Mg (maltosa, 0,2 mM y $MgSO_4$, 10 mM) utilizado tanto en forma líquida como sólida (mediante la adición de agar al 2%).

El crecimiento de la cepa JM109 de *E. coli* a partir de colonias en medio M-9 para la obtención de células competentes, se realizó

mediante incubación a 30°C con agitación vigorosa (250 r.p.m.) en medio LB.

Para la selección de transformantes de *E. coli* JM109 que contenían plásmidos recombinantes se utilizaron placas de agar LB suplementado con ampicilina (LBamp), isopropil- β -D-tiogalactosidasa (IPTG; 0,5 M, concentración final) y 5-bromo-4-Cloro-3-indolil- β -D-Galactósido (X-Gal; 0,5 M concentración final). La ampicilina se disolvió en agua (50 mg/ml) y la solución se esterilizó por filtración. Un volumen adecuado de solución de ampicilina para obtener una concentración final de antibiótico de 1 µg/ml se adicionó seguidamente al medio base previamente esterilizado. En el caso del IPTG, el compuesto fue disuelto en agua destilada estéril (concentración final 100 mM) y de la solución obtenida se adicionaron asépticamente 100 µl por placa. Finalmente el X-Gal se disolvió al 2% en dimetilformamida y de la solución resultante se adicionaron en condiciones asépticas 50µl por cada placa. Los clones de *E. coli* transformados con los plásmidos de interés fueron cultivados y mantenidos en placas de agar LBamp.

II.6. Solubilización de componentes de la pared celular de ambas fases morfológicas (levadura y micelio) de *C. albicans*

Las células crecidas como blastosporas (levaduras) y blastosporas germinadas (micelio) como se ha descrito anteriormente, se recogieron por centrifugación (4.000xg, 10 min) y se lavaron con agua bidestilada estéril, resuspendiéndose seguidamente en un volumen de tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) conteniendo 2-mercaptoetanol (2-ME, 1% v/v) equivalente a 1/10 del volumen de los cultivos en medio líquido a partir de los cuales se habían cosechado las células. La suspensión celular resultante se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 min con agitación. A

continuación las células fueron sedimentadas por centrifugación (4.000xg, 10 min), y el sobrenadante resultante se dializó frente a agua destilada (5 litros, con 4 cambios durante 48 horas) y se concentró por liofilización (extracto de 2-ME). Las células tratadas con el agente reductor se lavaron 2 veces con una solución de KCl 0,6 M en agua bidestilada, resuspendiéndose seguidamente en esa misma solución conteniendo Zimoliasa (Zymoliasa 20T, 0,5 mg/ml), que es una preparación enzimática comercial con actividad β -glucanásica (Kitamura y Yamamoto, 1972; Kitamura *et al.*, 1974), incubándose la suspensión a 28°C con agitación hasta la obtención de protoplastos, lo que fue monitorizado mediante observación en un microscopio de contraste de fases. Los protoplastos se sedimentaron por centrifugación (4.000xg, 10 min) y el líquido sobrenadante se dializó según la pauta descrita anteriormente y se concentró por liofilización (extracto de Zimoliasa). Por otro lado, los protoplastos se lavaron 2 veces con KCl 0,6 M conteniendo fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) y se lisaron en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4), conteniendo CaCl_2 , 1 mM, MgCl_2 , 1 mM, PMSF, 3 mM, y n-octil-glucósido, 200 mM (éste último es un detergente que solubiliza proteínas transmembranales), mediante agitación vigorosa en un vórtex. El lisado resultante se centrifugó primero a baja velocidad (4.000xg, 5 min) para eliminar restos de paredes no digeridas, y a continuación a 40.000xg durante 30 min. El sedimento fue desechado y el sobrenadante resultante (lisado de protoplastos) fue analizado mediante las técnicas que se describirán a continuación junto con los extractos obtenidos mediante tratamiento con 2-ME y Zimoliasa. La metodología descrita fue diseñada con objeto de solubilizar la totalidad de componentes de la pared celular de ambas fases morfológicas de *C. albicans*, incluyendo po-

sibles proteínas de naturaleza transmembranal que pudieran poseer dominios asociados a la estructura de la pared celular (Casanova *et al.*, 1992a y b).

II.7. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína existente en las diferentes muestras se determinó mediante diversos procedimientos.

II.7.1. Método de Lowry *et al.* (1951)

Las muestras fueron tratadas con NaOH 1N a 28°C durante 12-14 h antes de proceder a efectuar la valoración de la concentración de proteína. Como referencia se utilizó una recta patrón confeccionada con cantidades crecientes (de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$) de albúmina de suero bovino (BSA). En general, se tomaron alícuotas de 5-10 μl de las diferentes muestras para llevar a cabo la determinación.

II.7.2. Método de Bradford *et al.* (1976)

La concentración de proteína se determinó mediante el reactivo azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad Laboratories Ltd). La muestra se hizo reaccionar con 5 ml de una solución 5 veces concentrada de azul de Coomassie en ácido fosfórico al 55%, metanol al 15% y se midió la absorción a 595 nm, refiriendo los valores frente a una recta patrón de BSA (0-100 $\mu\text{g/ml}$).

II.7.3. Lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 280 nm (A_{280})

El contenido en proteína se determinó también midiendo la absorbancia a 280 nm de la muestra problema, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. La densidad óptica se calculó mediante la ley de Lambert-Beer en la que la $DO (A_{280}) = \epsilon cl$, siendo ϵ el coeficiente de extinción, c la concentración y l la longitud de la cubeta.

II.7.4. Método del ácido bicinonídico (BCA) (Smith *et al.*, 1985)

La detección de proteína se realizó por la formación de un complejo coloreado intenso del reactivo BCA con cobre monovalente. El método, comercializado por Pierce, consiste en mezclar el reactivo BCA y la solución de SO_4Cu (a las concentraciones indicadas en el kit) en proporción 50:1 añadiendo seguidamente 20 volúmenes de dicha mezcla por cada volumen de muestra.

II.8. Determinación de carbohidratos totales

Los azúcares totales se determinaron utilizando el método de **Dubois *et al.* (1956)**. A 2 ml de la solución problema (que preferiblemente debe contener entre 10 y 80 μg totales de aldosa) se añadieron 50 μl de una solución de fenol al 80%. A continuación se adicionaron rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico al 95,5%. La mezcla se agitó, y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente, manteniéndose posteriormente a 25°C durante 20 minutos en un baño de agua. La intensidad del color desarrollado se midió frente a un blanco de reactivos a 490 nm. Con objeto de determinar cuantitativamente la concentración de azúcar en la muestra, se realizó una curva patrón con distintas cantidades de glucosa desde 10 hasta 120 μg y se valoraron de 5-10 μl de los diferentes extractos según el caso.

II.9. Electroforesis en geles de dodecil sulfato sódico (SDS)-poliacrilamida

Se utilizó el método de **Laemmli (1970)** de electroforesis vertical en placa de vidrio, con ligeras modificaciones (**Casanova *et al.*, 1989**). Las electroforesis se llevaron a cabo empleando una cubeta vertical Bio-Rad, y una fuente de alimentación LKB 2197. Se utilizaron geles separadores en gradiente lineal (5-15%) de acrilamida (con una relación acrilamida:bisacrilamida de 30:0,2) preparados en tampón Tris-HCl 0,37 M (pH 8,8),

conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,15%. El gel de empaquetamiento tenía una concentración de acrilamida del 3% (relación acrilamida:bisacrilamida 30: 0,2), y fue preparado en tampón Tris-HCl 0,25 M (pH 6,8), con SDS al 0,2%. Los pocillos formados en el gel empaquetador permitían colocar un volumen máximo de 100 μl de muestra.

En algunos casos se utilizaron geles de poliacrilamida lineales (10%) con geles de empaquetamiento al 6% con una composición cualitativa idéntica a la que se ha descrito unas líneas más arriba. En ciertos experimentos la muestra (hasta 2ml) se depositó en un único pocillo de gran tamaño construido en el gel de empaquetamiento. La solución solubilizadora de la muestra contenía, en todos los casos, 35% (v/v) de glicerol, 7% de SDS, 0,035% de azul de bromofenol, y 14% de 2-ME en tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8). Esta solución se añadió de modo que la relación muestra:solución solubilizadora fuese de 2:1 (v/v). A continuación se hirvieron las diferentes mezclas de muestra problema:solución solubilizadora durante 5 minutos, y seguidamente se aplicaron las mismas en los pocillos formados en el gel empaquetador. En paralelo se corrieron estándares de proteínas de alto peso molecular comprendidos entre 200 y 18,5 kDa. La posición relativa de las bandas correspondientes a estas proteínas de peso molecular conocido se utilizó para construir un gráfico de movilidad relativa en función del peso molecular, que se utilizó para determinar los tamaños de los polipéptidos desconocidos. El tampón del ánodo y del cátodo fue Tris-glicina (25 mM/192 mM respectivamente) a pH 8,3, con SDS al 0,1%. La carrera se realizó a corriente constante de 15 mA por placa a través del gel empaquetador, y 30 mA a través del gel separador, interrumpiéndose la misma cuando el frente de azul de bromofenol llegó a 0,5 cm del

borde inferior del gel.

II.10. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida fueron teñidos durante 45 minutos con una solución de azul de Coomassie G-250 al 0,2% en una mezcla de alcohol isopropílico:ácido acético:agua destilada (25:10:65 en volumen), a temperatura ambiente y con agitación suave y continua. La eliminación del colorante de las áreas del gel no correspondientes a bandas proteicas, se realizó mediante lavados sucesivos en una mezcla de alcohol isopropílico:ácido acético:agua destilada (en la proporción 10:10:80 en volumen).

Los geles fueron fotografiados con película Copex-Rapid Agfa, utilizando una cámara Nikon con filtro naranja, a una velocidad de 1/4 de segundo y con aperturas de diafragma de 8, 11 y 16 según los casos.

Seguidamente los geles fueron secados por aplicación de calor bajo vacío, sobre láminas de papel Whatman MM3, en un secador de geles Bio-Rad 583, utilizando un programa de secado para geles en gradiente, en el cual, la temperatura va subiendo a razón de 1°C por minuto hasta alcanzar la temperatura deseada (80°C), temperatura que se mantiene ya constante hasta cumplirse el tiempo fijado (3 h).

II.11. Transferencia de los polipéptidos separados electroforéticamente en los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (Western blotting)

II.11.1. Método de Burnette

La transferencia se llevó a cabo por el método de Burnette (1981), con algunas modificaciones (Casanova et al., 1989). Una vez completada la separación electroforética de los polipéptidos presentes en las diferentes muestras, los geles de poliacrilamida junto con las hojas de papel de nitrocelulosa

(Schleicher & Schüell) sobre las que se iba a efectuar la transferencia, se equilibraron separadamente por inmersión durante 30 min en tampón de transferencia, que es una solución 25 mM de Tris/192 mM de glicina (pH 8,3), conteniendo un 20% (en volumen) de metanol. Finalizado el tiempo de equilibrado, se pusieron en contacto los geles con las hojas de nitrocelulosa en una cubeta de transferencia (Bio-Rad), en presencia de tampón de transferencia como electrolito, aplicándose una corriente de 200 mA, durante 17-18 horas a 4°C, para producir la transferencia de los polipéptidos desde el gel de poliacrilamida hacia la hoja de papel de nitrocelulosa.

II.11.2. Método semi-seco (Semi-dry)

El método de transferencia semi-seco se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando un sistema electroforético Multiphor II (Pharmacia) con un tampón de transferencia cuya composición en gramos por litro es: 2,93 g de glicina, 5,81 g de Tris base, 0,375 g de SDS y 200 ml de metanol. La transferencia se realizó aplicando un amperaje de 0,8 mA/cm² durante 1h.

II.12. Tinción de proteínas en los soportes de nitrocelulosa

Las especies proteicas transferidas a las membranas de nitrocelulosa fueron visualizadas mediante tinción con una solución del colorante Ponceau S al 0,2% en ácido tricloroacético al 3%. Las membranas se sumergieron en esta solución durante tiempos que oscilaron entre 15 y 30 minutos, tras lo cual, y después de la visualización de las bandas, la totalidad del colorante se eliminó mediante lavados sucesivos con agua bidestilada, con objeto de aplicar otros procedimientos de detección específicos de los distintos polipéptidos presentes sobre las hojas de papel de nitrocelulosa.

II.13. Detección de glicoproteínas en los

soportes de nitrocelulosa, mediante tinción con la lectina Concanavalina A (Con A)

Se siguió el método empleado por Hawkes (1982) con las modificaciones descritas por Millette y Scott (1984). Una vez efectuada la transferencia, el papel de nitrocelulosa se incubó durante 1 h a 37°C en una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,2), con NaCl al 0,9% (solución de bloqueo). Seguidamente, la hoja se transfirió a solución de bloqueo fresca conteniendo la lectina (10 µg/ml), manteniéndose en estas condiciones durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave. A continuación se eliminó el exceso de Con A no ligada, mediante tres lavados de 5 minutos cada uno con una solución de NaCl al 0,9% en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) (tampón TBS). El siguiente paso consistió en sumergir la hoja de nitrocelulosa en solución de bloqueo con peroxidasa (10 µg/ml) manteniéndola durante 30 minutos en esta solución, con agitación suave a temperatura ambiente, para permitir el acoplamiento de la peroxidasa a las moléculas de Con A, que se hubieran unido previamente a las glicoproteínas transferidas, susceptibles de ser reconocidas por la lectina. Después de lavar tres veces el papel de nitrocelulosa, al igual que se hacía tras la incubación con Con A, la unión de la lectina a las glicoproteínas se visualizó mediante la aplicación de una mezcla de 60 mg de 4-cloro-1-naftol y 60 µl de agua oxigenada (de 30 volúmenes) en 100 ml de tampón TBS. El 4-cloro-1-naftol es totalmente insoluble en agua, por lo que previamente a su incorporación a la mezcla de revelado, se solubilizaba en 20 ml de metanol frío. El desarrollo de la reacción coloreada que tiene lugar se detuvo al alcanzarse la intensidad adecuada, mediante lavados con agua bidestilada.

II.14. Ensayo para la caracterización de

la unión de fibrinógeno y laminina a componentes proteicos y/o glicoproteicos de la superficie (pared) celular de *C. albicans*

Con objeto de detectar especies presentes en la superficie celular de las células del hongo que pudieran ser responsables de la interacción específica de éstas con componentes del plasma (fibrinógeno) o de la membrana basal (laminina), se llevó a cabo el siguiente ensayo. Los extractos celulares obtenidos mediante solubilización con 2-ME (ver apartado II.6), se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida como se describió anteriormente. Las especies proteicas separadas electroforéticamente fueron seguidamente transferidas a papel de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa se incubó a continuación durante 30 min a 37°C y otros 30 min a temperatura ambiente con agitación en tampón TBS conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) al 3%. Seguidamente la hoja se sumergió en 50 ml de tampón PBS (tampón fosfato 10 mM, pH 7,4, NaCl, 0,9%) conteniendo CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, 1% de leche en polvo descremada, 0,05% de Tween-20 y 15 mg de fibrinógeno de origen humano básicamente libre de plasminógeno (Sigma), incubándose a temperatura ambiente durante 10-12 horas con agitación. Finalizada ésta, se realizaron 4 lavados de 10 min con tampón TTBS (TBS conteniendo 0,05% de Tween-20; en el segundo lavado se aumentó la concentración de NaCl en la solución tampón hasta 1 M). Seguidamente la hoja de nitrocelulosa se incubó en una solución de anticuerpo anti-fibrinógeno acoplado a peroxidasa diluido 1:500 en tampón TTBS conteniendo BSA al 1% (tampón TTBSB) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, tras lo cual la membrana se lavó siguiendo la misma pauta y condiciones que se han descrito anteriormente. Por último, se procedió a visualizar la reacción entre el anticuerpo anti-fibrinógeno y el fibrinógeno que previamente

podiera haber interactuado con alguna de las especies proteicas o manoproteicas presentes en los diferentes extractos obtenidos de las células levaduriformes y miceliales de *C. albicans*, utilizando para ello peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol como agente cromogénico.

Para determinar la interacción de laminina a componentes proteicos y/o glicoproteicos de la pared del hongo, la hoja de nitrocelulosa con los polipéptidos transferidos se incubó inicialmente en tampón TBS conteniendo 3% de BSA durante 2h a 37°C, lavándose seguidamente una vez con tampón TTBS. A continuación el papel de nitrocelulosa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en una solución de laminina (Sigma; 50 µg/ml) en tampón PBS suplementado con BSA al 1%, CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 1 mM, tras lo cual se lavó 4 veces en tampón TTBS (en el segundo lavado la concentración de NaCl en el tampón se aumentó hasta 1 M). La fase siguiente consistió en la incubación del papel de nitrocelulosa con los polipéptidos transferidos en una solución de anticuerpos de conejo anti-laminina (dilución 1:500) (Sigma) en tampón TTBSB, durante un período de 3 h a temperatura ambiente; finalizada esta incubación, la hoja fue lavada nuevamente con la misma pauta que se describió en el párrafo anterior. A continuación, el papel se sumergió en una solución de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo acoplados a peroxidasa (Bio-Rad) diluidos 1:2.000 en tampón TTBSB, incubándose la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la hoja de nitrocelulosa se lavó nuevamente 4 veces en tampón TTBS, procediéndose al revelado de las posibles interacciones del ligando con peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol como agente cromogénico.

II.15. Inmunodetección de polipéptidos

transferidos a membranas de nitrocelulosa (inmunotransferencia)

Se ha seguido la técnica descrita en el manual de la firma Bio-Rad (Bio-Rad Immun-Blot Assay Kit), que está basada en el procedimiento descrito por Towbin *et al.* (1979) y Burnette (1981).

El método utilizado es semejante al descrito anteriormente para la detección de glicoproteínas con Con A. Tras mantener la hoja de papel de nitrocelulosa con los polipéptidos transferidos en solución de bloqueo, la misma se incubó en diluciones apropiadas de los antisueros procedentes de las distintas categorías de pacientes hospitalizados o aquellos obtenidos a partir de conejos inmunizados con diferentes tipos de componentes proteicos y/o glicoproteicos de la pared celular de *C. albicans* (Harlow *et al.*, 1988; Casanova *et al.*, 1992b) en tampón TTBSB. A continuación se procedió a efectuar 4 lavados de 10 minutos cada uno con tampón TTBS (en el segundo de los lavados la concentración de NaCl en la solución tampón se incrementó hasta un valor de 1 M). Seguidamente se incubó el papel en una solución de anticuerpos de ratón anti-inmunoglobulina humana o anti-inmunoglobulinas de conejo, ambos acoplados a peroxidasa (Bio-Rad), utilizándose una dilución 1:3.000 de estos anticuerpos marcadores en la misma solución tampón que se utilizó para diluir los correspondientes anticuerpos específicos utilizados en primer lugar. Tras eliminar el exceso del segundo reactivo no unido mediante 4 lavados sucesivos, la unión de los anticuerpos a sus correspondientes antígenos se reveló utilizando el mismo método descrito en el caso de la tinción de manoproteínas con Con A acoplada a peroxidasa (ver apartado II.13).

II.16. Tratamientos enzimáticos y químicos

II.16.1. Tratamiento con endo-β-N-

acetil-glucosaminidasa H (Endo H)

La fracción carbohidrato unida por enlaces N-glicosídicos de las glico(mano)proteínas solubilizadas de la pared celular de *C. albicans*, fue selectivamente eliminada mediante digestión con Endo H (Casanova *et al.*, 1987). El extracto de 2-ME de blastosporas y blastosporas germinadas fue tratado con Endo H (Boehringer) durante 48 h con agitación (0,01 unidades de enzima por 400 µg de material expresado como contenido de azúcar total) resuspendido en 100 µl de tampón citrato sódico 0,15 M, pH 5,5 conteniendo PMSF 1 mM, pepstatina A, 10 µM y azida sódica 5 mM. La muestra se incubó durante 48 h a 28°C con agitación.

II.16.2. β-eliminación alcalina

La eliminación de azúcares de las glicoproteínas unidos O-glicosídicamente (Elorza *et al.*, 1988) se llevó a cabo mediante tratamiento de los extractos de 2-ME con NaOH 0,1 M en presencia de NaBH₄ 0,4 M durante 18-20 h a 0°C. El tratamiento se detuvo mediante neutralización con ácido acético 0,5 M, tras lo cual las muestras se dializaron exhaustivamente y concentraron por liofilización. En algunos casos las muestras (los extractos de 2-ME) se sometieron a un doble tratamiento desglicosilante, primero con Endo H seguido de hidrólisis alcalina (β-eliminación) en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente.

II.16.3. Tratamiento con colagenasa

Las incubaciones se realizaron en un volumen total de 60 µl. Se incubaron 50 µl de los extractos de 2-ME con 10 µl de una mezcla seis veces concentrada de inhibidores proteolíticos y colagenasa según el caso, de tal forma que la concentración final en el ensayo fuera la siguiente: N-etilmaleimida, 5 mM; benzamidina, 4 mM; ácido ε-aminocaproico, 25 mM; azida sódica, 0,05 mM; PMSF, 1 mM; HEPES, 50 mM. Las mezclas se incuba-

ron 21 h a 37°C en un baño termostático. Se empleó EDTA 1 mM como inhibidor de la colagenasa en el control negativo y se añadió CaCl₂ 1mM (concentración final) en todas las incubaciones con la enzima. La colagenasa (CPLSA) (327 U/mg) fue suministrada por Worthington biochemical corporation y se ensayaron 17,5 µg de enzima por cada 500 µg de muestra (expresada como contenido total de azúcar).

II.17. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

En algunos experimentos se siguió el método descrito por Sundstrom y Kenny (1984). Una vez cosechados los microorganismos de las distintas cepas se lavaron dos veces con tampón PBS, ajustándose la concentración de células a un valor de 10⁶ células por ml por conteo microscópico. A continuación se centrifugó 1 ml de cada suspensión y el sedimento obtenido se resuspendió en 150 µl de tampón PBS 10 mM, pH 7,4 conteniendo un 1% de BSA (PBSB). Seguidamente se añadió el anticuerpo a una dilución final de 1:10 en tampón PBSB. Las diferentes suspensiones incubaron a 37°C en una cámara húmeda durante 60 min, lavándose a continuación 4 veces por centrifugación con tampón PBS. Posteriormente se añadió a cada tubo 150 µl de IgG de cabra anti-conejo acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución 1:10 en PBSB incubando de nuevo 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Por último se realizaron 3 lavados más con tampón PBS y después de centrifugar por última vez, las células se resuspendieron en tampón PBS y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su observación al microscopio óptico por la técnica de la cámara húmeda utilizando un Fotomicroscopio III de Zeiss, equipado con sistema de contraste de fases y de epifluorescencia.

En algunos casos, las extensiones de células para ser examinadas mediante inmunofluo-

rescencia, se prepararon en una centrifuga Cytospin 2 (Shandon) a 1.000 r.p.m. durante 10 min. Tras la centrifugación, las células se fijaron con acetona fría durante 5 min y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo específico diluido en tampón PBS. Tras varios lavados con PBS, las extensiones se hicieron reaccionar con IgG de cerdo anti-conejo conjugada con FITC (Dako). Tras el lavado final y una vez secas, las preparaciones se examinaron y fotografieron en este caso con un Fotomicroscopio Leitz Labolux II.

II.18. Adsorción de sueros a bolas de latex-poliestireno

Con objeto de eliminar la fracción de inmunoglobulinas dirigidas contra manano (la parte carbohidrato de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans*) que pudieran estar eventualmente presentes en los diferentes sueros utilizados en el presente estudio, los antisueros crudos fueron sometidos a un proceso de adsorción a microesferas de látex recubiertas con manano purificado según el método descrito por Peat *et al.* (1961). Las microesferas de látex ($0,801 \pm 0,036 \mu\text{m}$ de diámetro) se recubrieron con manano mezclando (en proporción 1:1 vol/vol) una suspensión comercial de microesferas de látex (10% en peso de contenido en microesferas) con una solución de manano (1 mg/ml) en tampón glicina-NaCl, 100 mM, pH 8,2 (tampón GS). La mezcla se incubó durante 2 h a 35°C y seguidamente se adicionaron 2 volúmenes de tampón GS conteniendo 0,1% de BSA. La suspensión de partículas de látex recubiertas con manano se mezcló seguidamente (1:1, vol/vol) con el suero problema previamente diluido (1:25) en tampón PBS y se incubó durante 2h a 37°C para adsorber los anticuerpos específicamente dirigidos hacia el manano de *Candida*. La mezcla se centrifugó por último desechándose las partículas de látex y reser-

vando el sobrenadante (el suero adsorbido). Los antisueros adsorbidos así obtenidos se utilizaron en los ensayos de E.L.I.S.A. e inmunotransferencia convenientemente diluidos en los tampones adecuados en cada caso.

II.19. Adsorción de antígenos a bolas de látex-poliestireno

El tapizado de las bolas de látex-poliestireno se realizó en este caso con el extracto de 2-ME. 1 ml de dicho extracto (conteniendo 5 mg de material expresado como azúcar total) fue incubado con 5 ml de una suspensión de bolas de látex (10 % en peso de contenido en microesferas) en tampón glicina-NaOH, 100 mM, pH 8,4 (tampón GB) durante 5 horas a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a 4°C durante la noche. La suspensión se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 5 min y el sedimento obtenido se resuspendió en 5 ml de tampón GBS (tampón GB más NaCl 150 mM). La mezcla se homogeneizó y se distribuyó en alícuotas de 1 ml. Para los ensayos de aglutinación se mezclaron 20 μl de suero problema con 20 μl de la suspensión de partículas de látex tapizadas con el extracto de 2-ME (antígeno-látex) diluida 1:4 en tampón GB, observándose la aparición e intensidad de la reacción de aglutinación. La reactividad de los sueros frente a los antígenos de pared fue ensayada a varias concentraciones correspondientes a diluciones seriadas de los mismos. En algunos casos se llevó a cabo un tratamiento térmico de los sueros a 56°C durante 30 min para eliminar falsos positivos debidos a aglutininas inespecíficas. El distinto grado o intensidad de la reacción de aglutinación se expresó como (+++) para el caso de aglutinación fuerte, (++) para indicar aglutinación media, (+) para aglutinación débil y (-) en caso de no apreciarse aglutinación.

II.20. Métodos de marcaje de anticuerpos

II.20.1. Marcaje con peroxidasa

La solución de la peroxidasa utilizada para el marcaje de anticuerpos se preparó resuspendiendo 5 mg de peroxidasa (Sigma) en 1,2 ml de agua bidestilada. A continuación se añadieron 0,3 ml de NaIO₄ 0,1 M en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y la solución de peroxidasa se dializó frente a acetato sódico 1 mM, pH 4 a 4°C durante 16 h. Seguidamente se añadió 0,5 ml de una solución de inmunoglobulinas (10 mg/ml; concentración calculada relacionando la A₂₈₀ con un coeficiente de extinción de 0,9 para el caso de las inmunoglobulinas) a la mezcla de reacción ya dializada y se incubó 2 h a temperatura ambiente. Una vez marcadas las inmunoglobulinas se neutralizó la mezcla de reacción añadiendo 0,1 ml de NaBH₄ (4 mg/ml en agua destilada) e incubando 2 h a 4°C. Finalmente la solución conteniendo los anticuerpos marcados con peroxidasa se dializó frente a PBS con 4 cambios de 5 horas cada uno.

II.20.2. Etiquetado con biotina

Para el marcaje de anticuerpos con biotina se preparó una solución de N-hidroxisuccinimida-biotina (NHS-biotina) en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mg/ml. Dicha solución se mezcló con una dilución de anticuerpos en tampón fosfato 10 mM, pH 8,8 conteniendo 1-3 mg de inmunoglobulinas por ml determinadas mediante la medida de la A₂₈₀ con una relación de 250 µg de biotina por mg de inmunoglobulinas. La mezcla se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 20 µl de NH₄Cl 1M por cada 250 µg de NHS-biotina y se incubó 10 min a temperatura ambiente. La solución de anticuerpos marcados se dializó exhaustivamente frente a tampón PBS.

II.21. E.L.I.S.A. (ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzimas)

Las concentraciones óptimas de antígeno, suero y segundo anticuerpo fueron determinadas previamente mediante valoraciones control con sueros controles positivos y negativos para determinar el rango óptimo de concentraciones para los diferentes reactivos. Los pocillos de placas poliestireno Nunc-Immuplate (A/S Nunc) se tapizaron durante 12-14 h a 4°C con 1 µg (expresado como concentración de proteína total) de los diferentes extractos antigénicos (2-ME, Zimoliasa y lisado de protoplastos) en 100 µl de tampón de tapizado (CO₃Na₂ 0,05 M, pH 9,6) por pocillo.

Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, pH 7,4 conteniendo 0,1% de Tween 20; PBST) y después se rellenaron con tampón de bloqueo (tampón PBS conteniendo 3% BSA) durante 2 h a 37°C. A continuación las placas se lavaron con tampón de lavado. Los sueros de pacientes se diluyeron en tampón PBS conteniendo 0,05% de Tween 20 y 0,1% de BSA, a la dilución que se especifica en cada bloque de resultados.

Los sueros diluidos se añadieron a series dobles de pocillos, incubándose seguidamente las placas durante 1 h a 37°C. Los pocillos se lavaron de nuevo 4 veces con tampón PBST y se adicionó a cada uno de ellos 50 µl de una solución de PBSTB (PBST más 1% de BSA) conteniendo inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas humanas (dil 1:2.000). Los pocillos se volvieron a lavar con tampón PBST, adicionándose seguidamente a cada uno de ellos 100 µl del sustrato de la peroxidasa, tras lo cual la placa se incubó en la oscuridad durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl por pocillo de H₂SO₄ 3 M, determinándose por último la intensidad del color desarrollado a 492 nm en un microtitulador de E.L.I.S.A. de lectura automática (Titertek Multiskan Plus MKII).

La composición del sustrato de la peroxidasa utilizado fue: 12,2 ml de ácido cítrico, 0,1 M; 12,8 ml de Na₂HPO₄, 0,2 M; 25 ml de agua destilada; 20 mg de O-fenilendiamina y 20 µl de H₂O₂. El sustrato se preparó extemporáneamente, manteniéndolo almacenado en la oscuridad.

A partir de los valores de absorción a 492 nm hallados (DO₄₉₂) se procedió a determinar las unidades arbitrarias (UE) para los diferentes ensayos de E.L.I.S.A., utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$1 \text{ UE} = [(OD_x - OD_n) / (OD_c - OD_n)] \times 100$$

donde: OD_x es la media de los dos valores del suero problema, OD_n es la media de los dos valores del control negativo y OD_c es la media de los dos valores del control positivo comercial.

La línea de corte para cada ensayo de E.L.I.S.A. se determinó con la media de los valores hallados (expresados como UE) para 113 ensayos correspondientes a 67 muestras de individuos sanos y 46 pacientes con candidiasis superficial. Al valor obtenido se le sumó tres veces el valor de la desviación estándar.

Otra modalidad de ensayo utilizado fue el E.L.I.S.A.-captura, cuyo protocolo fue básicamente el descrito en el apartado anterior pero en este caso lo que se fijó en los pocillos de la placa de poliestireno fueron 50 µl de una solución de inmunoglobulinas específicas purificadas a partir del antisuero según se indica en el apartado II.22.2. (0,75 µg de material por pocillo expresado como contenido de proteína total) en tampón de tapizado e incubadas del mismo modo que en el E.L.I.S.A. estándar. Seguidamente se bloqueó con PBS conteniendo BSA al 3% durante 2 h a 37°C en cámara húmeda, y a continuación se añadieron a cada pocillo 50 µl de una solución de

antígeno en PBS. En el E.L.I.S.A. control se emplearon como antígenos una serie de diluciones decimales decrecientes de extracto de 2-ME. En el E.L.I.S.A. problema se emplearon como antígenos sueros de pacientes (dilución 1:10 en PBSTB) correspondientes tanto a pacientes con candidiasis sistémica probada (controles positivos) como a pacientes con candidiasis superficial o no diagnosticada (controles negativos). Transcurrida 1 h las placas se lavaron 3 veces con PBST y se añadieron 50 µl de las mismas inmunoglobulinas pero en este caso etiquetadas con peroxidasa o biotina, incubándose 1 h a 37°C. Después el procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente excepto en el caso de que las inmunoglobulinas estuvieran acopladas a biotina, en el que el revelado se llevó a cabo con un complejo de avidina-peroxidasa (Bio-Rad), a dilución 1:3.000 en PBST de forma similar a la descrita en el apartado anterior.

II.22. Métodos cromatográficos

II.22.1. Cromatografía de intercambio iónico

Para la separación de componentes anti-génicos de la superficie celular de *C. albicans* presentes en los extractos de 2-ME obtenido a partir de blastosporas germinadas, se empleó una columna de intercambio iónico de DEAE-Sepharosa (Memsep 1000, Millipore) equilibrada con Tris-HCl, 50 mM; pH 8 (TCl). Una vez aplicada la muestra se eluyó con un gradiente salino de NaCl cuya concentración fue aumentando del 0 (0 mM) al 30% (300 mM), de forma lineal con una pendiente de 1 y a partir de ahí se alcanzó el 100% (1M) de forma asintótica. El gradiente se realizó mediante una dilución decreciente de una solución madre de NaCl 1M con tampón TCl. Las muestras se eluyeron a una velocidad de flujo de 4 ml/min y la cantidad de muestra ensayada fue de 250 µl de un extrac-

to de 2-ME con una concentración de 5,4 µg/µl (expresado como contenido total de azúcar). Las fracciones recogidas coincidieron con el número de picos detectados al analizar a 280 nm el eluido mediante un lector de densidad óptica (A_{280}).

II.22.2. Cromatografía de afinidad.

La fracción de inmunoglobulinas del suero se precipitó previamente con sulfato amónico (ver apartado II.23). El precipitado resultante se resuspendió en tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M a pH 8 y se aplicó en circuito cerrado a una columna de proteína A-Sepharosa (Memsep 1010, Milipore) previamente equilibrada con el mismo tampón, haciendo recircular el fluido que contiene las inmunoglobulinas, durante 24 h mediante una bomba peristáltica. La elución de las inmunoglobulinas retenidas en la matriz cromatográfica se llevó a cabo mediante un cambio de pH, haciendo fluir una solución de glicina 10 mM, pH 2,5. Antes de proceder a la elución, la columna fue lavada con el tampón anterior hasta obtener una absorción a A_{280} en el líquido eluido de la columna inferior a 0,01. La velocidad de flujo fue de 5 ml/min y el volumen de cada fracción recogida fue de 2 ml. Las fracciones eluidas tras el cambio de pH se recogieron en tubos que contenían un volumen adecuado de tampón Tris-HCl, 1M, pH 8 para neutralizar rápidamente el pH y así evitar la desnaturalización de las inmunoglobulinas.

II.22.3. Cromatografía de exclusión molecular

II.22.3.1. Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100

El gel (Sephadex G-100; Pharmacia) se hidrató y equilibró con tampón PBS, pH 7,4. Una vez hidratado el gel se empaquetó en una columna de vidrio de 77 x 0,75 cm. El límite de exclusión de dicha columna es de 100 kDa, lo que corresponde a un volumen muerto de 45,8 ml. Una vez aplicada la muestra conte-

niendo 2 mg de material (expresado como contenido total de azúcar) resuspendidos en 2,5 ml, se procedió a eluir con tampón PBS, pH 7,4 con una velocidad de flujo de 9 ml/h, recogiendo fracciones de 2,3 ml cada 20 min. El tampón que se empleó como eluyente fue el mismo que se utilizó para hidratar la resina y la muestra que se analizó contenía 9,8 mg/ml de azúcar. La concentración de proteína de cada fracción se midió mediante lectura de la A_{280} .

II.22.3.2. Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-25 para la desalación de muestras

Columnas PD-10 (Pharmacia) previamente equilibradas en tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 se lavaron con 4 volúmenes del mismo tampón ajustándose el flujo de salida a 0,5 ml/min. Seguidamente se aplicó la muestra a desalar y se eluyó con un volumen de tampón fosfato 10 mM, pH 7,4, 0,5 ml superior al volumen introducido mediante una breve centrifugación suficiente para recoger tan solo la fracción no retenida, lavándose finalmente la columna con varios volúmenes de tampón fosfato conteniendo azida sódica al 0,05%. El volumen de gel eficaz para este tipo de columnas es de 9 ml.

II.23. Generación de un anticuerpo policlonal frente a una especie proteica de 37 kDa asociadas a la estructura de la pared celular de *C. albicans*

El material solubilizado mediante tratamiento con 2-ME de levaduras fue sometido a electroforesis preparativa en geles de SDS-poliacrilamida en gradiente (5-15%). Seguidamente los polipéptidos separados electroforéticamente se transfirieron a papel de nitrocelulosa según se ha descrito anteriormente. Finalizada la transferencia, la hoja de nitrocelulosa se tiñó con reactivo de Ponceau al 0,2% en ácido tricloroacético al 3% en agua bidestilada, con objeto de visualizar la

posición de los polipéptidos transferidos, y en particular la de la especie de 37 kDa de peso molecular aparente. Una vez localizadas la banda de 37 kDa, la membrana de nitrocelulosa se lavó exhaustivamente con agua bidestilada para eliminar el colorante de Ponceau, cortándose seguidamente las secciones transversales del papel correspondiente a la región donde habían migrado la especie anteriormente mencionada. Las tiras de papel obtenidas a partir de dos procesos electroforéticos, se secaron en la estufa, disolviéndose a continuación en 0,4 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Las suspensiones resultantes se mezclaron con un volumen semejante de adyuvante completo de Freund (DIFCO) y la mezcla así obtenida se inyectó subcutáneamente en varios puntos de la espalda de dos conejos hembra de la raza New Zealand White. Tras la primera inmunización, a las dos semanas se administró una segunda dosis, y seguidamente se realizaron otras dos inmunizaciones más, espaciadas 10 días una de la otra (para cada una de estas tres inmunizaciones se utilizó el mismo tipo de preparación antigénica [material presente en 2 tiras de papel de nitrocelulosa disueltas en DMSO] descrito anteriormente, pero emulsionada con adyuvante incompleto de Freund en este caso). Siete días después de la última inyección, se sangró al animal por la vena marginal de la oreja. La sangre obtenida se dejó coagular 1 h a 37°C y 2 h más a 4°C para separar la fracción sérica. A partir del suero, que se separó del coágulo por centrifugación, se procedió a la purificación de las inmunoglobulinas por precipitación con sulfato amónico. Para ello el suero se precipitó adicionando un volumen, equivalente a la mitad del volumen de la muestra del suero a tratar, de una solución saturada de sulfato amónico que fue añadido lentamente y con agitación. Seguidamente, la mezcla resultante se mantuvo durante 12 h a 4°C y transcurrido ese tiempo la

mezcla se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 15 min. El precipitado obtenido se resuspendió en PBS estéril y se dializó frente al mismo tampón. La fracción de inmunoglobulinas purificadas se dividió en varias alícuotas que se almacenaron a -20°C. El título del suero así obtenido, al que se denominó PAb anti-p37, se determinó por el método de E.L.I.S.A.

Eventualmente y para experimentos de biología molecular posteriores, el PAb anti-p37 se trató para bloquear selectivamente las inmunoglobulinas presentes en el suero que pudieran reaccionar con especies antigénicas de *E. coli* o del bacteriófago λ gt11. Para ello se adicionaron 20 μ l del PAb anti-p37 a una mezcla compuesta por 1 ml de tampón TBS (x10), 5 μ l de Tween-20, 0,1 g de BSA y 6,66 ml de un lisado de *E. coli* infectado por λ gt11 (1,5 μ g/ μ l de proteína), aforando la mezcla a 10 ml con agua destilada, de tal modo que la concentración final del lisado fuera de 1 mg/ml de proteína y el anticuerpo se encontrara diluido 1:500. La mezcla se incubó durante 30 min en agitación se utilizó directamente como sonda en ensayos de rastreo sobre filtros de nitrocelulosa.

II.24. Rastreo de una genoteca de ADNc con el PAb anti-p37

La genoteca de ADNc empleada en este estudio fue cedida amablemente por la Dra. La Jean Chaffin (Texas Tech University Health Science Center, Lubbock, USA) (Alloush *et al.*, 1995). Dicha genoteca se construyó con los ADNc sintetizados a partir de la población de ARNms obtenidos de un cultivo de tubos germinativos de *C. albicans* 3153A recogidos 30 min después de inducir la miceliación. Estos ADNcs se subclonaron en el bacteriófago λ gt11, el cual es un vector de expresión que contiene una copia del gen *lac Z* de *E. coli*, con un único sitio *Eco RI* localizado 53 pb arriba del codón de termina-

ción de traducción del gen *lac Z*. Las secuencias codificantes (ADNcs) insertadas en la pauta de lectura y orientación correcta, se expresaran como proteínas de fusión cuyo extremo amino terminal consiste en la β -galactosidasa y cuyo extremo carboxi terminal es el polipéptido codificado por el ADNc. Algunas de estas proteínas de fusión poseerán epitopos antigénicos que pueden detectarse por su capacidad para reaccionar con anticuerpos específicos. En nuestro estudio, la selección de los clones se realizó empleando como sondas los anticuerpos policlonales PAb anti-p37 (ver apartado II.23) y PAb anti-tipo IV, un anticuerpo policlonal dirigido frente a la molécula de colágeno tipo IV.

Para el rastreo con los anticuerpos se analizaron varias placas Petri conteniendo cada una aproximadamente 30.000 clones recombinantes. Para ello se siguió el método descrito por Sambrook et al. (1989). En primer lugar se mezclaron 100 μ l de suspensión de fago a la dilución apropiada con 150 μ l de un cultivo de *E. coli* Y1090 crecido 12-16 h en medio LB-maltosa, incubándose la mezcla 20 min a 37°C. A la mezcla fago/bacteria se le adicionó un volumen adecuado de agar LB top fundido a 47°C y tras homogeneizar se vertió sobre las placas conteniendo un colchón de agar LB. Una vez hubo solidificado la cubierta de agar, las placas se incubaron tres horas a 42°C hasta la aparición de halos de lisis. A continuación se colocaron filtros de nitrocelulosa previamente impregnados en una solución de IPTG 100 mM prolongándose la incubación durante 12 h a 37°C. A continuación los filtros se retiraron de las placas, marcando previamente su orientación, se lavaron con tampón TTBS 10 min y se bloquearon en una solución de tampón TTBS conteniendo BSA al 3%. Seguidamente se realizaron 4 lavados de 10 min cada uno, tras lo cual los filtros se incubaron con el primer

anticuerpo (PAb anti-p37) diluido 1:500 en tampón TTBSB. Después de realizar 4 lavados más de 10 min cada uno se incubó cada filtro con una solución de inmunoglobulinas de cabra anti-conejo a una dilución 1/2.000 en tampón TTBSB.

Después de lavar tres veces los filtros de nitrocelulosa, al igual que se hacía en los métodos de inmunotransferencia (ver apartado II.15), la unión de los anticuerpos a los antígenos se visualizó mediante la aplicación de una mezcla de 60 mg de 4-cloro-1-naftol y 60 μ l de agua oxigenada (de 30 volúmenes) en 100 ml de tampón TBS. El 4-cloro-1-naftol se solubilizó en 20 ml de metanol frío, previamente a su incorporación a la mezcla de revelado. El desarrollo de la reacción coloreada que tiene lugar se detuvo, al alcanzarse la intensidad adecuada, mediante lavados con agua bidestilada.

Una vez identificados los clones positivos se cogieron las calvas correspondientes con pipeta Pasteur y se guardaron en tampón SM (NaCl, 100 mM; MgSO₄·7H₂O, 1 mM; Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM y gelatina al 0,01%) conteniendo unas gotas de cloroformo, almacenándose a 4°C (24-48 h), para eluir el fago recombinante y proceder posteriormente a su amplificación.

II.25. Purificación del ADNc del bacteriófago recombinante λ gt11 mediante el sistema Magic Lambda Preps

Para la obtención de un lisado fágico en gran escala se infectaron 0,5 ml de un cultivo de *E. coli* Y1090 crecido en LB-maltosa durante 12-16 h con agitación a 37°C, con 10-20 μ l de suspensión de fagos incubándose 20 min a 37°C. El cultivo infectado se transfirió a un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de medio LB, precalentado a 37°C y se incubó a dicha temperatura con agitación hasta que la lisis fue aparente (unas 5 h). A continuación

se añadieron 0,5 ml de cloroformo para asegurar la lisis y la incubación se prolongó durante 15 min más. Finalmente el lisado se centrifugó a 10.000xg durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se guardó a 4°C. Una vez obtenido el lisado fágico en medio líquido se procedió a la degradación del ADN bacteriano contenido en suspensión en el lisado, mediante la adición a 10 ml de lisado de 40 µl de nucleasa (una mezcla 1:1 de DNasa I y RNasa A, preparada en la solución de resuspensión de la nucleasa tal y como se indica en el kit a una concentración en cada una de ellas de 0,25 mg/ml), incubándose 15 min a 37°C. Seguidamente se añadieron 4 ml de la solución precipitante del fagos (suministrada por el kit) y se mezcló suavemente, manteniendo la mezcla en hielo durante 30 min. Los fagos precipitados se recogieron por centrifugación a 10.000xg durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de fagos (tampón SM). La eliminación de la cubierta del fago se llevó a cabo mediante la incubación a 37°C durante 5 min, de la suspensión de fagos con pronasa a una concentración final de 0,5 mg/ml, centrifugándose seguidamente 10 seg a 12.000xg para eliminar cualquier partícula insoluble. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y el ADN del fago se purificó mediante la unión a una resina suministrada por el kit. El procedimiento consistía en añadir 1 ml de resina al sobrenadante obtenido en el último paso y transferir la mezcla al interior de una jeringa. La resina unida al ADN del fago se lavó con 2 ml de isopropanol al 80 % y se secó por centrifugación durante 20 seg a 12.000 g. El ADN se eluyó con tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8) precalentado a 80°C y posterior centrifugación a 12.000xg durante 20 seg, almacenándose a 4°C o a -20°C.

II.26. Amplificación y titulación de los clones recombinantes positivos

La amplificación se llevó a cabo mezclando 150 µl de un cultivo de *E. coli* Y1090 crecido 12-16 h en medio LB-maltosa con 50 µl de la solución a amplificar e incubando seguidamente 20 min a 37°C con agitación (250 r.p.m.).

A continuación la mezcla se inoculó en 5 ml de medio LB-maltosa y se incubó 6 h a 37°C con agitación a 250 r.p.m.. Una vez observada la lisis se añadieron 250 µl de cloroformo y se prolongó la incubación durante 10 min más. El lisado se centrifugó para eliminar los restos celulares y al sobrenadante se le añadió DMSO al 7%, almace-nándose a -20°C ó a -70°C.

Para la titulación de los lisados de fagos se realizaron diluciones decimales seriadas de cada amplificado de un clon con tampón SM, las cuales se sembraron en placas de la forma descrita para el rastreo (ver apartado II.24), incubándolas al menos 8 h a 37°C. Para el conteo del número de calvas por placa se tomó la placa que contuviese entre 30 y 300 calvas, para calcular a partir de ese dato el número de unidades formadoras de placas o calvas (ufp) en el lisado original.

II.27. Amplificación del ADN por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de fragmentos de ADN por el método de la PCR se empleó un termociclador Gene-E (Techne). El método consistía en mezclar cantidades apropiadas de ADN molde, cebadores, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y *Taq* polimerasa y someter la mezcla a las temperaturas adecuadas para la desnaturalización del ADN molde y alineamiento de los cebadores, con un periodo de repetición de 30 ciclos (Olher *et al.*, 1992; Lawyer *et al.*, 1993). Todos los reac-

tivos fueron suministrados por Promega Corporation (Wisconsin, USA) y el protocolo seguido fue el siguiente: se mezcló 1 μg del ADN a amplificar (purificado como se indica en el apartado anterior) con 5 μl de tampón de PCR ($\times 10$), 5 μl de solución de MgCl_2 , 4 μl de una mezcla de dNTPs, 1 μl de cada uno de los cebadores universales (1 pmol/ μl) y 0,5 μl de *Taq* polimerasa y se añadió agua en cantidad suficiente para completar un volumen de 30 μl . Para evitar la evaporación durante la reacción, se adicionaron 20-30 μl de aceite mineral. A continuación la mezcla de reacción se sometió a varias temperaturas de forma cíclica de tal modo que se favoreciera la desnaturalización de la doble hélice del ADN (95°C), seguida del alineamiento de los cebadores en su zona complementaria y elongación de los mismos por acción de la *Taq* polimerasa (72°C). Así el programa del termociclador consistía en un primer ciclo de 1 min a 95°C, 29 ciclos en los que la temperatura se mantenía 40 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 2 min a 72°C y finalmente un último ciclo que se diferenciaba de los 29 anteriores en el tiempo de incubación a 72°C, que en este caso era de 15 min. Una vez realizada la amplificación la mezcla se almacenó a 4°C.

La temperatura necesaria para producirse el alineamiento del cebador con su zona complementaria varió según el cebador empleado.

II.28. Preparación de lisados de péptidos de fusión codificados por lisógenos del bacteriófago $\lambda\text{gt}11$

II.28.1. Obtención de lisógenos de $\lambda\text{gt}11$ en la cepa de *E. coli* Y1089

La obtención de fagos recombinantes en estado de lisogenia se llevó a cabo según el método descrito por Sambrook et al. (1989). Un cultivo de *E. coli* Y1089 crecido durante 16 h en medio LB-maltosa conteniendo 50

mg/ml de ampicilina y diluido posteriormente en medio LB, se infectó con el fago recombinante, de tal modo que existiera una multiplicidad de sobreinfección de 5 (5 fagos/célula de *E. coli* Y1089). La mezcla fago/bacteria se incubó 20 min a 32°C y a continuación se tomaron 10 μl del cultivo infectado y se diluyeron en 10 ml de medio LB. Alícuotas de 100 μl del cultivo diluido se extendieron con un asa de vidrio sobre placas de agar LB a una densidad de 200 células por placa y se incubaron a 32°C durante 16 h. A esta temperatura el receptor del ciclo lítico es funcional. Seguidamente se tomaron 20 colonias con palillos estériles y se replicaron en dos placas, una de las cuales se incubó a 32°C y la otra a 42°C durante 16 h. Las colonias lisogénicas no crecerán a 42°C ya que esa es la temperatura de activación del ciclo lítico. La frecuencia de lisogenia obtenida osciló entre el 10-50%.

II.28.2. Obtención de lisados de lisógenos

Para la identificación de los péptidos de fusión es necesaria la inducción de la lisis en los lisógenos. Por ello cada una de las colonias lisogénicas fue inoculada en 2 ml de medio LB conteniendo 50 mg/ml de ampicilina (LBamp) y los cultivos se incubaron durante 12-16 h a 32°C con agitación fuerte (300 r.p.m.). Posteriormente se adicionaron 50 μl de cada uno de esos cultivos a 4 ml de medio LBamp-maltosa precalentado a 30°C y se continuó incubando a 32°C con agitación fuerte. Los cultivos se incubaron hasta alcanzar una DO_{600} de 0,45, densidad máxima a la que es posible inducir la producción de proteínas en los lisógenos.

Los cultivos se transfirieron a un baño de agua atemperado a 44°C y se incubaron durante 20 min a dicha temperatura con agitación fuerte. A continuación se adicionó IPTG a cada cultivo hasta una concentración final

de 10 mM y se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación fuerte. Las células se recogieron por centrifugación (3.000xg, 5 min a temperatura ambiente) y el sobrenadante se eliminó rápidamente por aspiración. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 1/25 del volumen original del cultivo con tampón de extracción de lisógenos (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5, 50 µg/µl de PMSF y ditiotreitól 5 mM) o bien en la solución solubilizadora empleada para solubilizar las muestras para electroforesis (ver apartado II.9) homogeneizándose seguidamente en un vórtex. Finalmente los lisados celulares se congelaron con hielo seco y se almacenaron a -70°C.

II.29. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión con los diferentes enzimas de restricción se realizó mediante la incubación de 1-3 µg de ADN durante 1-2 h (para el caso de ADN plasmídico) o 20 µg durante 12-16 h (para el ADN cromosomal) con el/las enzimas (5-10 unidades para ADN plasmídico y 10-15 unidades para ADN cromosomal) en el tampón apropiado para cada tipo de enzima y siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante (Boehringer-Mannheim, S.A. y Promega Corporation). El volumen de reacción se ajustaba a 20 µl con agua estéril. En las reacciones en las que no se deseaba contemplar la pureza de la muestra de ADN se adicionaba 1 µl (para ADN plasmídico) o 5 µl (para ADN cromosomal) de una solución de RNasa (10 mg/ml) en los diferentes ensayos para eliminar el ARN contaminante que pudiera enmascarar la detección de fragmentos de restricción de pequeño tamaño.

II.30. Electroforesis del ADN en geles de agarosa

Los geles fueron preparados con agarosa (Bio-Rad) al 0,8% en tampón TAE (Tris-

acetato 40 mM pH 8,3, EDTA 1 mM) (Sambrook, *et al.*, 1990) y la electroforesis se realizó horizontalmente en una cubeta apropiada con el gel sumergido en el tampón correspondiente.

Antes de proceder a la electroforesis la muestra, previamente digerida, se mezcló en una proporción 1:6 con una solución de azul de bromofenol al 0,025 % y glicerol al 40% en tampón TAE para aumentar su densidad y visualizar el frente de la electroforesis y se corrió en paralelo con una mezcla de marcadores de peso molecular obtenidos mediante digestión del ADN del bacteriófago λgt11 con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Boehringer-Mannheim, S.A.). La electroforesis se realizó a voltaje constante (entre 40 y 90 V) durante 1-2 h.

En el caso de realizar la separación electroforética para eluir los fragmentos del gel, se empleó una agarosa de bajo punto de fusión (Low melting point Agarose; Boehringer-Mannheim, S.A.) al 0,9 % en tampón TAE y las condiciones de la electroforesis fueron más suaves, empleándose un voltaje menor (30-40 V) para evitar el recalentamiento del sistema o bien realizándose a 4°C.

El ADN fue visualizado tras la electroforesis mediante tinción con una solución de bromuro de etidio (BrEt, 10 µg/ml) durante 15 min y subsiguiente observación en un transiluminador ultravioleta (360 nm). Las fotografías se realizaron con un equipo Polaroid MP-4.

II.31. Elución de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa mediante el sistema Wizard PCR Prep. (Promega Corporation)

El fragmento a eluir se identificó según se indica en el apartado II.29 y se cortó lo más rápidamente posible la porción mínima de gel que contenía el fragmento, para evitar la de-

gradación del ADN por la luz ultravioleta. Para la purificación del ADN se utilizó el método del kit Wizard PCR Prep DNA Purification System (Promega Corp.) que consistía en lo siguiente:

(i) Fundir el fragmento de agarosa transferido a un tubo Eppendorf mediante incubación a 70°C.

(ii) Añadir 1 ml de la resina Magic PCR Prep previamente resuspendida y agitar en un vórtex durante 20 seg.

(iii) Preparar una minicolumna (jeringas de 3 ml desechables) para cada producto de PCR. Retirar el émbolo, colocar en el interior de la jeringa la mezcla ADN/resina y eliminar el exceso de líquido con ayuda del émbolo.

(iv) Lavar la resina pasando 2 ml de etanol al 80% con ayuda del émbolo, para eliminar otras macromoléculas biológicas contaminantes (proteínas, nucleótidos, etc.)

(iv) Secar la resina para eliminar completamente el etanol, que podría inhibir posteriores reacciones enzimáticas, colocando un tubo eppendorf en la salida de la minicolumna y centrifugando 20 seg a 12.000xg.

(v) Transferir la minicolumna a un nuevo tubo y proceder a la elución del ADN mediante lavado de la resina con tampón TE precalentado a 80°C y centrifugado de la minicolumna 20 seg a 12.000xg. El ADN así obtenido puede almacenarse seguidamente a 4°C o a -20°C.

II.32. Ligamiento de fragmentos de ADN para construir moléculas (plásmidos) híbridas

El ligamiento de fragmentos compatibles de ADN se realizó mezclando vector/inserto con un volumen adecuado de ligasa de ADN del fago T4. La cantidad de inserto necesario para la ligación se calculó de la siguiente

forma:

$$ADN_i = ADN_v \times (kb_i / kb_v) \times RM(i/v)$$

donde: ADN_i y ADN_v indican la cantidad la cantidad de ADN de inserto y vector respectivamente, expresada en ng; kbi y kbv indican el tamaño en kb del inserto y el vector respectivamente, y RM (i/v) indica la relación molar inserto/vector que suele ser de 4:1.

El protocolo empleado fue el siguiente: El fragmento de ADN correspondiente al inserto (conteniendo el producto de PCR) se mezcló en cantidad adecuada con el ADN del vector (en nuestro caso el vector pGEM-T) y se adicionó 1 µl de ligasa de T4 (0,3 unidades) y 1 µl de tampón de ligamiento (x10), ajustándose el volumen final a 10 µl con agua estéril. Tanto el tampón como el enzima fueron suministrados por Boehringer-Mannheim. La reacción se incubó a 15°C, durante 16-20 h.

II.33. Transformación con ADN plasmídico

II.33.1. Preparación de células competentes

La introducción de moléculas de ADN en las células de *E. coli* requiere que estas se encuentren en un estado especial (competencia) que puede obtenerse de manera artificial en el laboratorio. La cepa de *E. coli* empleada para este propósito fue la JM109, la cual puede usarse para la selección por color (blanco/azul, dependiendo de la inserción o no inserción de ADNc en el sitio *Eco RI* del gen *lac Z*) y debe crecerse siempre en placas de medio mínimo (M-9) (ver apartado II.4).

Para ello un matraz con 100 ml de medio LB se inoculó con 0,5 ml de un cultivo de *E. coli* JM109 (crecido a partir de la inoculación de una colonia en LB e incubado 12-16 h a 30°C) y se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó la fase exponen-

cial de crecimiento ($A_{600} = 0,6$), aproximadamente dos horas después. Las células se recogieron por centrifugación (6.000xg, 10 min, 2°C), y se resuspendieron en 20 ml de solución salina estéril y fría (CaCl_2 , 100 mM, MnCl_2 , 70 mM, acetato sódico, 40 mM, pH 5,5), manteniéndose a 0°C durante 2 h. A continuación se recogieron de nuevo por centrifugación a 4°C, se resuspendieron en 5 ml de solución salina fría y se adicionaron 0,94 ml de glicerol estéril al 80%. La suspensión se repartió en alícuotas de 0,2 ml que se almacenaron a -70°C.

II.33.2. Transformación en *E. coli*

Las células competentes mantenidas a -70°C se descongelaron a 0°C en hielo durante 10 min. A continuación se adicionaron a las mezclas de ligamiento (conteniendo 10-20 ng de ADN; ver apartado II.32) a 0°C y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, las células fueron sometidas a un choque térmico (45°C, 1 min), y rápidamente enfriadas. Con este proceso las células competentes internalizaban el ADN exógeno. Tras la transformación se adicionó, al tubo con las células bacterianas, 1 ml de LB y se procedió a incubar a 37°C durante 1 h, con objeto de que las células transformadas expresaran el gen de resistencia a ampicilina. Las bacterias se recogieron por centrifugación (5.000xg, 5 min), se resuspendieron en 200 μl de medio LB y se realizaron diluciones seriadas decimales (1/10 a 1/1.000) de dicha resuspensión en el mismo medio (LB).

II.33.3. Selección de los transformantes

La selección de los transformantes en el vector pGEM-T, se realizó aprovechando el hecho de que dicho vector posee el gen de resistencia a ampicilina. Además la cepa bacteriana JM109 está preparada para la selección de color blanco/azul, por lo que para seleccionar los transformantes, se sembraron 100 μl de cada una de las diluciones anterior-

es en placas de agar LBamp conteniendo IPTG y X-Gal, y se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias (24 h). Las células transformadas dan lugar a colonias, distinguiéndose las que contienen plásmidos recombinantes por su color blanco, debido a la ausencia de actividad β -galactosidasa.

II.33.4. Análisis de los clones recombinantes por el sistema Wizard Minipreps. (Promega Corporation)

El análisis de los recombinantes se realizó empleando el kit Wizard minipreps-DNA purification system. Para ello se seleccionaron cinco transformantes de cada ligamiento y se crecieron durante 12-16 h en tubos conteniendo de 1-3 ml de LBamp. Las células se recogieron por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 1-2 min y se resuspendieron en 200 μl de solución de resuspensión (Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5, EDTA, 10 mM y RNasa A, 100 $\mu\text{g/ml}$). A continuación se procedió a la lisis celular mediante la adición de 200 μl de solución de lisis (NaOH, 200 mM, SDS al 1%) y agitación por inversión hasta la desaparición de la turbidez. Seguidamente se añadieron 200 μl de solución de neutralización (acetato potásico, 1,32 M; pH 4,8) y se mezcló por inversión. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 5 min y el sobrenadante se reservó para la posterior purificación del ADN plasmídico.

Un ml de Mini-prep DNA Purification Resin, previamente resuspendida por agitación vigorosa, fue añadido al sobrenadante obtenido en el paso anterior, y la mezcla resultante fue introducida en el interior de una jeringa de 1-3 ml. La mezcla ADN/resina se lavó con 2 ml de solución de lavado (NaCl, 200 mM, Tris-HCl, 20 mM; pH 7,5 y EDTA 5 mM) forzando el paso por la columna con ayuda del émbolo. Para eliminar el exceso de líquido se colocó un tubo Eppendorf en la boca de la

jeringa y se centrifugo a 12.000 r.p.m. durante 20 seg. La minicolumna se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 50 µl de tampón TE precalentado a 80°C. Después de 1 min, la columna se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 20 seg y el ADN recuperado se guardó a 4°C o a -20°C hasta su uso.

Una vez obtenido el ADN plasmídico, se procedió al análisis del mismo mediante digestión con endonucleasas de restricción y posterior electroforesis en geles de agarosa con objeto de seleccionar aquellos clones que contuvieran la construcción plasmídica deseada.

II.34. Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se purificó siguiendo el método descrito para el análisis de los plásmidos recombinantes en *E. coli* (apartado II.33.4). La purificación de plásmidos a gran escala se realizó empleando el kit Wizard maxi-preps de Promega. El procedimiento es idéntico al de las minipreparaciones, pero se trabaja con mayor cantidad de cultivo, obteniéndose así mayores cantidades de ADN plasmídico.

Para la purificación de ADN plasmídico destinado a la secuenciación automática se empleó el método de la lisis alcalina/ precipitación con PEG. El protocolo consiste en lo siguiente:

(i) Incubar una colonia recombinante (ver apartado II.33.3) en 50 ml Terrific Broth (Sigma) suplementado con ampicilina 50 mg/ml, durante 12-16h a 37°C.

(ii) Recoger alicuotas de 1,5 ml por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 1 min. Pueden recogerse hasta 4,5 ml por tubo mediante centrifugaciones sucesivas.

(iii) Eliminar el sobrenadante de cada tubo por aspiración y resuspender el sedimento de células en 200 µl de tampón GTE (glucosa,

50 mM, Tris, 25 mM; pH 8, EDTA, 10 mM; pH 8).

(iv) Añadir 300 µl de una solución fresca de NaOH, 0,2 N, SDS 1%, mezclar por inversión e incubar en hielo durante 5 min.

(v) Neutralizar la solución mediante la adición de 300 µl de acetato potásico 3 M, pH 4,8, mezclar por inversión e incubar en hielo durante 5 min.

(vi) Eliminar los restos celulares mediante centrifugación a temperatura ambiente a 12.000 r.p.m. durante 10 min y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

(vii) Añadir RNasa A a una concentración final de 20 µg/ml e incubar a 37°C durante 20 min.

(viii) Extraer el sobrenadante 2 veces con 400 µl de cloroformo. Centrifugar el tubo durante 1 min a 12.000 r.p.m. para separar las fases y recoger la fase acuosa (superior).

(ix) Precipitar el ADN total adicionando un volumen igual de isopropanol al 100% y centrifugando a 12.000 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente.

(x) Lavar el precipitado con 500 µl de etanol al 70% y secar a vacío durante 5 min.

(xi) Disolver el sedimento en 32 µl de agua desionizada estéril y precipitar el ADN plasmídico por adición de 8 µl de NaCl, 4M y 40 µl de polietilenglicol (PEG8000) al 13% estéril.

(xii) Incubar la muestra durante 20 min en hielo y recoger el ADN plasmídico por centrifugación a 12.000 r.p.m. en una centrífuga de ángulo fijo durante 15 min a 4°C.

(xiii) Eliminar cuidadosamente el sobrenadante, lavar el sedimento de ADN plasmídico con 500 µl de etanol al 70%, secarlo a vacío durante 5 min y resuspenderlo en 20 µl de

agua desionizada estéril, almacenándolo a -20°C.

II.35. Obtención de ADN cromosomal de levaduras

El ADN de levaduras de *C. albicans*, se obtuvo a partir de 20 ml de cultivos en YPD crecidos hasta fase exponencial de crecimiento mediante el método descrito por Rothstein (1985) en el que el ADN se obtiene a partir de protoplastos, para evitar la ruptura de las células con perlas de vidrio, que fragmentarían el ADN. Los protoplastos se prepararon según el método descrito en el apartado II.6. Posteriormente se adicionaron 200 µl de acetato potásico 5 M y 150 µl de NaCl 5 M y la mezcla resultante se mantuvo en hielo durante 20 min, centrifugándose a continuación a 15.000 r.p.m. durante 20 min en una centrífuga para tubos eppendorf. Seguidamente se añadió 1/3 de volumen de la mezcla de polietilenglicol (PEG6000) al 30% y se incubó en hielo durante 10 min. El precipitado se recogió por centrifugación (15.000 r.p.m., durante 10 min) y se disolvió en 40 µl de tampón TE.

II.36. Marcaje no radiactivo de sondas de ADN

Los fragmentos de ADN fueron marcados mediante el empleo del kit comercial de la casa Boehringer-Mannheim (DIG DNA labeling and detection kit), siguiendo sus instrucciones. La sonda a marcar fue purificada por elución a partir de un gel de agarosa. El fragmento de ADN se desnaturalizó térmicamente, y el marcaje se realizó mediante la síntesis de las cadenas complementarias por acción del fragmento Klenow de la ADN polimerasa, en presencia de dUTP marcado con digoxigenina. Como cebadores se emplean mezclas de hexanucleótidos que hibridan con la sonda en puntos distribuidos al azar. Este

tipo de ensayo permite la detección de la sonda tras la hibridación mediante inmunoensayo empleando anticuerpos frente a digoxigenina marcados con fosfatasa alcalina.

II.37. Análisis de los fragmentos de restricción de ADN mediante hibridación con sondas

II.37.1. Transferencia de las moléculas de ADN a filtros de Nylon (Southern)

La transferencia se llevó a cabo por el método de Southern (1975) con ligeras modificaciones descritas por Sambrook et al. (1989).

Una vez completada la separación electroforética los fragmentos de ADN en geles de agarosa, se trataron para desnaturalizar el ADN y facilitar su transferencia, del siguiente modo:

(i) lavado, por duplicado, con HCl 0,25 M, durante 15 min.

(ii) lavado con una solución de NaCl 1 M y NaOH 0,5 M durante 15 min, por duplicado.

(iii) neutralización con Tris-HCl 1 M pH 7, NaCl 0,6 M, durante 15 min, por duplicado.

(iv) saturación del gel en tampón SSC x20 (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7), durante 15 min.

Todos los tratamientos se realizaron con agitación suave a temperatura ambiente.

La transferencia se realizó simultáneamente a dos filtros de Nylon (Hybond-N, Amersham), como se describe a continuación:

Sobre un taco de hojas de papel absorbente (5 cm), de dimensiones superiores al gel, se colocaron dos filtros Whatmann 3MM empapados en tampón SSCx20. Sobre ellos se situó el filtro de Nylon equilibrado con el mismo tampón. A continuación se colocó el gel de agarosa, y sobre él se situaron de

nuevo otro filtro de Nylon, equilibrado en tampón, dos filtros Whatmann 3MM también equilibrados, y otro taco de papel absorbente (5 cm de espesor aproximadamente). Todo el montaje se realizó sobre una superficie plana. Para asegurar el paso de tampón a través del filtro, el gel se aisló del papel absorbente colocando en sus bordes trozos de plástico (Parafilm). El contacto entre todos los componentes del sistema se aseguraba para evitar la formación de burbujas entre ellos y colocando un peso (0,5-1 kg) encima del montaje.

La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante 16-20 h. Tras la misma, el ADN transferido se fijó al filtro mediante incubación a 120°C durante 30 min.

II.37.2. Hibridación ADN/ADN

La hibridación se llevó a cabo por el método descrito en el kit de detección no radiactiva de ADN (Lumigen PPD) de Boehringer-Mannheim. El protocolo consiste en lo siguiente:

(i) Incubar los filtros durante 1-3 h en la solución de prehibridación DIG Easy Hyb (SSCx5, reactivo de bloqueo al 1%, N-laurilsarcosina al 0,1 %, SDS al 0,02%) (25 ml de solución/100 cm² de filtro) a 68°C en un horno de hibridación.

(ii) Sustituir la solución anterior por otra igual (5 ml/100 cm²) que contenga la sonda (10-20 ng/ml) desnaturalizada por calentamiento (5 min a 100°C). La hibridación se realizó a 68 °C durante 16-20 h.

(iii) Lavar los filtros 2 veces durante 5 min cada vez con tampón SSC x2, conteniendo SDS al 0,1%, a temperatura ambiente.

(iv) Realizar dos lavados más de 15 min a 68°C con tampón SSC (x0,1) con 0,1% de SDS.

La detección de la sonda hibridada se realizó empleando el kit Lumigen PPD de Boeh-

ringer-Mannheim, siguiendo las instrucciones descritas en el mismo.

II.38. Obtención de ARN

El ARN total de células levaduriformes y de blastosporas germinadas de *C. albicans* se obtuvo siguiendo básicamente el método descrito por Denis *et al* (1981) a partir células en ayuno metabólico crecidas durante 3 h de incubación a 28°C y 37°C respectivamente.

Las células se sedimentaron por centrifugación (4.000xg, 5 min) en botellas estériles y se resuspendieron en 1,5 ml de tampón LETS (LiCl 0,1 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y SDS 0,2%), pasándose a tubos de vidrio Córax (de 30 ml) estériles que contenían 11 g de perlas de vidrio estériles (diámetro: 0,45 mm) y 1,5 ml de fenol/LETS (fenol equilibrado con tampón LETS). La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex durante intervalos de 1 min intercalados con periodos de reposo en hielo, hasta conseguir un porcentaje elevado de rotura celular, la cual se determinaba por observación microscópica. Seguidamente al lisado resultante se le adicionaron 3,5 ml de tampón LETS y se centrifugó a 4.000xg durante 10 min. El sedimento fue desechado y la fase acuosa (superior) se recogió en nuevos tubos y se sometió al menos a cuatro extracciones con fenol/cloroformo (fenol equilibrado/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 28:25:1). Finalmente se realizó una extracción única con cloroformo y el ARN así purificado se precipitó por adición de un volumen de LiCl 5 M a la fase acuosa y mantenimiento durante 3 h a -20°C. El precipitado se recogió por centrifugación a 12.000xg durante 15 min a 2°C, y se lavó con etanol al 80% frío. El sedimento fue secado al vacío y se disolvió en 100-200 µl de tampón TE.

Todo el material empleado en la obtención del ARN fue previamente esterilizado en un horno Pasteur durante 3 h a 180°C o bien

tratado con dietilpirocarbonato (DPC) al 0,1% durante al menos 1 h y posterior esterilización en autoclave.

II.39. Análisis de las especies de ARN mediante hibridación con sondas marcadas

II.39.1. Electroforesis del ARN en geles de agarosa

Antes de realizar la separación electroforética, el ARN se desnaturizó mediante la adición por cada 10 µg de ARN de 2 µl de tampón MOPS(ácido 3-[N-Morfolino]propano sulfónico)x10 conteniendo (MOPS 0,2 M, acetato sódico 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7), 10 µl de formamida desionizada, 3,25 µl de formaldehído (40%), 1 µl de BrEt (10 mg/ml) y agua hasta un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 55°C durante 15 min y a continuación se colocó en hielo. Para la electroforesis se adicionó a las muestras 1/6 de su volumen de una solución solubilizadora compuesta por azul de bromofenol (25%) y glicerol (40%) en agua. La separación electroforética se realizó en geles del 1,2% de agarosa preparado en tampón MOPS conteniendo formaldehído (1%), y a un voltaje constante de 85 voltios durante 4 h. El tampón de electroforesis era MOPSx1 conteniendo formaldehído al 1%.

Todo el material empleado fue previamente tratado con DPC al 0,1% y esterilizado.

II.39.2. Transferencia de ARN a filtros de Nylon (Northern).

Antes de la transferencia, el gel fue equilibrado por inmersión en sucesivos tampones y soluciones con la pauta siguiente:

- (i) Lavado de 5 min con agua estéril.
- (ii) Lavado con NaOH 50 mM durante 30 min.
- (iii) Neutralización con Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 durante 30 min.

(iv) Equilibrado en tampón SSC (x1) durante 30 min.

La transferencia a filtros de Nylon (Amersham) se realizó según las instrucciones del fabricante. El montaje consistió en colocar un soporte sólido y plano dentro de una cubeta y sobre él, situar una placa de vidrio cubierta por dos papeles de filtro, empapados en SSC (x1), de manera que sus extremos descansaran sobre la cubeta. Encima se colocaron 2 filtros Whatman 3MM, también empapados en tampón, de tamaño ligeramente superior al del gel, y sobre él se situó el gel de agarosa. Inmediatamente encima se colocó el filtro de Nylon, equilibrado en tampón, dos papeles Whatmann 3MM y un taco de papel absorbente. Sobre el sistema se puso un peso aproximado de 1 kg, y el gel se aisló completamente del papel absorbente colocando plástico (Parafilm) en sus bordes, de manera que el tampón solo pudiera circular a través del filtro. El tampón de transferencia SSC (x1) se colocó en la cubeta y por capilaridad ascendía a través del gel hacia el papel absorbente. La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante 16-20 h. Todo el material empleado estaba esterilizado y/o tratado con DPC al 0,1%.

El filtro de Nylon conteniendo el ARN transferido se iluminó con luz UV (360 nm) para señalar la posición de los ARN ribosómicos, que servían de marcadores de tamaño y se fijó durante 30 min a 120°C.

II.39.3. Hibridación con sondas no radiactivas y revelado

La hibridación se realizó según el protocolo recomendado por la firma Boehringer-Mannheim. Los filtros fueron equilibrados con la solución de prehibridación (SSC x5, formamida desionizada al 50%, KH₂PO₄ 50 mM, pH 7,2, SDS al 7%, reactivo de bloqueo al 2%, 50 µg/ml de ADN sonificado y desnatu-

realizado de esperma de arenque y 50 µg/ml de ARNt) en la proporción de 15 ml por 100 cm² de filtro, durante al menos 1 h a 50°C.

Tras la prehibridación, la solución utilizada se sustituyó por una nueva de idéntica composición que contenía la sonda marcada (aproximadamente 20 ng/ml). La proporción de solución de hibridación era de 7,5 ml/100 cm² de filtro. El tiempo de hibridación fue de 16-20 h en un horno de hibridación a 50°C.

Antes del revelado, el filtro se lavó con las siguientes soluciones:

(i) SSC, SDS 0,1%, 5 min a temperatura ambiente (dos veces).

(ii) SSC (x0,2), SDS, 0,1%, 20 min a 65°C, dos veces.

El revelado se realizó empleando el kit Lumigen PPD (Boehringer) siguiendo las instrucciones del mismo que se describen en el apartado II.37.2.

II.40. Secuenciación del ADN

El ADNc subclonado en el vector pGEM-T se secuenció utilizando los cebadores universales de λgt11 "forward" y "reverse". Los oligos sintéticos deducidos de la secuencia fueron suministrados por la firma Durviz S.L. (Valencia, España). La secuenciación se realizó siguiendo el protocolo Taq Dyedeoxy Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc) y la secuencia nucleotídica se determinó en un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystem automated DNA sequencer 373A). La secuencia de nucleótidos se comparó con las bases de datos EMBL y GenBank utilizando el programa FASTA (Lipman *et al.*, 1985).

II.41. Productos químicos y reactivos

Los reactivos empleados en las electroforesis, así como en los experimentos de

transferencia y de biología molecular fueron de la firma Bio-Rad (Richmond, California, USA), Promega Corporation (Wisconsin, USA), Hoefer (San Francisco, U.S.A), Amershan International (UK) y Boehringer-Mannheim (Alemania). La Zimoliasa 20T se obtuvo de Seikagaku Kogyo Co. (Japón). La mayor parte de los reactivos y productos químicos fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA). Excepto en los casos en que queda expresamente indicado, el resto de productos empleados fueron de grado de pureza para análisis, y se obtuvieron de las firmas Merck (Alemania) y Panreac (España).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Identificación de receptores para laminina presentes en la superficie de *C. albicans*

La laminina, un componente mayoritario de la membrana basal de los tejidos animales (Timpl *et al.*, 1979), es una glicoproteína con diferentes dominios funcionales, que parece jugar un papel crítico no sólo en los procesos normales de adhesión celular, sino también en la invasión de los tejidos por microorganismos patógenos y en la metástasis tumoral. En este contexto, se han identificado receptores específicos para laminina en células tumorales, bacterias patógenas (Lopes *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1983; Switalski *et al.*, 1987; Wewer *et al.*, 1986), y recientemente también en *C. albicans* (Bouchara *et al.*, 1990). Algunas de las proteínas con capacidad para ligar laminina identificadas en las células animales pertenecen a la denominada familia de las integrinas, mientras que otras son receptores del tipo no integrina (Mc Donald, 1989; Ruoslahti, 1991). Entre estos últimos se ha identificado un receptor humano de 67 kDa de alta afinidad para laminina (67 LR) así como un precursor del mismo de 37 kDa (37 LRP), que también muestra elevada afinidad por el ligando, tanto en células normales como tumorales (Castronovo *et al.*, 1990, 1991; Rao *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta que experiencias previas llevadas a cabo por nuestro grupo habían apuntado la posibilidad de que *C. albicans* poseyera receptores para laminina (López-Ribot, 1991) y con objeto de determinar si la cepa patrón empleada en este estudio (ATCC 26555) tuviera receptores para laminina semejantes a los descritos por Bouchara *et al.* (1990) en otro aislamiento de *C. albicans*, se procedió a detectar la presencia de especies proteicas y/o glicoproteínas capaces de interaccionar con laminina de origen humano en el material solubili-

zado de la pared celular del hongo mediante 2-ME, utilizando un procedimiento semejante al empleado por nuestro grupo para caracterizar receptores de fibrinógeno en *C. albicans* (Casanova *et al.*, 1992b). Mediante este procedimiento, se puso de manifiesto la existencia de dos polipéptidos de 67 y 37 kDa en los extractos de células levaduriformes que mostraron la capacidad para interaccionar específicamente con laminina (Fig. III.1, panel B, calle 1, flechas) entre todas las especies polipeptídicas detectadas mediante tinción con azul de Coomassie, en los extractos de 2-ME (Fig. III.1, panel A, calles 1,2) y en los lisados de protoplastos (Fig. III.1, panel A, calles 3,4) de ambas fases morfológicas del hongo. Cuando las hojas de nitrocelulosa se incubaron únicamente con el anticuerpo anti-laminina acoplado a peroxidasa, no se detectó banda reactiva alguna, evidencia adicional de que la reacción observada (Fig. III.1, panel B, calle 1) era dependiente de la interacción específica previa de los polipéptidos transferidos con laminina. Mediante tinción con el conjugado Con A-peroxidasa se puso de manifiesto que la especie de 67 kDa era una manoproteína, mientras que la banda de 37 kDa no mostró reactividad frente a la lectina, lo que sugiere la ausencia de residuos azucarados en esta especie (no mostrado).

Debido a que los dos presuntos receptores para laminina detectados en el experimento indicado en la Fig. III.1 poseían un peso molecular aparente (67 y 37 kDa) semejante al del receptor humano de alta afinidad para laminina (67 LR) y su precursor (37 LRP) anteriormente descritos, se investigó a continuación si las dos especies presentes en los extractos de 2-ME de *C. albicans* exhibían reactividad cruzada con dos anticuerpos policlonales dirigidos contra (i) un dominio extracelular localizado en la región carboxiterminal próximo al dominio de unión a laminina

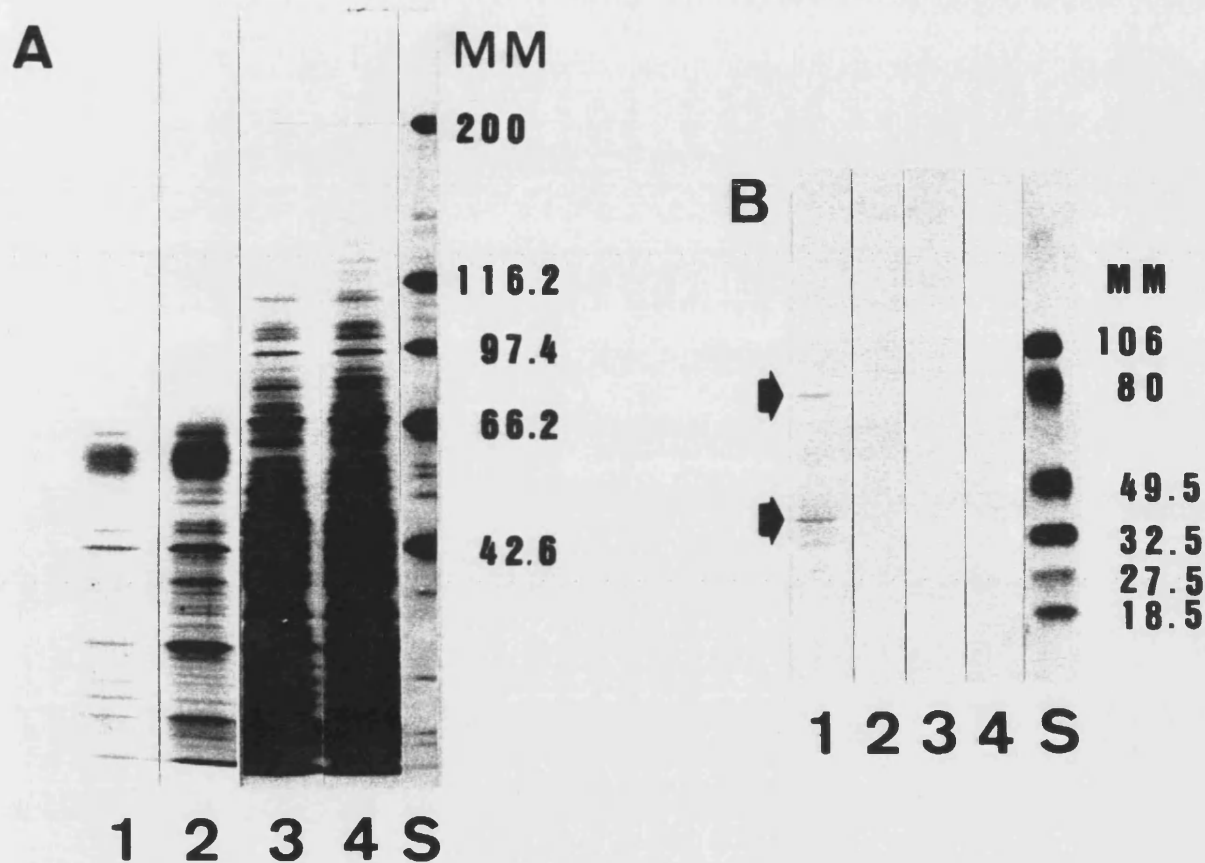


Fig.III.1. Análisis mediante electroforesis en geles en gradiente de acrilamida del 5-15% (SDS-PAGE) y electrotransferencia (Western-blotting) de extractos obtenidos mediante tratamiento con 2-ME (calles 1,2; las muestras aplicadas en cada calle contenían unos 300 μ g de material expresado como contenido en azúcar total) y de lisados de protoplastos (calles 3,4; en este caso se aplicaron 40 μ g de material expresado como contenido en proteína total en cada calle) de células levaduriformes (calles 1,3) y de levaduras germinadas (calles 2,4). Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (panel A) o alternativamente transferidos a papel de nitrocelulosa (panel B). Las flechas indican polipéptidos de 37 y 67 kDa, presentes exclusivamente en los extractos de 2-ME obtenidos de células en fase levaduriforme, que mostraron reactividad tras el ensayo de unión a laminina (panel B) descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. A la derecha de cada panel se indica el tamaño molecular (expresado en kilodaltons; kDa) de proteínas estándar corridas en paralelo. En el panel B (calle S) se aplicó una mezcla de proteínas preteñidas de peso molecular conocido.

de la especie 67 LR (PAb 4160; **Castronovo et al., 1991**) y (ii) un dominio interno de dicha molécula (PAb 4056; **Castronovo et al., 1990**). Con el PAb 4160 solo se detectó reactividad con la especie de 37 kDa presente en el extracto de 2-ME de células levaduriformes, (Fig.III.2, panel A, calle 1, flecha), mientras que el PAb 4056 reconoció básicamente una especie de 37 kDa en todas las muestras analizadas (Fig.III.2, panel B; calles 1-4, flecha), además de dos especies minoritarias de 67 y 34 kDa presentes en los lisados de protoplastos de células levaduriformes (Fig.III.2, panel B; calle 3, estrellas).

Mediante inmunofluorescencia indirecta, el PAb 4160 reconoció exclusivamente la superficie de las células levaduriformes (Fig.III.3, paneles B y C), particularmente unas levaduras que poseían un tamaño medio superior al resto de células en la población (Fig.III.3, panel E, flechas). Estas células que representaban alrededor del 10% del total de la población, mostraron un patrón de fluorescencia irregularmente distribuida en su superficie (Fig.III.3, paneles B y C) tras la tinción de inmunofluorescencia indirecta utilizando el PAb 4160 como sonda. Ello sugiere que los receptores para laminina no se encuentran homogéneamente distribuidos en la superficie de las células *in vivo*; una observación semejante ha sido recientemente publicada por nuestro grupo en relación con el receptor manoproteico de 58 kDa para fibrinógeno de *C. albicans* (**Martínez et al., 1994**). La reacción observada con el PAb 4160 fue específica, puesto que no se detectó fluorescencia cuando las células se enfrentaron solamente al segundo anticuerpo marcador acoplado a FITC. Así mismo, con el PAb 4160 tampoco se observó fluorescencia en los filamentos miceliales ni en las levaduras de las que emanaban los tubos germinativos (Fig. III.3). Tras la reacción con el PAb 4056, tanto las levaduras

como los filamentos miceliales exhibieron una fluorescencia superficial muy débil (no mostrado).

Los receptores de laminina encontrados en el presente trabajo parecen diferentes de los previamente identificados por **Bouchara et al.(1990)** en *C. albicans*. En primer lugar, estos autores identificaron receptores en los filamentos miceliales, pero no en células levaduriformes como en el presente trabajo. En segundo lugar, aunque estos autores describieron componentes de la superficie celular de tubos germinativos con capacidad para ligar laminina que exhibían un peso molecular similar a la especie 67 LR (68, 62 y 60 kDa), estos receptores pertenecían a una familia de proteínas y glicoproteínas con afinidades múltiples por diferentes ligandos como laminina, fibrinógeno y C3d (**Calderone et al., 1988; Saxena et al., 1990; Tronchin et al., 1987**). Sin embargo, las proteínas de 37 y 67 kDa descritas en este trabajo, no mostraron capacidad de interaccionar con otras proteínas tales como fibrinógeno, fibronectina o colágeno IV, bajo las condiciones experimentales ensayadas. Además la proteína de 37 kDa presente en el extracto de 2-ME de células levaduriformes (Fig.III.1, panel A, calle 1) así como la especie de 67 kDa detectada en los lisados de protoplastos de células levaduriformes (Fig.III.2, panel B, calle 3, estrella superior), exhibieron inmunorreactividad con anticuerpos dirigidos frente a diferentes dominios topológicos y funcionales del receptor humano de alta afinidad para laminina. Esta observación no es del todo sorprendente ya que se ha descrito la existencia de reactividad cruzada entre anticuerpos dirigidos frente a receptores de laminina bacterianos y el correspondiente receptor de laminina de células animales (**Motta et al., 1988**). Además recientemente se ha caracterizado una secuencia de ADN que codifica para una proteína idéntica al re-

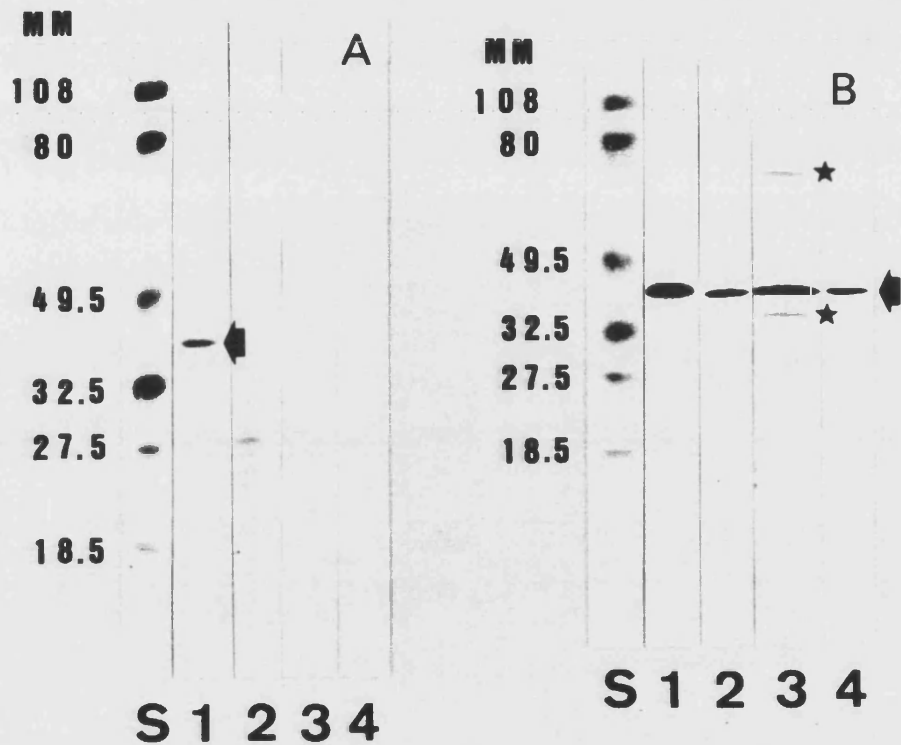


Fig III.2. Análisis mediante SDS-PAGE (en geles en gradiente de acrilamida del 5-15%) y electrotransferencia de extractos de 2-ME (calles 1,2) y de lisados de protoplastos (calles 3,4) obtenidos de células levaduriformes (calles 1,3) y de levaduras germinadas (calles 2,4). La cantidad de muestra aplicada en cada caso es la indicada en la leyenda de la Fig.III.1. Tras la electroforesis, los polipéptidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa, que se incubaron con los antisueros policlonales PAb 4160 (panel A) y PAb 4056 (panel B) dirigidos contra diferentes dominios del receptor humano de alta afinidad para laminina (ver texto). Las flechas en ambos paneles señalan la especie de 37 kDa que exhibió reactividad frente a los anticuerpos ensayados. Las estrellas en el Panel B indican otros polipéptidos presentes en el lisado de protoplastos de células levaduriformes que también mostraron una cierta reactividad frente al PAb 4056. El tamaño molecular de proteínas preteñidas corridas en paralelo (calle S) se muestra a la izquierda de cada panel (expresado en kDa).

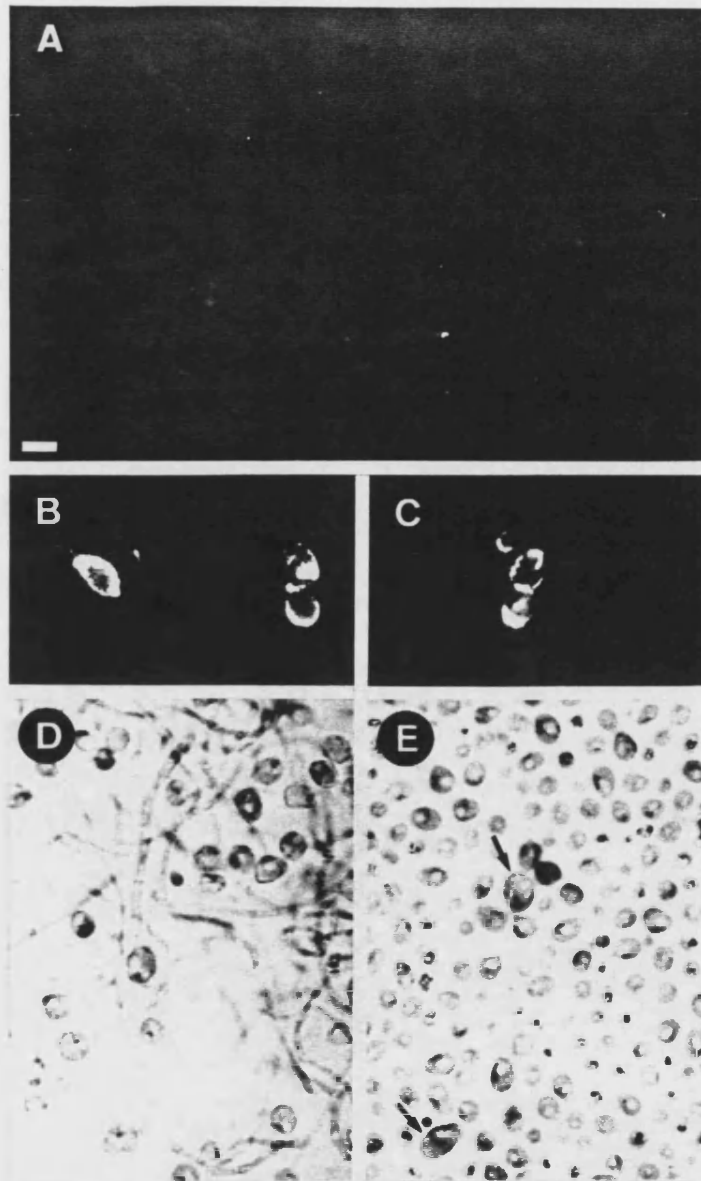


Fig.III.3. Microscopía de contraste de fases (D,E) y de fluorescencia (A-C) de células incubadas con PAb 4160 (dilución 1:50). *C. albicans* ATCC 26555 se incubó bajo condiciones que indujeran la formación de tubos germinativos (A,D) o el crecimiento en forma de levadura (B,C,E). En el panel E las flechas señalan células levaduriformes con un tamaño superior al promedio, que fueron las únicas que exhibieron fluorescencia irregularmente distribuida en su superficie. La barra en el panel A representa 3 μ m y es la misma escala utilizada en el resto de los paneles.

ceptor humano de alta afinidad para laminina en *S. cerevisiae* (Weinstock et al., 1993).

No obstante no puede descartarse la posibilidad de que los resultados hallados reflejen una característica particular de la cepa de *C. albicans* (ATCC 26555) utilizada. En este contexto, la heterogeneidad en la expresión de inmunodeterminantes superficiales no solo entre diferentes cepas de *C. albicans* sino incluso entre células de una misma población (Gil et al., 1991; Poulain et al., 1985) y la variación fenotípica, un fenómeno que se cree que modifica las características antigénicas de la superficie celular de *C. albicans* (Martínez et al., 1990; Soll et al., 1992), podrían estar implicadas en la aparición de moléculas con homología con el receptor de alta afinidad para laminina en células levaduriformes de la cepa ATCC 26555. Nuestro grupo ha descrito que dicha cepa exhibe una frecuencia de variabilidad fenotípica espontánea (Martínez et al., 1990) semejante a la descrita por David Soll en la cepa de *C. albicans* 3153A (Soll et al., 1992). Hay que destacar que las células que expresaban el receptor de 37 kDa, eran de mayor tamaño que el resto de células de la población (Fig.III.3, panel E, flechas) y exhibían una morfología en forma de judía semejante a la descrita para las levaduras del fenotipo "opaco" que es uno de los diferentes sistemas de variabilidad fenotípica descritos en *C. albicans* (Soll, 1992). En consecuencia, las levaduras que expresan el receptor de laminina podrían representar una subpoblación fenotípicamente diferente al resto de las células, con componentes superficiales específicos. En este contexto hay que indicar que las células de los fenotipos "blanco" y "opaco" tienen marcadas diferencias en su capacidad de adherencia a tejidos animales (Soll, 1992). Alguna o todas las diferentes posibilidades comentadas en este párrafo podrían justificar las diferencias entre los resultados mostrados en

esta memoria y los publicados por Bouchara et al. (1990) en relación con la caracterización de receptores para laminina en *C. albicans*.

Teniendo en cuenta los resultados de otros autores (Bouchara et al., 1990; Klotz et al., 1992; Tronchin et al., 1987), nuestros datos señalan la posibilidad de que se expresen de forma selectiva o constitutiva diferentes receptores para laminina en la superficie celular de *C. albicans*. Así, un homólogo altamente conservado de la especie 37 LRP humana, la cual parece ser una proteína multifuncional que juega diferentes papeles en el citoplasma y en la superficie celular como receptor para laminina (Castronovo et al., 1991), se encuentra presente aparentemente en las células levaduriformes de *C. albicans*.

En cualquier caso existen diferencias en los epitopos presentes en la especie de 37 kDa presente en ambas morfologías del hongo. Así, aunque esta molécula se encuentra presente en ambos tipos de células, como se constató por su reactividad con el PAb 4056 dirigido hacia un dominio interno de la especie 37 LRP (Fig.III.2, panel B, calles 1-4), la capacidad para ligar laminina se detectó exclusivamente en la especie extraída por el 2-ME de blastosporas no germinadas de *C. albicans*, que así mismo fue la única que mostró inmunorreactividad con el PAb 4160 (Fig.III.2, panel A, calle 1). Este hecho puede explicarse por diferencias en la secuencia aminoácídica o por modificaciones postraduccionales que afectarían al dominio carboxiterminal de unión a laminina de la especie de 37 kDa presente en las levaduras germinadas.

Aunque está generalmente aceptado que los tubos germinativos son la forma invasiva de *C. albicans* (Odds et al., 1988), la presencia de receptores de laminina en células levaduriformes, puede permitir la diseminación in vivo de las mismas, para producir in-

fecciones metastásicas en el hospedador. En cualquier caso, como los tubos germinativos también presentan receptores de laminina (Bouchara *et al.*, 1990) aparentemente distintos de los aquí descritos, la existencia de diferentes familias de receptores de laminina expresadas selectivamente en células levaduriformes y miceliales, podría estar en relacionada con el comportamiento característico de cada forma de crecimiento durante la invasión de tejidos.

Finalmente, Klotz *et al.* (1992) describieron que el PepTite-2000, un péptido sintético que posee la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) que es reconocida por el receptor de fibronectina de *Candida*, inhibe la adherencia de las células levaduriformes a la matriz extracelular así como la unión de diferentes ligandos proteicos a esta última, en más de un 90%. En este contexto, otro péptido artificial (péptido G) sintetizado a partir de la secuencia deducida de aminoácidos del dominio carboxiterminal de la especie 37 LRP, el cual liga laminina con alta afinidad y representa un sitio de unión putativo para el ligando en la especie 67 LR (Castronovo *et al.*, 1991a), ha sido utilizado en la inhibición de la adhesión de las células tumorales al tejido endotelial, un paso crítico en el establecimiento de focos metastásicos a través del torrente circulatorio (Castronovo *et al.*, 1991b). Como la habilidad de los microorganismos patógenos para unirse a la membrana basal parece ser una etapa fundamental en la invasión del hospedador (Calderone *et al.*, 1991; Klotz *et al.*, 1992; Valkonen *et al.*, 1991) y teniendo en cuenta que la laminina es el componente mayoritario de la membrana basal que juega un papel fundamental en la adhesión celular (Timpl *et al.*, 1979), dicho péptido podría tener utilidad terapéutica como inhibidor de la diseminación de las células fúngicas necesaria para el desarrollo de la candidiasis sistémica.

III.2. Obtención y caracterización de un antisuero policlonal frente al receptor de 37 kDa para laminina

Con objeto de disponer de una herramienta que permitiera abordar posteriores estudios sobre el receptor de 37 kDa de *C. albicans* a nivel fisiológico y de biología molecular, se procedió a obtener un antisuero policlonal mono específico de conejo frente a dicho receptor (PAb anti-p37), siguiendo la metodología descrita en el apartado II.2.3 del capítulo de Materiales y Métodos. El conejo se sangró a intervalos de 10 días después de la inmunización inicial (en el momento de la segunda sangría se le administró al animal una dosis de refuerzo de antígeno). El título de anticuerpos en el suero se determinó por E.L.I.S.A., utilizando como preparación antigénica el extracto de 2-ME tanto de células levaduriformes como de levaduras germinadas y osciló entre valores de 1:4.000 (para el suero obtenido en la primera sangría) y 1:500 (en el suero obtenido en la sexta extracción) independientemente del extracto antigénico de 2-ME utilizado para llevar a cabo el tapizado de los pocillos de las placas de E.L.I.S.A.

La detección mediante inmunotransferencia de los extractos de 2-ME de ambas fases morfológicas del hongo con el PAb anti-p37, reveló una banda de 37 kDa en los dos casos (Fig.III.4), mientras que por inmunofluorescencia indirecta el antisuero reconoció principalmente las células levaduriformes (Fig. III.5). Teniendo en cuenta que el PAb anti-p37 fue obtenido frente a la especie de 37 kDa solubilizada por 2-ME de la fase levadura de *C. albicans*, los resultados obtenidos por E.L.I.S.A., inmunotransferencia e inmunofluorescencia utilizando dicho antisuero como sonda sugieren que la especie de 37 kDa se encuentra presente en la pared celular ambas fases morfológicas del hongo, aunque se expresa principalmente o está topológica-

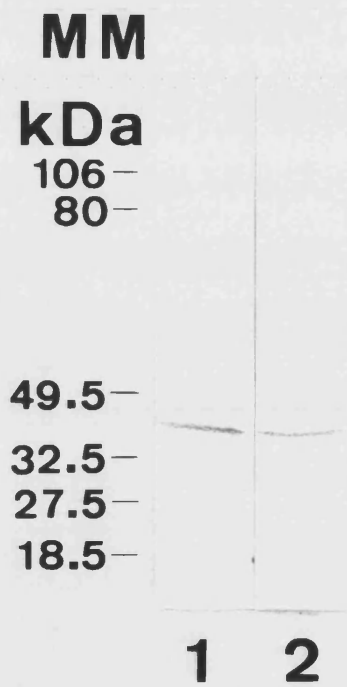


Fig.III.4. Inmunodetección sobre papel de nitrocelulosa de especies proteicas presentes en los diferentes extractos celulares obtenidos de blastosporas (calle 1) y de blastosporas germinadas (calle 2) mediante tratamiento con 2-ME, utilizando como sonda el antisuero policlonal PAb anti-p37 (dilución 1:500) generado frente a la proteína de 37 kDa solubilizada por el 2-ME de las células de la fase levaduriforme (ver texto y Fig.III.1). La cantidad de muestra sometida a electroforesis fue de 100 μ g por pocillo (expresado como contenido total de azúcar). En la parte izquierda del panel se indica la movilidad electroforética de proteínas de peso molecular conocido (expresado en kDa).

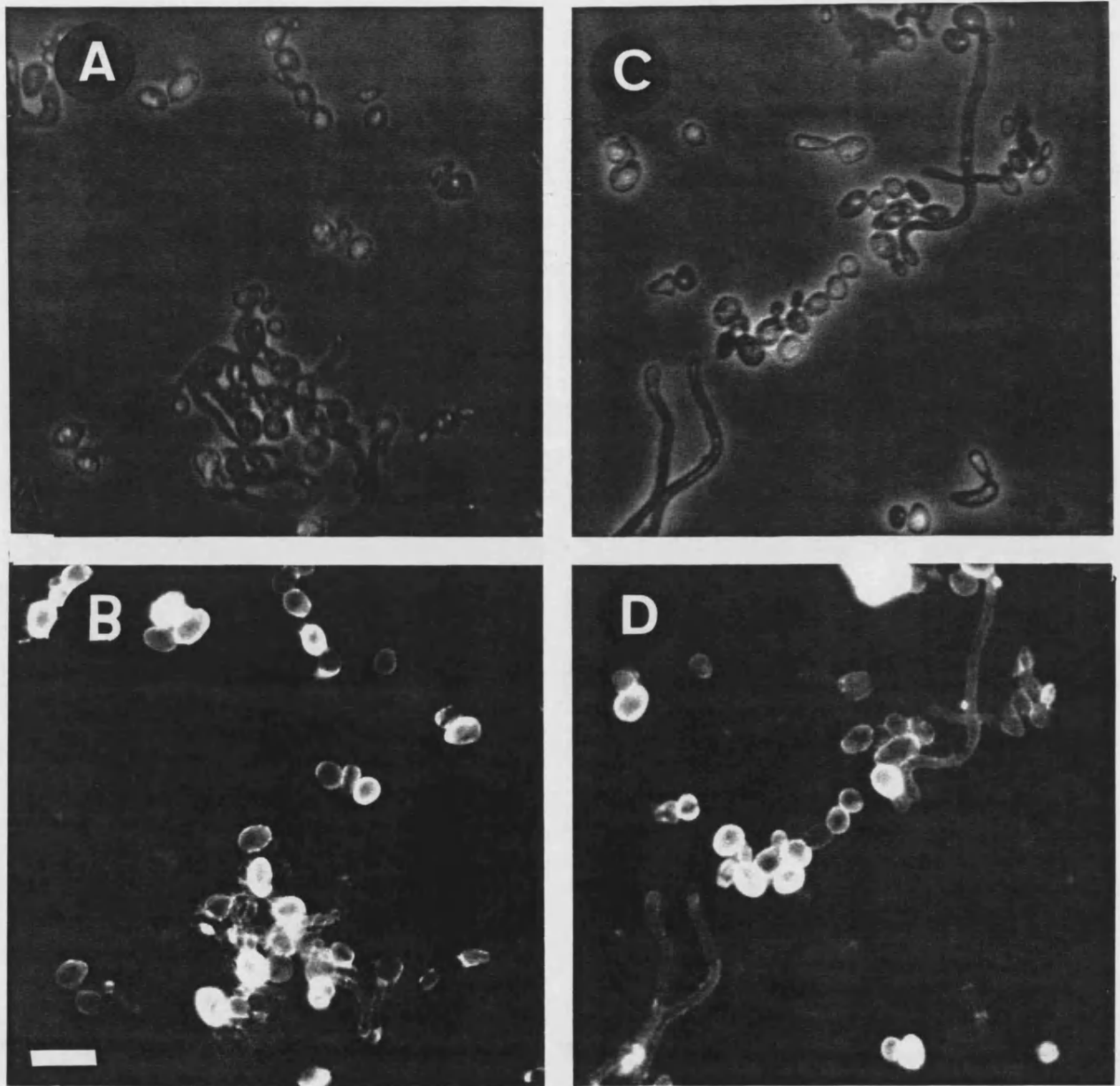


Fig.III.5. Microscopía de contraste de fase (paneles A y C) y de fluorescencia (paneles B y D) de blastosporas (paneles A y B) y blastosporas germinadas (paneles C y D) de *C. albicans* previamente incubadas con el antisuero PAb anti-p37 (dilución 1:10) dirigido frente a la especie proteica de 37 kDa solubilizada por el 2-ME de células levaduriformes. La barra representa 10 μ m en todos los paneles.

mente más accesible en la superficie de las células levaduriformes.

III.3. Caracterización de dominios colagenosos en proteínas de la superficie celular de *C. albicans*

El colágeno tipo IV es el principal componente colagenoso de la membrana basal de los tejidos animales, constituyendo una estructura reticular con la que interaccionan el resto de componentes de la membrana basal (p.ej. laminina y entactina). Así mismo, el colágeno tipo IV también puede interaccionar indirectamente con las células a través de laminina. En este contexto, la unión de colágeno tipo IV con laminina esta mediada por la entactina, una glicoproteína de 150 kDa que posee dominios por los que se une fuertemente con laminina por un lado y con el colágeno tipo IV por otro (Bejarano *et al.*, 1989; Olsen y Ninomiya, 1993).

La adherencia inicial de *C. albicans* a células epiteliales parece ser la etapa crítica en el establecimiento de la candidiasis. Una vez se ha producido la colonización de las mucosas por el hongo, tiene lugar la diseminación de las células de éste a través de las barreras constituidas por la matriz celular endotelial y subendotelial de los tejidos del hospedador, proceso que depende de la interacción entre moléculas complementarias presentes en la superficie tanto del parásito como del hospedador, lo que da lugar a la aparición de focos infecciosos metastásicos por todo el cuerpo del organismo afectado (Hostetter, 1994b). En este contexto, parecen existir bastantes mecanismos que permiten la interacción de las células de *C. albicans* con componentes del suero y tejidos animales a nivel molecular (Calderone y Braun, 1991; Cutler, 1991; Hostetter, 1994b).

Teniendo en cuenta, (i) la presencia en *C. albicans* de receptores para laminina con ho-

mología antigénica con el receptor humano de alta afinidad para dicho componente de la membrana basal (ver apartado III.1), (ii) el hecho de disponer de una serie de anticuerpos policlonales dirigidos contra distintos dominios de la molécula de colágeno tipo IV, y (iii) lo comentado en los dos párrafos anteriores, se consideró de interés ensayar mediante diferentes métodos (inmunotransferencia e inmunofluorescencia) la reactividad de proteínas y manoproteínas de la superficie celular de ambas fases morfológicas de *C. albicans*, para ver si ello permitía la caracterización de nuevos motivos moleculares, mediante los cuales el hongo pudiese interaccionar con los tejidos animales. Los antisueros policlonales utilizados en este bloque de experiencias y que fueron amablemente proporcionados por el Dr. Billy G. Hudson (Kansas University Medical Center, Kansas City, USA) estaban dirigidos contra (i) el dominio amino-terminal 7S rico en cisteína (PAb anti-7S), (ii) el dominio interno colagenoso mayoritario (PAb anti-tipo IV), y (iii) el dominio no colagenoso NC1 de la región carboxiterminal (PAb anti-NC1) de la molécula de colágeno tipo IV.

III.3.1. Inmunofluorescencia indirecta

Mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), la mayor parte de las levaduras no germinadas (alrededor de un 80%) y de las células levaduriformes de las que se originan los filamentos miceliales mostraron una fuerte fluorescencia, cuando se utilizó el PAb anti-7S como sonda, mientras que los tubos germinativos mostraron escasa o nula reactividad frente a dicho anticuerpo (Fig.III.6).

Sin embargo, con el PAb anti-tipo IV se detectó el patrón contrario puesto que en este caso fueron los filamentos miceliales los que, de forma casi exclusiva, mostraron una reacción fluorescente (Fig.III.7). Finalmente cuando se utilizó el PAb anti-NC1 como

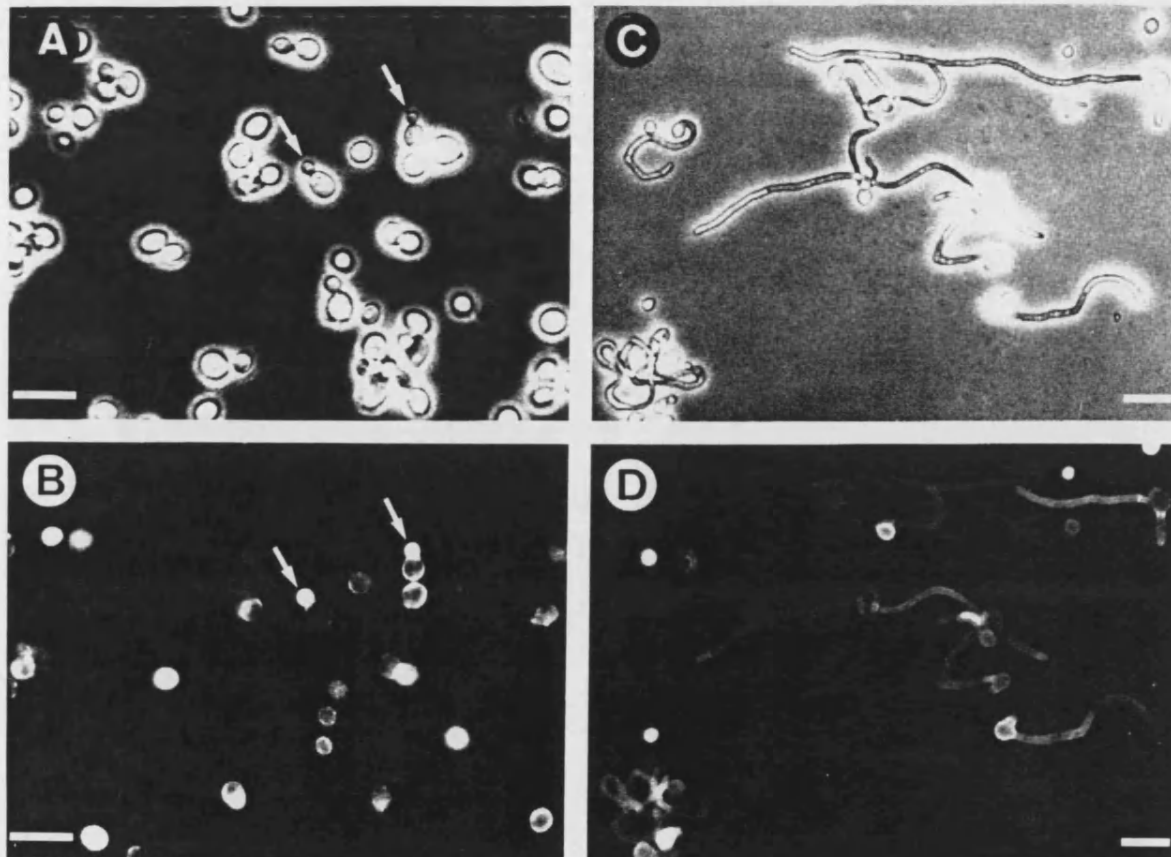


Fig.III.6. Microscopía de contraste de fases (paneles A,C) y de fluorescencia (paneles B,D) de células de *C. albicans* incubadas en condiciones adecuadas para inducir el crecimiento en fase de levadura (paneles A,B) o la formación de tubos germinativos (paneles C,D) en la cepa ATCC 26555. Las células fueron enfrentadas al PAb anti-7S (dil 1:10). La barra representa 10 μ m en todos los paneles.

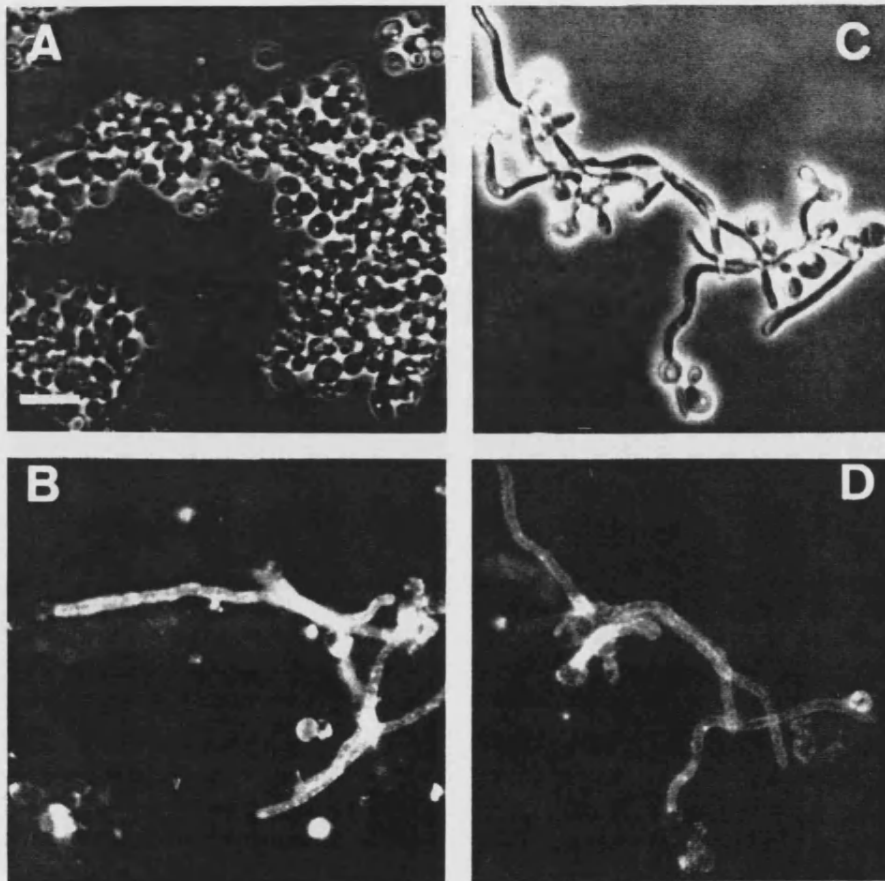


Fig.III.7. Microscopía de contraste de fases (paneles A,C) y de fluorescencia (paneles B,D) de células de *C. albicans* incubadas en condiciones adecuadas para inducir el crecimiento en fase de levadura (paneles A,B) o la formación de tubos germinativos (paneles C,D) en la cepa ATCC 26555. Las células fueron enfrentadas al PAb anti-tipo IV (dil 1:10). La barra en el panel A equivale a 10 μ m y representa la misma escala para todos los paneles.

sonda, no se observó fluorescencia en ninguna de ambas formas de *C. albicans* (no mostrado). En todos los casos la reactividad dependió de la interacción previa de los anticuerpos específicos (PAb anti-7S y PAb anti-tipo IV) con las células, ya que no se observó fluorescencia en los controles en los que se ensayaron las células directamente con el segundo anticuerpo marcador acoplado a FITC. El hecho de que la fluorescencia apareciera, por lo general, irregularmente distribuida por la superficie de las células de *C. albicans*, sugería que las proteínas y/o manoproteínas reactivas con los anticuerpos PAb anti-7S y PAb anti-tipo IV no tenían una distribución homogénea *in vivo*, como sucedía también en el caso de los receptores de *C. albicans* para fibrinógeno (Martínez *et al.*, 1994) y para laminina (el presente trabajo).

III.3.2. Identificación de los componentes presentes en la estructura de la pared celular responsables de la reactividad frente a los anticuerpos anti-colágeno tipo IV

Con objeto de caracterizar a nivel molecular las proteínas y/o manoproteínas que pudieran determinar la reactividad observada frente a los PABs anti-7S y anti-tipo IV por IFI (Figs. III.6 y III.7), se procedió a analizar mediante inmunotransferencia los extractos de 2-ME y Zimoliasa, y los lisados de protoplastos de células levaduriformes y de levaduras germinadas, utilizando como sondas los diferentes antisueros frente a la molécula de colágeno tipo IV.

Entre los polipéptidos liberados por el 2-ME (entre 21-25 especies distribuidas en un rango de 650 a 13 kDa), un polipéptido de 58 kDa, presente en los extractos de ambas fases morfológicas y que corresponde al receptor para fibrinógeno previamente caracterizado por nuestro grupo (Casanova *et al.*, 1992b), fue la principal especie reconocida por el PAb anti-7S (Fig.III.8, flecha), junto con otros

componentes con un peso molecular aparente superior a 106 kDa presentes básicamente en el extracto de 2-ME de levaduras (Fig.III.8, calle 1, estrellas). Así mismo, el PAb anti-7S reconoció otras bandas en el rango de alto peso molecular (>106 kDa) en los extractos obtenidos de levaduras germinadas mediante digestión con Zimoliasa (Fig.III.8, calle 4).

La inmunodetección con el PAb anti-tipo IV reveló básicamente un único polipéptido de 37 kDa en los extractos de 2-ME de ambas fases morfológicas de *C. albicans* (Fig.III.9, calles 1 y 2, flechas), aunque ocasionalmente el PAb anti-tipo IV reconoció también una especie de 50 kDa presente en alguno de los lotes de extracto de 2-ME analizados (Fig.III.10, calle 2). Aunque la identidad y función biológica de esta última especie no es conocida, el polipéptido de 37 kDa que presentó reactividad con el antisuero, corresponde al receptor para laminina previamente caracterizado (ver apartado III.1).

No se detectó banda alguna cuando se utilizó el PAb anti-NC1 como sonda (no mostrado) ni cuando se incubaron las hojas de nitrocelulosa solamente con el anticuerpo marcador acoplado a peroxidasa, hechos que confirmaron la especificidad de la reacción observada con los PABs anti-7S (Fig.III.8) y anti-tipo IV (Fig.III.9). Puesto que los componentes que presentaron reactividad con ambos antisueros fueron detectados en los extractos de ambas morfologías del hongo, las diferencias cualitativas en la reactividad en función de la fase morfológica analizada, observadas en los ensayos de IFI (Fig. III.6 y III.7), sean posiblemente consecuencia de una distinta localización y/o distribución de los componentes inmunoreactivos frente a los PABs anti-7S y anti-tipo IV en la estructura de la pared celular, cuyo grosor es mayor en las células levaduriformes que en los filamentos miceliales (Casanova *et al.*, 1992b).

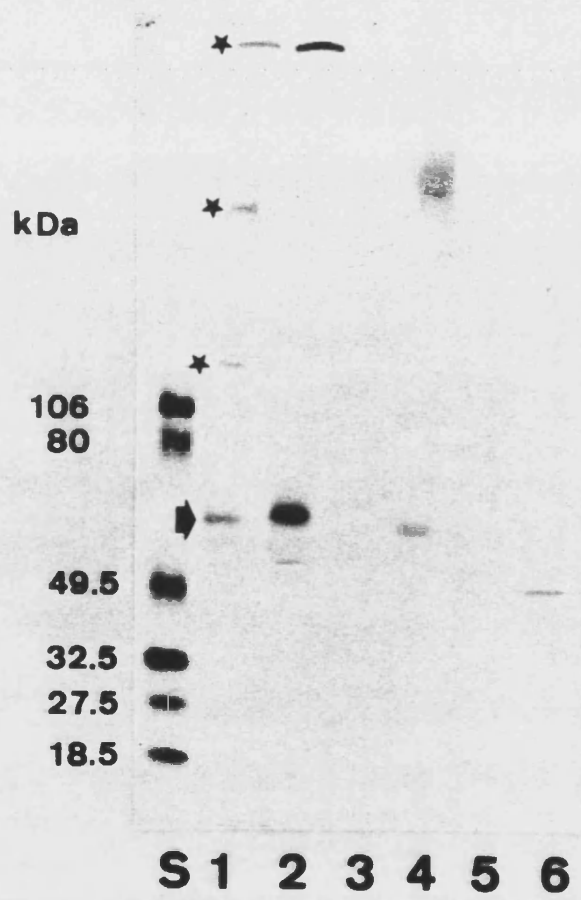


Fig.III.8. Análisis mediante electroforesis en gels en gradiente del 5-15% (SDS-PAGE) seguido de electrotransferencia (Western-blotting) de extractos obtenidos mediante tratamiento con 2-ME (calles 1,2; las muestras aplicadas a cada calle contenían unos 200 μ g de material expresado como contenido en azúcar total), Zimoliasa (calles 3,4; las muestras aplicadas a cada calle contenían la misma cantidad de material expresado como contenido en azúcar total que en el caso de los extractos de 2-ME) y de lisados de protoplastos (calles 5,6; en este caso se aplicaron 15 μ g de material expresado como contenido en proteína total en cada calle) de células levaduriformes (calles 1,3,5) y de levaduras germinadas (calles 2,4,6), utilizando como sonda un anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio 7S de la molécula de colágeno tipo IV (PAb anti-7S) (dilución 1:500). La flecha indica un polipéptido de 58 kDa presente en los extractos de 2-ME de ambas fases morfológicas del hongo (calles 1,2) que exhibe reactividad frente al antisuero. En la calle marcada con la letra S se corrió en paralelo una mezcla de proteínas patrón preteñidas de peso molecular conocido (expresado en kDa).

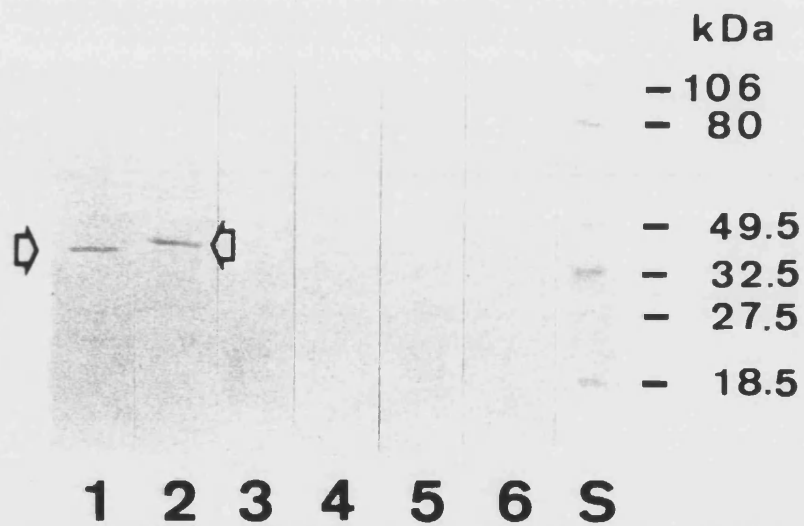


Fig.III.9. Análisis mediante electroforesis en geles en gradiente del 5-15% (SDS-PAGE) y electrotransferencia (Western-blotting) de extractos obtenidos mediante tratamiento con 2-ME (calles 1,2; las muestras aplicadas a cada calle contenían unos 200 μ g de material expresado como contenido en azúcar total), Zimoliasa (calles 3,4; las muestras aplicadas a cada calle contenían la misma cantidad de material expresado como contenido en azúcar total que en el caso de los extractos de 2-ME) y de lisados de protoplastos (calles 5,6; en este caso se aplicaron 15 μ g de material expresado como contenido en proteína total en cada calle) de células levaduriformes (calles 1,3,5) y de blastosporas germinadas (calles 2,4,6), utilizando como sonda un anticuerpo policlonal dirigido contra la molécula de colágeno tipo IV (PAb anti-tipo IV; dilución 1:1.000). Las flechas indican un polipéptido de 37 kDa presente en los extractos de 2-ME de ambas fases morfológicas del hongo (calles 1,2) que exhibe reactividad frente al antisuero. En la calle S se corrió una mezcla de estándares preteñidos de peso molecular conocido (expresado en kDa).

III.3.3. Efecto de tratamientos químicos y enzimáticos sobre la reactividad de los componentes presentes en los extractos de 2-ME frente a los anticuerpos anti-colágeno tipo IV

Con objeto de determinar la naturaleza de los determinantes antigénicos responsables de la reactividad de las moléculas presentes en los extractos de 2-ME y más concretamente, de las especies de 37 y 58 kDa frente a los PAb anti-7S y anti-tipo IV, se ensayó el efecto de varios tratamientos desglicosilantes (tratamiento con Endo H y β -eliminación alcalina) y proteolíticos (digestión con colagenasa) sobre los extractos de 2-ME de células levaduriformes.

La digestión con colagenasa provocó la desaparición de la reactividad de las especies de 37 y 50 kDa frente al PAb anti-tipo IV (Fig.III.10, calle 1). La sensibilidad al tratamiento proteolítico sugiere la presencia de dominios colagenosos en ambos componentes polipeptídicos de la pared celular de *C. albicans*.

El tratamiento de los extractos de 2-ME con Endo-H provocó un descenso del tamaño molecular de la manoproteína de 58 kDa reactiva con el PAb anti-7S (Fig.III.11, panel A, calles 1, flecha negra) hasta una especie de 47 kDa que mantuvo inalterada su reactividad con dicho anticuerpo (Fig.III.11, panel A, calle 2, flecha blanca). Así mismo la digestión con la glicosidasa provocó la transformación del material polidisperso de alto peso molecular (>106 kDa) reconocido por el PAb anti-7S (Fig.III.11, panel A, calle 1) en dos bandas discretas que todavía fueron capaces de reaccionar con el antisuero (Fig. III.11, panel A, calle 2, estrellas).

La desglicosilación subsiguiente mediante β -eliminación o la digestión con colagenasa del extracto de 2-ME previamente tratado con Endo H, no modificó sustancialmente la

reactividad frente al PAb anti-7S (Fig.III.11, paneles B y C respectivamente), respecto de lo observado en la muestra tratada con la glicosidasa solamente (Fig.III.11, panel A, calle 2) en relación con la especie de 58 kDa (47 kDa), aunque el tratamiento solamente con colagenasa provocó la desaparición de la reactividad del material polidisperso de elevado peso molecular con el antisuero (Fig. III.11, panel B) La digestión del extracto de 2-ME con Endo H seguida o no del tratamiento de β -eliminación alcalina se tradujo en cambios en la movilidad electroforética de la especie de 58 kDa previstos de acuerdo con lo descrito anteriormente por nuestro grupo (Casanova *et al.*, 1992b), pero sin afectar la reactividad de dicha especie con el PAb anti-7S (Fig.III.12)

Todos estos resultados indican que el epítopo reconocido por el PAb anti-7S en la especie de 58 kDa se encontraría localizado en la cadena polipeptídica de esta manoproteína, y mimetiza la región amino terminal de la molécula de colágeno tipo IV (dominio 7S), que es colagenosa y totalmente resistente a la acción de la colagenasa (Langeveld *et al.*, 1987). Sin embargo, la ausencia de reactividad del material de alto peso molecular (>106 kDa) frente al PAb anti-7S tras el tratamiento con colagenasa (Fig.III.11, panel B), sugiere la existencia de dominios colagenosos sensibles a la colagenasa en estas especies, aunque el subsiguiente tratamiento con Endo H, puso de manifiesto la existencia de al menos un polipéptido resistente a la colagenasa en el material de alto peso molecular solubilizado por el 2-ME de la pared celular de las levaduras (Fig.III.1, panel C, flecha). En cualquier caso, no debe descartarse la posibilidad de que el tratamiento con la glicosidasa pudiera provocar cambios conformacionales en alguna de las moléculas de alto peso molecular,

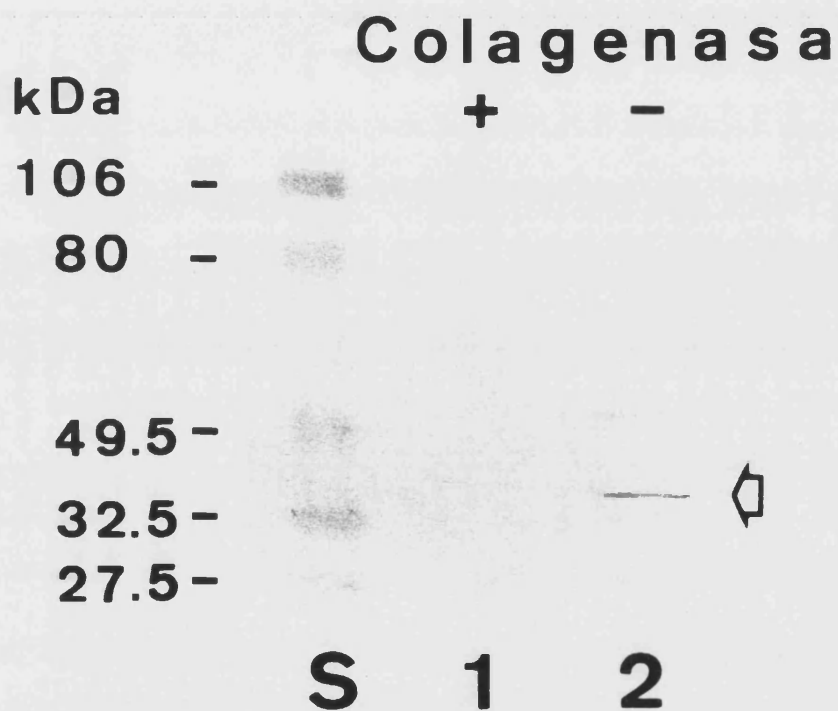


Fig.III.10. Efecto del tratamiento con colagenasa del extracto de 2-ME obtenido de células levaduriformes sobre la reactividad de la especie de 37 kDa (p37) frente al PAb anti-tipo IV (ver leyenda de la Fig.III.6. para obtener información complementaria). Las muestras tratadas (+) y no tratadas (-) con colagenasa se separaron mediante SDS-PAGE con un gradiente del 5 al 15% de acrilamida, los polipéptidos separados se transfirieron a nitrocelulosa y se inmunodetectaron con el antisuero PAb anti-tipo IV (dilución 1:1.000). La cantidad de muestra aplicada en las calles 1 y 2 fue de 200 µg por pocillo (expresado como contenido total de azúcar). En la parte izquierda del panel se indica la movilidad electroforética de proteínas de peso molecular conocido (expresado en kDa).

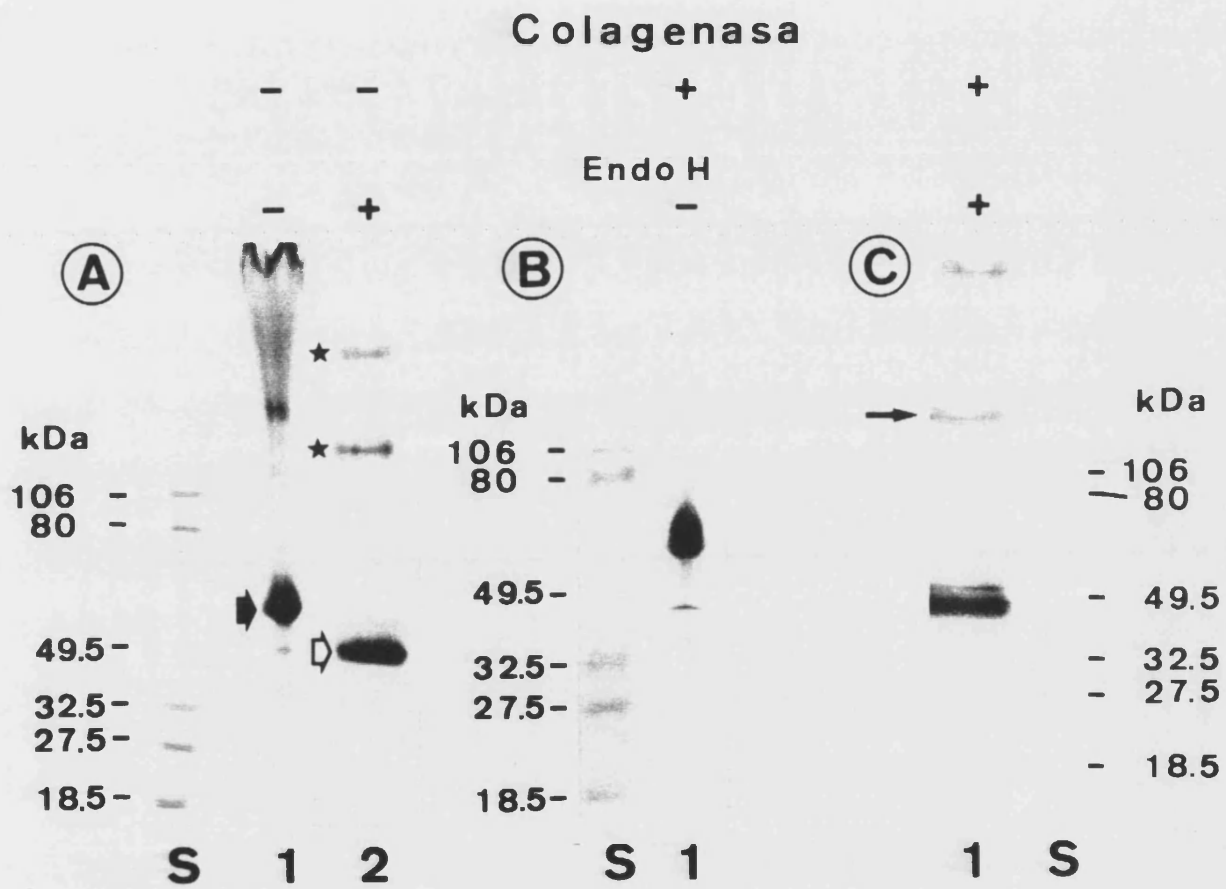


Fig. III.11. Efecto de tratamientos proteolíticos (digestión con colagenasa) y/o desglucosilantes (digestión con endo H) sobre la reactividad del material liberado por el 2-ME de blastosporas germinadas frente al PAb anti-7S. El material solubilizado por el 2-ME fue digerido independiente o secuencialmente con colagenasa y endo H (calles marcadas +) y comparado con el material sin tratar (panel A, calle 1). Las muestras (200 μ g por pocillo expresados como contenido total de azúcar) se separaron mediante SDS-PAGE en geles en gradiente del 5-15% de acrilamida. Los polipéptidos separados fueron transferidos a papel de nitrocelulosa, procediéndose a su inmunodetección con el antisuero. La movilidad electroforética de proteínas de peso molecular conocido (expresado en kDa) corridas en paralelo (calles marcadas con la letra S) se muestra en los diferentes paneles.

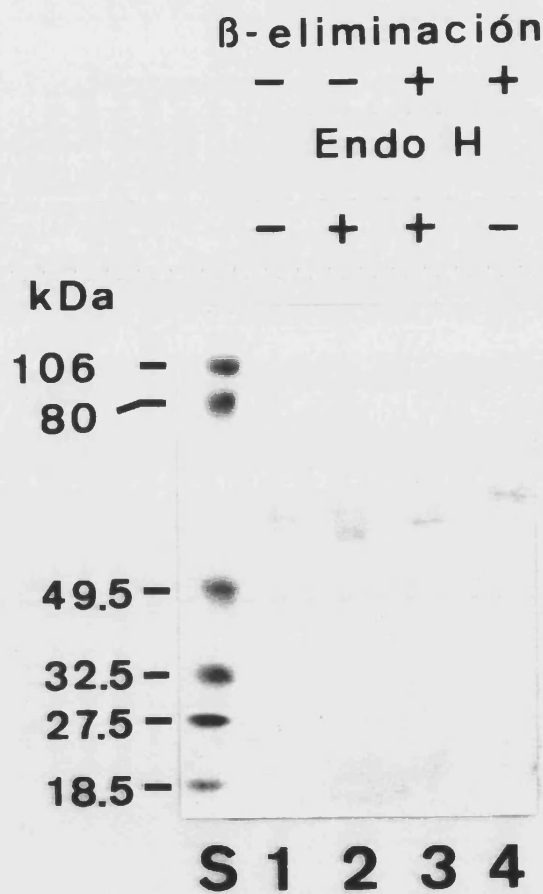


Fig.III.12. Efecto de los diferentes tratamientos desglucosilantes (digestión con endo H y/o β-eliminación alcalina; ver Materiales y Métodos) del extracto de 2-ME obtenido a partir de levaduras germinadas, sobre la reactividad frente al PAb anti-7S. Las muestras aplicadas a cada calle contenían unos 200 μg de material (expresado como contenido de azúcar total). Tras la electroforesis en geles de gradiente de acrilamida (5-15%), los polipéptidos separados fueron transferidos a papel de nitrocelulosa, incubándose seguidamente las hojas en una dilución 1:500 del antisuero. A la izquierda de la figura se indica el peso molecular (expresado en kDa) de proteínas estándar preteñidas corridas en paralelo (calle marcada con la letra S).

que se tradujesen en un aumento en la resistencia a la proteólisis.

En conjunto, los resultados descritos en este apartado sugieren que varias proteínas y manoproteínas que son componentes genuinos de la pared celular de *C. albicans*, incluyendo el receptor de 58 kDa para fibrinógeno (Casanova *et al.*, 1992b) y el receptor para laminina 37 kDa caracterizado en el presente trabajo, poseen epitopos que mimetizan dominios o secuencias colagenosas de la molécula de colágeno tipo IV. Los cambios en la respuesta frente a los PABs anti-7S y anti-tipo IV, observados tras los tratamientos desglucosilantes y/o proteolíticos, indican que tales dominios estarían determinados por la secuencia de aminoácidos, más que por los restos azucarados unidos N y/o O-glicosídicamente a las cadenas polipeptídicas.

La reactividad cruzada observada entre los anticuerpos anti-colágeno y algunos componentes celulares de *C. albicans* no es un hecho excesivamente sorprendente, puesto que se ha descrito una situación semejante con antisueros dirigidos frente a proteínas animales como el receptor de alta afinidad para laminina (el presente trabajo) y la subunidad $\beta 1$ de la integrina de pollo (Marcantonio y Hynes, 1988). En cualquier caso, y teniendo en cuenta la diversidad de especies existentes en los extractos de *C. albicans* analizados (alrededor de 20 polipéptidos diferentes en el caso de los extractos de 2-ME), el hecho de que el PAB anti-tipo IV reconozca básicamente la especie de 37 kDa y que con el PAB anti-7S se identifiquen sólo entre 1 y 4 bandas (dependiendo de la forma de crecimiento, micelio o levadura, considerada), habla por sí sólo de la especificidad de la inmunorreactividad observada con dichos antisueros. La ausencia de reactividad con el PAB anti-NC1, que está dirigido contra el dominio carboxiterminal no colagenoso de la molécula

de colágeno tipo IV, es una evidencia más en este sentido.

Las dos bandas mayoritarias reconocidas por los anticuerpos PABs anti-7S y anti-tipo IV (las especies de 58 y 37 kDa) están presentes en ambas fases morfológicas del hongo. Sin embargo, aunque el receptor de 58 kDa para fibrinógeno se encuentra en la pared celular de la levadura y del micelio y es biológicamente funcional en ambos casos, (Casanova *et al.*, 1992b), el receptor de 37 kDa para laminina exhibió capacidad para interactuar con el ligando sólo en el caso de las blastosporas, si bien los extractos de 2-ME de micelio también contienen una especie de 37 kDa, que fue reconocida por anticuerpos dirigidos contra el receptor humano de alta afinidad para laminina, pero no mostró capacidad alguna para interactuar con laminina (ver apartado III.1 de la presente memoria). En este contexto, la presencia de dominios colagenosos en la especie de 37 kDa podrían determinar una vía alternativa, y esto sería particularmente significativo en el caso de los filamentos miceliales, por la que este componente de la pared celular del hongo interaccionase con laminina a través de entactina (Fox *et al.*, 1991). La existencia de dichos dominios colagenosos podría ser responsable, al menos en parte, de la capacidad que muestran las células de *C. albicans* para interactuar con entactina (López-Ribot y Chaffin, 1994). Además ha sido descrito recientemente que el dominio de la fibronectina que interacciona con colágeno y gelatina, posee un lugar de unión de alta afinidad por *C. albicans* (Négre, *et al.*, 1994). Parece obvio, pues, que la presencia de dominios colagenosos en algunas proteínas y manoproteínas de la pared celular del hongo, tal como se ha puesto de manifiesto en la presente memoria, podría determinar la existencia de más de un receptor para fibronectina en *C. albicans*

como ha sido sugerida por algunos autores (Klotz y Smith, 1991; Klotz *et al.*, 1992). Dichos dominios colagenosos podrían jugar un papel importante en las interacciones proteína-proteína, que son una de las tres categorías de mecanismos de adhesión propuestos para *C. albicans* y que parecen estar mediadas por adhesinas que serían análogos de integrinas (semejantes a las moléculas del tipo CR2 y CR3) presentes en la superficie de las células del hongo (Calderone *et al.*, 1991; Cutler, 1991; Hostetter, 1994b). Debido a una serie de características (peso molecular y afinidad por diversos ligandos) compartidas por las adhesinas de *Candida* que muestran propiedades semejantes a las integrinas, se ha sugerido que diferentes actividades funcionales observadas, podrían residir en una única molécula, que sería capaz de reconocer la parte proteica de diversas glicoproteínas del hospedador que poseyeran la secuencia RGD (arginina-glicina-aspartico), como los componentes del complemento C3d e iC3b, fibronectina, colágeno tipos I y IV, laminina, fibrinógeno y fibrina (Cutler, 1991). Sin embargo esta idea es poco sostenible por varias razones. En primer lugar, parece difícil explicar cómo se pueden acomodar simultáneamente varios dominios adhesivos para ligandos animales de gran tamaño molecular en una única proteína de la pared celular del hongo (Hostetter, 1994b). En este contexto hay que destacar, además, que los receptores caracterizados hasta el momento en los extractos de *C. albicans* son proteínas de medio y bajo peso molecular. En segundo lugar, existen evidencias de que los ligandos no son intercambiables (Bouali, *et al.*, 1986, 1987; Klotz y Smith, 1991; Tronchin, *et al.*, 1987). En tercer lugar, se han caracterizado distintos receptores en *Candida* para un mismo ligando (laminina) animal (Bouchara, *et al.*, 1990; López-Ribot, *et al.*, 1991, el presente trabajo). Por último, dos de las adhesinas del

hongo mejor caracterizadas hasta el momento, los receptores para C3d (Calderone *et al.*, 1988) y fibrinógeno (Casanova *et al.*, 1992b), parecen ser entidades funcional y bioquímicamente distintas (López-Ribot *et al.*, 1995). En cualquier caso, la existencia de dominios colagenosos en algunos componentes de la pared celular de *C. albicans*, incluyendo el receptor manoproteico de 58 kDa para fibrinógeno y la proteína de 37 kDa receptora para laminina (Casanova *et al.*, 1992b; el presente trabajo), y posiblemente también el receptor para el C3d (Calderone *et al.*, 1988; la ancha banda reconocida por el PAb anti-7S en el rango de peso molecular medio [Fig.III.11, paneles A y B] pudiera representar un grupo de polipéptidos que incluyeran los receptores para el C3d y fibrinógeno, puesto que ambos tienen un tamaño molecular semejante [alrededor de 60 kDa]), podría explicar la reactividad funcional cruzada entre adhesinas encontrada por algunos autores. Concretamente en el caso de la fibronectina, se ha sugerido que *C. albicans* poseería un receptor "promiscuo" para este ligando, que (Négre, *et al.*; 1994) sería análogo al receptor "basurero" de los macrófagos, que contiene un dominio colagenoso (Krieger, 1992) y/o al receptor del *Staphylococcus* para fibronectina, que es capaz de reconocer con distinta afinidad múltiples dominios del ligando (Bozzini *et al.*, 1992). Las observaciones mostradas en esta memoria, podrían explicar la existencia del receptor "promiscuo" para fibronectina sugerida por Négre *et al.* (1994).

Finalmente, teniendo en cuenta la existencia de proteínas y manoproteínas en la superficie de *C. albicans* que exhiben propiedades adhesivas parecidas a las de las lectinas y que son capaces de interactuar con factores del complemento (Alaei *et al.*, 1993; Brassart *et al.*, 1991; Critchley y Douglas, 1987; Gil-

more *et al.*, 1988; Tosh y Douglas, 1992) y la existencia de secuencias colagenosas en algunas proteínas de la superficie celular del hongo (el presente trabajo), puede hipotetizarse que en la pared de *C. albicans* existan especies proteicas análogas a las "colectinas" de mamíferos, término empleado para describir un grupo de proteínas que poseen dominios colagenosos, están asociadas a un receptor de complemento y tienen actividades tipo lectina (ligan carbohidratos) (Malhotra, 1992), además de estar implicadas en varias funciones efectoras e inmunomoduladoras (Jensenius *et al.*, 1994 y Turner, 1994), funciones que al menos en parte (la inmunomodulación) han sido asignadas a las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* (Cassone, 1989).

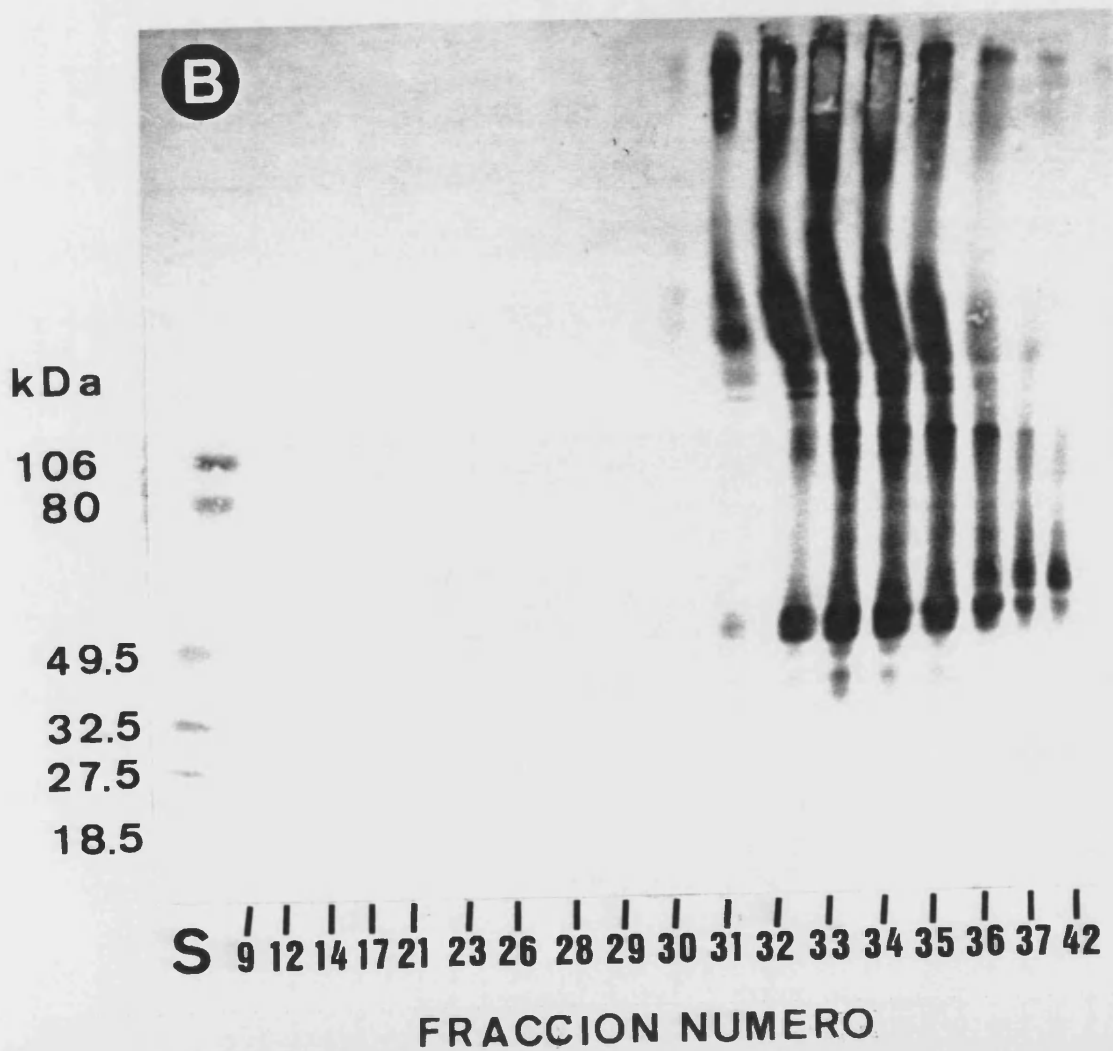
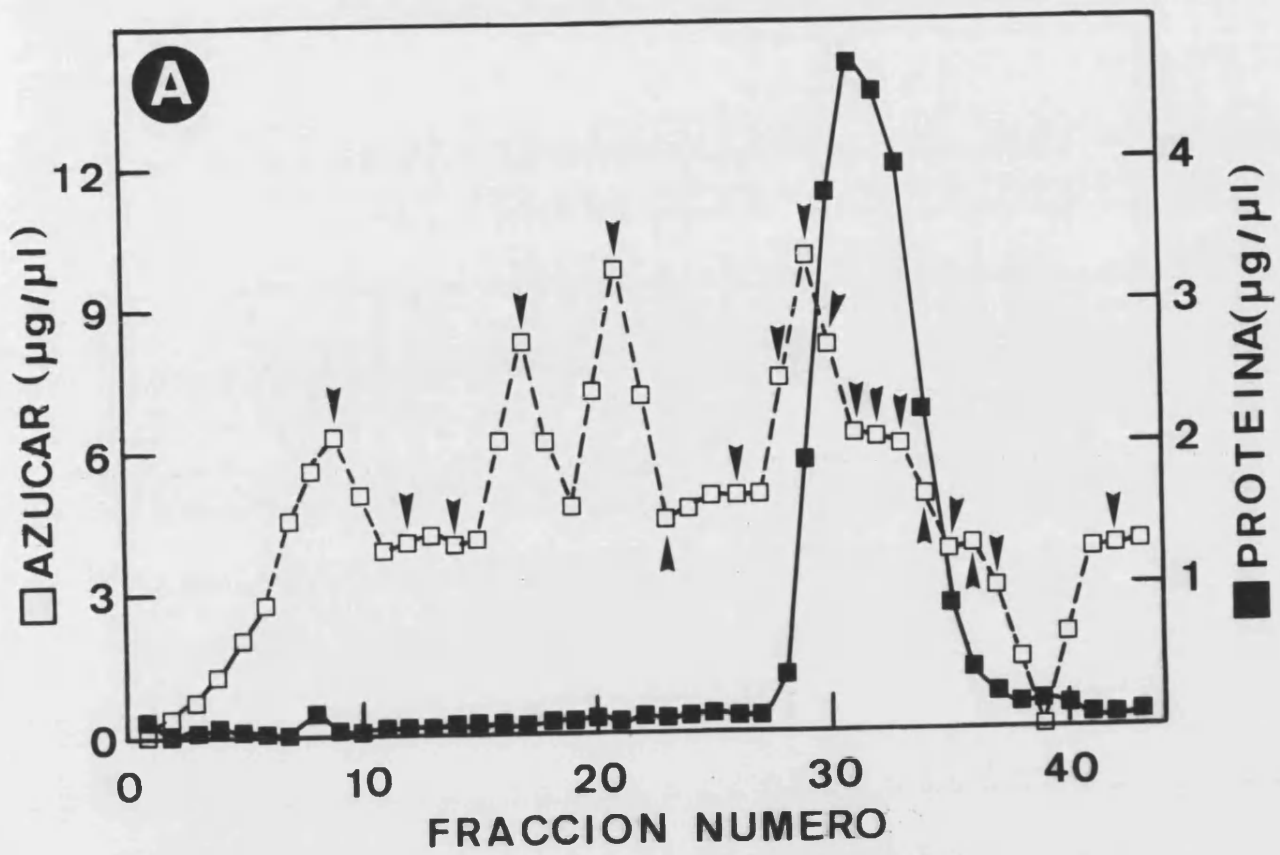
III.4. Análisis cromatográfico del material solubilizado de la superficie celular de *C. albicans* mediante tratamiento con 2-ME

Con objeto de conocer el estado nativo en el que se encuentran los componentes proteicos y/o glicoproteicos presentes en los extractos de 2-ME, el tipo de interacciones que puedan existir entre los mismos, así como para poner a punto una metodología que permitiera eventualmente la purificación individualizada de algunas especies de interés (p.ej. los receptores para laminina y fibrinógeno; ver apartados anteriores), se procedió a analizar mediante cromatografía de filtración molecular (Fig. III.13) y de intercambio iónico (Fig. III.14) el extracto obtenido tras el tratamiento de blastosporas con 2-ME, de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado II.22 del capítulo de Materiales y Métodos.

El perfil de elución cromatográfica obtenido en una columna de Sephadex G-100 mostró varios picos en función de la cantidad de azúcar total presente en cada fracción

eluida (Fig. III.13, panel A, cuadrados blancos) y que correspondían a complejos de naturaleza carbohidrato de diferente tamaño molecular, mientras que la valoración en paralelo de la concentración de proteína en las diferentes fracciones dió como resultado la aparición de un único pico relativamente simétrico (Fig. III.13, panel A, cuadrados negros) y parcialmente solapado con el pico de naturaleza glucídica de menor tamaño molecular (Fig. III.13, panel A, fracciones 26-36).

Cuando se analizaron mediante SDS-PAGE y electrotransferencia seguida de tinción con Con A-peroxidasa, una serie de fracciones escogidas dentro de cada uno de los diferentes picos (Fig. III.13, panel A, puntas de flechas), solo se detectaron bandas en algunas de las fracciones integradas en el pico de proteína (Fig. III.13, panel B, fracciones 31-37), observándose un patrón asimétrico de distribución, siendo más abundantes los componentes de elevado peso molecular aparente en las fracciones correspondientes a un menor volumen de elución que en aquellas que eluyeron a un volumen mayor. En cualquier caso las diferencias observadas fueron más de tipo cualitativo que cuantitativo, ya que muchas de las especies manoproteicas se detectaron con mayor o menor intensidad (aunque no es posible establecer una relación de proporcionalidad directa entre la intensidad de una banda detectada mediante tinción con Con A-peroxidasa y concentración real de dicha banda en la muestra analizada) en las distintas fracciones, detectándose simultáneamente en todas ellas, especies dentro de un rango muy amplio de peso molecular aparente. Estos resultados sugieren que los componentes proteicos y/o glicoproteicos podrían haber sufrido un proceso de reagrupación espontánea al desaparecer el efecto disociante del 2-ME durante la elución cromatográfica o bien que en realidad tales componentes son extraídos de la pared celular por el 2-ME en forma de



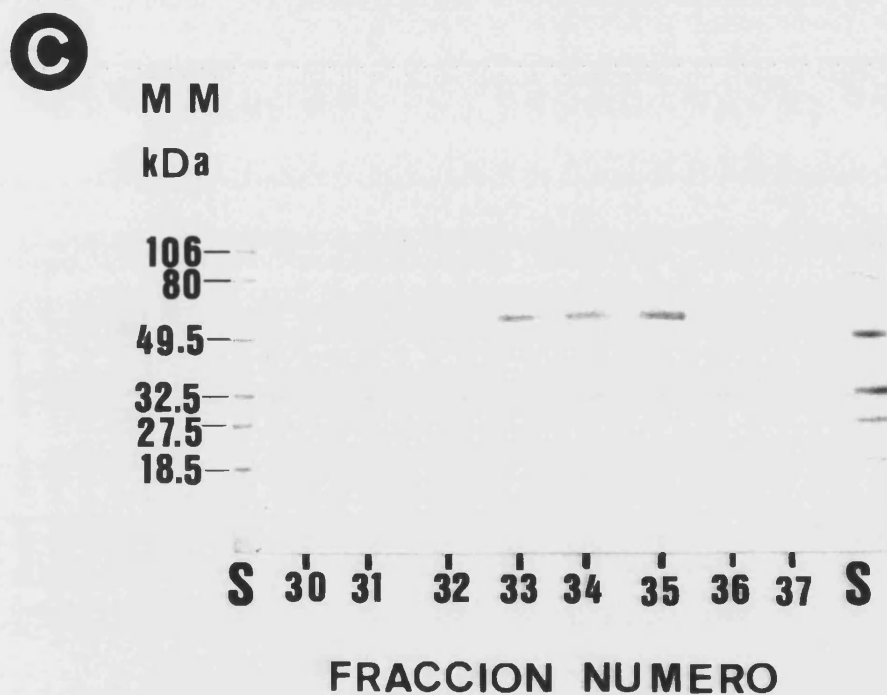
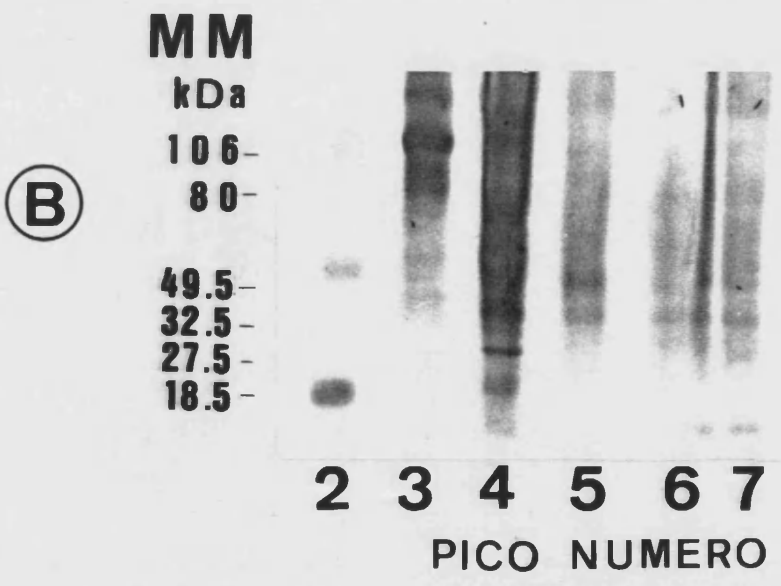
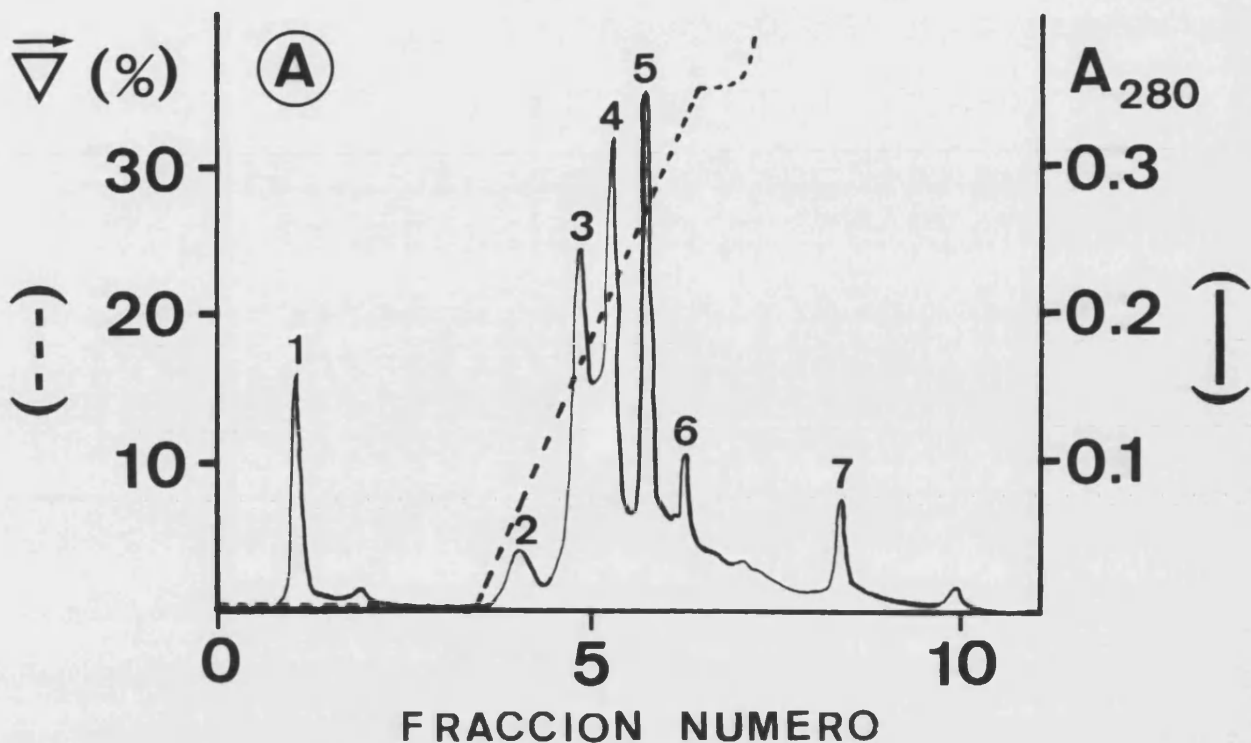


Fig.III.13. Análisis del material liberado por 2-ME de células levaduriformes de *C. albicans* ATCC 26555, mediante cromatografía de filtración molecular en columna de Sephadex G-100 (panel A) y electroforesis seguida de electrotransferencia y subsiguiente detección con Con A acoplada a peroxidasa (panel B) y PAb anti-mp58 (panel C). Un volumen de 2 ml de extracto de 2-ME conteniendo 2 mg de material (expresado como contenido de azúcar total) fue aplicado a la columna procediéndose a eluir la muestra con tampón PBS (tampón fosfato sódico, 10 mM, pH 7,4, NaCl, 0,9 %) en las condiciones descritas en el apartado II.21.3.1 del capítulo de Materiales y Métodos. Una vez recogidas las diferentes fracciones se procedió a valorar en las mismas el contenido de azúcar total y proteína por los métodos de Dubois *et al.* (1956) y Lowry *et al.* (1951) respectivamente. Las fracciones indicadas con puntos de flecha se sometieron a posterior análisis electroforético como se describe a continuación. Las fracciones fueron previamente dializadas, concentradas por liofilización y resuspendidas en un pequeño volumen de agua destilada. Muestras de las diferentes fracciones concentradas conteniendo 10 μ g de material cada una de ellas (expresado como contenido de azúcar total) fueron sometidas a electroforesis en geles en gradiente de poliacrilamida (5-15%); los polipéptidos separados electroforéticamente se transfirieron a papel de nitrocelulosa, procediéndose seguidamente a su detección mediante tinción con Con A acoplada a peroxidasa (panel B) y con el PAb anti-mp58 (panel C) utilizado a una dilución 1:500. En las calles marcadas con la letra S en los paneles B y C, se corrió en paralelo una mezcla de proteínas estándar preteñidas de peso molecular conocido que se indica expresado en kDa a la izquierda de cada panel.

Fig.III.14. Análisis del material liberado por 2-ME de células levaduriformes (blastosporas) de *C. albicans* ATCC 26555 mediante cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa (panel A) y electroforesis seguida de electrotransferencia y subsiguiente detección con Con A acoplada a peroxidasa (panel B) y PAb anti-mp58 (panel C). Un volumen de 150 μ l de extracto de 2-ME conteniendo 500 μ g de material (expresado como contenido en azúcar total) fue aplicado a la columna procediéndose a eluir la muestra con un flujo de 4 ml/min en las condiciones descritas en el apartado II.22.1. Las fracciones fueron recogidas a tiempos variables (todos inferiores a 1 min), haciéndose coincidir cada fracción recogida con los diferentes picos de A₂₈₀ a medida que éstos fueron detectándose en el registrador. Las diferentes fracciones recolectadas fueron seguidamente dializadas, concentradas por liofilización y resuspendidas en un pequeño volumen de agua destilada. Muestras de las fracciones concentradas conteniendo 10 μ g de azúcar de material cada una de ellas (expresada como contenido de azúcar total) fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente (5-15 %), los polipéptidos separados se transfirieron a papel de nitrocelulosa, procediéndose seguidamente a su detección con Con A acoplada a peroxidasa (panel B) y con el PAb anti-mp58 (panel C). La movilidad electroforética de proteínas patrón de peso molecular conocido (expresado en kDa) se indica a la izquierda de los paneles B y C.



complejos multiproteicos, aunque la ligera asimetría del perfil de elución determinado midiendo la concentración de proteína y las diferencias cualitativas detectadas en los perfiles electroforéticos, apuntan hacia la segunda posibilidad. La inmunodetección con el antisuero policlonal frente al receptor de fibrinógeno de *C. albicans* (PAb anti-mp58; Casanova *et al.*, 1992b), puso de manifiesto la presencia de éste en las fracciones proteicas 33-35 (Fig.III.13, panel C), que son las que mostraron una mayor riqueza de bandas manoproteicas (Fig.III.13, panel B), lo que sugiere que el receptor para fibrinógeno podría encontrarse en su estado nativo en la pared celular formando parte de complejos con otros componentes proteicos y/o glicoproteicos de aquella.

Las fracciones seleccionadas, entre las que integran los diferentes picos de naturaleza glucídica (Fig.III.13, fracciones 1-30), para su análisis por SDS-PAGE y electrotransferencia acoplada a tinción con Con A-peroxidasa, no mostraron poseer componente alguno que pudiera resolverse mediante electroforesis, probablemente por contener material exclusivamente de naturaleza carbohidrato y de muy elevado peso molecular, y que por ambas razones no penetraría en los geles de poli(acrilamida) utilizados (Fig.III.13, panel B).

El análisis por cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa del extracto de 2-ME tanto nativo como desnaturalizado mediante tratamiento térmico (100°C, 5 min), condujo en todos los casos a la obtención del perfil de elución (que en este caso se determinó midiendo la A_{280} del eluido cromatográfico) que se muestra en el panel A de la Fig.III.14. El gradiente de fuerza iónica aplicado para provocar la elución del material retenido en la columna, resolvió un total de 6 picos (marcados del 2-7). El análisis de los componentes macromoleculares eluidos en

cada pico, mediante SDS-PAGE y electrotransferencia acoplada a tinción con Con A-peroxidasa (Fig.III.14, panel B) o inmunodetección con el PAb anti-mp58 (Fig.III.14, panel C), reveló nuevamente un perfil electroforético complejo en la mayor parte de los casos, detectándose especies manoproteicas distribuidas dentro de un amplio rango de peso molecular. Aunque las diferencias cualitativas observadas en este caso fueron más acusadas que las que se apreciaron en el análisis equivalente realizado a partir de los picos obtenidos tras la cromatografía de filtración molecular (Fig.III.13), nuevamente da la impresión de que el 2-ME extrae de la pared complejos multiproteicos cualitativa y/o cuantitativamente distintos entre sí, y en los que algunos de los componentes serían comunes, como es el caso de la especie de 58 kDa receptora para fibrinógeno, que solo se detectó en el material eluido en los picos 2-4 (Fig.III.14, panel C), mientras que otros serían específicos de cada complejo. Mediante tinción con azul de Coomassie e inmunodetección con el PAb anti-p37, se puso de manifiesto que la proteína de 37 kDa receptora para laminina, eluye junto con otros polipéptidos en el pico número 7 (no mostrado), aunque dicha especie no sea apreciable en la calle 7 del panel B de la Fig.III.14, que muestra el patrón de manoproteínas revelado mediante tinción con Con A-peroxidasa, dado que el receptor para laminina no contiene restos azucarados reactivos frente a la Con A. Este comportamiento cromatográfico, indica que la especie de 37 kDa posee un fuerte carácter electronegativo, ya que fue necesaria una concentración de 1 M de NaCl para lograr que eluyera de la columna de DEAE-celulosa.

Del conjunto de los resultados obtenidos del análisis cromatográfico se pueden extraer básicamente dos conclusiones de carácter general: (i) el 2-ME extrae componentes proteicos y manoproteicos de la pared celular de

C. albicans que *in vivo* se encuentran aparentemente formando complejos, lo que podría modular el papel funcional y/o estructural que distintos componentes pudieran desempeñar en la pared celular, y (ii) la purificación de forma individualizada de especies que pudieran tener interés tanto desde el punto de vista básico como aplicado (p.ej. como marcadores antigénicos específicos) mediante cromatografía, parece difícil de conseguir, al menos con los dos tipos de matrices y técnicas cromatográficas empleadas en este trabajo, debidas a las interacciones que parecen existir entre las moléculas presentes en los extractos de 2-ME.

III.5. Clonación del ADNc que codifica para la especie p37

Una vez caracterizada la especie proteica de 37 kDa como receptor para laminina y debido a la dificultad de aislarla mediante métodos cromatográficos como se indicó en el apartado anterior, se procedió al clonaje del gen que pudiera codificar para dicha proteína. Este objetivo se abordó partiendo de la base de que la clonación de genes que codifiquen para proteínas implicadas en la virulencia, como puede ser el caso de la especie p37, así como la obtención mediante técnicas de ADN recombinante de tales proteínas, permitiría elucidar de forma precisa la relación estructura/función de las mismas, y facilitaría su utilización en el diseño y puesta a punto de métodos de diagnóstico serológico de las candidiasis y en la búsqueda de compuestos de potencial aplicación terapéutica.

Algunos de los métodos que se han utilizado para el aislamiento de genes en *C. albicans* se basan en la complementación de mutaciones en *S. cerevisiae* (Jenkinson *et al.*, 1988 y Rosenbluh *et al.*, 1985), la homología de secuencias (Lott *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1988) y en la capacidad de ciertos genes de *C. albicans* de conferir determi-

nados fenotipos a cepas de *Saccharomyces* (Magee *et al.*, 1988), tales como la resistencia a fungicidas.

En nuestro caso particular ninguno de estos métodos era útil, puesto que no se ha descrito la existencia de receptores para laminina en *Saccharomyces*, por lo que la estrategia de clonaje se centró en el rastreo de genotecas de expresión con anticuerpos dirigidos frente a dicho receptor.

III.5.1. Genoteca de ADNc empleada

Se empleó una genoteca de ADNc preparada a partir de ARNms obtenidos de células de *C. albicans* 3153A después de 30 min de inducción de la formación de los tubos germinativos. Dicha genoteca, en la que se estimó la existencia de unos 5,8 millones de clones de los cuales el 98 % eran recombinantes, fue cedida amablemente por la Dra. La Jean Chaffin (Lubbock, USA) y una descripción más detallada de la misma se indica en apartado II.24 del capítulo de Materiales y Métodos (Alloush *et al.*, 1995, en prensa).

III.5.2. Antisueros policlonales utilizados para el rastreo

Los antisueros policlonales anti-p37 y anti-tipo IV previamente definidos (ver apartados III.2 y III.3.2 de este capítulo) se utilizaron para aislar los clones de ADNc que pudieran codificar para el receptor de laminina. Dichos antisueros reconocen específicamente la p37 en los materiales solubilizados por el 2-ME, tanto en células levaduriformes como miceliales (Figs. III.4 y III.9).

III.5.3. Rastreo de la genoteca de ADNc

Inicialmente se analizaron unos 60.000 clones de la genoteca de ADNc (ver apartado II.24 del capítulo de Materiales y Métodos) mediante el rastreo con el antisuero PAb anti-p37, encontrándose 12 clones que inmuno-

rraccionaron con dicho antisuero. A continuación, cada uno de los clones, una vez aislados y amplificados (ver el método descrito en los apartados II.23 y II.24), se ensayó frente al PAb anti-tipo IV, detectándose en todos los casos una mayor o menor reactividad tal como se indica se indica en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Reactividad de los clones positivos aislados de la genoteca de λ gt11 mediante el rastreo con los anticuerpos PAb anti-p37 y PAb anti-tipo IV. +++, reactividad intensa; ++, reactividad intermedia; +, reactividad débil; - reactividad nula. Los clones 13 y 14 se ensayaron como controles negativos de la actuación de los anticuerpos.

Nº clon	PAb anti-p37	PAb anti-tipoIV	PAb anti-p37 λ
1	++	++	+
2	++	++	++
3	++	++	+
4	++	++	+
5	++	++	++
6	++	++	+
7	++	++	+
8	++	++	++
9	++	++	+
10	++	+++	-
11	++	+++	-
12	++	++	++
13	-	-	-
14	-	-	-

Finalmente y para descartar aquellos clones preseleccionados cuya reactividad frente al antisuero pudiera ser debida a una reacción cruzada con proteínas del bacteriófago λ gt11 o de *E. coli* presentes en las calvas de lisis, el antisuero se pretrató con una solución de lisado fágico de λ gt11 (PAb anti-p37 λ) tal y como se describió en el apartado II.23. De este modo se bloquearon selectivamente del suero las inmunoglobulinas capaces de interaccionar con proteínas ajenas a *C. albicans* que pudieran estar presentes en los lisados.

La reactividad de cada uno de los clones con el PAb anti-p37 λ disminuyó notable-

mente y solo 4 de los 12 clones anteriores resultaron ser claramente positivos (clones 2, 5, 8 y 12; Tabla III.1).

III.5.4. Análisis de los clones recombinantes

Con objeto de confirmar los clones positivos se procedió a visualizar el péptido de fusión formado por la expresión conjunta del gen *lac Z* y el correspondiente ADNc subclonado responsable de la inmunorreactividad. Para ello se analizaron por inmunotransferencia los lisados obtenidos tras la inducción del ciclo lítico en presencia de IPTG, a partir de lisógenos correspondientes a los 4 clones seleccionados (clones 2, 5, 8 y 12; Tabla III.1).

La separación electroforética del material presente en los lisados de los lisógenos correspondientes a los 4 clones y la tinción de las especies proteicas con azul de Coomassie (Fig.III.15, calles 1-4), reveló la existencia de un amplio espectro de proteínas pertenecientes a la bacteria y al bacteriófago, entre los que se incluyen los péptidos de fusión de la β -galactosidasa, de elevado tamaño molecular. La presencia de dichos péptidos fue inapreciable en los controles negativos (Fig.III.15, panel A, calles 5,6), en los cuales la obtención de los lisados se llevó a cabo sin IPTG (calle 5) o sin choque térmico a 44°C (calle 6), lo que indica que la producción de dicha proteína está controlada por el promotor del gen *lac Z* del fago. Además la inmunodetección con el PAb anti-p37, demostró la inmunorreactividad de las proteínas de fusión en los clones 2, 8 y 12 (calles 1, 3 y 4, Fig.III.15, panel B). Se detectó también reactividad cruzada con proteínas de bajo peso molecular presentes en todos los lisados, tanto en los lisógenos inducidos como en los controles, por lo que en ningún caso dicha reactividad se debía a proteínas de fusión codificadas por el ADNc (Fig.III.15, panel

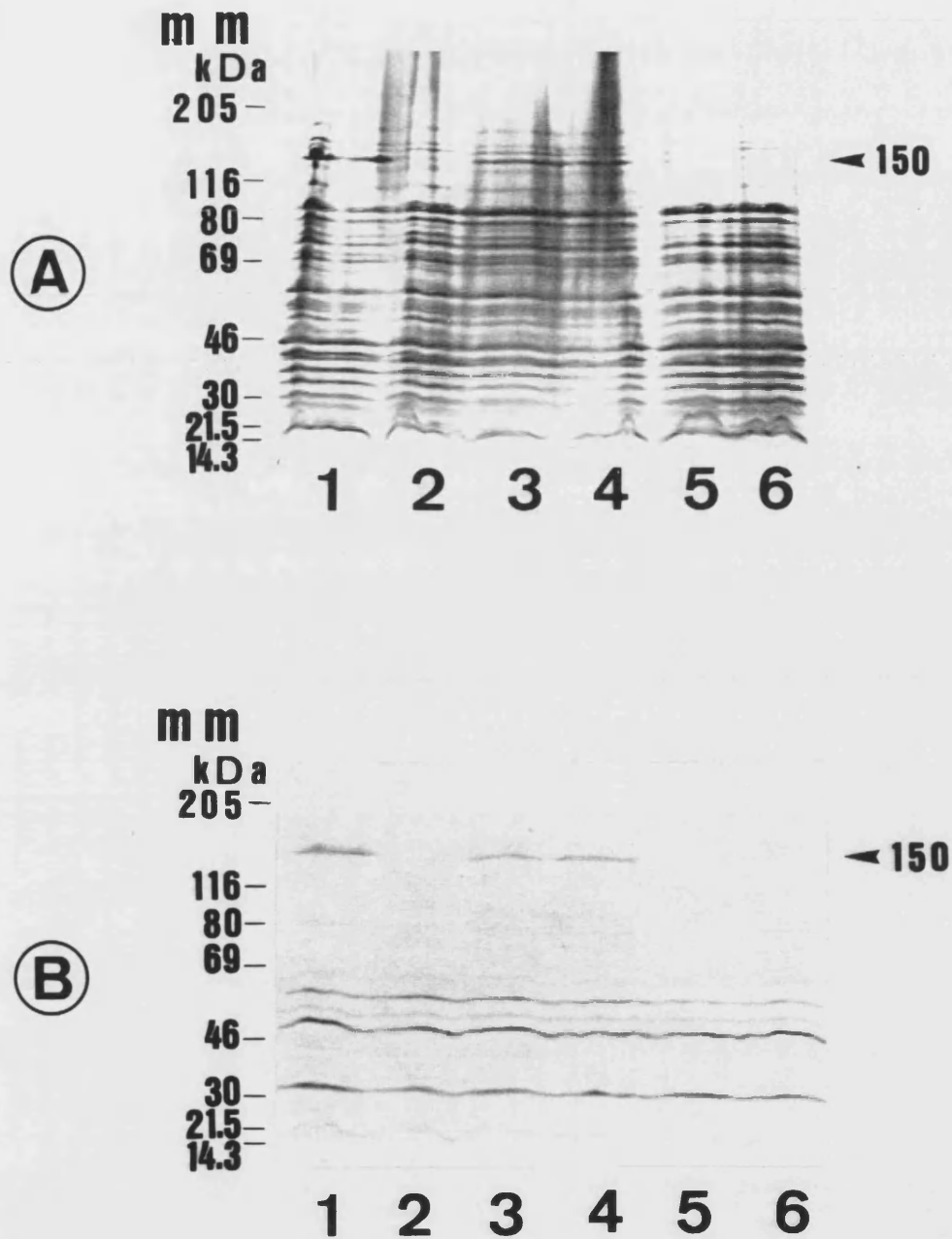


Fig.III.15. Detección de la proteína de fusión en los lisógenos. Los lisados de lisógenos correspondientes a los clones 2 (calle 1), 5 (calle 2), 8 (calle 3) y 12 (calle 4) se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente (5-15%). En las calles 5 y 6 se corrieron muestras correspondientes a dos controles negativos correspondientes a lisados del clon 1 obtenidos sin inducción del ciclo lítico (calle 5) o inducidos en ausencia de IPTG (calle 6). Las muestras aplicadas a cada calle contenían 30 μ g de material (expresado como concentración de proteína total). Tras la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomassie (panel A), o alternativamente se transfirieron a papel de nitrocelulosa, inmunodetectándose con el PAb anti-p37 (panel B). El proteína de fusión formada por la β -galactosidasa y el péptido codificado por el cDNA obtenido, con un peso molecular aparente de 150 kDa se indica con una flecha. La movilidad electroforética de proteínas estándar de peso molecular aparente conocido (expresado en kDa) se indica a la izquierda de los paneles.

B). El peso molecular aparente de los péptidos de fusión detectados en las calles 1, 3 y 4 (Fig.III.15, panel B) se estimó en todos los casos alrededor de 150 kDa. Como se indicó en el apartado de la construcción de la genoteca (apartado II.24), el ADNc se inserta a tan solo 53 pb del codón de terminación del gen *lac Z*, por lo que solo dejan de traducirse unos pocos aminoácidos de la β -galactosidasa y la proteína de fusión tendrá un tamaño que corresponderá aproximadamente a la suma de la β -galactosidasa y el péptido codificado por el ADNc. Teniendo en cuenta que la masa molecular de la β -galactosidasa es de 116 kDa, el péptido codificado por el ADNc debía poseer un peso molecular entre 30 y 40 kDa.

El clon cuyo péptido de fusión reaccionó aparentemente más intensamente con el PAb anti-p37 fue el correspondiente a la calle número 1 (Fig.III.15, panel B), por lo que dicho clon se seleccionó para posteriores estudios genéticos denominándose a partir de ahora clon PS1.

III.5.5. Subclonación del clon PS1 en un vector plasmídico (pGEM-T)

El ADN fágico del clon PS1 se purificó empleando el kit comercial denominado Magic Lambda Prep (Promega Corp.) tal y como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos (ver apartado II.24). Posteriormente el ADNc se amplificó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como cebadores los oligonucleótidos universales de λ gt11 "forward" y "reverse", por lo que también se amplificaron los sitios *EcoRI* de los adaptadores empleados en la construcción de la genoteca. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa (ver apartado II.29) y el fragmento resultante resultó ser de 0,9 kb (Fig.III.16). El tamaño del fragmento fue estimado a partir de un análisis de regresión lineal utilizando para

el cálculo unos fragmentos de ADN generados a partir de la digestión del ADN del fago λ gt11 con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, que sirvieron de marcadores de peso molecular. Algunos de los tamaños de estos fragmentos se indica a la izquierda de la Fig.III.16.

El producto de PCR se eluyó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (vease apartado II.31). El fragmento de ADN así purificado se subclonó en el vector pGEM-T tras el ligamiento y la transformación (vease apartados II.32 y II.33), encontrándose que en ninguno de los transformantes analizados resultaba posible la liberación del inserto mediante digestión con *EcoRI*, aunque se demostraba la existencia de un fragmento único de ADN de un tamaño de aproximadamente de 4 kb, que equivalía a la suma del vector pGEM-T y el inserto de ADNc. Esto hizo sospechar que el problema estaba en la amplificación del ADN por la técnica de PCR, que muchas veces va acompañada de errores de copia inherentes a la *Taq* polimerasa (Barnes, 1994). Así, la liberación del fragmento de ADNc subclonado en el vector pGEM-T (Fig.II.17, calle 6) se realizó mediante digestión con *EcoRI* y *PstI*, enzima que corta en el sitio múltiple de clonaje de pGEM-T, lo que indicaba que una de las dianas *EcoRI* se había modificado. Este plásmido recombinante se denominó pPS1.

Seguidamente para averiguar la existencia de posibles sitios de restricción dentro del inserto, se ensayaron diversas enzimas de restricción que no cortaban en el vector. En la Fig.III.17 se muestran las 8 digestiones dobles del plásmido pPS1 realizadas, en las que se combina el enzima *EcoRI* con los enzimas *HindIII* (calle 1), *XhoI* (calle 2), *ClaI* (calle 3), *BglII* (calle 4), *SmaI* (calle 5), *PstI* (calle 6) como control positivo, *BamHI* (calle 7) y *XbaI* (calle 8) respectivamente. Solo el enzi-



Fig.III.16. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del clon recombinante PS1, obtenido con los cebadores universales de λ gt11. El tamaño molecular es aproximadamente de 0,9 kb. La movilidad de estándares de peso molecular de ADN de λ gt11 (digerido con *EcoRI/HindIII*) se indica en kb a la izquierda de la figura.



Fig.III.17. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido recombinante pPS1 digerido con los enzimas de restricción *EcoRI/HindIII* (calle 1), *EcoRI/XhoI* (calle 2), *EcoRI/ClaI* (calle 3), *EcoRI/BglIII* (calle 4), *EcoRI/SmaI* (calle 5), *EcoRI/PstI* (calle 6), *EcoRI/BamHI* (calle 7) y *EcoRI/XbaI* (calle 8). Los patrones de λ gt11 de peso molecular conocido fueron corridos en paralelo y la calle se indica con una S.

ma *ClaI* era capaz de cortar el inserto correspondiente al ADNc subclonado, liberando un fragmento de pequeño tamaño (aproximadamente 200 pb).

III.5.6. Caracterización del clon PS1

III.5.6.1. Southern blot

El ADN cromosomal de *C. albicans* digerido con *EcoRI*, *EcoRV*, *XhoI*, *HindIII* y *XbaI*, se separó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Fig. III.18, calles 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente) y se transfirió a una membrana de Nylon para su posterior hibridación con la sonda correspondiente al fragmento contenido en el plásmido pPS1 (vease apartados II.34, II.35 y II.36). A continuación se procedió al revelado (vease apartado II.36) y se visualizaron de una a tres bandas según el enzima utilizado en la digestión. Esto indicaba la existencia en el genoma de *C. albicans*, de secuencias homólogas al ADNc clonado.

III.5.6.2. Northern blot

El ARN total de levaduras y tubos germinativos se obtuvo tal como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos (apartado II.37). Tanto las células levaduriformes como los tubos germinativos se recogieron después de 3 h de incubación de células levaduriformes previamente sometidas a ayuno metabólico (vease apartado II.5), en medio sintético a 28°C y 37°C respectivamente. Las moléculas de ARN separadas electroforéticamente y transferidas a filtros Hybond-N se hibridaron con la sonda de ADNc correspondiente al inserto del plásmido pPS1 (vease apartado II.38). El revelado de la hibridación mostró la existencia de una única y relativamente abundante especie molecular de ARNm de aproximadamente 0,9 kb, presente en cantidades similares en células levaduriformes y miceliales (Fig. III.19).

III.5.6.3. Secuenciación del ADNc.

Una vez caracterizado a nivel de Northern y Southern el ADNc contenido en el plásmido pPS1, se realizó un análisis de la secuencia nucleotídica con objeto de determinar la estructura primaria de la proteína codificada por el mismo. Las reacciones de secuenciación se realizaron mediante el kit secuenciación Taq DyDeoxy Terminator (Applied Biosystems Inc) y la secuencia nucleotídica se determinó en un secuenciador automático Applied Biosystem modelo 373A. La estrategia utilizada se detalla a continuación: (i) los extremos del ADNc se secuenciaron utilizando como oligonucleótidos los cebadores del bacteriófago λ gt11 "forward" y "reverse" cuyas regiones complementarias se encontraban flanqueando el inserto de ADNc o bien empleando cebadores universales de pGEM-T (vector en el que está subclonado en ADNc). De este modo se secuenciaron 300-400 pb por cada extremo. Debido a que la longitud del inserto era superior a 800 pb, fue necesaria la construcción de dos oligonucleótidos específicos deducidos de la secuencia (37F-1 y 37R-1) que hibridaran en zonas internas del ADNc, de modo que al secuenciar, los fragmentos llegaran a solaparse. Esta estrategia no funcionó ya que cuando se secuenciaba no se observaba señal o bien se obtenían secuencias llenas de indeterminaciones. En un principio se pensó que esto era debido a la existencia de estructuras secundarias en el ADNc, pero más tarde se pudo determinar que este no era el verdadero motivo. Cuando se introdujeron los dos tramos de secuencia correspondientes a ambos extremos del ADNc, en una base de datos, se observó que cada una de ellas por separado poseía una homología del 70-80 % con la ubiquitina de *S. cerevisiae*.

La ubiquitina es una proteína de pequeño tamaño que puede encontrarse libre o ligada a una amplia variedad de especies proteicas,

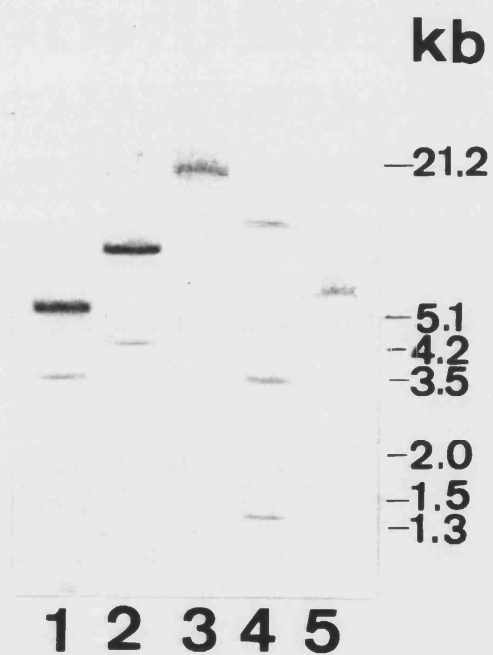


Fig.III.18. Análisis por Southern blot del ADN cromosomal de levaduras de *C. albicans* ATCC 26555. El ADN genómico fue digerido completamente con *EcoRI* (calle 1), *EcoRV* (calle 2), *XhoI* (calle 3), *HindIII* (calle 4) y *XbaI* (calle 5), se separó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa y se transfirió a una membrana de Nylon para su posterior hibridación con la sonda marcada correspondiente al fragmento de ADNc subclonado en el plásmido pPS1. La posición de los estándares se indica en la parte derecha expresada en kb.

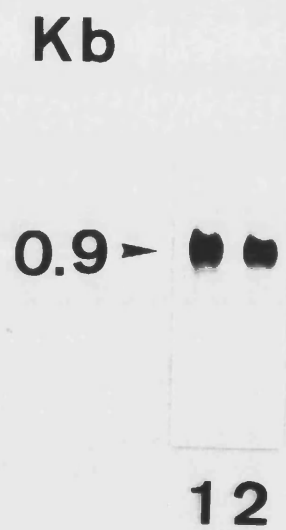


Fig.III.19. Análisis por Northern blot del ARN de *C. albicans* ATCC 26555 tanto de células levaduriformes como de levaduras germinadas, obtenido 3 h después de la incubación a 28°C y 37°C respectivamente. El ARN total fue separado por electroforesis en gel de agarosa y transferido a una membrana de Nylon. La hibridación se realizó con la sonda correspondiente al fragmento de ADNc subclonado en el plásmido pPS1 y el tamaño aproximado del ARN transcrito se indica con una flecha.

ubicadas en el citoplasma, en el núcleo o en la membrana plasmática incluyendo a receptores de la superficie celular (Finley y Chau, 1991; Hershko y Ciechanover, 1992). La ubiquitinación juega un papel importante en muchos mecanismos reguladores (control del ciclo celular, modificación de histonas y receptores, respuesta a estrés) aunque su función principal es actuar como marcador para la degradación selectiva de proteínas, modulando así los niveles de proteínas específicas y eliminando proteínas dañadas o anómalas. Además como la ubiquitinación es reversible, la ubiquitina puede actuar con otras funciones distintas a la degradación (Wilkinson *et al.*, 1989; Finley y Chau, 1991; Paolini y Kinet, 1993).

La ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos codificado por 228 pb que aparece extremadamente conservado en la evolución y se encuentra en plantas, animales, levaduras y otras especies en las que difiere en solo unos pocos aminoácidos (Ozkaynak *et al.*, 1984, 1987). En eucariotas la ubiquitina se encuentra codificada por una familia multigénica, en la que la mayoría de los genes codifican para proteínas híbridas en las cuales la ubiquitina está fusionada por su extremo carboxi a sí misma, como en el caso de la poliubiquitina, o a una cola de aminoácidos no relacionada con la ubiquitina (Finley y Chau, 1991).

Cada uno de los fragmentos secuenciados del ADNc, aunque no poseían zonas comunes entre sí, correspondía a una región de una ubiquitina, lo que suponía la existencia de al menos dos unidades de esta proteína, ya que estaban demasiado separadas en el ADNc para corresponder a la misma, lo que indicaba que se trataba de poliubiquitina. Esto explicaba la imposibilidad de secuenciar con los oligonucleótidos específicos, ya que al haber secuencias repetidas dentro del ADNc estos hibridarían en más de un sitio. Así se diseñó

un tercer oligonucleótido que hibridara en un sitio único, por lo que se eligió para su construcción una secuencia situada inmediatamente después del principio de las regiones 3' no codificantes. Con este oligonucleótido denominado 37R-2 y con el cebador universal de λ gt11 "forward" se consiguieron solapar las secuencias entre los dos extremos del ADNc, encontrándose una tercera ubiquitina en la región central.

La secuencia completa del ADNc se indica en la Fig.III.20. La disposición de las regiones que codifican para cada unidad de ubiquitina es idéntica al gen de la poliubiquitina de *S. cerevisiae* (UBI4), en el que las copias se disponen en tándem unidas cabeza-cola sin ningún espacio entre ellas. La secuencia de 76 aminoácidos de cada unidad es idéntica a la encontrada en el gen UBI4 de *S. cerevisiae*. La secuencia nucleotídica de cada unidad difiere en algunas bases, al igual que ocurre en *S. cerevisiae* (Fig.III.21). Por otro lado se observó que el aminoácido extra (Phe) de la última copia de ubiquitina que precede al codón de terminación de la traducción, es diferente al encontrado en la poliubiquitina de *S. cerevisiae* (Asn). En este sentido se ha descrito que dicho aminoácido difiere en las poliubiquitinas de diferentes especies (Ozkaynak *et al.*, 1987). Además la secuencia 5' arriba con respecto a la metionina de la primera copia de ubiquitina no codifica para otra unidad de la misma.

De todo lo expuesto se dedujo que el ADNc del clon PS1 correspondía a la poliubiquitina de *C. albicans*. El análisis de la secuencia de nucleótidos y los tamaños similares del fragmento de ADNc y ARNm detectado por Northern blot, indicaron que el clon de ADNc contenía la secuencia codificadora completa del gen; por lo tanto el gen de la poliubiquitina de *C. albicans* posee tres copias de ubiquitina organizadas en tandem de

1/1 31/11
 ATG CAA ATT TTC GTT AAA ACT TTG ACT GGT AAA ACC ATT ACC TTA GAA GTC GAA TCT TCT
 M Q I F V K T L T G K T I T L E V E S S
 61/21 91/31
 GAC ACC ATC GAT AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT CCA CCA GAC CAA
 D T I D N V K S K I Q D K E G I P P D Q
 121/41 151/51
 CAA AGA TTG ATT TTC GCC GGT AAA CAA TTG GAA GAC GGT AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC
 Q R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N
 181/61 211/71
 ATC CAA AAG GAA TCT ACT CTT CAC TTG GTG TTG AGA CTG AGA GGT GGT ATG CAA ATC TTT
 I Q K E S T L H L V L R L R G G M Q I F
 241/81 271/91
 GTT AAA ACT TTA ACT GGT AAG ACT ATC ACT TTG GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT
 V K T L T G K T I T L E V E S S D T I D
 301/101 331/111
 AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATC CCA CCA GAT CAA CAA AGA TTG ATT
 N V K S K I Q D K E G I P P D Q Q R L I
 361/121 391/131
 TTT GCT GGT AAA CAA TTA GAA GAT GGT AGA ACC TTG TGT GAC TAC AAC ATC CAA AAA GAA
 F A G K Q L E D G R T L C D Y N I Q K E
 421/141 451/151
 TCT ACT TTA CAT TTG GTT TTG AGA TTG AGA GGT GGT ATG CAA ATC TTT GTT AAA ACT TTA
 S T L H L V L R L R G G M Q I F V K T L
 481/161 511/171
 ACT GGT AAG ACT ATC ACT TTG GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT AAC GTC AAA TCC
 T G K T I T L E V E S S D T I D N V K S
 541/181 571/191
 AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCT GGT AAA
 K I Q D K E G I P P D Q Q R L I F A G K
 601/201 631/211
 CAA TTA GAA GAT GGT AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC ATC CAA AAA GAA TCT ACC TTG CAC
 Q L E D G R T L S D Y N I Q K E S T L H
 661/221 691/231
 TTG GTC TTG AGA TTG AGA GGT GGT TTC TAA TTT TTT ATA ATC ATT GCT GCT AAA TAG TTT
 L V L R L R G G F * *
 721/241 751/251
 TGT TTT ATA GAC TAG GCT TTA ATT TAT TAT GAG GGT CCA ATT CAG GTC CCA TTG ATT ATG
 *
 781/261
 AGA AAA AAA AAA AAA AAA

Fig.III.20. Secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 0,9 kb que codifica para la poliubiquitina de *C. albicans*. Se muestra la secuencia de ADNc entre los adaptadores *EcoRI* utilizados en la construcción de la genoteca. La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se indica con el código de una sola letra. El primer aminoácido (Met) de cada ubiquitina se indica con una flecha. El aminoácido extra de la tercera copia (Phe) y la secuencia poli(A) localizada en el extremo 3' del cDNA se muestran subrayados. Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco. La secuencia correspondiente al oligonucleótido empleado en la secuenciación (37R-2) se indica con una línea discontinua.

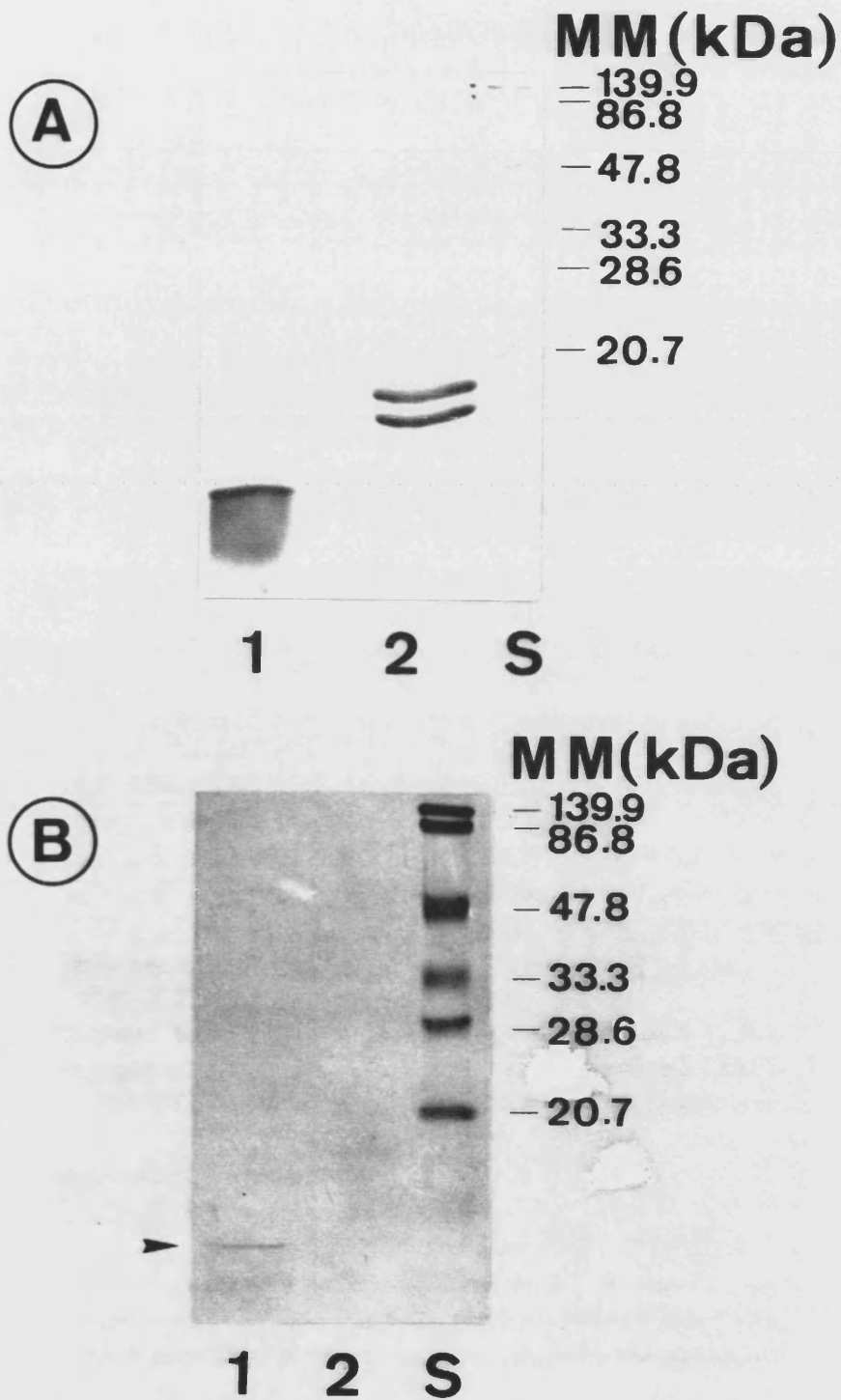


Fig.III.21. Análisis electroforético (SDS-PAGE en gels en gradiente del 5-15% de acrilamida) de la ubiquitina de levadura (calle 1, paneles A y B) y de las proteínas mioglobina y β -lactoglobulina (calle 2, paneles A y B) que se ensayaron como control negativo de la reactividad del PAb anti-p37. Las muestras aplicadas a cada calle contenían 4 μ g de proteína total. Tras la electroforesis, los polipéptidos separados fueron visualizados mediante tinción con azul de Coomasie (panel A) o transferidos para su posterior detección con el PAb anti-p37 (panel B). Las calles marcadas con una S en ambos paneles muestran una mezcla de proteínas de tamaño molecular conocido (indicado en kDa), corridas en paralelo.

forma idéntica al gen UBI4 de *S. cerevisiae*, el cual posee cinco copias en lugar de tres (Ozkaynak *et al.*, 1987). Como ya hemos mencionado, los 76 aminoácidos de la ubiquitina de *C. albicans* codificados por cada repetición, son idénticos a la ubiquitina de *S. cerevisiae*, hecho esperado para una proteína tan conservada. Además de la observación del análisis por Southern, se deduce que existen en el genoma de *C. albicans* secuencias relacionadas con la ubiquitina que pueden corresponder a otros genes diferentes a la poliubiquitina, como ocurre en *S. cerevisiae*, donde los genes UBI1-UBI3 codifican para proteínas híbridas en las cuales la ubiquitina se encuentra fusionada en su extremo 3' con secuencias de aminoácidos no relacionadas (Ozkaynak *et al.*, 1987). En *S. cerevisiae* la ubiquitina madura se obtiene de las proteínas de fusión UBI1-UBI3 en células crecidas en condiciones óptimas, mientras que en células sometidas a estrés se obtiene de la poliubiquitina codificada por UBI4, el cual es un gen inducible por estrés y se expresa en unos niveles muy bajos en células no estresadas (Finley *et al.*, 1987; Finley y Chau, 1991).

En cuanto al análisis por Northern blot, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de ARNm de células levaduriformes y miceliales después de 3 h desde la inducción de la germinación, no puede descartarse que la expresión diferencial ocurra durante una etapa temprana de la inducción, ya que la transición de levadura a micelio puede ser debida en parte a una respuesta adaptativa del hongo a condiciones de estrés *in vivo* o *in vitro* (Martínez y Gosalbo, 1994).

Finalmente, la posible relación entre el receptor de laminina de 37 kDa y la ubiquitina no ha sido aún elucidada. La detección de una débil pero significativa reactividad cruzada entre el PAb anti-p37 y la ubiquitina de leva-

dura (Fig.III.21), explica la clonación de la poliubiquitina con dicho anticuerpo, especialmente si se tiene en cuenta la proporción de ARNm de la p37, que es una proteína muy poco abundante, frente al ARNm de la ubiquitina, lo que implicaría su escasa abundancia relativa en la genoteca de ADNc, frente al ADNc de ubiquitina. Además cuando se realizaron reacciones de amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos 37F-1 y 37R-1 que hibridaban con regiones internas del gen de la poliubiquitina, de los 12 clones preseleccionados por su reactividad frente a los PAb anti-p37 y anti-tipo IV (Tabla III.1), se observó que 4 de ellos correspondían a la poliubiquitina ya que se amplificaron los fragmentos específicos (no mostrado), lo que supone una proporción de 1:3 frente al total de clones reactivos frente a dichos anticuerpos. Esta reactividad cruzada puede ser debida a una relación estructural entre ambas proteínas o a que en la inmunización del conejo se introdujeran proteínas contaminantes de peso molecular equivalente a 37 kDa que contuviesen unidades de ubiquitina. Se ha comprobado además la reactividad cruzada entre proteínas presentes en el extracto de 2-ME (que podrían incluir a la p37) y un anticuerpo anti-ubiquitina de cerdo (no mostrado).

Además la superficie celular de *C. albicans* (Fig.III.22) tanto de células levaduriformes (panel A) como de levaduras germinadas (panel B) se marcó (mediante inmunofluorescencia indirecta) con anticuerpos anti-ubiquitina de cerdo, lo que sugiere la presencia en *C. albicans* de moléculas ubiquitinadas o bien relacionadas con la ubiquitina.

Todos estos resultados apuntan a una relación entre la p37 y la ubiquitina aunque serán necesarios estudios complementarios para elucidar la relación entre ambas. La posible función de la ubiquitina en la pared celu-

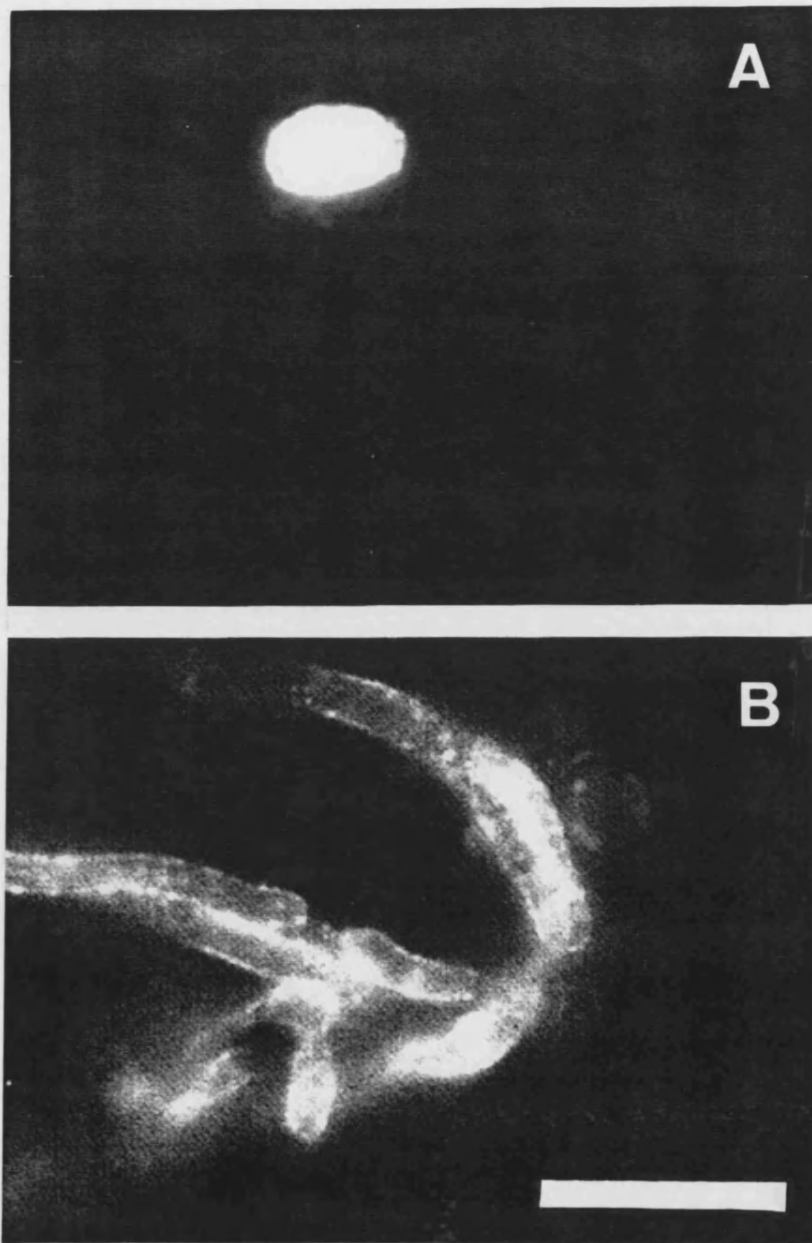


Fig.III.22. Microscopía de fluorescencia de blastosporas (panel A) y blastosporas germinadas (panel B) de *C. albicans* previamente incubadas con un antisuero policlonal anti-ubiquitina (dil 1:50). Barra, 10 μ m.

lar de *C. albicans* y su relación con el receptor para laminina de 37 kDa puede sugerirse teniendo en cuenta que los receptores de la superficie celular pueden ser estructuras complejas formadas por subunidades múltiples. Algunas de estas subunidades actúan en la unión al ligando, mientras que otras están implicadas en procesos mediadores de señales intracelulares. Diversos autores han descrito la existencia en células superiores de receptores ubiquitinados (p.ej. el receptor direccionador de los linfocitos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, los receptores de las hormonas de crecimiento, etc.) (Siegelmann *et al.*, 1986; Van de Rijn *et al.*, 1990; Leung *et al.*, 1987). Además la multiubiquitinación y deubiquitinación reversible puede conectar y desconectar receptores de la superficie celular (Paolini y Kinet, 1993). Es de interés indicar que el receptor direccionador de los linfocitos (homing receptor) es una glicoproteína de la superficie celular modificada covalentemente por la ubiquitina (Siegelman *et al.*, 1986, Van de Rijn *et al.*, 1990) y que el rastreo de una genoteca de expresión con un anticuerpo monoclonal MEL-4 dirigido frente a dicho receptor de los linfocitos, condujo al aislamiento de varios clones que codificaban para la ubiquitina (John *et al.*, 1986). De la misma forma, en nuestro caso el receptor para laminina de 37 kDa podría estar ubiquitinado y ello justificaría el haber aislado con el PAb anti-p37 el gen de la poliubiquitina.

En cualquier caso estos resultados apuntan a que la ubiquitinación esté involucrada en la interacción entre células fúngicas y tejidos animales.

III.6. Estudio comparativo de componentes proteicos y manoproteicos presentes en la pared celular de cepas de *C. albicans* de origen clínico

Las manoproteínas parecen ser los principales componentes de la pared celular de *C. albicans* con carácter antigénico (Brawner y Cutler, 1984, 1986a,b; Casanova *et al.*, 1989,1991; Chaffin *et al.*, 1988; Hopwood *et al.*, 1986; Poulain *et al.*, 1985; Sundstrom *et al.*, 1987,1988). Sin embargo diversos estudios han puesto de manifiesto que los determinantes antigénicos de naturaleza proteica y/o manoproteica ligados a la estructura de la pared, no se expresan uniformemente en todas las cepas de *C. albicans*, existiendo incluso variabilidad para una misma cepa, en función de las condiciones ambientales en las que se encuentra (Poulain, *et al.*; 1985; Gil *et al.*, 1991; López-Ribot *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1991). La variabilidad antigénica parece depender también del origen y condiciones de almacenamiento del microorganismo, habiéndose observado diferencias antigénicas notables entre cepas aisladas de pacientes aquejados de candidiasis y de individuos sanos, y entre cepas recientemente aisladas y aquellas que han sido mantenidas durante periodos prolongados en condiciones de laboratorio (Poulain *et al.*, 1983,1985).

Hasta el momento presente, el diagnóstico de las infecciones sistémicas producidas por *Candida* spp. plantea serios problemas, debido a que los síntomas de dichas infecciones tienen, a menudo, un carácter inespecífico (Meunier, 1989; Odds, 1988). Sin embargo el poder diagnosticar de forma inequívoca las candidiasis de tipo diseminado es algo absolutamente necesario, si se desea instaurar lo más rápidamente posible, una quimioterapia antifúngica adecuada por vía intravenosa. Lamentablemente resulta extremadamente difícil establecer de forma precisa dicho diagnóstico, especialmente en los estadios iniciales de la enfermedad.

En consecuencia, en los últimos años se han llevado a cabo estudios por parte de dife-

rentes grupos, encaminados a desarrollar métodos serológicos específicos y de elevada sensibilidad para el diagnóstico precoz de las infecciones de tipo sistémico producidas por *C. albicans* y otras especies del género *Candida*.

Puesto que la inmunología de las candidiasis se basa en las moléculas con carácter antigénico presentes en las células del hongo, y en este contexto los componentes de la pared celular deben actuar como los inductores más inmediatos de la respuesta inmune por parte del hospedador infectado (Cassone, 1989), en principio parecía lógico suponer que la caracterización de antígenos de dicha estructura podría ser de gran utilidad en el diseño de métodos de diagnóstico serológico. Sin embargo, la variabilidad detectada en relación con los constituyentes de la pared celular de *Candida*, y más concretamente de *C. albicans*, comentada en los párrafos anteriores, ha ocasionado que los métodos serológicos disponibles en la actualidad para el diagnóstico de las candidiasis y que están basados en la detección de antígenos superficiales del hongo, o de anticuerpos generados por el hospedador en respuesta a dichos antígenos, posean, en general, bajos niveles de sensibilidad y especificidad (Jones *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 1993a).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente expuestas, el objetivo perseguido en este apartado fue intentar caracterizar antígenos de naturaleza proteica y/o manoproteica ligados a la estructura de la pared que se expresaran de forma constante, y que en consecuencia pudieran ser de utilidad potencial para el diagnóstico serológico.

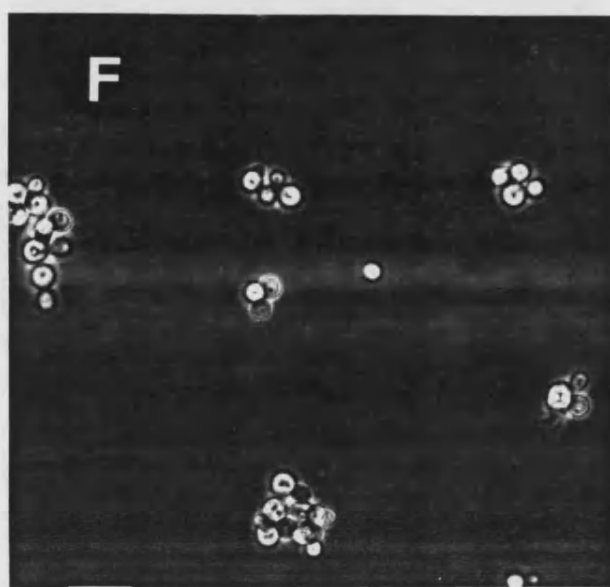
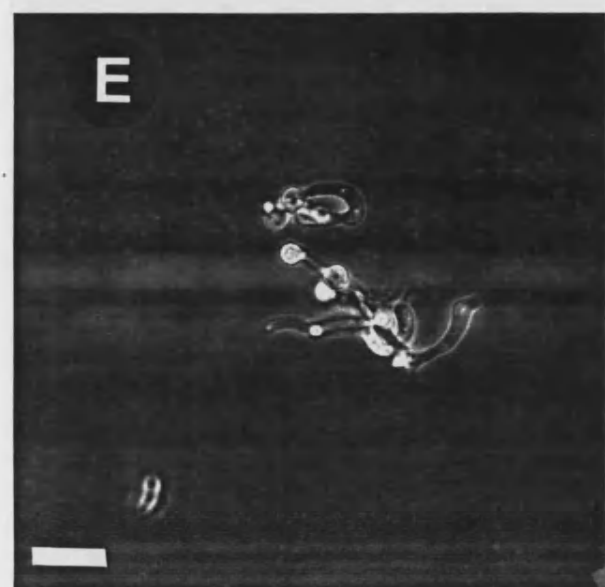
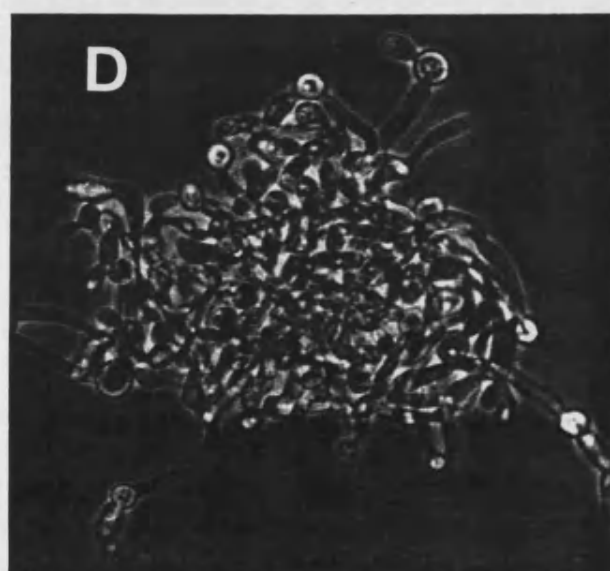
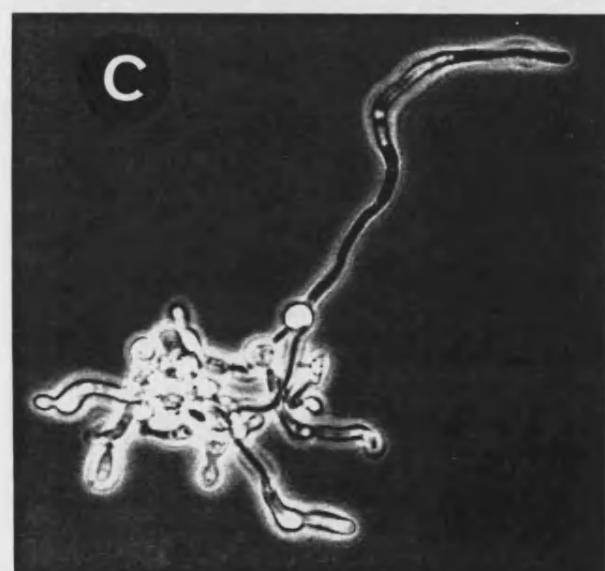
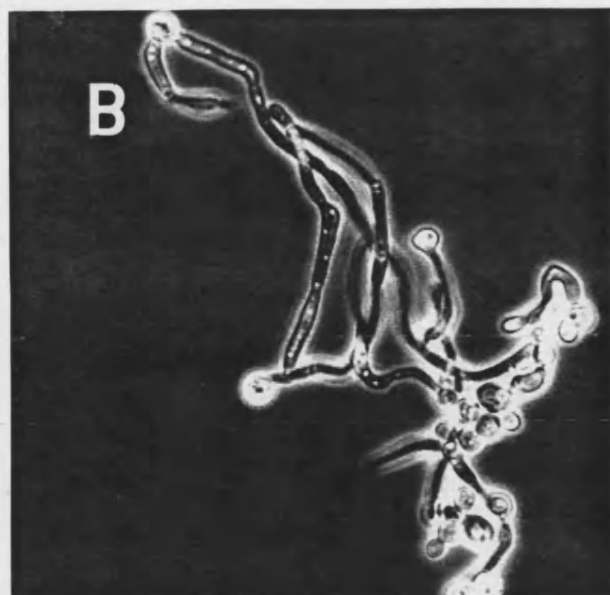
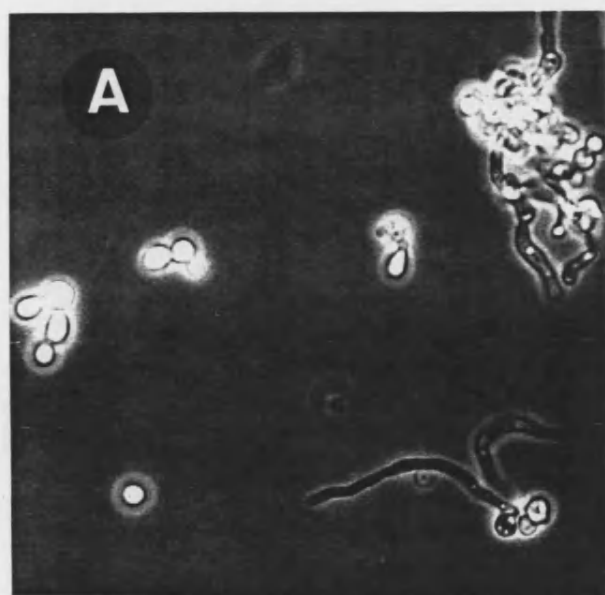
Este estudio se llevó a cabo seleccionando 17 cepas de *C. albicans* aisladas de individuos aquejados de diferentes formas de candidiasis, utilizando además como cepa de re-

ferencia para el análisis comparativo la cepa ATCC 26555. El listado identificativo de todas estas cepas se muestra en la Tabla II.1 del capítulo de Materiales y Métodos de la presente memoria.

Dado que la capacidad de crecer en forma de micelio se considera que es un factor de virulencia importante en *C. albicans*, los diferentes aislamientos estudiados se incubaron en las condiciones utilizadas para inducir el crecimiento en fase levaduriforme (28°C) o la emisión de tubos germinativos (37°C) en la cepa de referencia ATCC 26555, y que se describieron en el apartado II.5 de Materiales y Métodos.

La morfología de las células crecidas bajo las diferentes condiciones de incubación se examinó bajo microscopía óptica de contraste de fases. A 28°C (condiciones de crecimiento de la fase levaduriforme), todas las cepas dieron lugar a cultivos homogéneos de blastosporas (levaduras), no observándose diferencias apreciables en lo que respecta al tamaño y aspecto de las células. Sin embargo, a 37°C (condiciones para inducir la formación de tubos germinativos), solo unas pocas de las cepas estudiadas fueron capaces de formar filamentos miceliales que en cualquier caso fueron muy diferentes tanto en longitud como en aspecto morfológico de los observados en el caso de la cepa ATCC 26555 incubada en idénticas condiciones. En la Fig.III.23 se muestran algunos ejemplos representativos de los diferentes tipos de crecimiento encontrados en las cepas de *C. albicans* de origen clínico. En particular las cepas 30259 (Fig. III.23, panel A) y 105688 (Fig.III.23, panel F), junto con las cepas 105805, 105671 y 104851 (no mostrado), no miceliaron o lo hicieron en muy baja proporción, siendo generalmente los filamentos observados cortos y/o gruesos en comparación con los producidos por la cepa de referencia. Las cepas 106199,

Fig.III.23. Observaciones microscópicas bajo contraste de fases de diferentes cepas de *C. albicans*. (ver Tabla II.1 para información complementaria sobre dichas cepas) incubadas en condiciones idénticas a las empleadas para inducir la formación de tubos germinativos en la cepa de referencia ATCC 26555. Panel A (cepa 30259), panel B (cepa 36985), panel C (cepa 106203), panel D (cepa 104011), panel E (cepa 24248), panel F (cepa 105688). La barra en el panel E equivale a 10 μm y representa la misma escala para todos los paneles.



24249, 32216 y 106203 (Fig.III.23, panel C) presentaron un grado de miceliación similar entre ellas produciendo formas filamentosas finas y alargadas. Por el contrario las cepas 104011 (Fig.III.23, panel D), 24248 (Fig. III.23, panel E), 105719, 32878, 104682 y 24250 germinaron dando lugar a hifas cortas y gruesas con gran tendencia a la agregación. Finalmente la cepa 36985 (Fig.III.23, panel B) fué la que exhibió una mayor capacidad para miceliar en las condiciones de incubación utilizadas, y las hifas resultaron ser las más parecidas morfológicamente a la cepa patrón.

Aunque las características de crecimiento *in vivo* (es decir en tejidos infectados) pueden diferir notablemente de las observadas *in vitro*, la heterogeneidad observada en lo que respecta a la capacidad para formar micelio en las diferentes cepas examinadas, todas ellas aisladas a partir de individuos aquejados de candidiasis, sugiere que la formación de tubos germinativos puede tener una importancia relativa como factor de virulencia.

Una vez determinadas las características de crecimiento de los diferentes aislados clínicos en ambas condiciones de incubación, se procedió a obtener extractos de 2-ME a partir de cultivos de cada cepa obtenidos a 28°C (condiciones de cultivo de la fase levaduriforme) y 37°C (condiciones para inducir la germinación de las blastosporas). Los diferentes extractos de 2-ME se analizaron mediante técnicas electroforéticas, como se describe a continuación con objeto de caracterizar el perfil de componentes proteicos y/o manoproteicos presentes en la pared celular de las distintas cepas, y poner de manifiesto especies mayoritarias que pudieran tener eventualmente un carácter común para todas ellas.

El hecho de que el análisis electroforético se llevase a cabo utilizando solamente los extractos de 2-ME se justifica por las siguientes razones: (i) los agentes reductores tales como

el ditiotreitól y el 2-ME extraen a partir de células intactas de *C. albicans* una gran diversidad de proteínas y glicoproteínas de la pared celular que parecen encontrarse presentes en las capas más externas de dicha estructura (Calderone y Braun, 1991; López-Ribot *et al.*, 1991); (ii) las especies proteicas y glicoproteicas extraídas por el 2-ME parecen estar extremadamente relacionadas con la virulencia y patogenicidad, puesto que determinan y/o modulan la interacción de las células del hongo con los tejidos componentes del suero del hospedador (Calderone y Braun, 1991; Casanova *et al.*, 1992b; Cassone, 1989; Cutler, 1991; Hostetter, 1994b; López-Ribot *et al.*, 1991; Sentandreu *et al.*, 1991b); (iii) teniendo en cuenta lo mencionado en los puntos (i) y (ii) parecería lógico suponer que los constituyentes de la pared presentes en los extractos de 2-ME pudieran actuar como los inductores más inmediatos de la respuesta inmune por parte del hospedador infectado.

El análisis del contenido de proteína y azúcar total en los diferentes extractos de 2-ME reveló diferencias notables entre los mismos. La distinta eficacia del tratamiento solubilizador con el agente reductor sugiere tanto la existencia de diferencias cuanti y/o cualitativas en la concentración de componentes proteicos y glicoproteicos presentes en la pared de las cepas analizadas, como de diferencias en la organización espacial de dichos componentes y en la interacción de los mismos entre sí y con otros constituyentes de la pared, en concordancia con resultados previamente publicados por nuestro grupo en este contexto, aunque utilizando otra metodología para extraer proteínas y glicoproteínas de la pared celular (Gil *et al.*, 1991; López-Ribot *et al.*, 1994).

Cuando se procedió a analizar mediante SDS-PAGE los diferentes extractos de 2-ME,

y a visualizar seguidamente los polipéptidos separados mediante tinción con azul de Coomassie, se puso de manifiesto en todos los casos, un patrón polipeptídico complejo, con un elevado número de bandas proteicas distribuidas en un rango de peso molecular entre 80 y 13 kDa para el caso de los extractos obtenidos a partir de células de las diferentes cepas crecidas a 28°C (Fig. III.24, panel A), y entre 106 y 13 kDa para las muestras correspondientes a células incubadas a 37°C (Fig. III.24, panel B). Aunque la mayor parte de las bandas detectadas tuvieron un carácter común independientemente de la cepa y las condiciones de crecimiento utilizadas, se apreciaron diferencias evidentes en la concentración de diversos componentes individuales, así como especies (generalmente minoritarias) específicas de cepa. Entre los polipéptidos comunes hay que destacar una especie con un peso molecular aparente de 58 kDa que fue detectable en todos los extractos analizados obtenidos tanto de células crecidas a 28°C (Fig. III.24, panel A) como a 37°C (Fig. III.24, panel B). Sobre esta especie de 58 kDa se volverá a insistir un poco más adelante.

La tinción con Con A-peroxidasa de los componentes presentes en los extractos de 2-ME, previamente separados mediante SDS-PAGE y posteriormente transferidos a papel de nitrocelulosa, puso de manifiesto la existencia de un material de elevado peso molecular (>106 kDa) y altamente polidisperso (Fig.III.25), que no fue detectable mediante tinción con azul de Coomassie (Fig.III.24). Este material está constituido por glicoproteínas (manoproteínas) con un gran contenido en carbohidratos (polímeros de manosa), lo que determina su fuerte reactividad con la lectina. En este caso se detectaron diferencias evidentes entre los extractos de 2-ME en función de las condiciones de incubación

empleadas para obtener los cultivos de las diferentes cepas, puesto que las especies de elevado peso molecular extraídas de las células a 28°C exhibieron una mayor polidispersidad (Fig.III.25, panel A), que las glicoproteínas presentes en los extractos de 2-ME de células crecidas a 37°C, que en general se resolvieron en bandas más discretas (Fig.III.25, panel B). Además se apreciaron diferencias cualitativas y/o cuantitativas notables en los perfiles de especies glicoproteicas reactivas frente a la Con A entre las diversas cepas crecidas en idénticas condiciones. En este contexto, el análisis de los extractos de 2-ME obtenidos de las cepas identificadas con los números 11, 12 y 14 (ver Tabla II.1) crecidas a 28°C, reveló un escaso número de componentes manoproteicos, detectándose en todos los casos una débil reactividad frente a la Con A (Fig.III.25, panel A). Sin embargo los extractos correspondientes a estas mismas cepas pero incubadas a 37°C, contenían, aparentemente, una mayor riqueza de componentes manoproteicos (Fig.III.25, panel B). Practicamente en todos los extractos de 2-ME de las diferentes cepas crecidas tanto a 28°C como a 37°C se detectó una banda con una movilidad electroforética correspondiente a un peso molecular aparente de 58 kDa, que mostró una fuerte reactividad frente a la Con A (Fig.III.25). Hay que destacar aquí que el receptor para fibrinógeno caracterizado por nuestro grupo en *C. albicans* es una manoproteína de 58 kDa (mp 58; Casanova *et al.*, 1992b). La mayor parte de especies de medio y bajo peso molecular detectadas mediante tinción con azul de Coomassie (Fig.III.24) no fueron visualizables tras la tinción con Con A (Fig.III.25), lo que sugiere que tales componentes de la pared celular del hongo extraídos por la acción del 2-ME carecen de restos de naturaleza carbohidrato unidos a las cadenas polipeptídicas.

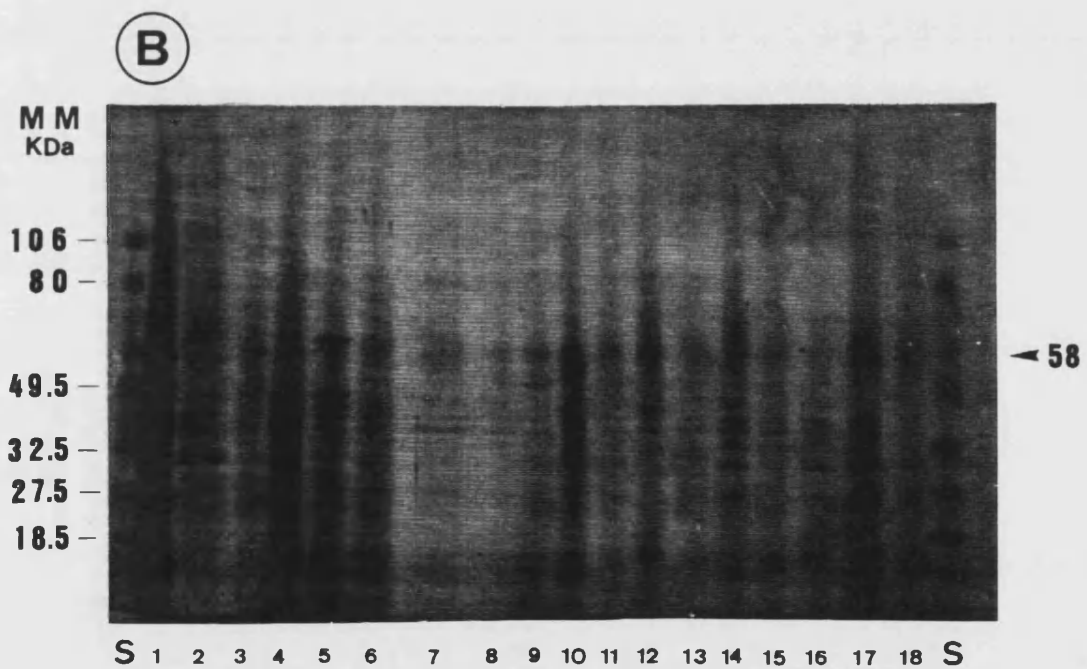
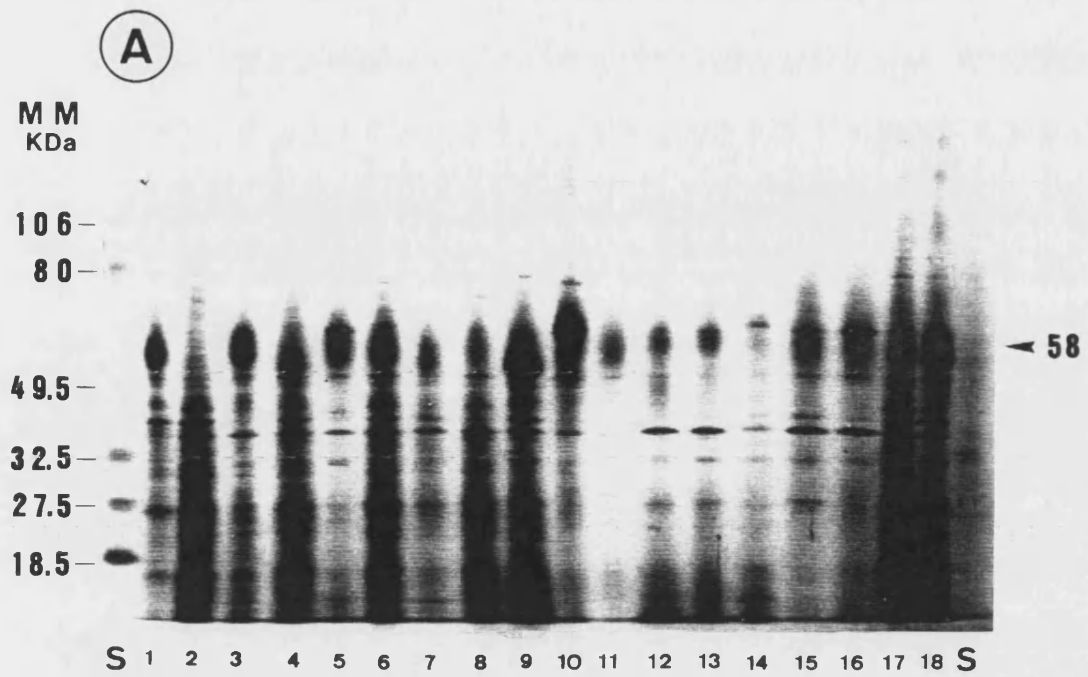


Fig.III.24. Patrones polipeptídicos obtenidos mediante el análisis electroforético (SDS-PAGE en geles en gradiente del 5-15% de acrilamida) de extractos de 2-ME de cepas de *C. albicans* (las cepas analizadas son las que se muestran en la Tabla II.1 con el mismo número de orden que allí se indica) incubadas en las condiciones utilizadas para inducir el crecimiento en fase levaduriforme (panel A) o de micelio (panel B) en la cepa de referencia ATCC 26555 (calle 1 en ambos paneles). Las muestras aplicadas en cada calle contenían 200 µg de material expresado como contenido de azúcar total. Tras la electroforesis, los polipéptidos separados fueron visualizados mediante tinción con azul de Coomassie. Las calles marcadas con una S en ambos paneles muestran una mezcla de proteínas de tamaño molecular conocido (indicado en kDa), corridas en paralelo.

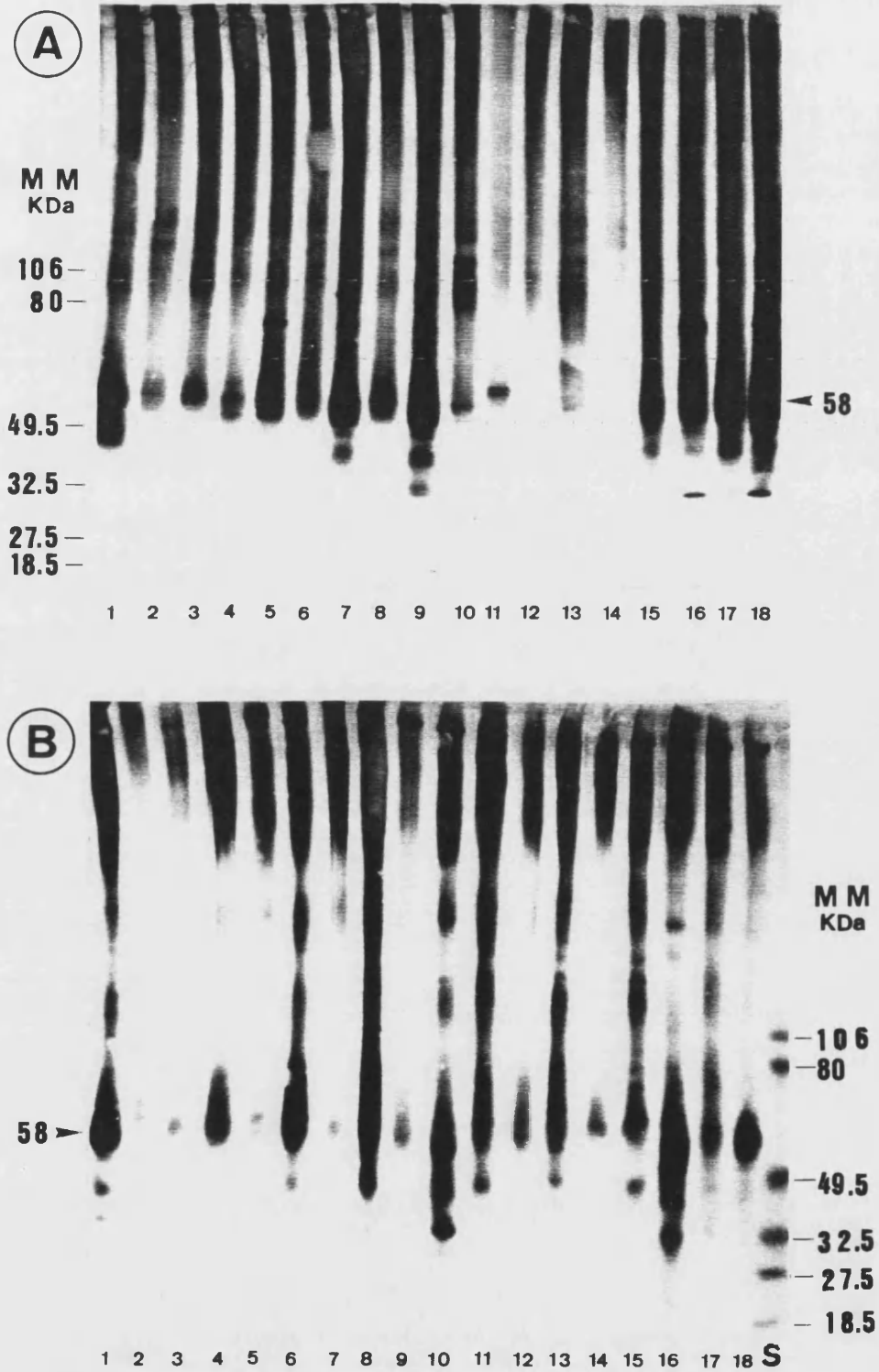


Fig.III.25. Análisis mediante SDS-PAGE (geles en gradiente del 5-15% de acrilamida) y electrotransferencia (Western blotting) de extractos de 2-ME obtenidos de cepas de *C. albicans* (las cepas analizadas son las que se muestran en la Tabla II.1 con el mismo número de orden que allí se indica) incubadas en las condiciones utilizadas para inducir el crecimiento en fase levaduriforme (panel A) o de micelio (panel B) en la cepa de referencia ATCC 26555 (calle 1 en ambos paneles). Las muestras aplicadas en cada calle contenían unos 100 μ g de material expresado como azúcar total. Tras la electroforesis, los polipéptidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa y seguidamente visualizados mediante tinción con Concanavalina A acoplada a peroxidasa. El peso molecular aparente (expresado en kDa) de proteínas patrón preteñidas corridas en paralelo (calle marcada con la letra S) se indica a la izquierda y derecha respectivamente de los paneles A y B.

Dado que la tinción de los geles de acrilamida con azul de Coomasie y la de los soportes de nitrocelulosa con Con A-peroxidasa, apuntaba hacia la posibilidad de que la pared celular de los aislamientos clínicos de *C. albicans* analizados poseyera una manoproteína equivalente a la especie mp 58 descrita previamente (Casanova *et al.*, 1992b), se procedió a inmunodetectar la presencia de moléculas en los extractos de 2-ME que pudieran mostrar (i) reactividad cruzada con el anticuerpo policlonal monoespecífico generado frente al receptor mp58 (PAb anti-mp58; Casanova *et al.*, 1992b) y (ii) capacidad para interactuar con fibrinógeno, determinada mediante la técnica puesta a punto con esta finalidad por nuestro grupo (Casanova *et al.*, 1992b).

La inmunodetección con el PAb anti-mp58 puso de manifiesto básicamente la existencia de una especie mayoritaria con un peso molecular aparente de 58 kDa, que mostraba reactividad cruzada con el antisuero, en los diferentes extractos (Fig.III.26). La expresión de estas especies reactivas frente al PAb anti-mp58 parecía depender, en algunos casos, de las condiciones de incubación. Así, la pared celular de la mayor parte de las células crecidas tanto a 28°C como a 37°C contenía una especie de unos 58 kDa de tamaño molecular, extraíble por la acción del 2-ME, y que era detectable mediante inmunotransferencia con el antisuero (Fig.III.26). Sin embargo las cepas identificadas con los números 10, 11, 12, 13 y 14 (ver Tabla II.1) no expresaron el componente de 58 kDa a 28°C (Fig.III.26, panel A) pero sí a 37°C (Fig.III.26, panel B). Por el contrario las cepas identificadas como 12 y 15 exhibieron el comportamiento opuesto (comparar las calles 2 y 15 en los paneles A y B de la Fig.III.26).

Una vez detectada la presencia de especies inmunoreactivas frente al PAb anti-mp58 en

los diferentes extractos de 2-ME, se procedió a determinar si aquellas eran capaces de interactuar con el fibrinógeno de origen humano, utilizando las condiciones experimentales descritas en el apartado II.14 del capítulo de Materiales y Métodos. El perfil de bandas obtenido en este caso coincidió en algunos casos (Fig.III.27) con el correspondiente a la inmunodetección con el PAb anti-mp58 (Fig. III.26), aunque se apreciaron una serie de discrepancias (o más bien falta de paralelismo) notables. Así por ejemplo, los extractos de 2-ME de las cepas 6, 7 y 8 (Tabla II.1) crecidas a 28°C (Fig.III.26, panel A) y a 37°C (Fig. III.26, panel B) contenían una especie de 58 kDa con reactividad cruzada frente al antisuero, pero que solo era funcional (en lo que respecta a su capacidad para ligar fibrinógeno) en los extractos de las células incubadas a 28°C (Fig.III.27, paneles A y B, calles 6, 7 y 8). Por otro lado, aunque las cepas 11, 12, 13 y 14 crecidas a 28°C no poseían, aparentemente, componente alguno inmunoreactivo frente al PAb anti-mp58 (Fig.III.26, panel A), sí que fue detectable en los extractos de 2-ME obtenidos de dichas cepas, la presencia de una banda con un peso molecular aparente de 58 kDa, capaz de interactuar con fibrinógeno humano débilmente, aunque de forma específica.

Todos estos resultados indican que una manoproteína homóloga del receptor de mp58 para fibrinógeno caracterizado previamente por nuestro grupo (Casanova *et al.*, 1992b) en la cepa de referencia de *C. albicans* (ATCC 26555), se encuentra presente en la pared celular de las diversas cepas de origen clínico del hongo examinadas. Sin embargo, parecen existir notables diferencias tanto antigénicas (reactividad frente al PAb anti-mp58) como funcionales (capacidad para interactuar con el fibrinógeno) entre las diferentes especies homólogas de la mp58 en

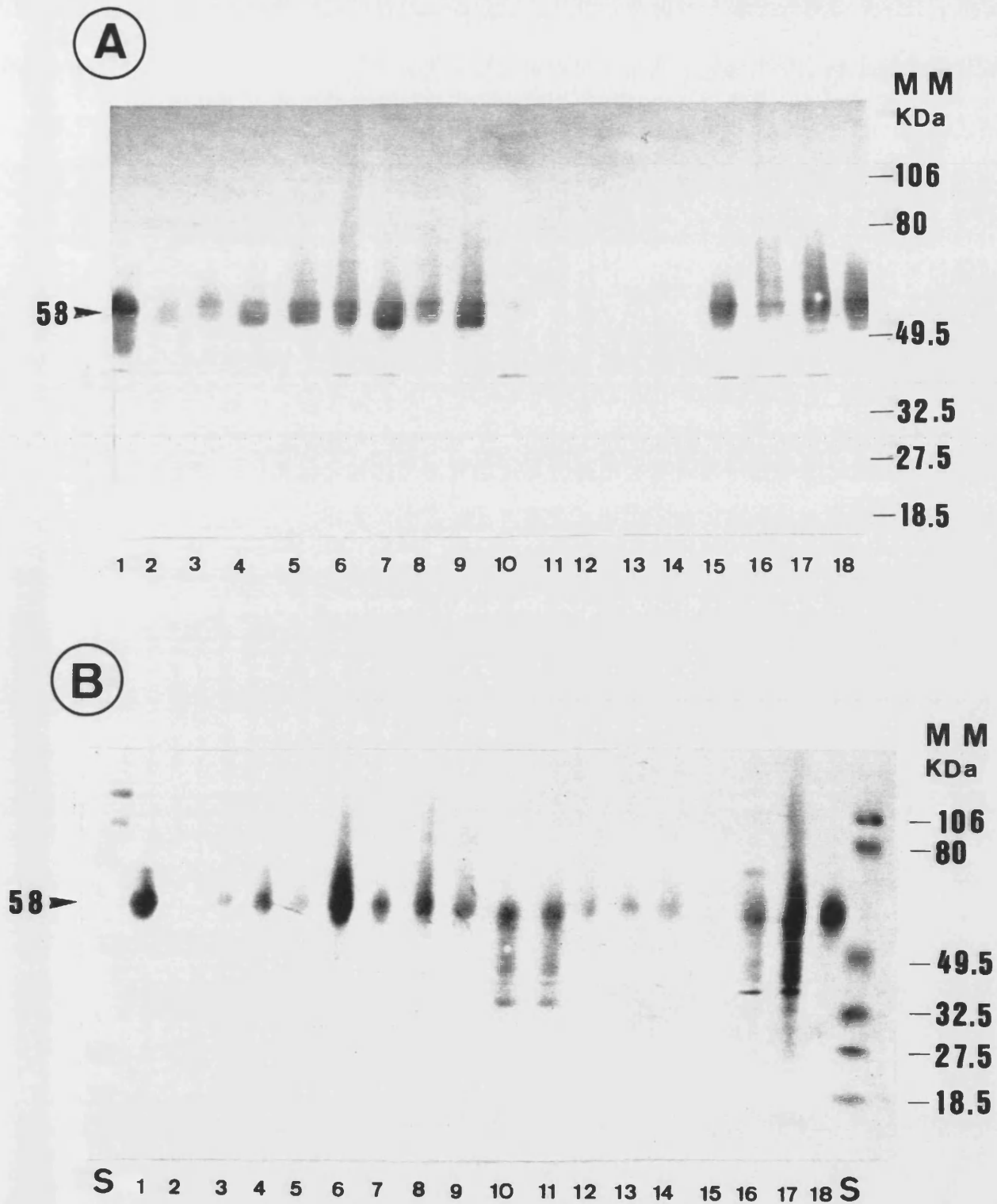


Fig.III.26. Inmunodetección sobre papel de nitrocelulosa utilizando como sonda un antisuero policlonal mono específico frente al receptor manoproteico de 58 kDa (mp 58) para fibrinógeno previamente caracterizado en *C. albicans* ATCC 26555 (PAb anti-mp58; Casanova *et al.*, 1992b). Las condiciones experimentales, el tipo de muestra aplicada en las diferentes calles y las cepas examinadas se describen en el texto de la Fig.III.23. La cantidad de muestra aplicada por calle en este caso fue de unos 100 μ g expresado como contenido en azúcar total. La inmunodetección sobre papel de nitrocelulosa se llevó a cabo utilizando una dilución 1:500 del PAb anti-mp58. El peso molecular aparente (expresado en kDa) de proteínas patrón preteñidas corridas en paralelo (calle marcada con la letra S) se indica a la derecha de cada panel.

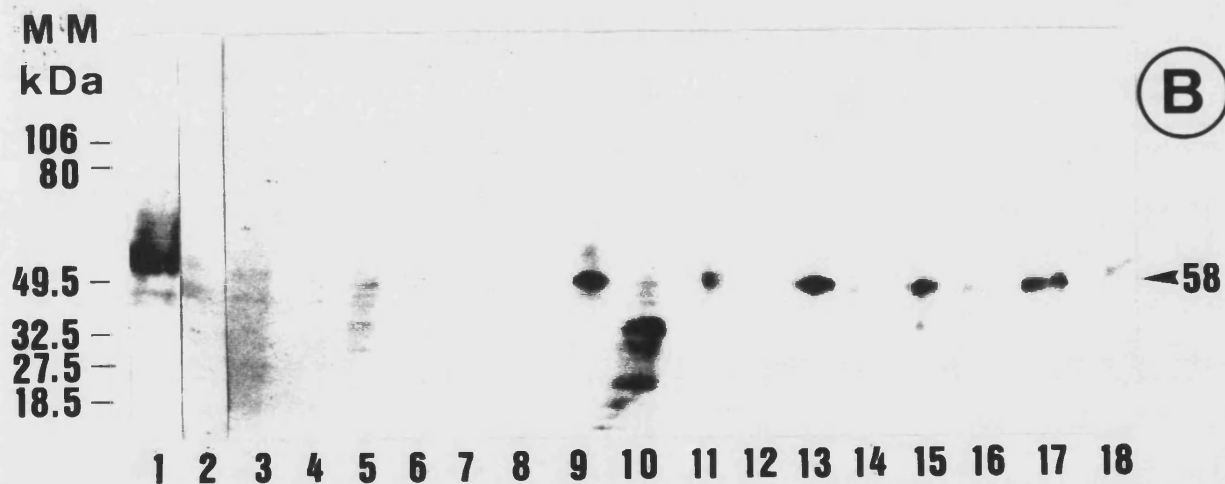
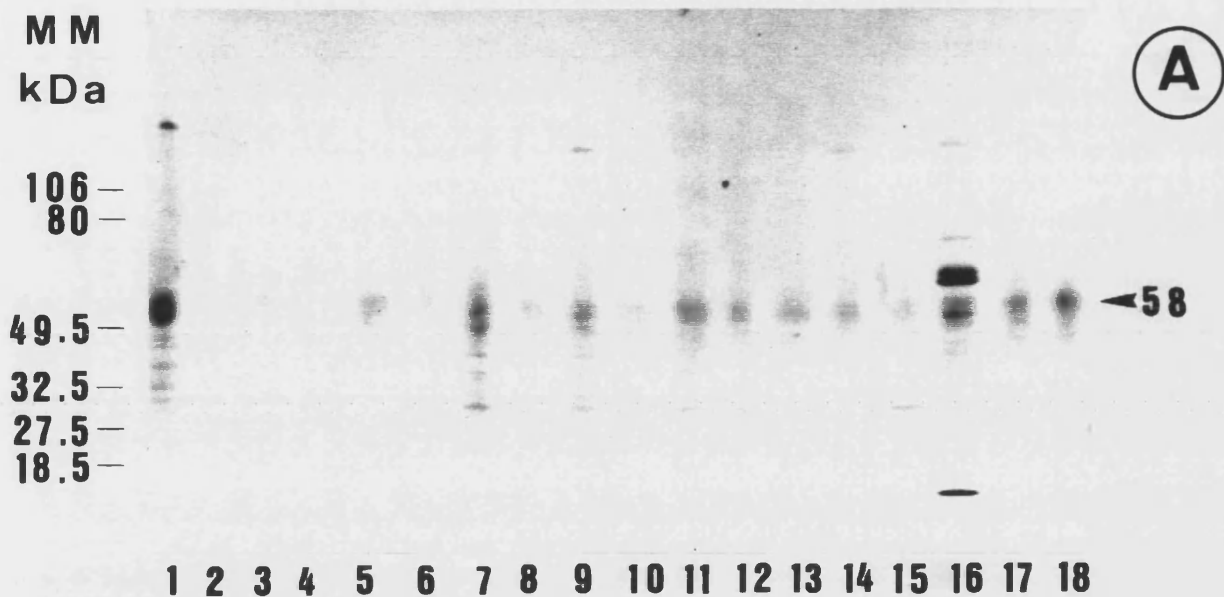


Fig.III.27. Identificación de componentes solubilizados mediante tratamiento con 2-ME de la superficie celular de cepas de *C. albicans* incubadas en las condiciones utilizadas para inducir el crecimiento en fase levaduriforme (panel A) o de micelio (panel B) en la cepa de referencia ATCC 26555 (calle 1 en ambos paneles). Las cepas analizadas son las que se muestran en la Tabla II.1, con el mismo orden que allí se indica. Las muestras aplicadas en cada calle contenían, en este caso, unos 200 μ g de material (expresado como contenido de azúcar total). Tras la electroforesis en gels en gradiente del 5-15% de acrilamida, los polipéptidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa, sobre los que se llevó a cabo el ensayo de interacción con fibrinógeno como se describió en Materiales y Métodos. La movilidad electroforética de proteínas estándar de peso molecular conocido (expresado en kDa) se muestra a la izquierda de ambos paneles.

función tanto de la cepa examinada como de las condiciones de incubación utilizadas para generar los cultivos a partir de los cuales se obtuvieron los extractos de 2-ME.

En la Tabla III.2 se ha intentado resumir de forma comparativa las diferencias observadas en la intensidad de la reactividad frente a los distintos métodos de detección empleados. Teniendo en cuenta que los diferentes perfiles electroforéticos mostrados en las Fig. III.25 a III.27, se obtuvieron cargando la misma cantidad de material (el extracto de 2-ME correspondiente en cada caso) expresado como contenido de azúcar total en cada pocillo, las diferencias de reactividad observadas (Tabla III.2) sugieren que las especies homólogas a la mp58 se expresan, además, en cantidades variables en las diferentes cepas.

En resumen, los resultados del estudio descritos en este apartado, confirman la dificultad, puesta de manifiesto en estudios previos (Gil *et al.*, 1991; López-Ribot *et al.*, 1994), para definir antígenos que por expresarse de forma general en todas las cepas de *C. albicans*, pudieran utilizarse como marcadores selectivos para el diagnóstico serológico de las candidiasis. En este contexto, la especie de 58 kDa, que por sus características biológicas (la capacidad que muestra para interactuar con fibrinógeno humano) cabe suponer que represente un importante factor de virulencia para el hongo, pudiera ser un candidato potencial como antígeno marcador.

Tabla III.2. Reactividad de las especies homólogas a la mp58 presentes en los extractos de 2-ME de las diferentes cepas tras (i) tinción con azul de Coomassie (A) y Con A-peroxidasa (B) (ii) inmunodetección con el PAb anti-mp58 (C) y (iii) el ensayo de unión a fibrinógeno revelado con anticuerpo anti-fibrinógeno (D), deducida de los experimentos mostrados en las Figs III.24, III.25, III.26 y III.27. Los símbolos indican: ++, elevada reactividad; +, reactividad intermedia; - ausencia de reactividad. Los símbolos a la izquierda de la barra corresponden a los resultados

obtenidos a partir de extractos de 2-ME obtenidos a partir de células incubadas a 28°C, mientras que los de la derecha corresponden a muestras de células crecidas a 37°C.

Cepa	A	B	C	D
1	+++	+++	++/++	+++
2	++	++	+++	++
3	+++	+++	+++	++
4	+++	+++	+++	++
5	+++	++	++	+++
6	+++	+++	+++	++/-
7	+++	++	+++	++/-
8	+++	+++	+++	++/-
9	+++	++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++
11	+++	-/+	-/+	+++
12	+++	-/+	-	++/-
13	-/+	-	-/+	+++
14	-/+	-/+	-/+	-/+
15	+++	+++	++/-	+++
16	+++	+++	+++	+++
17	+++	+++	+++	+++
18	+++	+++	+++	+++

III.7.- Detección de antígenos circulantes y de inmunoglobulinas frente a antígenos de *C. albicans* en suero humano

Como ya se ha mencionado en apartados previos de la presente memoria, el diagnóstico pre-mortem de las candidiasis de tipo diseminadas es un problema difícil todavía pendiente de solución en la actualidad (Meunier, 1989; Navarro *et al.*, 1993a; Odds, 1988). Cuando se utilizan técnicas microbiológicas convencionales como el hemocultivo para el diagnóstico, el porcentaje de resultados positivos que se obtienen es muy bajo (Maksymiuk *et al.*, 1984). Por otro lado, los métodos serológicos actualmente existentes para la detección de antígenos de *Candida* (por ejemplo, manano, glicoproteínas y otros antígenos proteicos) en los fluidos biológicos de los pacientes, son de utilidad controvertible, puesto que dichos inmunoensayos no han mostrado ser, claramente, de utilidad clínica (Cabezudo *et al.*,

1989; Escuro *et al.*, 1989; Jones, 1990; Lemieux *et al.*, 1990; Matthews y Burnie, 1988; Nakamura *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1993a,b; Phillips *et al.*, 1990; Ruchel, 1989). Del mismo modo, otros métodos serológicos utilizados para detectar anticuerpos anti-*Candida* muestran por lo general unos niveles bajos de sensibilidad y especificidad (por ejemplo en muchos casos son incapaces de discriminar entre las formas superficial y diseminada de las candidiasis), puesto que tales métodos detectan principalmente anticuerpos generados contra el componente carbohidrato de las glicoproteínas de la pared celular de *Candida*, el manano, componente que también se encuentra presente con similares características biológicas y antigénicas en las glicoproteínas de otros hongos saprófitos como *S. cerevisiae*, lo que ocasiona que los anticuerpos frente al manano sean ubicuos en el suero humano, incluso en individuos sanos (Jones, 1990; Zoller *et al.*, 1991). Así mismo la gran variabilidad antigénica que exhibe *C. albicans* (y presumiblemente otras especies del género *Candida*), provoca que las preparaciones antigénicas utilizadas en el diseño y puesta a punto de todos esos procedimientos de diagnóstico serológico, no puedan ser convenientemente estandarizados, condición indispensable para obtener resultados reproducibles entre diferentes laboratorios (Jones, 1990). En consecuencia, en los últimos años, se ha intentado diseñar métodos de diagnóstico serológico con la mayor especificidad y sensibilidad posibles, para detectar diversos antígenos selectos de *Candida*. En este contexto, se han utilizado una serie de antígenos citoplásmicos de naturaleza proteica de bajo y medio peso molecular (entre 29 y 47 kDa) como marcadores para la detección de anticuerpos específicos frente a aquellos, en pacientes con candidiasis sistémica (Matthews y Burnie, 1988; Zoller *et al.*, 1991; Bru-
neau y Guinet, 1984). Aunque se han hecho

algunos progresos interesantes en este campo, los resultados obtenidos hasta el momento no han conducido todavía al desarrollo de métodos serológicos simples y fiables para el diagnóstico precoz de las infecciones de tipo sistémico causadas por *Candida*. Además, parecería *a priori* más lógico basar las estrategias para el diseño de procedimientos serológicos para el diagnóstico de las candidiasis sistémicas en la detección de (i) moléculas de la pared celular del hongo, principalmente de las manoproteínas que son los principales componentes de carácter antigénico presentes en dicha estructura, y que actúan como los inductores más inmediatos de la respuesta inmune en el hospedador (Cassone, 1989), o (ii) de anticuerpos generados frente a tales antígenos superficiales por el individuo infectado.

En el presente apartado, se describen los resultados del estudio, planteado como consecuencia de lo anteriormente expuesto en los párrafos introductorios, sobre la detección de antígenos de *C. albicans* y de inmunoglobulinas G frente a antígenos de pared celular y citoplásmicos del hongo en muestras de suero procedentes tanto de individuos sanos como de pacientes aquejados de candidiasis superficial y/o sistémica. Este estudio se abordó en un intento de contribuir al diseño de estrategias para el diagnóstico precoz y específico de las infecciones causadas por *C. albicans*.

III.7.1. Detección de antígeno circulante en sueros de pacientes con candidiasis sistémica

Para la detección de antígenos circulantes, se utilizó un ensayo de E.L.I.S.A. modificado (E.L.I.S.A.-captura) empleando como sonda captadora, IgGs purificadas a partir de un antisuero policlonal de conejo (PAb anti-LátexAd) utilizando como inmunógeno microesferas de látex sobre las que se habían ad-

sorbido los extractos de 2-ME de blastosporas germinadas (micelio).

Las razones que justificaban *a priori* la elección anterior fueron las siguientes. En primer lugar, aunque ambas morfologías (levadura y micelio) se detectan simultáneamente en tejidos infectados, la formación de filamentos miceliales parece jugar un papel muy importante en la patogénesis e invasividad (Odds, 1988). En segundo lugar, los extractos de 2-ME contienen una gran diversidad de componentes antigénicos superficiales de las células del hongo, entre otros, diversos receptores para ligandos del hospedador como fibrinógeno, complemento y laminina (Casanova *et al.*, 1992b; Calderone y Braun, 1991; el presente trabajo), algunos de los cuales parecen expresarse en muchas cepas de *C. albicans* (ver apartado III.6 de esta memoria); además el tratamiento con 2-ME es un procedimiento de extracción que no afecta sustancialmente las características nativas de los componentes antigénicos de la pared, a diferencia de otros métodos de solubilización de antígenos que implican la digestión de la estructura de la pared celular con enzimas hidrolíticos (Casanova y Chaffin, 1991a; Casanova *et al.*, 1992a), que pueden degradar parcialmente los constituyentes proteicos y glicoproteicos de la misma, concomitantemente con su solubilización.

El PAb anti-LátexAd se purificó tal y como se describe en el apartado II.22.2 del capítulo de Materiales y Métodos, y la fracción de IgGs obtenida se marcó con peroxidasa o biotina, para su posterior utilización en el ensayo de E.L.I.S.A.-captura. De los dos métodos de marcado de inmunoglobulinas, la reacción con biotina dio el mejor rendimiento, por lo que fueron las IgGs biotiniladas las utilizadas como anticuerpos marcadores.

La determinación (titulación) mediante E.L.I.S.A. estándar de la reactividad de las inmunoglobulinas biotiniladas (IgGs purificadas a partir del PAb anti-LátexAd y posteriormente etiquetadas con biotina) en función de la dilución ensayada de las mismas, frente a concentraciones decimalmente crecientes de extracto de 2-ME (expresadas como contenido en azúcar total), permitió establecer la dilución máxima del anticuerpo y la concentración mínima de antígeno óptimas en unos valores de 1:200 y 0,1 μg respectivamente (Fig.III.28). En consecuencia, los ensayos subsiguientes se diseñaron teniendo en cuenta estos datos.

A continuación, para cuantificar la cantidad de antígeno que eran capaces de retener las IgGs no biotiniladas (sonda captadora) purificadas a partir del PAb anti-LátexAd, se procedió a realizar un ensayo control de E.L.I.S.A.-captura. El método consistía en adsorber el anticuerpo no marcado a pocillos de placas de E.L.I.S.A., añadir seguidamente el extracto de 2-ME a diferentes concentraciones y finalmente detectar las posibles uniones sonda captadora-antígeno con las inmunoglobulinas biotiniladas (sonda marcadora).

Los resultados obtenidos mostraron que cuando se tapizaban los pocillos con una concentración constante (1 μg de proteína por pocillo) de IgGs no biotiniladas (sonda captadora) y se utilizaban las IgGs biotiniladas a una dilución de 1:200, el método era capaz de detectar una concentración mínima de antígeno (extracto de 2-ME) de 100 ng por pocillo (Fig.III.29, panel A).

Una vez calibrada la sensibilidad de la técnica, se procedió a determinar su efectividad en una situación real (Fig.III.29). En este experimento se analizaron sueros de 6 pacientes con candidiasis sistémica confirmada por hemocultivo positivo repetido (Fig.III.29, panel B,1-6), 1 suero de un individuo hospitali-

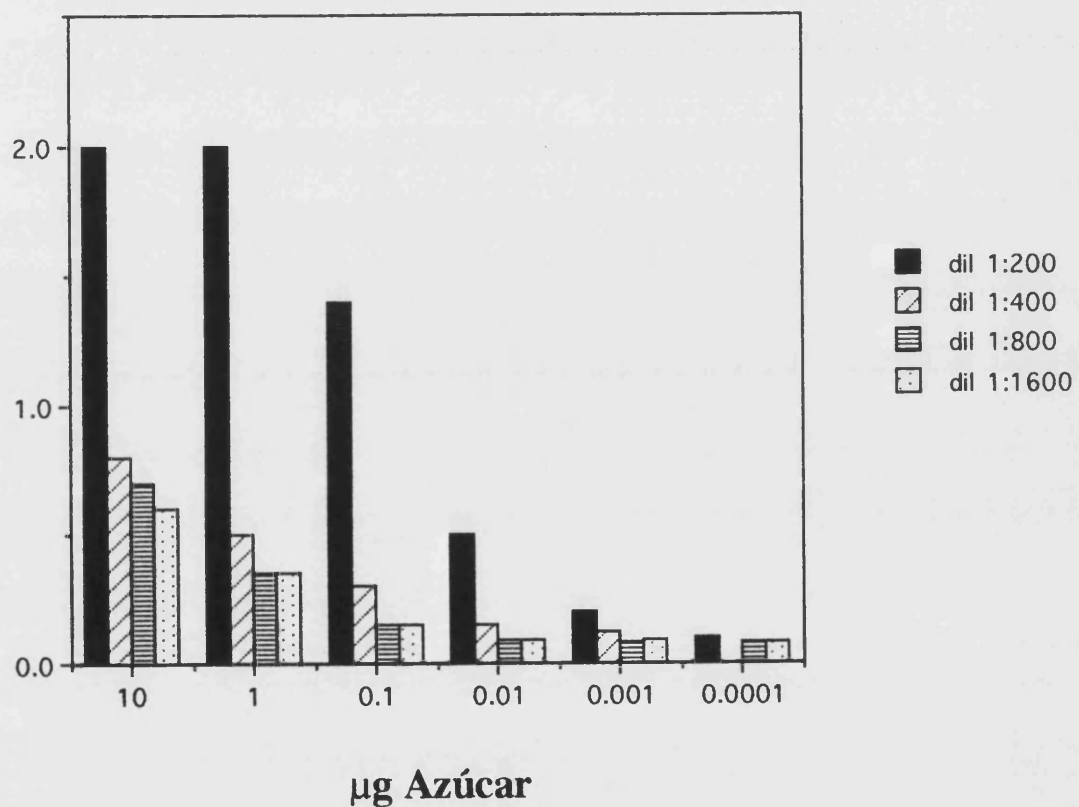


Fig.III.28. Determinación mediante E.L.I.S.A. de la reactividad en función de la dilución ensayada del PAb anti-LátexAd (López-Ribot, 1991) frente al material solubilizado por el 2-ME de la superficie de levaduras germinadas de la cepa ATCC 26555. Los pocillos de la placa se tapizaron con cantidades decimales decrecientes del extracto de 2-ME (expresado como contenido de azúcar total), ensayándose a continuación diferentes diluciones del antisuero etiquetado con biotina. La formación de los complejos antígeno-anticuerpo se reveló mediante la adición de estreptavidina acoplada a peroxidasa y el correspondiente sustrato cromogénico a los pocillos, cuantificándose la intensidad de la reacción coloreada que aparece en cada caso, por la lectura de la absorción a 492 nm. Las barras de la figura son el resultado de la media de dos valores obtenidos para cada ensayo.

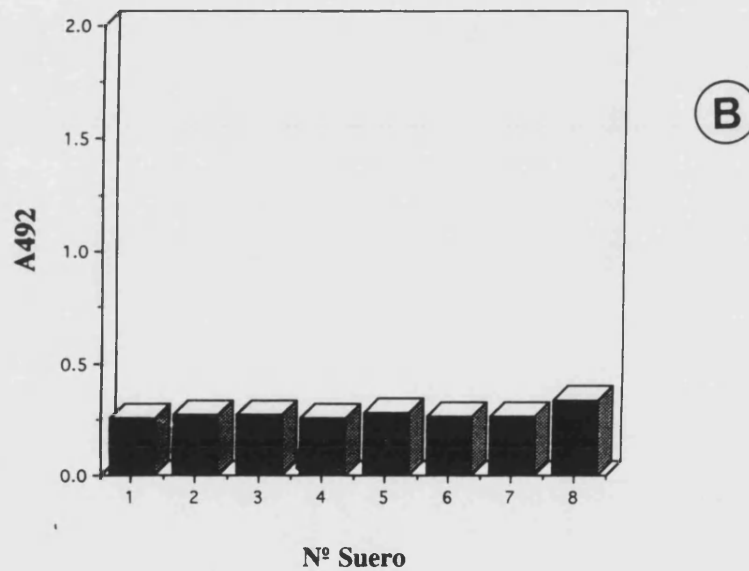
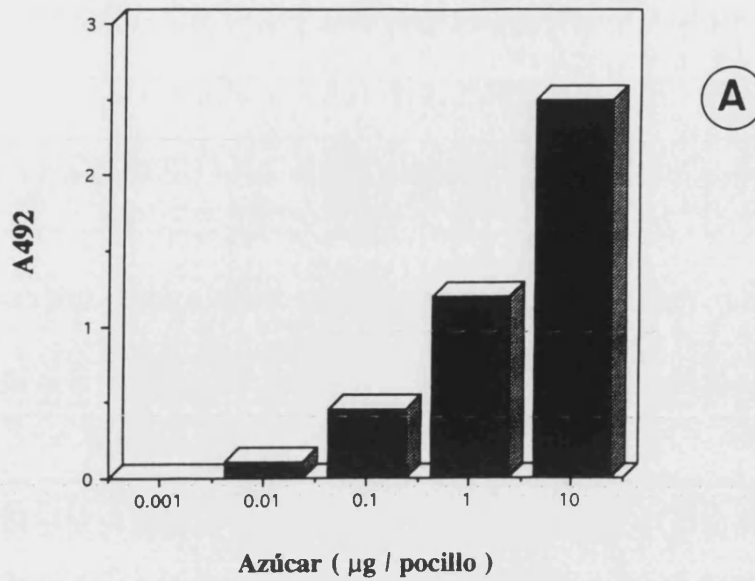


Fig.III.29. Panel A: Cálculo del nivel de detección mínimo de antígeno por el método de inmunocaptura utilizado. A los pocillos tapizados con IgGs anti-LátexAd (1 µg por pocillo) se añadieron cantidades decimalmente crecientes del extracto de 2-ME obtenido de blastosporas (expresado como contenido de azúcar total). Tras la incubación, los inmunocomplejos que pudieran haberse formado eventualmente por inmunocaptura fueron revelados mediante la subsiguiente adición de IgGs anti-LátexAd marcadas con peroxidasa, y tras una nueva incubación, de estreptavidina acoplada a peroxidasa y el sustrato cromogénico apropiado.

Panel B: Detección de antígenos en sueros de pacientes mediante inmunocaptura utilizando como sonda inmunoglobulinas G (IgGs) purificadas a partir del PAb anti-LátexAd (IgGs anti-LátexAd) (panel A). Los pocillos de las placas de E.L.I.S.A. se tapizaron con IgGs anti-LátexAd (1 µg de proteína por pocillo). Seguidamente se depositaron en los pocillos alícuotas de los diferentes sueros ensayados (diluidos 1:10); sueros de 6 pacientes con candidiasis sistémica confirmada por hemocultivo positivo repetido (grupo clínico A; barras 1-6); suero de un individuo hospitalizado pero en situación de ausencia de riesgo de contraer candidiasis (barra 7); suero de un paciente con candidiasis superficial (barra 8). La formación de inmunocomplejos se reveló del mismo modo que en el experimento correspondiente al panel A. En ambos experimentos (paneles A y B) la cuantificación de la reacción coloreada se llevó a cabo midiendo la absorción a 492 nm y las barras son el resultado de la media de dos valores tomados para cada ensayo.

zado pero en situación de ausencia de riesgo de contraer candidiasis (Fig.III.29, panel B,7) y un suero de un individuo aquejado de candidiasis superficial (Fig.III.29, panel B,8). Los sueros problema se diluyeron 1:10 en tampón y se ensayaron mediante el método de E.L.I.S.A-captura descrito anteriormente. Los resultados obtenidos revelaron unos valores de reactividad muy bajos y prácticamente idénticos en todas las muestras procedentes de pacientes con candidiasis sistémica (Fig.III.29, panel B, 1-6) y semejantes a los encontrados en los sueros utilizados como control negativo (Fig. III.29, panel B,7-8), lo que indica que los antígenos presentes en la superficie celular de *C. albicans* (en particular los componentes solubilizados mediante tratamiento de las células con 2-ME), susceptibles de ser retenidos por los anticuerpos captadores (las IgGs del PAb anti-LátexAd), se encontrarían presentes en el suero pero en cantidades por debajo del nivel mínimo de detección del método, o bien serían rápidamente eliminados del torrente circulatorio, de forma semejante como sucede en el caso del manano de pared celular de *C. albicans* (De Repentigny *et al.*, 1985). En este contexto algunos autores han sugerido recientemente que la detección de antígenos citoplásmicos del hongo podrían tener una mayor utilidad como método diagnóstico de las candidiasis sistémicas (Morhart *et al.*, 1994). En conclusión, el método de E.L.I.S.A.-captura para detectar antígenos circulantes, no fue de utilidad, al menos en las condiciones experimentales utilizadas, para el diagnóstico de la candidiasis diseminada.

III.7.2. Detección de anticuerpos específicos

Comprobada la ineficacia del método de detección de antígenos circulantes como criterio diagnóstico de la candidiasis sistémica, seguidamente se procedió a investigar la

reactividad debida a IgGs mediante enzimoinmunoensayo (E.L.I.S.A.) de sueros frente preparaciones antigénicas (extractos de 2-ME y de Zimoliasa, y lisados de protoplastos) obtenidas de blastosporas germinadas de *C. albicans* tal como se indicó en el apartado II.6 del capítulo de Materiales y Métodos, con objeto de evaluar la posible utilidad de esta aproximación experimental para el diagnóstico de la infección.

Con esta finalidad se ensayaron sueros de: (i) 28 pacientes con diagnóstico de candidiasis sistémica confirmado (grupo clínico A), 15 de los cuales eran individuos adictos a las drogas (heroína) mientras que de los 13 pacientes restantes, 9 padecían una fuerte inmunodepresión y 4 de ellos desarrollaron una candidiasis sistémica contraída tras una cateterización; (ii) 46 individuos no hospitalizados aquejados de candidiasis superficial (vaginitis [n=40] y balinitis [n=6]) (grupo clínico B); (iii) 31 individuos sanos y 36 pacientes hospitalizados pero en situación de bajo riesgo para contraer una candidiasis de tipo sistémico, es decir personas no inmunodeprimidas, que no estaban cateterizadas, y no habían sido sometidas ha tratamiento con antibióticos de amplio espectro o a hiperalimentación (grupo clínico C); (iv) 13 pacientes hospitalizados en situación de alto riesgo de contraer candidiasis (a partir de estos individuos se obtuvieron 50 muestras de suero), por padecer diferentes tipos de cáncer y/o por haber sido sometidos aun transplante autólogo de médula ósea (grupo clínico D). Seis de estos pacientes tenían colonización mucocutánea por *Candida* spp. (5 por *C. albicans* y 1 por *Torulopsis glabrata*), aunque ninguno de ellos llegó a desarrollar una candidiasis sistémica durante el periodo en que se realizaron las experiencias.

Las concentraciones óptimas de antígeno, suero problema y segundo anticuerpo marca-

dor a utilizar en los ensayos de E.L.I.S.A. se determinaron previamente mediante titulaciones piloto con sueros control positivos y negativos, para establecer la relación óptima de los diferentes reactivos.

Con objeto de establecer si el ensayo de E.L.I.S.A. utilizado para detectar IgGs circulantes frente a antígenos de pared y citoplásmicos de *C. albicans* era capaz de discriminar entre candidiasis sistémica y no sistémica, los grupos clínicos B, C y D fueron considerados como controles negativos a los efectos del cálculo de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo (negativo y positivo) del ensayo. La línea de corte se estableció añadiendo tres veces el valor de la desviación estandar, al valor medio de las absorbancias (DO_{492}) obtenidas con las muestras de suero procedentes de los grupos B y C. De acuerdo con este criterio, uno podría esperar que el ensayo fuera muy específico pero tuviera una baja sensibilidad, al menos que él mismo fuera capaz de discriminar entre presencia y ausencia de candidiasis sistémica. En este contexto, el ensayo de E.L.I.S.A. utilizado mostró una elevada especificidad (98,6-100%) pero una baja sensibilidad (3,5-17,8%) (Tabla III.3), estando los valores de densidad óptica encontrados, con los sueros de los pacientes del grupo B, por lo general en el mismo rango que los obtenidos cuando se utilizaron los sueros de los individuos de los grupos C y D (Fig.III.30, panel 1). La mayor parte de los métodos existentes en la actualidad para el diagnóstico de las candidiasis se basan principalmente en la detección de anticuerpos dirigidos contra el componente carbohidrato de las manoproteínas de la pared celular de *Candida* (el manano). El escaso poder discriminatorio de tales métodos entre las diferentes formas de candidiasis (superficial y diseminada) se debe principalmente al hecho de que estos anticuerpos están presentes en la mayoría de sueros humanos.

Pensando en la posibilidad de que la baja sensibilidad observada (3,5-17,8%) en los ensayos de E.L.I.S.A. realizados con los sueros crudos (Tabla III.3) pudiera deberse a los anticuerpos anti-manano que eventualmente pudieran estar presentes en los mismos, dichos anticuerpos fueron eliminados por adsorción de los sueros crudos sobre partículas de látex recubiertas de manano (vease apartado II.18 de Materiales y Métodos). La reactividad debida a IgGs en los sueros adsorbidos determinada por E.L.I.S.A. se muestra en la Fig. III.30, panel 2. Como puede apreciarse claramente la adsorción de los sueros incrementó de forma muy significativa la eficiencia diagnóstica del ensayo. Los mejores resultados en lo referente a sensibilidad (89,2%) y especificidad (98,6%) con los sueros adsorbidos se obtuvieron cuando estos se enfrentaron al extracto de 2-Me como preparación antigénica (Tabla III.3). Hay que destacar el hecho de que con el extracto de 2-ME, prácticamente todos los sueros procedentes de pacientes fuertemente inmunodeprimidos dieron por E.L.I.S.A. valores de DO_{492} por encima de la línea de corte establecida (Fig. III.30, panel 2), y en el rango de los obtenidos con los sueros de los individuos consumidores de drogas (grupo clínico A); sin embargo, ninguno de los sueros obtenidos de los pacientes incluidos en el grupo D dió valores de DO_{492} por encima de la línea de corte (Fig.III.30, panel 2).

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, las manoproteínas son los principales componentes antigénicos presentes en la pared celular de *C. albicans* y en consecuencia deben actuar como los inductores más inmediatos de la respuesta inmune en el hospedador infectado (Casanova *et al.*, 1989, 1991; Cassone, 1989; Chaffin *et al.*, 1988; Gil *et al.*, 1991). Por otro lado la capacidad de formar hifas parece jugar un papel importante

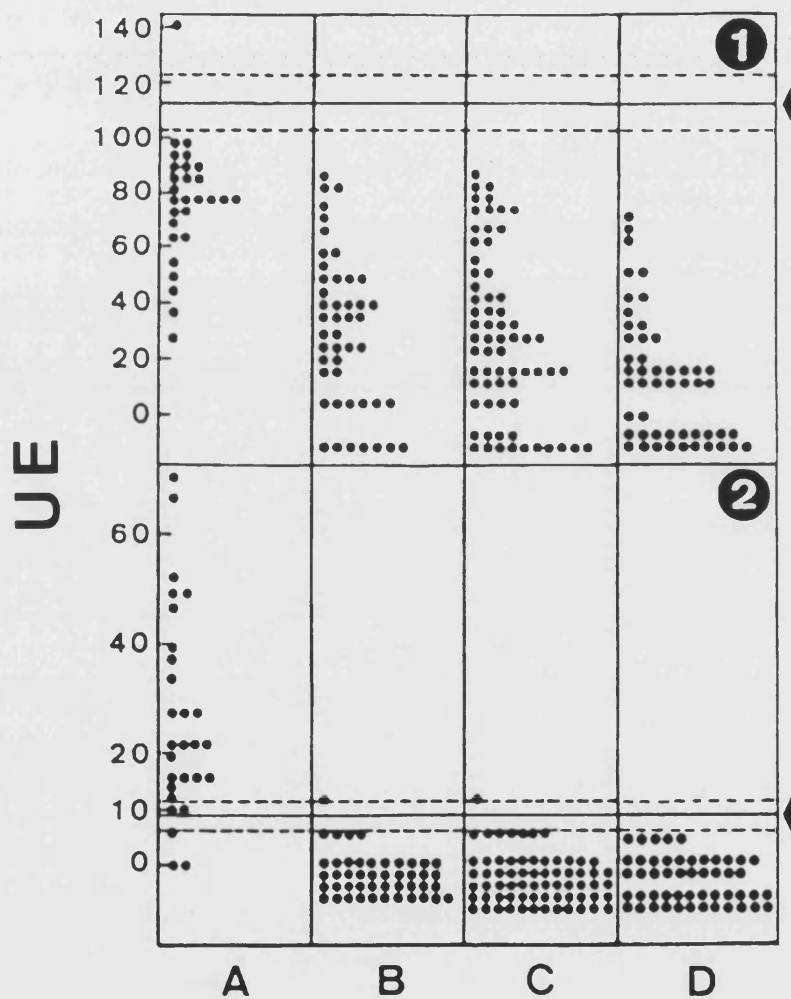


Fig.III.30. Reactividad específica debida a IgGs de sueros de individuos pertenecientes a los grupos clínicos A, B, C y D (ver texto) frente al extracto de 2-ME de blastosporas germinadas (micelio). La reactividad se determinó mediante enzimoimmunoensayo (E.L.I.S.A.) antes (panel 1) y después (panel 2) de adsorber los sueros con microesferas de látex recubiertas con manano para eliminar selectivamente los anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos de naturaleza carbohidrato (manano). Los valores se expresan como unidades arbitrarias de E.L.I.S.A. (UE; ver Materiales y Métodos). En cada panel la flecha indica la línea de corte, mientras que las líneas discontinuas delimitan la zona de incertidumbre debida a la variación del ensayo.

como factor de virulencia durante la interacción hospedador-parásito. En consecuencia, la detección de anticuerpos generados frente a antígenos expresados de forma específica o preferencial en la pared de las células miceliales podría ser de utilidad para el diagnóstico de las candidiasis invasivas. Teniendo en cuenta todo ello, junto con el hecho de que los agentes reductores (ditiotreitól, 2-ME) solubilizan componentes proteicos y manoproteicos localizados en las capas más externas de la pared celular del hongo, entre los que se encontrarían una serie de moléculas implicadas y/o relacionadas con la virulencia y la patogenicidad (Calderone y Braun, 1991; Casanova *et al.*, 1992a; Cassone, 1989; Hostetter, 1994; López-Ribot *et al.*, 1991; Sentandreu *et al.*, 1991), podría explicarse por qué el extracto de 2-ME fue la preparación antigénica con la que se obtuvo una mejor discriminación (o en otras palabras, una mayor sensibilidad del ensayo) de entre todas las utilizadas (Tabla III.3).

Los valores de sensibilidad y especificidad óptimos (89,2% y 98,6% respectivamente) obtenidos mediante la técnica de E.L.I.S.A. utilizando los sueros preadsorbidos y el extracto de 2-ME como antígeno, son similares (Zoller *et al.*, 1991) o incluso superiores (Greenfield *et al.*, 1983) a los obtenidos por otros autores que han utilizado tanto mezclas como especies purificadas de antígenos citosólicos de *C. albicans*. Además, el procedimiento descrito en esta memoria, evita o soluciona algunos de los problemas inherentes a la mayor parte de ensayos serológicos para el diagnóstico de las candidiasis existentes en la actualidad, como son: (i) la necesidad de recurrir a procesos técnicamente complejos para purificar los antígenos marcadores, procesos que pueden, por otro lado, alterar las características nativas de tales antígenos y dificultan la posibilidad de una obtención barata

de los mismos a escala industrial, (ii) escasa capacidad discriminatoria entre las formas invasiva y superficial de la candidiasis, y (iii) una baja sensibilidad (Jones, 1990, Zoller *et al.*, 1991; Greenfield *et al.*, 1983). En este contexto, el tratamiento de células intactas con 2-ME es un método simple y barato que permite la obtención de un extracto antigénico adecuado, sin alterar de forma sustancial las características nativas de los diferentes determinantes antigénicos presentes en el mismo. Por otro lado, el método de adsorción de los sueros con partículas de látex sensibilizadas con manano para eliminar de forma selectiva los anticuerpos anti-manano, con objeto de incrementar la sensibilidad del ensayo, es una técnica sencilla de realizar, por lo que podría incluirse fácilmente en el diagnóstico de rutina.

Una de las reservas más importantes que surge de forma habitual en relación con los métodos de diagnóstico de la candidiasis basados en la detección de anticuerpos, es que la mayor parte de pacientes aquejados de la enfermedad parecen ser incapaces de desencadenar una respuesta inmune de tipo humoral lo suficientemente intensa como para tener un título detectable de anticuerpos. Sólo 9 de los pacientes con diagnóstico confirmado de candidiasis sistémica, estaban profundamente inmunodeprimidos, aunque fue posible detectar en los mismos un título considerable de IgGs específicas. De hecho, las DO₄₉₂ medidas en estos casos fueron comparables e incluso superiores a las obtenidas con los sueros de los individuos drogadictos, también incluidos en el grupo clínico A. Por consiguiente, aunque es preciso analizar una población más numerosa de individuos inmunodeprimidos que la estudiada en el presente trabajo, los resultados preliminares que se han comentado anteriormente indican que la técnica de E.L.I.S.A. empleada aquí, podría ser

de utilidad en la práctica clínica. Finalmente, una prueba de tipo serológico para el diagnóstico de la candidiasis no debe de ser capaz de discriminar entre las formas invasiva y superficial de la infección solamente, sino también debe permitir un diagnóstico en los estadios iniciales de la enfermedad, de forma que pueda administrarse lo más rápidamente posible el tratamiento quimioterápico apropiado. En este contexto, experiencias preliminares llevadas a cabo por nuestro grupo utilizando un ensayo de E.L.I.S.A. semejante al descrito en esta memoria pero encaminado a la detección de IgMs en lugar de IgGs, indican que podría ser una aproximación experimental de utilidad para la detección precoz de la infección.

III.7.3. Análisis por inmunotransferencia de la reactividad de sueros escogidos frente a diferentes preparaciones antigénicas

Con objeto de caracterizar de forma individualizada las moléculas que contenían los determinantes antigénicos responsables de la reactividad observada mediante el ensayo de E.L.I.S.A., las proteínas y manoproteínas presentes en los extractos de 2-ME se separaron mediante SDS-PAGE, y seguidamente se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Western blot). La hoja de nitrocelulosa se dividió longitudinalmente en tiras de idéntica anchura, y cada una de las tiras se enfrentó a un suero en particular, revelándose seguidamente las posibles interacciones antígeno-anticuerpo con un antisuero de cabra anti-inmunoglobulinas de tipo G humanas (ver apartado II.12 del capítulo de Materiales y Métodos). En concreto se ensayaron 22 muestras de suero procedentes de los pacientes del grupo clínico A (individuos con candidiasis sistémica confirmada) y 67 muestras de suero de individuos sanos (grupo clínico C). En las Figs. III.31 y III.32 se muestran algunos ejemplos seleccionados de los patrones de reactividad observa-

dos con los extractos de 2-ME (Fig. III.31) y Zimoliasa (Fig. III.32) respectivamente.

Por lo general se observó reactividad de los sueros procedentes de individuos con candidiasis sistémica confirmada frente componentes del extracto de 2-ME en un rango de peso molecular de 62 a 12 kDa (Fig. III.31). Una banda de 58 kDa (Fig. III.31, b) fue el antígeno más frecuentemente reconocido por los sueros (18 de 22 muestras), seguido de otros componentes de 62 kDa (banda a), 37 kDa (banda c), 14 kDa (banda g), y 12 kDa (banda h), aunque el antígeno de 58 kDa (banda b) fue reconocido por algunos sueros de individuos presuntamente sanos (Fig. III.31, calle 1). Otros antígenos con pesos moleculares aparentes de 33 kDa (banda d), 29 kDa (banda e), y 16 kDa (banda f) también fueron reconocidos, aunque con menor frecuencia, por varios de los sueros ensayados (Fig. III.31). Eventualmente, algún suero mostró reactividad frente a numerosos componentes de medio y bajo peso molecular (Fig. III.31, calle 4), mientras que otros inmunorreaccionaron con un material de muy alto peso molecular (>108 kDa) y de naturaleza polidispersa (Fig. III.31, calles 2-5 y 8). Un análisis estadístico (X^2 , $P < 0,005$) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas en las frecuencias de detección de los componentes antigénicos mayoritarios entre los sueros pertenecientes al grupo clínico A y los del grupo control (grupo clínico C) (no mostrado).

Cuando se utilizó como preparación antigénica el extracto de Zimoliasa, el patrón de bandas reconocidas por los sueros fue distinto (Fig. III.32) al encontrado frente al extracto de 2-ME (Fig. III.31). En este caso, la mayoría de sueros de los pacientes del grupo clínico A reconocieron sistemáticamente una serie de antígenos de elevado peso molecular aparente (Fig. III.32, calles 2-9, bandas a-c),

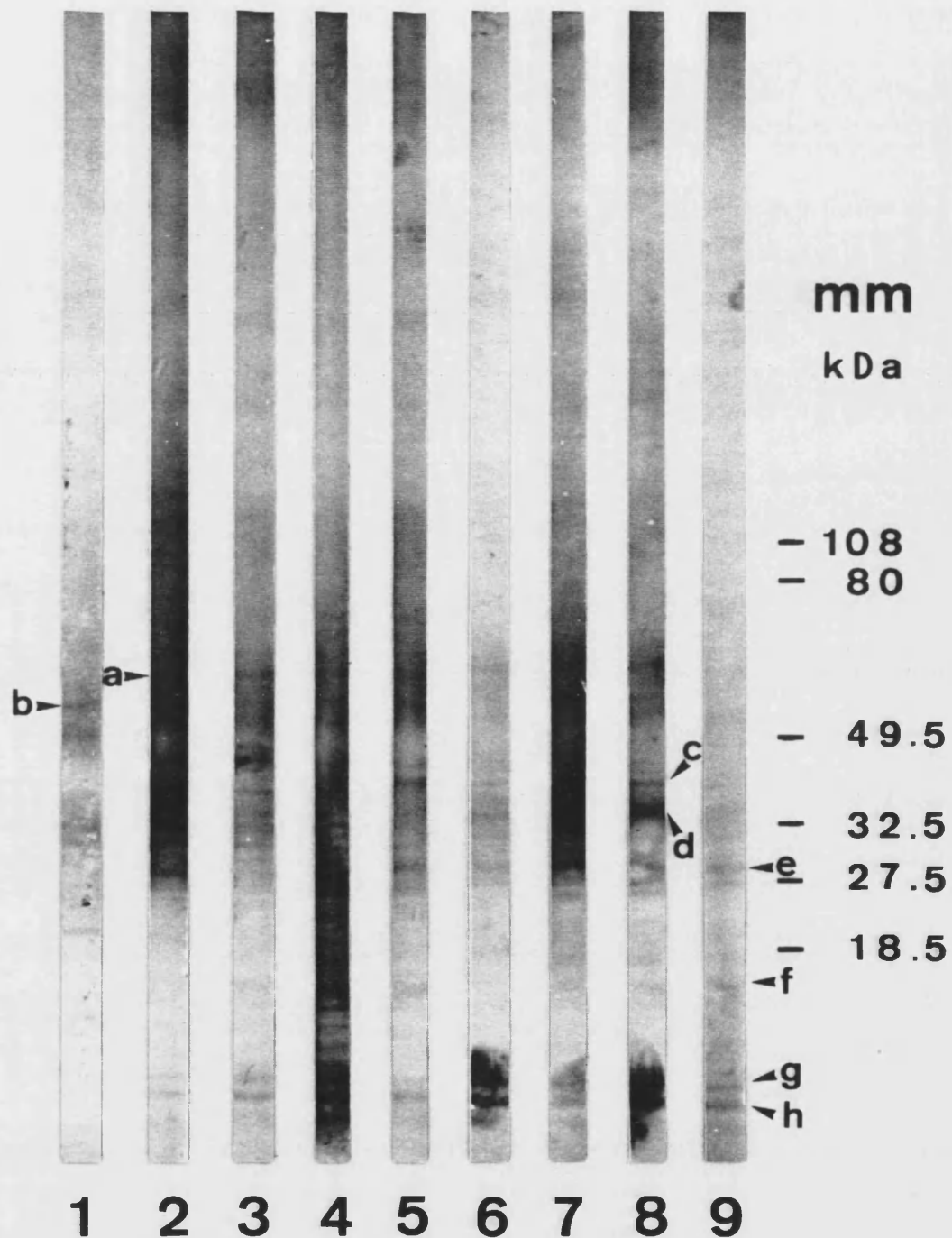


Fig.III.31. Análisis mediante inmunotransferencia de la reactividad de 1 suero del grupo clínico C (calle 1) y 8 sueros representativos del grupo clínico A (calles 2-8) frente a material solubilizado por 2-ME de blastosporas germinadas (micelio). Tras la separación electroforética (geles en gradiente del 5-15% de acrilamida) de los diferentes polipéptidos presentes en el extracto de 2-ME, estos se transfirieron a papel de nitrocelulosa. El papel de nitrocelulosa se dividió en varias tiras, cada una de las cuales se incubó con cada uno de los diferentes sueros (ensayados a una dilución 1:100). La detección de los correspondientes complejos antígeno-anticuerpo se llevó a cabo mediante un segundo anticuerpo marcador (antisuero de cabra frente IgG humanas) acoplado a peroxidasa, utilizando una dilución 1:500. Las letras identifican las bandas (antígenos) que fueron reconocidas más frecuentemente por los diferentes sueros. A la derecha de la figura se indica la movilidad electroforética de proteínas de peso molecular conocido (expresado en kDa) corridas en paralelo.

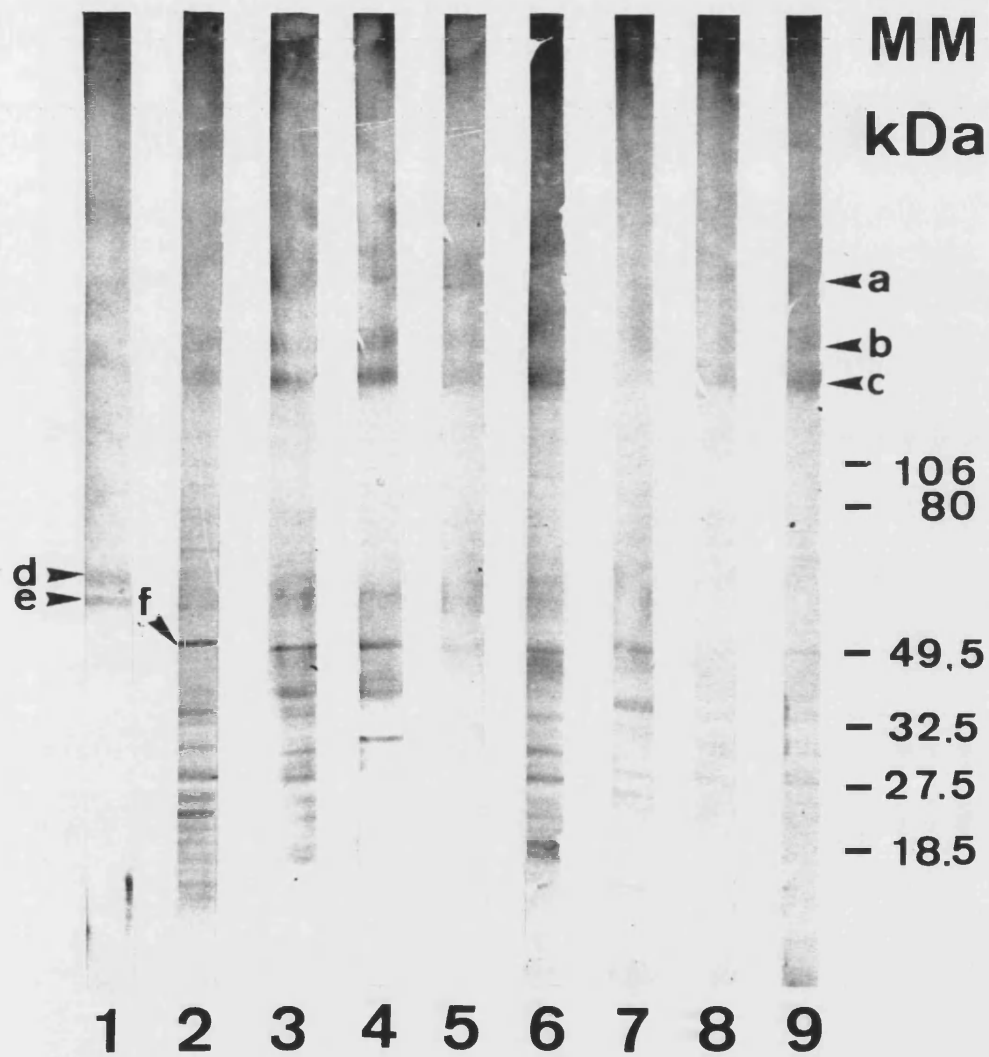


Fig.III.32. Análisis mediante inmunotransferencia de la reactividad de sueros humanos frente al material solubilizado por el tratamiento de blastosporas germinadas (micelio) con Zimoliasa. El orden de las muestras y las condiciones experimentales se describe en la leyenda de la Fig.III.31.

que podrían corresponder a las especies manoproteicas de alto peso molecular específicas de la morfología micelial previamente descritas por nuestro grupo (Casanova *et al.*, 1989). Estos antígenos no fueron detectables por los sueros de los individuos del grupo C (Fig. III.32, calle 1). Estas observaciones indican que aunque las manoproteínas de alto peso molecular de la pared celular extraídas mediante digestión con Zimoliasa, parecen jugar básicamente un papel estructural (morfogenético) (Calderone y Braun, 1991; Casanova *et al.*, 1989, 1990; Martínez *et al.*, 1990a,b; Sentandreu *et al.*, 1991), localizándose muy probablemente en las regiones más internas de la pared celular de forma preferencial, son también capaces de inducir una respuesta inmune de tipo humoral en el hospedador infectado. Otro antígeno de unos 49 kDa también fue específicamente reconocido por los sueros de los pacientes con diagnóstico confirmado de candidiasis (Fig. III.32, calles 2-8, banda f) pero no por los sueros de individuos sanos (Fig. III.32, calle 1). También se apreció inmunorreactividad frente a antígenos con pesos moleculares aparentes de 58 y 62 kDa (Fig. III.32, bandas d,e), aunque en este caso la especificidad fue menor puesto que dichos antígenos fueron reconocidos por sueros de personas sanas (o con diagnóstico negativo de candidiasis; Fig. III.32, calle 1). A diferencia de lo observado cuando se utilizó el extracto de 2-ME como preparación antigénica, muchos de los sueros pertenecientes al grupo clínico A mostraron reactividad frente a numerosos componentes de medio y bajo peso molecular (Fig. III.32, calles 2,3,6 y 7).

Como se mencionó anteriormente, los componentes de 62 y 58 kDa fueron dos de los antígenos más frecuentemente reconocidos por los sueros de los individuos con candidiasis sistémica en los extractos de 2-ME

(Fig. III.31, bandas a,b). Un antígeno de 37 kDa (Fig. III.31, banda c) también mostró reactividad con varios de los sueros del grupo clínico A ensayados. En este contexto, hay que indicar que se han identificado proteínas de la superficie celular de *C. albicans* con un peso molecular de 60-62 kDa que exhiben afinidad por laminina y complemento (C3d) (Calderone y Braun, 1991). Así mismo, nuestro grupo ha identificado una manoproteína de 58 kDa receptora para fibrinógeno humano (Casanova *et al.*, 1992a), y el receptor para laminina descrito en la presente memoria (ver apartado III.1) tiene un peso molecular aparente de 37 kDa. Todas estas moléculas implicadas y/o relacionadas con la virulencia y la patogenicidad (Calderone y Braun, 1991; Hostetter, 1994), son liberadas por la acción de agentes reductores (ditiotreitól, 2-ME) lo que implica que están localizadas en las capas más externas de la pared celular del hongo, y en consecuencia podrían actuar como inductores inmediatos de la respuesta inmune del hospedador infectado.

Entre los numerosos componentes proteicos y manoproteicos presente en los extractos de 2-ME y de Zimoliasa (Casanova *et al.*, 1992b), otros antígenos con un peso molecular aparente de 49 kDa (Fig. III.32, banda f) y 29 kDa (Fig. III.31, banda e) también mostraron inmunorreactividad con los sueros de los pacientes del grupo clínico A. Estos antígenos tienen un tamaño molecular semejante al de ciertas proteínas somáticas (¿citosólicas?) que han sido utilizadas como antígenos marcadores específicos en diferentes ensayos serológicos para el diagnóstico de las candidiasis (Matthews y Burnie, 1988; Strockbine *et al.*, 1984; Zoller *et al.*, 1991). Aunque las proteínas y manoproteínas presentes en los extractos de 2-ME y de Zimoliasa parecen ser componentes autóctonos de la pared celular de *C.*

albicans (Casanova *et al.*, 1992a), no puede descartarse totalmente la existencia de algunas proteínas citosólicas (por ejemplo, los antígenos de 49 y 29 kDa) en dichos extractos, y más concretamente en el caso del extracto de 2-ME, puesto que se ha sugerido que al tratamiento de células intactas del hongo con agentes reductores (procedimiento utilizado en este trabajo) puede ocasionar la liberación de algunas proteínas intracelulares junto con los componentes de la pared celular (Calderone y Braun, 1991). En este contexto, la presencia combinada de antígenos de pared y algunos antígenos citosólicos en el extracto de 2-ME podría contribuir al hecho de que ésta fuera la preparación antigénica que permitió una mejor discriminación entre candidiasis sistémica y no sistémica en los ensayos de E.L.I.S.A. (Fig. III.30 y Tabla III.3). De hecho, el lisado de protoplastos (que sería equivalente a la fracción citosólica) fue, después del extracto de 2-ME, la mejor preparación antigénica utilizada en los ensayos de E.L.I.S.A., en términos de sensibilidad y especificidad.

Finalmente, indicar que los antígenos de muy bajo peso molecular (alrededor de 14 kDa) reconocidos por la mayoría de sueros de los pacientes del grupo clínico A en los extractos de 2-ME Fig. III.31, bandas g,h), pueden ser semejantes a un antígeno mayoritario de *C. albicans* de 14-18 kDa que ha sido caracterizado recientemente, y que es reconocido por IgG₃ humanas (Poulain *et al.*, 1993).

Del conjunto de resultados obtenidos a partir del estudio de la reactividad de los sueros mediante inmunotransferencia parece lógico concluir que puesto que no parece existir un único antígeno de *Candida* que fuese reconocido por todos los sueros de los pacientes con diagnóstico confirmado de candidiasis (grupo clínico A), es preciso utilizar preparaciones antigénicas complejas en los ensayos diagnósticos basados en el método de E.L.I.S.A., con objeto

de incrementar la eficiencia de los mismos. Una observación semejante ha sido realizada por otros autores (Zoller *et al.*, 1991).

III.7.4. Reactividad de los sueros frente a antígeno-látex

Uno de los requisitos que debe cumplir cualquier método de diagnóstico de una enfermedad infecciosa es que debe ser técnicamente sencillo de realizar, sin que ello signifique renunciar a que el método posea una elevada sensibilidad y especificidad. Esto es particularmente importante en los procedimientos basados en criterios serológicos, que en muchas ocasiones implican utilizar una metodología compleja que requiere una especialización por parte del analista y que, además, suele ser clara.

Teniendo en cuenta esta premisa y los resultados derivados de la detección de anticuerpos mediante E.L.I.S.A. (ver apartado III.7.2. del capítulo de Resultados y discusión), se consideró interesante ensayar la reactividad de los sueros de los diferentes grupos clínicos, mediante la técnica de aglutinación en portaobjetos, que por su sencillez, sensibilidad y economía tiene un amplio campo de aplicación en la práctica clínica.

Para llevar a cabo el ensayo, se preparó una suspensión de antígeno-látex adsorbiendo el extracto de 2-ME obtenido de blastosporas germinadas (micelio), que fue con el que se obtuvo una mayor eficiencia diagnóstica en lo referente a sensibilidad y especificidad en el ensayo de E.L.I.S.A., sobre partículas de látex-poliestireno con un diámetro de 0,801 +/- 0,036 µm (ver apartado II.19 del capítulo de Materiales y Métodos).

Alicuotas de la suspensión de antígeno-látex se enfrentaron a volúmenes semejantes de los diferentes sueros sobre portaobjetos de vidrio, y la intensidad de la reacción de aglutinación aparecida se cuantificó según el siguiente cri-

Preparación antigénica

	Extracto de 2-ME		Extracto de Zimoliasa		Extracto citosólico	
	Suero crudo	Suero adsorbido	Suero crudo	Suero adsorbido	Suero crudo	Suero adsorbido
Sensibilidad	3,5	89,2	17,8	32,1	12	46,4
Especificidad	100	98,6	100	97,3	98,6	100
Valor predictivo positivo	100	92,5	100	69,2	60	100
Valor predictivo negativo	85	97,4	86,9	88,6	85,7	86,9

Tabla III.3. Sensibilidad y especificidad (expresadas en porcentaje) de los E.L.I.S.A.S. con diferentes preparaciones antigénicas obtenidas para los sueros crudos o previamente tratados para eliminar selectivamente la reactividad debida a componente carbohidrato (manano).

terio, comparando con lo observado en los respectivos controles positivos y negativos: +++, aglutinación fuerte; ++, aglutinación media; +, aglutinación débil; -, ausencia de aglutinación.

Tabla III.4. Relación de sueros ensayados frente a bolas de latex poliestireno tapizadas con extracto de 2-ME de blastosporas germinadas. +++, aglutinación fuerte; ++, aglutinación media; +, aglutinación débil; -, ausencia de aglutinación.

Nº Suero	Aglutinación	Grupo clínico
1	+++	A
2	+++	A
3	+++	A
4	+++	A
5	+++	A
6	+++	A
7	+++	A
8	++	A
9	++	A
10	++	A
11	++	A
12	++	A
13	++	A
14	++	A
15	++	A
16	++	A
17	++	A
18	+	A
19	+	A
20	+	A
21	+	A
22	+	A
23	+	B
24	-	B
25	-	B
26	-	B
27	-	B
28	-	B
29	-	B
30	-	B
31	-	B
32	-	B
33	-	C
34	-	C
35	-	C
36	-	C
37	-	C

En general todos los sueros procedentes de los pacientes con candidiasis sistémica confirmada (grupo clínico A), dieron una reacción fuerte, mientras que los sueros de los restantes grupos clínicos ensayados, no aglutinaron o dieron una reacción débil que desapareció al someter a tratamiento térmico dichos sueros para inactivar aglutininas inespecíficas (ver apartado II.19 de Materiales y Métodos). En función del criterio de cuantificación de la reacción de aglutinación anteriormente indicado, los sueros se clasificaron en cuatro grupos, que se solaparon bastante bien con los cuatro grupos clínicos establecidos. En la Tabla III.4 se indica la intensidad de la reacción de aglutinación y el grupo clínico al que pertenece el suero correspondiente. Estos resultados sugieren que la técnica de aglutinación pasiva podría ser de utilidad como método de diagnóstico de la candidiasis sistémica, aunque como se comentó en el caso de la detección de anticuerpos por el método de E.L.I.S.A., es preciso analizar una población más numerosa de individuos inmunodeprimidos que la estudiada en el presente trabajo, para dar validez al método.

III.8. Conclusiones

1. Un polipéptido de 37 kDa (p37), que posee semejanza antigénica con el precursor de 37 kDa del receptor humano de alta afinidad para laminina, se encuentra presente en extractos obtenidos mediante tratamiento de células intactas de ambas fases morfológicas (levadura y micelio) de *Candida albicans* con 2-mercaptoetanol, agente que extrae básicamente componentes proteicos y glicoprotéicos autóctonos de la pared celular del hongo.

2. Mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando como sondas anticuerpos policlonales mono-específicos tanto contra el receptor humano de laminina (frente a los cuales exhibe inmunorreactividad la especie p37) como contra la propia proteína p37 (éstos últimos obtenidos en el presente trabajo), se puso de manifiesto que dicha molécula se expresa principalmente o está topológicamente más accesible en la superficie de las células levadoriformes.

3. La especie p37 representa un receptor para laminina distinto de otros previamente caracterizados para dicho ligando en la fase micelial del hongo, puesto que sólo parece ser funcional en lo que respecta a su capacidad para interactuar específicamente con laminina, en el caso de las células levadoriformes. La existencia de diferentes familias de receptores para laminina expresadas selectivamente en cada una de las dos morfologías de *Candida albicans* podría estar relacionada con una diferente capacidad de cada forma de crecimiento para colonizar e invadir los tejidos durante el proceso infeccioso.

4. Tanto la especie p37 descrita en el presente trabajo como la manoproteína de 58 kDa receptora para fibrinógeno (mp 58) caracterizada previamente por nuestro grupo, junto con algunas otras proteínas y/o glicoproteínas de elevado peso molecular presentes en la pared celular del hongo, pero cuya identidad

y función no son conocidas, poseen epitopos determinados por la secuencia de aminoácidos, que mimetizan dominios colagenosos de la molécula de colágeno tipo IV.

5. La presencia de dominios colagenosos en las especies anteriormente mencionadas podrían determinar vías alternativas o complementarias de interacción de las células de *Candida albicans* con otros componentes de las matrices extracelulares de los tejidos animales, tales como la entactina y la fibronectina. En consecuencia, dichos dominios podrían jugar un papel importante determinante de las interacciones proteína-proteína, que son una de las tres categorías de mecanismos de adhesión propuestos para este microorganismo.

6. El análisis mediante cromatografía de filtración molecular e intercambio iónico del material solubilizado tras el tratamiento de células intactas de *Candida albicans* con 2-mercaptoetanol, sugiere que las proteínas y manoproteínas de la pared celular se encontrarían *in vivo* formando parte de complejos multiproteicos, lo que podría modular el papel funcional y/o estructural que estas moléculas pudieran desempeñar en la pared celular. La existencia de tales complejos hace así mismo difícil la purificación individual de las diferentes especies proteicas y manoproteicas presentes en el extracto mediante técnicas cromatográficas clásicas.

7. Mediante el rastreo de genotecas con el antisero generado frente a la especie p37 se aisló un ADNc que codifica para la poliubiquitina de *Candida albicans*. La región codificante contiene tres copias de ubiquitina dispuestas en tándem y unidad cabeza-cola sin ningún espacio de separación intermedio como ocurre en la poliubiquitina de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en este caso en número de copias o repeticiones es diferente. Los 76 aminoácidos de cada unidad de ubiquitina de *Candida albicans* son idénticos a

los de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que el aminoácido extra localizado en el extremo C-terminal de la última subunidad (Phe) es diferente al de *Saccharomyces cerevisiae*.

8. Cualquier posible relación entre la proteína p37 y la ubiquitina está por determinar. El hecho de que se haya clonado en gen de la poliubiquitina con el anticuerpo anti-p37, así como la reactividad de anticuerpos anti-ubiquitina de cerdo frente a células intactas por inmunofluorescencia y frente a proteínas presentes en el extracto de 2-mercaptoetanol por inmunotransferencia, sugiere la existencia de especies ubiquitinadas en la superficie celular de *Candida albicans*. Si la proteína p37 receptora para laminina estuviera ubiquitinada, al igual que se ha descrito para diversas moléculas receptoras en células superiores, ello podría modular su funcionalidad *in vivo* y jugar un papel en la interacción del hongo y los tejidos animales.

9. Se apreció una respuesta muy variable de las diferentes cepas de *Candida albicans* de origen clínico estudiadas a las condiciones experimentales utilizadas para inducir la formación de micelio. Aunque las características de crecimiento *in vivo* (es decir en tejidos infectados) pueden diferir notablemente de las observadas *in vitro*, la heterogeneidad apreciada en lo que respecta a la capacidad para filamentar en cepas del hongo aisladas a partir de individuos aquejados de candidiasis, sugiere que la formación de tubos germinativos podría tener tan solo una importancia relativa como factor de virulencia.

10. El análisis mediante diferentes técnicas electroforéticas del material solubilizado por el 2-mercaptoetanol a partir de células de las diferentes cepas de origen clínico incubadas en condiciones adecuadas para inducir el crecimiento en fase levaduriforme o la emisión de tubos germinativos, confirmó la dificultad

puesta de manifiesto en estudios previos de nuestro grupo para definir antígenos que, por expresarse de forma general en todas las cepas de *Candida albicans*, pudieran utilizarse como marcadores selectivos para el diagnóstico serológico de las candidiasis sistémicas, debido a la gran variabilidad cuali y cuantitativa observada en los componentes proteicos y manoproteicos de la superficie celular en función tanto de la cepa como de las condiciones de crecimiento.

11. Los resultados obtenidos indican que proteínas semejantes al receptor mp58 para fibrinógeno se encuentran presentes en la pared celular de todas las cepas de origen clínico examinadas, aunque existen diferencias antigénicas y funcionales entre las diferentes especies homólogas de la mp58 detectadas, en función de la cepa examinada y de las condiciones de incubación *in vitro*. Teniendo en cuenta que la especie mp58 parece expresarse de forma muy generalizada, y que por sus características biológicas cabe atribuirle un papel importante como factor de virulencia para el hongo, esta molécula pudiera ser un candidato potencial como antígeno marcador específico.

12. No fue posible detectar antígenos de *Candida albicans* circulantes en el suero de pacientes con diagnóstico confirmado de candidiasis sistémica, en concreto las especies presentes en los extractos de 2-mercaptoetanol, mediante el ensayo de inmunocaptura diseñado, lo que apunta a que estos antígenos se encontrarían, caso de estar presentes en el suero, en concentraciones por debajo del nivel mínimo de detección del método, o bien serían rápidamente eliminados del torrente circulatorio.

13. El ensayo de E.L.I.S.A. puesto a punto para detectar inmunoglobulinas G circulantes frente a antígenos de pared y citoplásmicos de *Candida albicans* en sueros humanos proce-

dentos de diferentes grupos clínicos, mostró una elevada sensibilidad (89,2%) y especificidad (98,6%) en lo que respecta a su capacidad para discriminar entre presencia y ausencia de candidiasis sistémica, cuando los sueros fueron preadsorbidos para eliminar anticuerpos dirigidos contra el manano que son inespecíficos y tienen carácter ubícuo en la mayoría de sueros humanos, y se enfrentaron al extracto de 2-mercaptoetanol como preparación antigénica.

14. El estudio de la reactividad de los sueros mediante inmunotransferencia mostró que no existe un mismo antígeno de *Candida* que fuera reconocido específicamente por todos los sueros de pacientes con diagnóstico confirmado de candidiasis sistémica, por lo que parece preciso utilizar preparaciones antigénicas complejas en los ensayos diagnósticos basados en el método de E.L.I.S.A., con objeto de incrementar la eficiencia de los mismos. En cualquier caso, varias especies con pesos moleculares de 62, 58, 37, 33, 29, 16, 14 y 12 kDa presentes en el extracto de 2-mercaptoetanol mostraron reactividad frente a la mayoría de sueros analizados. Algunos de estos antígenos (las especies de 62, 58 y 37 kDa) tienen pesos moleculares semejantes a los de los receptores de *Candida albicans* para complemento, fibrinógeno y laminina.

15. El 2-mercaptoetanol solubiliza, componentes proteicos y manoproteicos localizados, aparentemente, en las capas más externas de la pared celular de *Candida albicans*, entre los que se encontrarían una serie de moléculas relacionadas con la virulencia y la patogenicidad, y que en consecuencia podrían actuar como los inductores más inmediatos de la respuesta inmune en el hospedador infectado. La presencia combinada de antígenos de pared y posiblemente de algunos antígenos citosólicos en el extracto de 2-mercaptoetanol, explicaría porqué ésta fue la preparación anti-

génica que permitió una mejor discriminación entre presencia o no de candidiasis sistémica en el ensayo de E.L.I.S.A.

IV. BIBLIOGRAFÍA

- ALAEI, S., C. LARCHER, C. EBENBICHLER, W.M. PRODINGER, J. JANATOVA y M.P. DIERICH. 1993. Isolation and biochemical characterization of iC3b receptor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **61**:1395-1399.
- ALBEDA, S.M. y C.A. BUCK. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* **4**:2868-2880.
- ALLOUSH, H.M. J.L. LÓPEZ-RIBOT y W.L. CHAFFIN. 1995. Dynamic expression of cell wall proteins of *Candida albicans* revealed by probes from cDNA clones. *J. Med. Vet. Mycol* (en prensa).
- AOTA, S.I., T. NAGAI, K. OLDEN, S.K. AKIYAMA y K.M. YAMADA. 1991. Fibronectin and integrins in cell adhesion and migration. *Biochem. Soc. Transac.* **19**:830-835.
- AU-YOUNG, J.K., F.A. TROY y E. GOLDSTEIN. 1985. Serologic analysis of antigen-specific reactivity in patients with systemic candidiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **3**:419-432.
- BAILEY, J., E. SADA, C. BRASS y J. BENNETT. 1985. Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. *J. Clin. Microbiol.* **21**:749-752.
- BANERJI, J., J. SANDS, J.L. STROMINGER y T. SPIES. 1990. A gene pair histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and single ubiquitin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:2374-2378.
- BARNES, W.M. 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:2216-2220.
- BARLOW, A.J.E., T.A. ALDERSLEY y F.W. CHATTAWAY. 1974. Factors present in serum and seminal plasma which promote germ-tube formation and mycelial growth of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **82**:261-272.
- BEACHEY, E.H. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**:325-345.
- BEDNARCZYK, J.L., M.C. SZABO, J.N. WYGANT, A.I. LAZAROVITS y B.W. Mc INTYRE. 1994. Identification of a combinatorial epitope expressed by the integrin α 4 β 1 heterodimer involved in the regulation of cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **269**:8348-8354.
- BEJARANO, P.A., J.P.M. LANGEVELD, B.G. HUDSON y M.E. NOELKEL. 1989. Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immun.* **57**:3783-3787.
- BODEY, G. 1984. Candidiasis: a growing concern. *Am. J. Med.* **77** : 1-48.
- BORG, M. y R. RUCHEL. 1988. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect. Immun.* **56**:626-631.
- BOUALI, A., R. ROBERT, G. TRONCHIN y J.M. SENET. 1986. Binding of human fibrinogen to *Candida albicans* in vitro: a preliminary study. *J. Med. Vet. Mycol.* **24**:345-348.

- BOUALI, A., R. ROBERT, G. TRONCHIN y J.M. SENET.** 1987. Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ-tubes and mycelium of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:545-551.
- BOUCHARA, J., G. TRONCHIN, V. ANNAIX, R. ROBERT y J.M. SENET.** 1990. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* **58**:48-54.
- BOUGNOUX, M.E., C. HILL, D. MOISENET.** 1990. Comparison of antibody, antigen, and metabolite assay for hospitalized patients or peripheral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **28**:905-909.
- BOZZINI, M., L. VISAL, P. PIGNATTI, T.E. PETERSEN y P. SPEZIAL.** 1992. Multiple binding sites in fibronectin and staphylococcal fibronectin receptor. *Eur. J. Biochem.* **207**:327-333.
- BRADFORD, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **31**: 399-404.
- BRASSART, D., A. WOLTZ, M. GOLLARD y J.R. NEESER.** 1991. In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc1-2 α Gal β -bearing complex carbohydrates. *Infect. Immun.* **59**:1605-1613.
- BRAWNER, D.L. y J.E. CUTLER.** 1984. Variability in expression of a cell surface determinant on *Candida albicans* as evidenced by an agglutinating monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **43**:966-972.
- BRAWNER, D.L. y J.E. CUTLER.** 1986a. Ultrastructural and biochemical studies of dynamically expressed cell surface determinants on *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **51**:327-336.
- BRAWNER, D.L. y J.E. CUTLER.** 1986b. Variability in expression of cell surface antigens of *Candida albicans* during morphogenesis. *Infect. Immun.* **51**:337-343.
- BRUNEAU, S.M. Y R.M.F. GUINET.** 1987. *Candida albicans* y *Candida tropicalis* antigens studied by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and western blot. *Mykosen.* **30**:271-280.
- BUFFO, J., M. HERMAN y D.R. SOLL.** 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Micopathologia.* **85**:21-30.
- BURNETTE, W.N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**:195-203.
- CABEZUDO, I., M. PFALLER, T. GERARDEN, F. KOONTH, R. WENZEL, R. GINGRICH, K. HECKMAN y C.P. BURNS.** 1989. Value of Can-Tec antigen assay in the diagnosis and therapy of systemic candidiasis in high risk patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 770-777.
- CALDERONE, R.A.** 1993a. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends. Microbiol.* **1**:55-58.
- CALDERONE, R.A. y P.C. BRAUN.** 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **55**:1-20.

- CALDERONE, R.A., L. LINEHAN, E. WADSWORTH y A.L. SANDBERG. 1988. Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **56**:252-258.
- CALDERONE, R. A. y W.M. SCHELD. 1987. Role of fibronectin in the pathogenesis of candidal infections. *J. Infect. Dis.* **9**:400-403.
- CALDERONE, R.A. y E. WADSWORTH. 1993b. Adherence molecules of *Candida albicans*. *J. Microbiol. Methods.* **18**:197-211.
- CASANOVA, M. y W.L. CHAFFIN. 1991a. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1045-1051.
- CASANOVA, M. y W.L. CHAFFIN. 1991b. Phosphate-containing proteins and glycoproteins of the cell wall of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **59**:808-813.
- CASANOVA, M., M.L. GIL, L. CARDEÑOSO, J.P. MARTÍNEZ y R. SENTANDREU. 1989. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **57**:262-271.
- CASANOVA, M., J.P. MARTÍNEZ y W.L. CHAFFIN. 1990. Fab fragments from a monoclonal antibody against a germ tube mannoprotein block the yeast to mycelium transition in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **58**:3810-3812.
- CASANOVA, M., J.P. MARTÍNEZ y W.L. CHAFFIN. 1991. Identification of germ tube cell wall antigens of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **29**:269-272.
- CASANOVA, M., J.P. MARTÍNEZ, M.L. GIL, R. SENTANDREU y J. RUIZ-HERRERA. 1987. Different molecular forms of invertase in the *slime* variant of *Neurospora crassa*: comparison with the wild-type strain. *J. Gen. Microbiol.* **133**:2447-2456.
- CASANOVA, M., J.L. LÓPEZ-RIBOT, J.P. MARTÍNEZ y R. SENTANDREU. 1992a. Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin. Comparison with other techniques. *Infect. Immun.* **60**:4898-4906.
- CASANOVA, M., J.L. LÓPEZ-RIBOT, C. MONTEAGUDO, A. LLOMBART-BOSCH, R. SENTANDREU y J.P. MARTÍNEZ. 1992b. Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **60**:4221-4229.
- CASSONE, A. 1989. Cell wall of *Candida albicans*: its function and its impact on the host. En: *Current Topics in Medical Mycology*, vol. 3, pp. 248-314. (M.R. McGuinnis y M. Borgers eds.). Springer-Verlag, New York.
- CASSONE, A., D. KERRIDGE y E.F. GALE. 1979. Ultrastructural changes in the cell wall of *Candida albicans* following cessation of growth and their possible relationship to the development of polyene resistance. *J. Gen. Microbiol.* **110**:339-349.
- CASSONE, A., E. MATTIA y L. BOLDRINI. 1978. Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the structure of the cell wall. *J. Gen. Microbiol.* **105**:263-273.

- CASTRONOVO, V., C. COLIN, A.P. CLAYSMITH, P.H.S. CHEN, E. LI-FRANGE, R. LAMBOTTE, H. KRUTZSCH, L.A. LIOTTA y M.E. SOBEL. 1990. Immunodetection of the metastasis-associated laminin receptor in human breast cancer cells obtained by fine-needle aspiration biopsy. *Am. J. Pathol.* **137**:1373-1381.
- CASTRONOVO, V., G. TARABOLETTI y M. SOBEL. 1991. Funcional domains of the 67 kDa laminin receptor precursor. *J. Biol. Chem.* **266**:20440-20446.
- CENTENO, A., C.P. DAVIS, M.S. COHEN y M.M. WARREN. 1983. Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. *Infect. Immun.* **39**:1354-1360.
- CHAN, B.C.M., P.D. KASSNER, J.A. SCHIRO, H.R. RYER, T.S. KUPPER y M.E. HEMLER. 1992. Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin α subunit cytoplasmic domains. *Cell.* **68**:1051-1060.
- CLEMENT, B., B. SEGUI-REAL, P. SAVAGNER, H.K. KLEINMAN y Y. YAMADA. 1990. Hepatocyte attachment to laminin is mediated through multiple receptors. *J. Cell. Biol.* **110**:185-192.
- COHEN, R.E. y C.E. BALLOU. 1981. Mannoproteins: structure. En: *Encyclopedia of Plant Physiology: Plant Carbohydrates II (New Series)*. Vol. 13 B. (W. Tanner y F.A. Loewus, eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 441-458.
- CRITCHLEY, I.A. y L.J. DOUGLAS. 1987a. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:629-636.
- CRITCHLEY, I.A. y L.J. DOUGLAS. 1987b. Role of glycoses as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. **133**:637-643.
- CHAFFIN, W.L. y D.M. STOCCO. 1983. Cell wall proteins of *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* **29**:1438-1444.
- CHAFFIN, W.L., J. SLUDAREK y K.J. MORROW. 1988. Variable expression of a surface determinant during proliferation of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **56**:302-309.
- CHATTAWAY, F.W., M.R. HOLMES y A.J.E. BARLOW. 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **51**:367-376.
- COURTNEY, H.S., Y.L. DALE y D.L. HASTY. 1994. Cloning, sequencing and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A *Streptococci*. *Infect. Immun.* **62**:3937-3946.
- CUTLER, J.E. 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:187-218.
- DAY, A.J. 1993. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. *Biochem. Soc. Transac.* **22**:83-88.
- DEDHAR, S. 1990. Integrins and tumor invasion. *Bioessays* **12**:583-590.
- DENIS, C.L., J. FERGUSON y E.T. YOUNG. 1981. A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces*

cerevisiae. J. Mol. Biol. 148: 355-368.

DE REPENTIGNY, L., L.D. MARR, J.W. KELLER, A.W. CARTER, R.J. KUIKENDALL, L. KAUFFMAN y E. REISS. 1985. Comparison of enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients. J. Clin. Microbiol. 21:972-979.

DOUGLAS, L.J. 1985. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. Microbiol. Sciences 2:243-247.

DOUGLAS, L.J. 1987a. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. CRC Crit. Rev. Microbiol. 15:27-43.

DOUGLAS, L.J. 1987b. Adhesion to surfaces. En: The yeasts, vol 2, 2nd ed. (A.H. Rose y J. Harrison, eds.). Acad. Press Inc., New York.

DOUGLAS, L.J., J.G. HOUSTON y J. McCOURTIE. 1981. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells after growth on different carbon sources. FEMS Microbiol. Lett. 12:241-243.

D'SOUZA, S.E., M.H. GINSBERG y E.F. PLOW. 1991. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. TIBS 16:246-250.

DUBOIS, M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS y F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.

EDWARDS, J.E., Jr., T.A. GAITHER, J.J. O'SHEA, D. ROTROSEN, T.J. LAWLEY, S.A. WRIGHT, M.M. FRANK y I. GREEN. 1986. Expression of specific bin-

ding sites on *Candida* with functional and antigenic characteristics of human complement receptors. J. Immunol. 137:3577-3583.

EDWARDS, J.E., R.I. LEHRER, E.R. STIEHM, T.J. FISCHER y L.S. YOUNG. 1978. Severe candidal infections. Clinical perspective, immune defense mechanisms, and current concepts of therapy. Ann. Intern. Med. 89:91-106.

EIGENTLER, A., T.F. SCHULZ. C. LARCHER, E.M. BREITWIESER, B. MYONES, A.M. PETZER y M.P. DIERICH. 1989. iC3-binding protein on *Candida albicans*: temperature dependent expression and relationship to human complement receptor type 3. Infect. Immun. 57: 616-622.

ELORZA, M.V., A. MARCILA y R. SENTANDREU. 1988. Wall manoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of the glycosidic bonds and polydispersity of their mannan moiety. J. Gen. Microbiol. 134:2393-2403.

ELORZA, M.V., H. RICO, D. GOZALBO y R. SENTANDREU. 1983. Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 49:457-469.

ESCURO, R.S., M. JACOBS, S.L. GERSON, A.R. MACHICAO y H.M. LAZARUS. 1989. Prospective evaluation of a *Candida* antigen detection test for invasive candidiasis in immunocompromised adult patients with cancer. Am. J. Med. 87: 621-627.

EVANS, E.G.V., F.C. ODDS, M.D. RICHARDSON y K.T. HOLLAND. 1975. Optimum conditions for initiation of filamentation in *Candida albicans*. Can. J. Micro-

biol. 21:338-342.

FEIZI, T. 1991. Carbohydrate differentiation antigens: probable ligands for cell adhesion molecules. *TIBS*. 16:84-86.

FINLAY, B.B. y S. FALKOW. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 53:210-230.

FINLEY, D. y V. CHAU. 1991. Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7: 25-69.

FINLEY, D., E. OZKAYNAK y A. VARSHAVSKY. 1987. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell*. 48: 1035-1046.

FLEET, G.H. 1985. Composition and structure of yeast cell walls. En: *Current Topics in Medical Mycology*. Vol. 1. (M.R. McGinnis, ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 24-56.

FOX, J.L. 1991. Microheterogeneity of biological macromolecules. *ASM News*. 57:310-316.

FOX, J.L. 1993. Fungal infection rates are increasing. *ASM news*. 59:515-518.

FOX, J.F., U. MAYER, R. NISCHT, M. AUMAILLEY, R. REINHARDT, H. WIEDEMANN, K. MAUN, R. TIMPL, T. KRIEG, J. ENGEL y M.L. CHU. 1991. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* 10:3137-3146.

FRASEN, J., J. VANCUTSEM, R. VANDESTEELE y P.A.J. JANSSEN. 1984. Histopathology of experimental systemic candidosis in guinea-pigs. *Sabouradia. J. Med. Vet. Mycol.* 22: 455-469.

FRASER, V.J., J. JONES, S. STORFER, G. MEDOFF y W.C. DUNAGAN. 1992. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin. Infect. Dis.* 15:414-421.

FUNG, J.C., S.T. DONTA y R.C. TILTON. 1986. *Candida* detection system (Can-Tec) to differentiate between *Candida albicans* colonization and disease. *J. Clin. Microbiol.* 24: 542-547.

FUKAYAMA, M. y R.A. CALDERONE. 1991. Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and analysis of the cell surface proteins of the mutants. *Infect. Immun.* 59:1341-1345.

GANESAN, K., A. BANERJEE y A. DATTA. 1991. Molecular cloning of the secretory acid proteinase gene from *Candida albicans* and its use as a species-specific probe. *Infect. Immun.* 59:2972-2977.

GENTRY, L.O., I.D. WILKINSON, A.S. LEA y M.F. PRICE. 1983. Latex agglutination test for detection of *Candida* antigen in patients with disseminated disease. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2: 122-128.

GHANNOUM, M.A., G.R. BURNS, K. ABU ELTEEN y S.S. RADWAN. 1986. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 54:189-193.

GIL, M.L. 1989. Identificación de componentes antigénicos de la pared celular de *Candida albicans* y especies del género *Candida*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

GIL, M.L., M. CASANOVA, J.P. MARTINEZ y R. SENTANDREU. 1991. Antigenic

cell wall mannoproteins in *Candida albicans* isolates and in other *Candida* species. J. Gen. Microbiol. **137**:1053-1061.

GILMORE, B.J., E.M. RETSINAS, J.S. LORENZ y M.K. HOSTETTER. 1988. An iC3b receptor on *Candida albicans*: structure, function and correlates for pathogenicity. J. Infect. Dis. **157**:38-46.

GIMENO, C.J. y G.R. FINK. 1992. The logic of cell division in the life cycle of yeast. Science. **257**:626.

GLEW, R.H., H.R. BUCKLEY, H.M. ROSEN, R.C. MOELLERING y J.E. FISCHER. 1975. Value of prospective *Candida* precipitins in fungaemia in patients with hyperalimentation. Surg. Forum. **26**:113-115.

GOOCHEE, C.F., M.J. GRAMER, D.C. ANDERSEN, J.B. BAHR y J.R. RASMUSSEN. 1991. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. Biotechnol. **9**:1347-1355.

GOODAY, G.W. y A.P.J. TRINCI. 1980. Wall structure and biosynthesis in fungi. Symp. Soc. Gen. Microbiol. **30**:207-251.

GOPAL, P.K., M.G. SEPHERD y P.A. SULLIVAN. 1984. Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. **130**:3295-3301.

GOW, N.A. 1993a. Non chemical signals used for host location and invasion by fungal pathogens. Trends. Microbiol. **1**:45-49.

GOW, N.A., R. SWOBODA, G. BERTRAM, G. GOODAY y A.J.P. BROWN. 1993b. Key genes in the regulation of dimor-

phism of *Candida albicans*. En: Dimorphic fungi in biology and medicine, pp. 61-72. Vanden Bossche, H., F.C. Odds, D. Kerridge (eds). Plenum Press, New York.

GOW, N.A., G.W. GOODAY, R.M. NEWSAM y K. GULL. 1980. Ultrastructure of the septum in *Candida albicans*. Curr. Microbiol. **4**:357-359.

GREENFIELD, R.A, M.J. BUSSEY, J.L. STEPHENS y J.M. JONES. 1983. Serial enzyme-linked immunosorbent assay for antibody to *Candida* antigens during induction chemotherapy for acute leukemia. J. Infect. Dis. **148**: 275-283.

GRESHAM, G.A. y C.H. WHITTLE. 1961. Studies of the invasive, mycelial form of *Candida albicans*. Sabouraudia **1**: 30-33.

GUENTZEL, M.N., G.T. COLE y L.M. POPE. 1985. Animal models in candidiasis. Curr. Top. Med. Mycol. **1**:57-116.

GUTIERREZ, J., C. MAROTO, G. PIÉDROLA, E. MARTIN y J.A. PEREZ. 1993. Circulating *Candida* antigens and antibodies: useful markers of candidemia. J. Clin. Microbiol. **31**:2550-2552.

HAAPASALO, M., U. SINGH, B.C. McBRIDE y V. VITTO. 1991. Sulfhydryl-dependent attachment of *Treponema denticola* to laminin and other proteins. Inf. Immun. **59**:4230-4237.

HANAHAN, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: DNA cloning: a practical approach. **1**:109-1035.

HART, P.D., E. RUSSELL y J.S. REMINGTON. 1969. The compromised host and infection. II. Deep fungal infection. J.

Infect. Dis. **120**:169-191.

HASENCLEVER, H.F. y W.O. MITCHELL. 1961. Antigenic studies of *Candida*, I: observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J. Bacteriol. **82**: 570-573.

HASENCLEVER, H.F. y W.O. MITCHELL. 1964a. Immunochemical studies on polysaccharides of yeast. J. Immunol. **93**:763-771.

HASENCLEVER, H.F. y W.O. MITCHELL. 1964b. A study of yeast surface antigens by agglutination inhibition. Sabouraudia **3**: 288-300.

HAWKES, R. 1982. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. Anal. Biochem. **123**:143-146.

HAWORTH, W.N., R.L. HEATH y S. PEAT. 1941. The constitution of yeast mannan. J. Chem. Soc. 833-842.

HAZEN, B.W. y K.C. HAZEN. 1988. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tubes formation of *Candida albicans*. Infect. Immun. **56**: 2521-2525.

HAZEN, K.C. y B.W. HAZEN. 1992. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. Infect. Immun. **60**:1499-1508.

HAZEN, B.W., R.E. LIEBERT y K.C. HAZEN. 1988. Relationship of cell surface hydrophobicity to morphology of monomorphic and dimorphic fungi. Mycologia **80**:348-355.

HAZEN, K.C. 1989. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. Infect. Immun. **57**:1894-1900.

HAZEN, K.C. 1990. Cell surface hydrophobicity of medically important fungi, especially *Candida* species. En Microbial Cell Surface Hydrophobicity, pp.249-295. (R.J. Doyle y M. Rosenberg eds.

HAZEN, K.C. y J.E. CUTLER. 1979. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. Infect. Immun. **24**:661-666.

HAZEN, K.C. y B.W. HAZEN. 1987. A polystyrene microsphere assay for detecting cell surface hydrophobicity within *Candida albicans* populations. J. Microbiol. Methods **6**:289-299.

HAZEN, K.C., D.L. BRAWNER, M.H. RIESELMAN, M.A. JUTILA y J.E. CUTLER. 1991. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. Infect. Immun. **59**:907-912.

HAZEN, K.C., J.G. LAY, W. HAZEN, R.C. FU y S. MURTHY. 1990. Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. Infect. Immun. **58**:3469-3476.

HEINDERICH, F. y M.P. DIERICH. 1985. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. Infect. Immun. **50**:598-600.

HEINEMANN, H.S., E.J. YUNIS, J. SIEMIENSKI y A.I. BRAUDE. 1961. Chlamydozoospores and dimorphism in *Candida albicans* endocarditis. Arch. Intern. Med. **108**:

570-577.

HEINO, J., R.A. IGNOTZ, M.E. HEMLER, C. CROUSE y J. MASSAGUE. 1989. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* **24**:380-388.

HERMAN, M. y D.R. SOLL. 1984. A comparison of volume growth during bud and mycelium formation in *Candida albicans*: A single cell analysis. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2219-2228.

HERENT, P., D. STYNEN, F. HERNAN-DO, J. FRUIT Y D. POULAIN. 1992. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2158-2164.

HERRERO, E., P. SANZ y R. SENTAN-DREU. 1987. Cell wall proteins liberated by Zymoliase from several Ascomycetous and imperfect yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **133**:2895-2903.

HERSHKO, A. y A. CIECHANOVER. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:761-807.

HOPWOOD, V. y D.W. WARNOCK. 1987. Nuevos desarrollos en el diagnóstico de la infección por hongos oportunistas. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* pp. 285-294 (originariamente en *E. J. Clin. Microbiol.* 1986. pp. 379-388).

HORISBERGER, M. y M.F. CLERC. 1988. Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *Eur. J. Cell. Biol.* **46**:444-452.

HORISBERGER, M. y M. VOLAN-THEN. 1977. Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeast with gold markers. *Arch. Microbiol.* **115**:1-7.

HOSTETTER, M.K. 1994a. Interactions of *Candida albicans* with eukaryotic cells. *ASM news* **60**:370-374.

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

HOSTETTER, M.K. y K.E. KENDRICK. 1989. Cloning and sequencing of cDNA encoding the iC3b receptor on *Candida albicans*. *Compl. Inflam.* **6**:348.

HOSTETTER, M.K., J.S. LORENZ, L. PREUS y K.E. KENDRICK. 1990. The iC3b receptor on *Candida albicans*: subcellular localization and modulation of receptor expression by glucose. *J. Infect. Dis.* **161**:761-768.

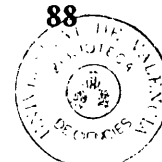
HSU, S.M., L. RAINE y H. FANGER. 1981. Use of avidine-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and the unlabeled antibody procedures (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**:577-580.

HURUM, S., S. THIEL, H.P. HAAGS-MAN, S. LAURSEN, B. LARSEN y J.C. JENSENIUS. 1993. Studies on the carbohydrate-binding characteristics of human pulmonary surfactant-associated protein A and comparison with two other collectins: mannan-binding protein and coaglutinin. *Biochem. J.* **293**:873-878.

HYNES, R.O. 1987. Integrins, a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**:549-555.

- HYNES, R.O.** 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*. **69**:11-25.
- IGNATIUS, M.J., T.H. LARGE, M. HOUDE, J.W. TAWIL, A. BARTON, F. ESCH, S. CARBONETTO y L.F. REICHARDT.** 1990. Molecular cloning of the rat integrin α 1-subunit: a receptor for laminin and collagen. *J. Cell. Biol.* **111**:709-720.
- ISHIGURO, A., M. HOMMA, T. SUKAI, K. HIGHASIDE, S. TORII Y K. TANAKA.** 1992. Immunoblotting analysis of sera from patients with candidal vaginitis and healthy females. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**:281-292.
- ISRAELACHVILI, J.N. y P.M. Mc GUIGGAN.** 1988. Forces between surfaces in liquids. *Science* **241**:795-800.
- IWATA, K., K. UCHIDA y H. ENDO.** 1967. "Canditoxin" a new toxin substance isolated from a strain of *Candida albicans*. I. Relationship between strains and virulence and conditions for the toxic substance production. *Medicine and Biology (Tokyo)* **74**: 335-345.
- JACQUES, M., T.J. MARRIE y J.W. COSTERTON.** 1986. "In vitro" quantitative adherence of microorganisms to intrauterine contraceptive devices. *Curr. Microbiol.* **13**: 133-137.
- JENKINSON, H.F., G.P. SCHEP y M.G. SHEPHERD.** 1988. Cloning and expression of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**:285-288.
- JENQ, W.M., C.L. CHEN, C.C. CHANG y R.F. ECRANG.** 1994. Characterization of a mayor antigen and potential adhesin in the three strains of *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* **162**:33-40.
- JENSENIUS, J.C., S.B. LAURSEN, Y. ZHENG y U. HOLMSKOV.** 1994. Coglutinin and Cl-43, two collagenous C-type lectins (collectins) in bovine serum. *Biochem. Soc. Transac.* **22**:96-100.
- JOHN, T.S., M.W. GALLATIN, M. SIEGELMAN, H.T. SMITH, V.A. FRIED e I.L. WEISSMAN.** 1986. Expression cloning of a lymphocyte homing receptor cDNA: ubiquitin is the reactive species. *Science* **231**: 845-850.
- JONES, J.M.** 1980. Quantitation of antibody against cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of *candida* in rabbits, mice, and humans. *Infect. Immun.* **30**:78-89.
- JONES, J.M.** 1990. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin. Microb. Rev.* **3**:32-35.
- KAHN, F.W. Y J.M. JONES.** 1986. Latex agglutination test for detection of *Candida* antigens in sera of patients with invasive candidiasis. *J. Infect. Dis.* **153**:579-585.
- KANBE, T., R.K. LI, E. WADSWORTH, R.A. CALDERONE y J.E. CUTLER.** 1991. Evidence for expression of the C3d receptor of *Candida albicans* in vitro and in vivo obtained by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Infect. Immun.* **59**:1832-1838.
- KAPPE, R.** 1988. Coexistence of free antigens, free antibodies and immune complexes in sera from patients with suspected deep-seated candidosis. *Mycoses.* **32**:24-32.

- KAPE, R. Y J. MÜLLER.** 1991. Rapid clearance of *Candida albicans* manan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1665-1669.
- KEARNS, M.J., P. DAVIES y H. SMITH.** 1983. Variability of the adherence of *Candida albicans* strains to human buccal epithelial cells: inconsistency of differences between strains related to virulence. *Sabouraudia* **21**: 93-98.
- KENNEDY, M.J.** 1987. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. En: *Current Topics in Medical Mycology*, vol. 2, pp. 73-169. (M.R. McGuinnis, ed.). Springer-Verlag, New York.
- KENNEDY, M.J. y R.L. SANDIN.** 1988. Influence of growth conditions on *Candida albicans* adhesion, hydrophobicity, and cell wall ultrastructure. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**: 79-92.
- KESSLER, G y W.J. NICKERSON.** 1959. Glucomannan protein complexes from cell walls of yeast. *J. Biol. Chem.* **234**:2281-2285.
- KIMURA, L.H. y N.N. PEARSALL.** 1978. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **21**: 64-68.
- KIMURA, L.H. y N.N. PEARSALL.** 1980. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **28**:464-468.
- KING, R.D., J.C. LEE y A.L. MORRIS.** 1980. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.* **27**:667-674.
- KITAMURA, K., T. KANEKO y Y. YAMAMOTO.** 1974. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. II. Purification and properties of an enzyme, Zymoliase, which lyses viable yeast cells. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **20**:327-344.
- KITAMURA, K. y Y. YAMAMOTO.** 1972. Purification and properties of an enzyme, Zymoliase, which lyses viable yeast cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **153**:403-406.
- KLEBL, F. y W. TANNER.** 1989. Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**:6259-6264.
- KLOTZ, S.A.** 1990. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:249-254.
- KLOTZ, S.A.** 1994. Adherence of *Candida albicans* to endothelial cells is inhibited by prostaglandin I₂. *Infect. Immun.* **62**:1497-1500.
- KLOTZ, S.A., D.J. DRUTZ y J.E. ZAJIC.** 1985. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.* **50**:97-101.
- KLOTZ, S.A., J.L. HARRISON y R.P. MISRA.** 1989. Aggregated platelets enhance adherence of *candida* yeast to endothelium. *J. Infect. Dis.* **60**:669-670.
- KLOTZ, S.A. y R.L. PENN.** 1987. Multiple mechanisms may contribute to the adherence of *Candida* yeasts to living cells. *Curr. Microbiol.* **16**:119-122.
- KLOTZ, S.A., M.J. RUTTEN, R.L. SMITH, S.R. BABCOCK y M.D. CUN-**



- NINGHAM.** 1993. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium dependent surface glycoproteins. *Microbial Pathog.* **14**: 133-147.
- KLOTZ, S.A. y R.L. SMITH.** 1991. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* **163**:604-610.
- KLOTZ, S.A., R.L. SMITH Y B.W. STEWART.** 1992. Effect of Arginine-Glycine-Aspartic acid-containing peptide on hematogenous candidal infections in rabbits. *Antimicrobial agents and chemother.* pp. 132-136.
- KOCOUREK, J. y C.E. BALLOU.** 1969. Method for fingerprinting yeast cell wall mannans. *J. Bacteriol.* **100**: 1175-1181.
- KODAMA, T., M. FREEMAN, L. ROHRER, J. ZABRECKY, P. MATSUDAIRA y M. KRIEGER.** 1990. Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen coils. **343**:531-535.
- KOGAN, G., V. PAVLIAK y L. MASLER.** 1988. Structural studies of mannans from the cell walls of the pathogenic yeast *Candida albicans* serotypes A and B and *Candida parapsilosis*. *Carbohydr. Res.* **172**: 243-254.
- KOMSHIAN, S.V., A.K. UWAYDAH, J.D. SOBEL y L.R.L. CRANE.** 1989. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev. Infect. Dis.* **11**:379-390.
- KRIEGER, M.** 1992. Molecular flypaper and the atherosclerosis: structure of the macrophage scavenger receptor. *Trends. Biochem. Sci.* **17**:141-146.
- KURTZ, M.B., D.R. KIRSCH y R. KELLY.** 1988. The molecular genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Sciences* **5**:58-63.
- KWON-CHUNG, K.J., D. LEHMAN, C. GOOD y P.T. MAGEE.** 1985. Genetic evidence for the role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **49**:571-575.
- LAEMMLI, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- LAMI, L., C. LEVEILLE, C. FORTIER, M. LACASSE, M.P. ROJAS y N. DESLAURIERS.** 1992. In situ detection of *Candida albicans* using oral mucosal imprints. *J. Microbiol. Meths.* **15**:311-320.
- LANE, D.** 1988. *Antibodies: a practical approach.* Ed. Harlow.
- LANGEVELD, J.P.M., J. WIESLANDER, J. TIMONEDA, P. MCKINNEY, R.J. BULKOWSKI, B.J. WISDOM y B.G. HUDSON.** 1988. Structural heterogeneity of the noncollagenous domain of basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* **263**: 10481-10488.
- LANGEVELD, J.P.M., A.W.T. YEM, J. TIMONEDA, J. SAUS, B.J. WISDOM y B.G. HUDSON.** 1987. Molecular structure of collagen IV of glomerular basement membrane, pp. 25-39. En R.G. Price and B.G. Hudson (ed), *Renal basement membrane in health and disease.* Academic Press, London.
- LAWYER, F.C., S. STOFFEL, R.K.**

- SAIKI, S.Y. CHANG, P.A. LANDRE, R.D. ABRAMSON y D.H. GELFAND. 1993. PCR methods and applications. **2**:275-287.
- LEE, K.L., M.R. BUCKLEY y C. CAMPBELL. 1975. An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. Sabouraudia **13**:148-153.
- LEE, J.C. y R.D. KING. 1983. Characterization of *Candida albicans* adherence to human vaginal epithelial cells in vitro. Infect. Immun. **41**:1024-1030.
- LEMIEUX, C., G. ST-GERMAIN, J. VINCELETTE, L. KAUFMAN y L. DE REPENTIGNY. 1990. Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. J. Clin. Microbiol. **28**:249-253.
- LEUNG, D.W., S.A. SPENCER, G. CACHIANES, R.G. HAMMONDS, C. COLLINGS, W.J. HENZEL, R. BARNARD, M.J. XATERS y W.I. WOOD. 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature. **330**:537-543.
- LEW, M.A. 1989. Diagnosis of systemic candida infections. Ann. Rev. Med. **40**:87-97.
- LI, R.K. y J.E. CUTLER. 1993. Chemical definition of an epitope adhesin molecule on *Candida albicans*. J. Biol. Chem. **268**:18293-18299.
- LINEHAN, L., E. WADSWORTH y R. CALDERONE. 1988. *Candida albicans* C3d receptor, isolated by using a monoclonal antibody. Infect. Immun. **56**:1981-1986.
- LIPMAN, D. y W. PEARSON. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. Science. **227**:1435-1441.
- LOPES, J.D., M. DOS REIS y R.R. BRENTANI. 1985. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. Science. **229**:275-277.
- LÓPEZ-RIBOT, J.L. 1989. Estudio comparativo de las manoproteínas de la pared celular y de la hidrofobicidad de la superficie celular en cepas de *Candida albicans*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia.
- LÓPEZ-RIBOT, J.L. 1991. Caracterización de componentes de la pared celular de *Candida albicans* implicados en la interacción con sustratos biológicos e inertes. Tesis doctoral. Universitat de València.
- LÓPEZ-RIBOT, J.L., M. CASANOVA, J.P. MARTÍNEZ y R. SENTANDREU. 1991. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. Infect. Immun. **59**: 2324-2332.
- LÓPEZ-RIBOT, J.L. y W.L. CHAFFIN. 1994a. Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. Infect. Immun. **62**:4564-4571.
- LÓPEZ-RIBOT, J.L., D. GOZALBO, P. SEPÚLVEDA, M. CASANOVA y J.P. MARTÍNEZ. 1995. Characterization of the material released to the culture medium by *Candida albicans* yeast and mycelial cells. Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol (en prensa).
- LÓPEZ-RIBOT, J.L., J.P. MARTÍNEZ y L.W. CHAFFIN. 1995. Comparative study

of the C3d receptor and 58 kDa fibrinogen-binding mannoproteins of *Candida albicans*. *Inf. Immun.* **63**:2126-2132.

J.L. LÓPEZ-RIBOT, P. SEPÚLVEDA, D. NAVARRO, J.M. NOGUEIRA, M. CASANOVA y J.P. MARTÍNEZ. 1994b. A comparative study on cell wall antigens and cell surface hidrophobicity in clinical isolates of *Candida albicans*. *Mycopathologia* **127**:1-13.

LOTT, T.J., L.S. PAGE, P. BOIRON, J. BENSON y E. REISS. 1989. Nucleotide sequence of the *Candida albicans* aspartyl proteinase gene. *Nucleic Acid Res.* **17**:1779.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

McDONALD, J.A. 1989. Receptors for extracellular matrix components. *Am. J. Physiol.* **257**:L331-L337.

MACKENZIE, D.W.R. 1964. Morphogenesis in *Candida albicans* in vivo. *Sabouraudia* **3**:225-232.

MACURA, A.B. 1987. Hydrophobicity of *Candida albicans* related to their adherence to mucosal epithelial cells. *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. A.* **266**:491-496.

MAGEE, B.B., Y. KOLTIN, J. GORMAN y P.T. MAGEE. 1988. Assignment of cloned *Candida albicans* genes to bands on the electrophoretic karyotype. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4721-4726.

MAGEE, P.T., E.H. RIKKERINK y B.B. MAGEE. 1988. Methods for the genetics and molecular biology of *Candida albicans*.

Anal. Biochem. **175**:361-372.

MAKSYMIUK, A.W., S. THONGPRA-SERT, R. HOPFER, M. LUNA V. FAINSTEIN y G.P. BODEY. 1984. Systemic candidiasis in cancer patients. *Am. J. Med.* **77**:20-27.

MALHOTRA R.J., J. HAURUM, S. THIEL y R.B. SIM. 1992. Interaction of C1q receptor with lung. *Eur. J. Immunol.* **22**:1437-1445.

MANNING, M. y T.G. MITCHELL. 1980. Strain variation and morphogenesis of yeast and mycelial-phase *Candida albicans* in low sulfate, synthetic medium. *J. Bacteriol.* **142**: 714-719.

MARCANTONIO, E. y R.O. HYNES. 1988. Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin $\alpha 1$ subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates and fungi. *J. Cell. Biol.* **106**:1765-1772.

MARCILLA, A., M.V. ELORZA, S. MORMENEO, H. RICO y R. SENTANDREU. 1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymoliasse, chitinase and β -mercaptoethanol. *Arch. Microbiol.* **155**:312-319.

MARRACK, P. y J. KAPPLER. 1994. Subversion of the immune system by pathogens. *Cell.* **76**:323-332.

MARRIE, T.J. y J.W. COSTERTON. 1981. The ultrastructure of *Candida albicans* infections. *Can. J. Microbiol.* **27**:1156-1164.

MARTÍNEZ, J.P., M.L. GIL, M. CASANOVA, J.L. LOPEZ-RIBOT, J. GARCIA de LOMAS y R. SENTANDREU. 1990a. Wall mannoproteins in cells from colonial

- MORHART, M., R. RENNIE, B. ZIOLA, E. BOW y T.J. LOUIE. 1994. Evaluation of enzyme immunoassay for *Candida* cytoplasmic antigens in neutropenic cancer patients. *J. Clin. Microbiol.* **32**:766-776.
- MORMENEO, S., A. MARCILLA, M. IRANZO y R. SENTANDREU. 1994. Structural mannoproteins released by β -elimination from *Candida albicans* cell walls. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**:131-136.
- MOTTA, G.F., C.R.W. CARNEIRO, L. GOMES, y J.D. LOPES. 1988. Monoclonal antibodies to *Staphylococcus aureus* laminin-binding proteins cross-react with mammalian cells. *Infect. Immun.* **56**:1580-1584.
- MULLER, H.L. y G. KIRCHOFF. 1969. Serologische typen von *Candida albicans*. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hg. Abt.* **210**: 114-121.
- MURPHY, J.W. 1991. Mecanism of natural resistance to human pathogenic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:509-538.
- MUSIAL, C.E., F.R. COCKERILL III y G.D. ROBERTS. 1988. Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**: 349-365.
- NAKAMURA, A., N. ISHIKAWA, H. SUZUKI. 1991. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **26**:459-463.
- NARASIMHAN, S., M.Y.K. ARMS-TRONG, K. RHEE, J.C. EDMAN, F.F. RICHARDS y E. SPICER. 1994. Gene for an extracellular matrix receptor protein from *Pneumocystis carinii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:7440-7444.
- NAVARRO, D., M. CASANOVA y J.P. MARTINEZ. 1993a. Systemic candidiasis: Current diagnostic methods. *Clin. Adv. Treatment Fungal Infect.* **4**(3):6-13.
- NAVARRO, D., E. MONZONIS, J.L. LÓPEZ-RIBOT, P. SEPÚLVEDA, M. CASANOVA, J.M. NOGUEIRA y J.P. MARTINEZ. 1993b. Diagnosis of systemic candidiasis by enzyme immunoassay detection of specific antibodies to micelial phase cell wall and cytoplasmic candidal antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:839-846.
- NELSON, R.D., N. SHIBATA, R.P. PODZORSKI y M.J. HERRON. 1991. Candida mannan: chemistry suppression of cell-mediated immunity, and possible mode of action. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:1-19.
- NEGRE, E., T. VOGEL, A. LEVANON, R. GUY, T. WALSH y D. ROBERTS. 1994. The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **269**:22039-22045.
- NICKERSON, W.J. y Z.T. MANKOWSKI. 1953. A polysaccharide medium of known composition favoring chlamyospore formation in *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* **92**: 20-25.
- ODDS, F.C. 1985. Morphogenesis in *Candida albicans*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **12**: 45-80.
- ODDS, F.C. 1987. *Candida* infections: an overview. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **15**:1-5.
- ODDS, F.C. (ed.). 1988. *Candida* and candidosis, 2nd ed. Bailliere-Tindall, London.

- ODDS, F.C.** 1994. *Candida* species and virulence. *60*:313-318.
- OFEK, I. y E.H. BEACHEY.** 1980. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man, pp. 2-29. En: *Bacterial adherence* (E.H. Beachey, ed.). Chapman & Hall, New York.
- OHLER, L. y E.A. ROSE.** 1992. PCR methods and applications. *2*:51-59.
- OLLERT, M.K., E. WADSWORTH y R.A. CALDERONE.** 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.
- OLSEN, B.R. y Y. NINOMIYA.** 1993. Basement membrane collagens (type IV), pg 35-37. En: T. Reis and R. Vale (ed), *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins*. Oxford University Press, Oxford.
- OZKAYNAK, E., D. FINLEY y A. VARSHAVSKY.** 1984. The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* *312*:663-666.
- OZKAYNAK, E., D. FINLEY, M.J. SOLOMON y A. VARSHAVSKY.** 1987. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* *6*:1429-1439.
- PAGE, S. y F.C. ODDS.** 1988. Binding of plasma proteins to *Candida* species in vitro. *J. Gen. Microbiol.* *134*:2693-2702.
- PAOLINI, R. y J.P. KINET.** 1993. Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors. *Embo J.* *12*:779-786.
- PARKER, J.C., J.J. McCLOSKEY y K.A. KNAUER.** 1976. Pathobiologic features of human candidiasis. A common deep mycosis of the brain, heart and kidney in the altered host. *Am. J. Clin. Pathol.* *65*:991-1000.
- PEAT, S., W.J. WHELAN y T.E. EDWARDS.** 1961. Polysaccharides of baker's yeasts. IV. Mannan. *J. Chem. Soc.* *1*:29-34.
- PERSI, M.A., J.C. BURNHAM y J.L. DUHRING.** 1985. Effects of carbon dioxide and pH on adhesion of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* *50*:82-90.
- PHAFF, H.J.** 1971. Structure and biosynthesis of the yeast cell envelope. En: *The yeast*, vol II. (A.H. Rose y J.S. Harrison, eds.). Academic Press, London, New York. pp. 135-210.
- PHELPS, C.** 1978. Techniques in protein and enzyme biochemistry. En: *The purity of proteins*. *103*:1-17.
- PHILLIPPS, P., A. DOWD, P. JEWESON, G. RADIGAN, M.G. TWEEDDALE, A. CLARKE, I. GEEVE, M. KELLY.** 1990. Nonvalue of antigen detection immunoassay for diagnosis of candidemia. *J. Clin. Microbiol.* *28*:2320-2326.
- POLAK, A.** 1992. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses.* *35*:9-16.
- PONTÓN, J. y J.M. JONES.** 1986. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot techniques. *Infect. Immun.* *53*:565-572.
- PONTÓN, J., A. MAROT-LEBLOND,**

- P.A. EZKURRA, B. BARTUREN, R. ROBERT y J.M. SENET. 1993. Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **61**:4842-4847.
- PONTÓN, J., P. REGULEZ, G. QUINDOS y R. CISTERNA. 1990. La composición antigénica de *Candida albicans* y su aplicación al diagnóstico de las candidiasis. *Rev. Iberoam. Micol.* **7**:122-132.
- POULAIN, D., C. FAILLE, C. DELAUNOY, P.M. JACQUINOT, P.A. TRINEL y D. CAMUS. 1993. Probable presence of β (1-2) linked oligomannosides that acts as human immunoglobulin IgG3 epitopes and are distributed over a *Candida albicans* 14-18 kDa antigen. *Infect. Immun.* **61**:1164-1166.
- POULAIN, D., V. HOPWOOD y A. VERNES. 1985. Antigenic variability of *Candida albicans*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **12**: 223-270.
- POULAIN, D., G. TRONCHIN, B. LEFEBRE y M.O. HUSSON. 1982. Antigenic variability between *Candida albicans* blastospores isolated from healthy subjects and patients with *candida* infection. *Sabouraudia* **20**:173-177.
- POULAIN, D., G. TRONCHIN, A. VERNES, R. POPEYE y J. BIGUET. 1983. Antigenic variations of *Candida albicans* in vivo and in vitro. Relationships between p antigens and serotypes. *Sabouradia*. **21**:99-112.
- RAO, C.N., S.H. BARSKY, V.P. TERRANOVA y L.A. LIOTTA. 1983. Isolation of a tumor cell laminin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**:804-808.
- RAO, C.N., V. CASTRONOVO, M.C. SCHMITT, U.M. WEWER, A.P. CLAYSMITH, L.A. LIOTTA y M.E. SOBEL. 1989. Evidence for the presence of the high affinity metastasis-associated murine laminin receptor. *Biochem.* **28**:7476-7486.
- REBOLI, A.C. 1993. Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for *Candida albicans* antigen detection. *J. Clin. Microbiol.* **31**:518-523.
- REGULEZ, P., M.C. ARILLA, J. BIKANDI, G. GUINDOS, R. CISTERNA y J. PONTON. 1992. Identification of antigens reacting with anti-*Candida albicans* germ tube antibodies. *Eur. J. Epidemiol.* **8**:356-361.
- REID, K.B. 1993. Structure/function relationships in the collectins (mammalian lectins containing collagen-like regions). *Biochem. Soc. Transac.* **21**:464-468.
- REISS, E. 1986. Molecular immunology of mycotic and actinomycotic infections, pp. 191-250. Elsevier, New York.
- REISS, E. y C.J. MORRISON. 1993. Non culture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin. Microb. Rev.* **6**:311-323.
- RICO, H., M.V. ELORZA y R. SENTANDREU. 1982. Dimorfismo en *Candida albicans*: biosíntesis de la pared celular y posible relación con su patogeneidad. *Análisis Clínicos*, Tomo VII. **28**: 183-194.
- RIFKIND, D., T.L. MARCHIORO, S.A. SCHNECK y R.B. HILL. 1967. Systemic fungal infections complicating renal transplantation and immunosuppressive therapy, clinical, microbiologic, neurologic and pathologic features. *Am. J. Med.* **43**:28-38.

- ROBERT, R., C. MAHAZA, A. MAROT-LEBLOND, G. TRONCHIN y J.-M. SENET.** 1991. Binding of mouse fibrinogen to *Candida albicans* in vivo. FEMS Microbiol. Lett. **78**:301-304.
- ROGERS, T.J. y E. BALISH.** 1980. Immunity to *Candida albicans*. Microbiol. Rev. **44**:660-682.
- ROSENBERG, M., D. GUTNICK y E. ROSENBERG.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett. **9**:29-33.
- ROSENBLUH, A., M. MEVARECH, Y. KOLTIN y J.A. GORMAN.** 1985. Isolation of genes from *Candida albicans* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **200**:500-502.
- ROTHSTEIN, R.** 1985. Cloning in yeast, cap 3:45-66, del libro DNA cloning, vol II (Glover, D.M., editor), IRL Press, Oxford.
- ROTROSEN, D., R.A. CALDERONE y J.E. EDWARDS Jr.** 1986. Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. Rev. Infect. Dis. **8**:73-85.
- ROTROSEN, D., J.E. EDWARDS Jr., T.R. GIBSON, J.C. MOORE, A.H. COHEN e I. GREEN.** 1985. Adherence of *Candida* to cultured vascular endothelial cells: mechanisms of attachment and endothelial cell penetration. J. Infect. Dis. **152**:1264-1274.
- RUBIN, K., T.K. BORG, L.R. HOLM-DAHL, L. KLARESKOG y B. ÖBRINK.** 1992. Interaction of mammalian cells with collagen. En: Basement membranes and cell movement. Ciba Foundation Symposium **180**: 93-116.
- RUCHEL, R.** 1981. Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta. **659**:99-113.
- RUCHEL, R.** 1989. Identification of certain false-positive results in the Cand-Tec test for candidal antigen. Mycoses. **32**:627-630.
- RUOSLAHTI, E. y M.D. PIERSCHBACHER.** 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science. **238**:491-497.
- RUOSLAHTI, E.** 1991. Integrins. J. Clin. Invest. **87**: 1-5.
- RYLEY, J.F. y N.G. RYLEY.** 1990. *Candida albicans* - do mycelia matter?. J. Med. Vet. Mycol. **28**:225-239.
- SALTARELLI, C.G., K.A. GENTILE y S.C. MANCUSO.** 1975. Lethality of *Candida* strains as influenced by the host. Can. J. Microbiol. **21**:648-654.
- SAMARANAYAKE, L.P. y T.W. Mc FARLANE.** 1982. Factors affecting the *in vitro* adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. Arch. Oral Biol. **27**:869-873.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH y T. MANIATIS.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, CSH, New York.
- SANDIN, R.L., A.L. ROGERS, R.J. PATTERSON y E.S. BENEKE.** 1982. Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells in vitro. Infect. Immun. **35**:79-85.

- SANZ, P., E. HERRERO y R. SENTANDREU. 1987. Secretory pattern of a major integral mannoprotein of the yeast cell wall. *Biochem. Biophys. Acta* **924**:193-203.
- SAXENA, A y R.A. CALDERONE. 1990. Purification and characterization of the extracellular C3d-binding protein of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **57**:309-314.
- SCHALLER, M.D. y J.T. PARSON. 1993. Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends. Cell. Biol.* **13**:258-261.
- SCHERER, S. y P.T. MAGEE. 1990. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **54**:226-241.
- SCHERWITZ, C. 1982. Ultrastructure of human cutaneous candidosis. *J. Invest. Dermatol.* **78**:200-205.
- SCHERWITZ, C., R. MARTIN y H. VEBERBERG. 1978. Ultrastructural investigations of the formation of *Candida albicans* germ tubes and septa. *Sabouraudia* **16**:115-124.
- SEELING, M.S. 1966. Mechanisms by which antibiotics increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defenses. *Bacteriol. Rev.* **30**:442-459.
- SEGUI-REAL, B., C. RODES y Y. YAMADA. 1989. The human genome contains a pseudogene for the Mr = 32000 laminin binding protein. *Nucl. Ac. Res.* **3**:1257.
- SENTANDREU, M., M.V. ELORZA, E. VALENTIN, R. SENTANDREU y D. GOZALBO. 1995. Cloning of cDNAs coding for *Candida albicans* cell surface proteins. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**:(en prensa)
- SENTANDREU, R., E. HERRERO, J.P. MARTINEZ y M.V. ELORZA. 1991a. Yeast cell wall glycoproteins. En: *Fungal cell wall and immune response*. NATO ASI Series (J.P. Latgé y D. Boucias eds.), vol. H53, pp. 229-239. Springer-Verlag.
- SENTANDREU, R., J.P. MARTINEZ, M.V. ELORZA y S. MORMENEO. 1991b. Relationships between dimorphism, cell wall structure, and surface activities in *Candida albicans*. En: *Candida albicans* (R. Prasad ed.). Springer-Verlag, pp. 72-88.
- SENTANDREU, R. y D.H. NORTH-COTE. 1969. The characterization of oligosaccharides attached to threonine and serine in mannan glycopeptides obtained from the cell wall of yeast. *Carbohyd. Res.* **10**:584-585.
- SEPÚLVEDA, P., A. MURGUI, J.L. LÓPEZ-RIBOT, M. CASANOVA, J. TIMONEDA y J.P. MARTÍNEZ. 1995. Evidence for the presence of collagenous-like domains in *Candida albicans* cell surface proteins. *Infect. Immun.* **63**:2173-2179.
- SHANNON, J.L. 1981. Scanning and transmission electron microscopy of *Candida albicans* chlamydospores. *J. Gen. Microbiol.* **125**:199-203.
- SHARON, N. 1975. Les sucres dans la vie sociale des cellules. *La Recherche* **6**:16-24.
- SHARON, N. 1987. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Lett.* **217**:145-157.
- SHARON, N. 1993. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *TIBS.* **18**:221-226.

- SHEPHERD, M.G.** 1987. Cell envelope of *Candida albicans*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **15**:7-25.
- SHEPHERD, M.G., Y.Y. CHIEW, S.P. RAM y P.A. SULLIVAN.** 1980. Germ tube induction in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* **26**:21-26.
- SHEPHERD, M.G., R.T.M. POULTER y P.A. SULLIVAN.** 1985. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity, *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:579-614.
- SHEPHERD, M.G. y P.A. SULLIVAN.** 1976. The production and growth characteristics of yeast and mycelial forms of *Candida albicans* in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **93**:361-370.
- SHERWOOD, J., N.A.R. GOW, G.W. GOODAY, D.W. GREGORY y D. MARSHALL.** 1992. Contact sensing in *Candida albicans* - a possible aid to epithelial penetration. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**:461-469.
- SHIBATA, N., H. KOBAYASHI, M. TOJO y S. SUZUKI.** 1986. Characterization of phosphomannan-protein complexes isolated from viable cells of yeast and mycelial forms of *Candida albicans* NHI B-792 strain by the action of zymolyase 100-T. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**:697-708.
- SIEBOLD, B., R. DEUTZMANN y K. KUHN.** 1988. The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, non-collagenous aggregation and cross-linking domain of basement membrane type IV collagen. *176*:617-624.
- SIEGELMAN, M., M.W. BOND, W.M. GALLATIN, T.S. JOHN, H.T. SMITH, V.A. FRIED e I.L. WEISSMAN.** 1986. Cell surface molecule associated with lymphocyte homing is a ubiquitinated branched-chain glycoprotein. *Science* **231**:823-829.
- SIEGELMAN, M., M. VAN DE RIJN e I.L. WEISSMAN.** 1989. Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science* **243**:1165-1172.
- SKERL, K.G., R.A. CALDERONE, E. SEGAL, T. SREEVALSAN y W.M. SCHELD.** 1983. In vitro binding of *Candida albicans* yeast to human fibronectin. *Can. J. Microbiol.* **30**:221-227.
- SIKL, D., L. MASLER, y S. BAUER.** 1964. Mannan from the extracellular surface of *Candida albicans*. *Berkhout Experientia* **20**: 456.
- SIMMS, H.H., y R. D'AMICO.** 1992. Polymicrobial sepsis disrupts normal neutrophil extracellular matrix protein interactions. *Circulatory shock* **38**:1-8.
- SKERL, K.G., R.A. CALDERONE, E. SEGAL, T. SREEVALSAN y W.M. SCHELD.** 1983. In vitro binding of *Candida albicans* yeast to human fibronectin. *Can. J. Microbiol.* **30**:221-227.
- SKOWRONSKI, R. y D. FELDMAN.** 1989. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Candida albicans*. *Endocrinology* **124**:1965-1972.
- SLODKI, M.E.** 1962. Phosphate linkages in phosphomannans from yeast. *Biochem. Biophys. Acta* **57**:525-533.
- SLUTSKI, B., J. BUFFO y D.R. SOLL.** 1985. High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*

230:666-669.

SLUTSKI, B., M. STAEBELL, J. ANDERSON, L. RISEN, M. PFALLER y D.R. SOLL. 1987. "White-opaque transition": a second high frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**: 189-197.

SMAIL, E.H. y J.M. JONES. 1984. Demonstration and solubilization of antigens expressed primarily on the surfaces of *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* **45**:74-81.

SMALLHEISER, N.R. y N. SCHWARTZ. 1987. Cranin: a laminin binding protein of cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**:6457-6461.

SMITH, H.A., H.S. HALLAUDEEN, M.H. WITHMAN, Y. KOLTIN y J.A. GORMAN. 1988. Isolation and characterization of a β -tubulin gene from *Candida albicans*. *Gene.* **63**:53-63.

SNYDER, M., S. ELLEDGE, D. SWEETSER, R.A. YOUNG y R.W. DAVIS. 1987. λ gt11: gene isolation with antibody probes and other applications. *Methods in enzymol.* **154**:107-128.

SOBEL, J.D., G. MULLER y H.R. BUCKLEY. 1984. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect. Immun.* **44**:576-580.

SOBEL, J.D., P.G. MYERS, D. KAYE y M.E. LEVISON. 1981. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **143**:76-82.

SOLL, D.R. 1984. The cell cycle and commitment to alternate cell fates in *Candida*

albicans. En: *The Microbial Cell Cycle* (P. Nurse y E. Streiblova, eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 143-162.

SOLL, D.R. y G.W. BEDELL. 1978. Bud formation and the inducibility of pseudo-mycelium outgrowth during release from stationary phase in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **108**: 173-180.

SOLL, D.R., C.J. LANGTIMM, J. McDOWELL, J. HICKS y R. GALASK. 1987. High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1611-1622.

SOLL, D.R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:183-203.

SOLL, D.R., M. STAEBELL, C. LANGTIMM, M.P. FALLER, J. HICKS y T.V.G. RAO. 1988. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. *J. Clin. Microbiol.* **26**:1448-1459.

SPELLER, C.D. 1980. Antifungal chemotherapy. John Wiley, New York.

SPRINGER, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**:425-434.

SPRINGER, T.A. y L.A. LASKY. 1991. Sticky sugars for selectins. *Nature* **349**:196-197.

STEPLEN, A., S.A. KLOTZ y R.L. SMITH. 1992. Glycosaminoglycans inhibit *Candida albicans* adherence to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**:205-208.

STEWART, T.S. y C.E. BALLOU. 1968. A comparison of yeast mannans and phospho-

- mannans by acetolysis. *Biochemistry* 7:1855-1863.
- STOTT, D.I.** 1989. Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Meths.* 119:153-187.
- STROCKBINE, N.A., M.T. LARGEN, S.M. ZWEIBEL y H.R. BUCKLEY.** 1984. Identification and molecular weight characterization of antigens from *Candida albicans* that are recognized by human sera. *Inf. Immun.* 43:715-721.
- SUDOH, M., S. NAGAHASHI, M. DOI, A. OHTA, M. TAKAGI y M. ARISAWA.** 1993. Cloning of the chitin syntase 3 gene from *Candida albicans* and its expression during yeast-hyphal transition. *Mol. Gen. Genets.* 241:351-358.
- SULLIVAN, P.A., Y.Y. CHIEW, C. MOLLLOY, M. TEMPLETON y M.G. SHEPHERD.** 1983. An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ tube formation. *Can. J. Microbiol.* 29:1514-1525.
- SUNAYAMA, H.** 1970. Studies on the antigenic activities of yeast. IV. Analysis of the antigenic determinant groups of the mannan of *Candida albicans* serotype-A. *Jap. J. Microbiol.* 14: 27-39.
- SUNDARAM, S., P.A. SULLIVAN y M.G. SHEPHERD.** 1981. Changes in lipid composition during starvation and germ-tube formation in *Candida albicans*. *Exptl. Mycol.* 5:140-147.
- SUNDSTROM, P.M. y G.E. KENNY.** 1984. Characterization of antigen specific to the surface of germ tubes of *Candida albicans* by immunofluorescence. *Infect. Immun.* 43:850-855.
- SUNDSTROM, P.M. y G.E. KENNY.** 1985. Enzymatic release of germ-tube specific antigens from cell walls of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 49:609-614.
- SUNDSTROM, P.M., E.J. NICHOLS y G.E. KENNY.** 1987. Antigenic differences between mannoproteins of germ tubes and blastopores of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 55:616-620.
- SUNDSTROM, P.M., M.R. TAM, E.J. NICHOLS y G.E. KENNY.** 1988. Antigenic differences in the surface mannoproteins of *Candida albicans* as revealed by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56:601-606.
- SUZUKI, S.** 1981. Antigenic determinants. En: *Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics, and ultrastructure*. Vol. 1. (W. N. Arnold, ed.), CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 85-96.
- SUZUKI, S. y M. USUYAMA.** 1971. Effect of *Arthrobacter*-mannosidase digestion on the immunochemical properties of the mannans of two serotypes of *Candida* yeast. *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo* 18:55-62.
- SWITALSKI, L.M., H. MURCHINSON, R. TIMPL, R. CURTIS III y M. HOOK.** 1987. Binding of laminin to oral and endocarditis strains of *viridans streptococci*. *J. Bacteriol.* 169:1095-1101.
- SWOBODA, R.K., G. BERTRAM, H. HOLLANDER, D. GREENSPAN, J.S. GREENSPAN, N.A.R. GOW, G.W. GOODAY y A.J.P. BROWN.** 1993. Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. 61: 4263-4271.
- TERRANOVA, V.P., C.N. RAO, T. KA-**

- LEBIC, I.M. MARGULIES y L.A. LIOTTA. 1983. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **80**:444-448.
- TIMPL, R., H. RODHE, P. GEHRON-ROBEY, S.I. RENNARD, J.M. FOIDART y G. MARTIN. 1979. Laminin: a glycoprotein form basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254**: 9933-9937.
- TOROSANTUCCI, A., M.C. GOMEZ, C. BROMURO, I. CASALINUOVO y A. CASSONE. 1991. Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **29**: 361-372.
- TOSH, F.D. y L.J. DOUGLAS. 1992. Characterization of a fucoside-binding adhesin of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **60**:4734-4739.
- TOWBIN, H., T. STAEHELIN y J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:4350-4354.
- TRACK, J.S., E.B. CYBULSKA y J.O. LAMPEN. 1971. Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. *J. Bacteriol.* **105**:1-5.
- TRONCHIN, G., J.P. BOUCHARA y R. ROBERT. 1989. Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. *Eur. J. Cell. Biol.* **50**:285-290.
- TRONCHIN, G., J.P. BOUCHARA, R. ROBERT y J.M. SENET. 1988. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect. Immun.* **56**:1987-1993.
- TRONCHIN, G., D. POULAIN, J. HERBAUT y J. BIGUET. 1981. Localization of chitin in the cell wall of *Candida albicans* by means of wheat germ agglutinin. Fluorescence and ultrastructural studies. *Eur. J. Cell. Biol.* **26**:121-128.
- TRONCHIN, G., R. ROBERT, A. BOUALI y J.M. SENET. 1987. Immunocytochemical localization of in vitro binding of human fibrinogen to *Candida albicans* germ tube and mycelium. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **138**:177-187.
- TURNER, M.W. 1994. Mannose binding protein. *Biochem. Soc. Transac.* **22**:88-94.
- TSUCHIYA, T., Y. FUKAZAWA, M. NAKASE y T. SHINODA. 1974. Serologic aspects on yeast classification. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **53**:77-91.
- VALKONEN, H.K., J. VEIJOLA, B. DAGBERG y B.E. UHLIN. 1991. Binding of basement-membrane laminin by *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:2133-2141.
- VAN DE RIJN, M., I.L. WEISSMAN y M. SIEGELMAN. 1990. Biosynthesis pathway of gp90, the mouse lymph node-specific homing receptor. *J. Immunol.* **145**:1477-1482.
- VICENTINI, A.P., J.L. GESZTESI, M.F. FRANCO, W. D'SOUZA, J.Z. D'MORALES, L.R. TRAVASSOS y J.D. LOPES. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.* **62**:1465-1469.
- VOLLER, A., D. BIDWELL y A. BAR-

- TLETT.** 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay En: Manual of clinical immunology (N.R. Rose y H. Friedman, eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 359-371.
- WALSH, T.J., J.W. HATHORN, J.D. SOBEL, W. MERZ, V. SANCHEZ, M. MARET, H.R. BUCKLEY, M.A. PFA-LLER, R. CHAUFÉLE, C.SLIVA, E. NAVARRO, J. LECCIONES, P. CHANDRASEKAR y J. LEE.** 1991. Detection of circulating *candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. N. Engl. J. Med. **324**:1026-1031.
- WALTON, A.G. y J. BLACKWELL.** 1973. Biopolymers. Academic Press, New York, pp. 464-474.
- WEINSTOCK, K.G., M.D. ADAMS, C. FIELDS y J.C. VENTER.** 1993. Expressed sequence tags from *Saccharomyces cerevisiae*, abstr. B9, pp. 23. ASM Conference on Candida and Candidiasis: Biology, Pathogenesis and Management, Baltimore, Md. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- WEIS, W.I., R. KAHN, R. FOURME, K. DRICKAMER y W.A. HENDRICKSON.** 1991. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. Science **254**:1608-1615.
- WESTERLUND, B. y T.K. KORHONEN.** 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. Mol. Microbiol. **9**:687-694.
- WEWER, V.M., L.A. LIOTTA, M. JAYE, G.A. RICCA, W. DROHAN, A.P. CLAYSMITH, C.N. RAO, P. WIRTH, J.E. COLIGAN, R. ALBRECHTSEN, M. MUDRIJ y M.E. SOBEL.** 1986. Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. Proc. Natl. Acad. Sci. **83**:7137-7141.
- WILCHEK, M. y E.A. BAYER.** 1988. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. Anal. Biochem. **171**:1-32.
- WILKINSON, K.D., K. LEE, S. DESHPANDE, P. DUERKSEN-HUGHES y J.M. BOSS.** 1989. The neuron-specific protein PGP9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Science. **246**:670-673.
- WINGARD, J.R., W.G. MERZ y M.G. RINALDY.** 1991. Increase in *Candida crusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazol. New. England. J. Med. pp.1274-1277.
- WINNER, H.I. y R. HURLEY.** 1964. *Candida albicans*. London: Churchill.
- YAMADA, K.M.** 1991. Adhesive recognition sequences. J. Biol. Chem. **266**:12809-12812.
- YAMAGUCHI, H.** 1974. Effect of biotin insufficiency on composition and structure of cell wall of *Candida albicans* in relation to its mycelial morphogenesis. J. Gen. Appl. Microbiol. **20**:217-228.
- YOUNG, R.A. y R.W. DAVIS.** 1987. Gene isolation with λ gt11 system. Methods in enzymol. **154**: 230-238.
- YOW, H., J.M. WONG, H.S. CHEN, C. LEE, G.D. STEELE y L.B. CHEN.** 1988. Increased mRNA expression of a laminin-bin-

ding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 6394-6398.

YU, R.J., C.T. BISHOP, F.P. COOPER, F. BLANK y H.F. HASENCLEVER. 1967. Glucans from *Candida albicans* (serotype B) and from *Candida parapsilosis*. *Can. J. Chem.* **45**:2264-2267.

YU, L., K. LEE, P.C. DOIG, M.C. CARPENTER, W. STADDON, R.S. HODGES, W. PARACHYCH y R. IRVIN. 1994a. Partial characterization of *Candida albicans* fimbrial adhesin. *Inf. Immun.* **62**:2834-2842.

YU, L., K. LEE, H. SHET, P. LANE-BELL, G. SRIVASTARA, O. HINDSGAUL, W. PARACHYCH, R.S. HODGES y R. IRVIN. 1994b. Fimbria-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**:2843-2848.

ZAJIC, J.E. y W. SEFFENS. 1983. Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **1**:87-107.

ZHOU, J., L. ANU y K. TRYGGUASON. 1994. Structure of the human type IV collagen COL4A5 gene. *J. Biol. Chem.* **269**:6608-6614.

ZOLLER, L., I. KRAMER, R. KAPPE Y H.-G. SONNTAG. 1991. Enzyme immunoassay for invasive *Candida* infections: Reactivity of somatic antigens of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1860-1867.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Pilar Segulveda Sanchez

la calificación de Apto "Cum laude" (por unanimidad)

Valencia, a 22 de Septiembre de 1995

El Secretario,

El Presidente



[Handwritten signature in blue ink]

[Handwritten signature in blue ink]

YU, L., K. LEE, H. SHET, P. LAKE-
BELL, G. SRIVASTARA, O. HINDSGA-
UL, W. PARACHYCH, R.S. HODGES Y
R. IRVIN. 1994b. Fimbria-mediated adhe-
rence of *Campylobacter* to glycosphingo-
lipid receptors on human buccal epithelial
cells. Infect Immun 62:2843-2848.

ZAJIC, J.E. y W. SEFFENS. 1983. Biotur-
factants. CRC Crit Rev Biotechnol 1:87-
107.

ZHOU, J., L. ANU Y K. TRYGGVASON.
1994. Structure of the human type IV colla-
gen COL4A2 gene. J Biol Chem 269:6008-
6014.

ZOLLER, L., I. KRAMER, R. KAPPE Y
H.-G. SONTAG. 1991. Enzyme immu-
nossay for invasive *Campylobacter* infections:
Reactivity of somatic antigens of *Campylobacter*
jejuni. J Clin Microbiol 29:1860-1867.