

ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU- AMAIERAKO LANA BIOTEKNOLOGIA

MABAdh ANTIGORPUTZ MONOKLONALAREN EFEKTUA
Candida albicans-EN BIDERAGARRITASUNEAN

Ikaslea: *Sainz de la Maza Larrea, Arrate*

Data: 2016ko ekaina

Zuzendaria:

Dr. Andoni Ramírez García

Zuzendarikidea:

Dr. Fernando Luis Hernando Echavarría

Ikasturtea
2015/16

AURKIBIDEA

1. SARRERA	2
2. HELBURUAK	7
3. MATERIALAK ETA METODOAK	8
3.1 Mikroorganismoak eta hazkuntza baldintzak	8
3.2 Anti-adh1 antigorputz monoklonalaren ekoizpena	8
3.3 Hazkuntza kurbak	9
3.4 Hazkuntzaren inhibizioa	9
3.5 Kontzentrazio minimoa inhibitzailea neurketa	10
3.6 Immunofluoreszentzia ez-zuzena	10
3.7 Metodo estatistikoak	11
4. EMAITZAK	11
4.1 Hazkuntza kurbak	12
4.2 Hazkuntzaren inhibizioa	13
4.3 MIC, minimum inhibitory concentration	16
4.4 IFI, indirect immunofluorescence	16
5. EZTABAIDA	18
6. ONDORIOAK	21
7. BIBLIOGRAFIA	22

1. SARRERA

C. albicans, gaur egungo populazio osasuntsuan komentsal moduan agertu ohi den legamia da. Egoera horretan arazorik sortzen ez duen arren, kasu batzuetan infekzio larriak eragin ditzake, kandidemia kasu, kandidiasi sistemikoa egoera larriena izanik. Izan ere, ospitaleetan hartutako gaixotasunak, hau da, infekzio nosokomialak eragiten dituzten onddoen artean, legami hau agente nagusia da. Kandidemia eta kandidiasi sistemikoaren intzidentziak azken urteotan gorakada handia izan du, batez ere giza immunodefizientziaren birusarekin (GIB) infektatutako, transplantatutako edota hipotiroidismo eta diabetes mellitus gaixotasun endokrinoak pairatzen dituzten indibiduo kopuruaren hazkuntza dela eta. Baita espektro zabaleko antibiotikoen, esteroideen eta farmako zitotoxikoen terapien erabilera zabalaren ondorioz ere.

Candida generoa *Fungi* erreinu, *Ascomycota* filum, *Saccharomyces* klase, *Saccharomycetales* orden eta *Saccharomyceae* familian sailkatuta dago. *Candida* generoa 350 espezie heterogeneo baino gehiagoz osatuta dago, zeintzuen artean bakar batzuk baino ez dauden giza gaixotasunekin erlazionatuta (Williams *et al.*, 2011). Patogenoak diren horien artean, *Candida albicans* garrantzitsua da.

Mikroorganismo hau legamia zelulabakar, eukariota, aerobio eta heterotrofoa da, zeina onddo-eredu unibertsala den *Saccharomyces cerevisiae* espeziearekin estuki erlazionatuta dagoen.

Ugalketari dagokionez, *Candida* generoko espezie guztiak gemazio deritzon zatiketa zelular prozesuaren bidez ugaltu egiten dira, baina *C. albicans* espeziearen berezitasunetako bat ingurune faktoreen arabera legamia moduan zein modu mizeliarrean hazteko ahalmena da. Konkretuki, lau morfologia posible ditu: blasospora edo legamia (zelula borobilak), hifak (filamentu luzeak), pseudohifak (ugalketan banatu ez diren zelulen lerroketa) eta klamidosporak (pareta zelular lodidun zelula handiak). Benetako hifak sortzeko gaitasun hau *C. albicans*-en birulentzia faktore nagusienetako bat da (Bliss *et al.*, 2003).

C. albicans patogeno oportunistak moduan sailkatu egiten da zeinak populazio osasuntsuaren azala eta mukosak kolonizatzen dituen; batez ere, aho-barrunbe eta baginako mukosa. Egoera normalean komentsal moduan agertzen da; populazioaren %30-70 kolonizatzen du (Gow *et al.*, 2012) sinbiosian kalterik sortzen ez duelarik,

baina egoera immunologikoa edota mikrobiota aldatu egiten denean, mukosen kolonizaziotik gaixotasunaren garapenera eboluzionatu egiten du.

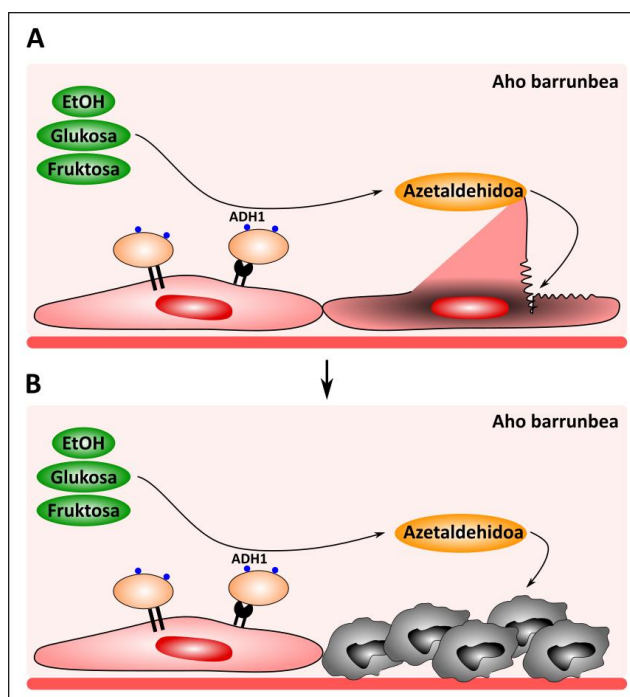
C. albicans-ek eragindako infekzio oportunisten artean azaleko lesio arinak, odol torrentearen kolonizazioa (kandidemia) eta barruko organoak kaltetu ditzaketen infekzio larriak (kandidiasi sistemikoa) agertzen dira. Azaleko kandidiasia infekzio motarik ohikoena da eta aho barrunbe eta baginaren mukosetan du eragina batez ere. Kandidiasi barreiatuan, onddoa linfa-ehun eta odol zirkulazioan zehar hedatu egiten da. Ospitaletako zainketa intentsiboetako unitateetan dauden gaixoek, *Candida* spp. onddoak eragindako infekzio sistemikoak pairatzeko arrisku handia daukate; nagusitzen diren gaixotasun eta erabilitako terapiak sortutako immunitate-sistemaren desorekaren ondorioz batez ere. Izan ere, *Candida* spp. odoleko infekzio nosokomialen laugarren eragilea da, %40ko heriotza-tasa eragiten duelarik (Pfaller eta Diekema, 2007).

Candida-k eragindako infekzioa pairatzeko arrisku faktoreetako bat tumore solidoak izatea da (Zirkel *et al.*, 2012). Minbizia gaur egun pairatu daitekeen osasun arazorik larrienetarikoa da. Gaixotasunak aurrera egin ahala, kontrolik gabeko zelulen hazkuntza, ehunen inbasioa eta kasurik larrienetan metastasia ematen dira. *C. albicans* eta minbiziaren arteko harremana sakonki aztertua izan da minbiziaren kontrako kimioterapia tratamenduak eragindako immunoeskasiak kandidiasia faboratzen duelako (Lalla *et al.*, 2010; Boheme *et al.*, 2009; Matsuda *et al.*, 2009). Hala ere, duela gutxi hipotesi berri bat proposatu da; kandidiasia ez litzateke soilik minbiziaren ondorioa izango, baizik eta minbizia izateko arriskuaren adierazlea eta kasu batzuetan eragilea (Nogaard *et al.*, 2013; Ramírez-García *et al.*, 2016).

Azalpen posibleetako bat kandidiasi eta minbiziaren arteko arrisku faktore komunak dira; hainbat komorbilitate, medikamentu, bizimodu eta immunitate-sistemaren ahultzearekin erlazionatuta (Nogaard *et al.*, 2013). Azken urteotan argitaratutako ikerketek (Gainza-Cirauqui *et al.*, 2013; Ramírez-García *et al.*, 2011, 2013), *C. albicans* prozesu kantzerigenoen agerpen eta garapena estimulatzeko gai dela frogatu dute. Ikerketa hauetan minbizia eragin dezaketen hainbat prozesu deskribatzen dira. Mekanismo horietariko bat *C. albicans*-en produktu kantzerigenoak (azetaldehidoa kasu) ekoizteko gaitasunean oinarritzen da, beste bide bat garapen metastasikoa

faboratu dezakeen hanturazko prozesuen indukzioa da eta hirugarren bat mimetismo molekularrekin eta immunitate-sistemako Th17 linfuzitoen erantzunarekin erlazionatuta dago (Ramírez-García *et al.*, 2016).

C. albicans-ek mukosako epitelioan kartzinogenoen ekoizpenean edota pro-kartzinogenoen metabolismoan parte hartzen du. Aurreko hamarkadetan argitaratutako ikerketa batzuen arabera (Krogh, 1990; Krogh *et al.*, 1987a,b), onddo honek aho-kartzinogenesisian garrantzia handia izan dezake, nitrosamina eta azetaldehidoaren antzeko konposatu kartzinogenoak ekoizteko gaitasuna dela eta (**1 Irudia**).



1 Irudia. *Candida albicans*-ek tumore genesiarekin erlazionatutako konposatu kartzinogenoen ekoizpenean bete dezakeen funtzioa. (A) *C. albicans*, alkohol deshidrogenasa (Adh1) entzimaren bidez alkohola eta karbohidratoen antzeko beste sustantziak metabolizatzeke gai da kantzerigenoa den azetaldehidoa ekoiztuz. (B) Azetaldehidoa, hainbat prozesuren bidez, tumoreen garapena eragiteko gai da. Proteina eta DNAr lotu egiten zaie egitura eta funtzioa aldatuz eta glutatioiaren aktibitate antioxidatzailea murriztu egiten du zelulako oxigeno espezie erreaktiboaren (ROS, reactive oxygen species) maila handituz. Aldaketa hauek genomaren desegonkortasuna sor dezakete eta makineria apoptotikoaren inhibizioarekin elkartuz gero tumore garapena eragin. (Ramírez-García *et al.*, 2016)

Hainbat ikerketek, azetaldehidoa minibiziarekin erlazionatu egin dute (Homann *et al.*, 2000; Gainza-Cirauqui *et al.*, 2013), batez ere aho minbiziarekin. Arrisku faktoreen artean alkohola edatea, erretzea eta aho higie desegokiak agertzen dira. Etanolak berez ez dauka efektu kartzinogenikorik, baina honen lehenengo metabolitoak, azetaldehidoak, bai. IARC (*International Agency for Research in Cancer*) erakundearen arabera, 100 μ Metik gorako azetaldehido kontzentrazioa kaltegarria kontsideratzen da; ADN aduktuak, ADN *crosslink*, kromatida ahizpen arteko aldaketak eta aberrazio kromosomikoak sortzeko gai da eta horrez gain, ADN konponketa mekanismoak oztopatu egiten ditu (tumore supresorea den p53 genean mutazioak sortuz adibidez) (Gainza-Cirauqui *et al.*, 2013).

Gorputzean ematen den etanolaren azetaldehidorako oxidazioa katalizatzen duen entzima alkohol deshidrogenasa (Adh) da. Gizakietan, mukosan (maila intrazelularrean) agertzen den arren, listuan aurkitzen den azetaldehido gehiena mikrobiotako entzimak ekoitzi egiten du (Homann *et al.*, 2000). *C. albicans* genomak *ADH* gene familiaren sei kide topatu izan dira (<http://www.candidagenome.org/>), baina hiruk bakarrik (*ADH1-3*) proteina funtzionala kodetzeko potentziala dute. Hala ere, soilik Adh isoentzima bakarra (*Adh1*) isolatua izan da; horrek entzima bakarrak bi norabideetan, etanolaren hartidura eta metabolismoan, lan egiten duela aditzera eman dezake (Bertram *et al.*, 1996). *C. albicans*-en frakzio manoproteikoak, zelula endotelial eta hanturaren estimulazioaren ondoriozko tumore zelulen atxikimenduaren areagotzea eragiten duela frogatu egin da (Ramírez-García *et al.*, 2011). Manoproteina horien artean *Adh1a* agertzen da; zenbait ikerketek (Ramírez-García *et al.*, 2011), proteina honek bide desberdinen bidez *C. albicans*-ek eragindako minbiziaren sorrera eta areagotzean izan dezakeen garrantzia azpimarratu egiten dute.

Adh1 proteina lau azpiunitatez osatutako homotetrameroa da, zeinak azpiunitate bakoitzean bi zink ioi dituen, bata zentro katalitikoan eta bestea funtzio estrukturala betetzen duena. *C. albicans*-en zelula-azalean kokatuta dago (Pitarch *et al.*, 2002) eta antigenizitateari dagokionez kandidiasian eginkizun garrantzitsua du (Ramírez-García *et al.*, 2011, 2013). Aipatutakoa funtzio nagusia izan arren, metilgloxal erreduktasa eta proteinen lotura funtzioak ere baditu. Nahiz eta funtzioak anotazio informatikoan baino ez dauden oinarrituta, *Candida genome* data basearen arabera

eta homologiak oinarritzat hartuz, onartu egiten da beste funtzio metaboliko batzuk dituela; parasito-ostalari interakzioaren prozesu glikolitikoetan, ostalariaren defentsaren aurkako erantzunean, zelula ostalariarekin interakzioan eta ostalariaren eta substratu bizigabeen biofilm sorreran parte hartzen du (Shen *et al.*, 1991; Swoboda *et al.*, 1994; Pitarch *et al.*, 2001; Crowe *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2006). Kontserbazioari dagokionez, legamien artean oso kontserbatuta mantendu egin da; hori, legamien hartziduretan Adh1aren ezinbesteko funtzioaren ondorio izan daiteke, ahalmen erreduzitzailea oxidatzerako orduan. Aipatzekoa da, bakteriatik eta legamietatik kanpo kontserbazioa ez dela hain hertsia, *H. sapien*-sekin sekuentziaren %86 elkarbanatzen du; horregatik, suposatu daiteke giza immunitate-sistema Adh1 mikrobianoa desberdintzeko gai dela onddoaren kontrako erantzuna sortuz.

Candida albicans onddoak sortzen dituen arazoak kontuan hartuta terapia eraginkorren beharra ezinbestekoa da. Gaur egun erabiltzen diren tratamenduen artean antifungikoak agertzen dira batez ere; anfoterizina B, ekinokandinak eta flukonazolen antzeko azolak bereziki. Hala ere, konposatu hauen erabilerak bi arazo nagusi ditu; alde batetik, toxizitate altua daukate eta bestetik, antifungikoekiko erresistentzia gero eta handiagoa da (Bugli *et al.*, 2013). *C. albicans*-en azolekiko erresistentziaren mekanismo ohikoena konposatua kanporatzeko ponpen ekoizpena handitzea da. Adh1ak esate baterako, flukonazolekiko erresistentzian parte hartzen du, kanporatze ponpekin erlazionatutako mekanismo batean konkretuki (Wang *et al.*, 2012).

Antifungikoek sortzen dituzten arazoak kontuan hartuta eta horren konponbide moduan, hainbat ikerketetan antigorputzen erabileraren potentziala aztertzen hasi dira (Bugli *et al.*, 2013; Coleman *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2015). Ikerketa hauek *C. albicans*-en aurrean ostalariaren immunitate humoralak izan dezakeen eraginkortasuna aztertu egin dute. Antigorputzek immunitate humoralean hainbat prozesutan parte hartzen dute; toxinen eta patogenoen neutralizazioan laguntzen dute, mikroorganismoen opsonizazioa burutzen dute zeinak fagozitosia errazten duen eta zelula efektoreen zitotoxizitatea aktibatzen dute besteak beste. Azkenaldian funtzio gehiago topatu izan dira; hala nola, atxikiduraren inhibizioa, hazkuntzaren inhibizioa, hozitzearen inhibizioa eta biofilm sorreraren inhibizioa (Coleman *et al.*, 2009; Elguezabal *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2014). Patogenesiaren urrats

garrantzitsuenetarikoa onddo eta ostalariaren ehunen arteko lotura da, atxikimendua; horregatik, gertaera hau ekiditeko modua topatzea oso garrantzitsua da infekzioa saihestu baitlezake. Listuko sIgAk adibidez, *C. albicans*-en atxikimendua murriztu egiten du onddoaren zelula paretara lotuz eta adesak maskaratuz (Elguezabal *et al.*, 2009). Baina, isotipoek molekula talde anitza ezagutu egiten dute; antigorputz monoklonalen erantzuna aldiz, molekula batekiko espezifiko da (Coleman *et al.*, 2009; Elguezabal *et al.*, 2009). Momentuz ezin dira terapia bakar modura erabili, baina *in vivo* egindako esperimentuetan antigorputz eta antifungikoen arteko konbinazioak efektu immunoterapeutikoa duela frogatu egin da; antigorputz monoklonalak eragindako hobetze erantzuna dela eta, honen erabilerak kasu klinikoetan anfoterizina dosiaren gutxitzea suposatzen dezake (Han, 2010).

2. HELBURUAK

Candida albicans eta ostalarien zelulen arteko kontaktua zelula-azaleko egiturek bideratu egiten dute, paretara ezinbestekoa da ostalari eta patogenoaren arteko harremanetarako (Coleman *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2015). Egitura horien artean, Adh1 proteina agertzen da; horregatik ikerketa honetan proteina hori oinarritzat hartuta antigorputz monoklonalak ekoiztu eta *C. albicans* legamiaren bideragarritasunean izan dezaketen eragina aztertu dugu, *C. albicans* onddoak eragiten dituen infekzio eta gaixotasunei tratamendu alternatibo bat topatzeko asmoarekin. Helburu orokor hori lotzeko hainbat helburu partzial planteatu izan dira:

1. Anti-Adh1 antigorputz monoklonalak *C. albicans* onddoaren hazkuntzan duen eragina aztertzea.
2. Anti-Adh1 MAb-k antifungiko desberdinekin izan dezakeen erlazio sinergikoa aztertzea.
3. Anti-Adh1 MAb-ren ezagupen espezifikoa zehaztea, onddoaren ze atal ezagutu eta non lotu egiten den.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1 Mikroorganismoak eta hazkuntza baldintzak

Ikerketa honetan 6 *Candida albicans* andui desberdin erabili ziren: *C. albicans* NCPF 3153 erreferentzia anduia, *C. albicans* UPV 1413 anduia ("Colección Española de Cultivos Tipo"-ko CECT 13062 erreferentzia duena) eta UPV 1360 anduia (CECT 13063) zeintzuk kandidiasi sistemikoa izan zuten pazienteengandik isolatuak izan ziren; eta *C. albicans* UPV 15-170, UPV 15-171 eta UPV 15-172, azken hauek kandidiasi orala zuten pazienteetatik isolatuak izan zirelarik. Azken hirurak Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia saileko (Medikuntza eta Odontologia fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea) Cristina Marcos doktoreak eman zituen. Pazienteek, laginak hartu aurretik, euren baimena eman zuten Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) Batzorde Etikoak ezarritakoaren arabera.

Candida generoko anduiak sabouraud destrosa agarrean mantendu ziren. Esperimentuaren aurreko egunean, sabouraud destrosa saldan 10^5 legami/mL hazi ziren 37 °C-tan eta 120 rpm-tan 18 orduz. Esperimentu bakoitzerako beharrezkoa zen blastokonidioen kontzentrazioa hemozitometroa erabiliz doitu zen. Hifak beharrezkoak ziren kasuetan, *C. albicans* behi-serum fetal (*Fetal bovine serum*, FBS ingelesez) %10arekin aberastutako RPMI 1640 medioan 4 orduz hazi zen (37 °C eta 120 rpm).

3.2 Anti-Adh1 antigorputz monoklonalaren ekoizpena

Anti-Adh1 antigorputz monoklonalak (MAb) Abyntek (Zamudioko Parke Teknologikoa, Bizkaia) enpresak ekoiztu zituen, saguei txertatutako Adh1 proteina birkonbinatu purifikatua (rAdh1) erabilita. Bost MAb lortu ziren, baina ikerketa honetan, antigenoarekiko errektibotasun handiena erakutsi zuten bi antigorputzak baino ez ziren erabili. Hauek IgG isotipoko talde desberdinetakoak ziren, IgG1 eta IgG2 zehazki eta ondorioz, lan honetan antigorputz hauek desberdintzeko, horixe da erabiliko den nomenklatura.

Antigorputzak lortu ahal izateko, lehenik BALB/C saguei antigenoa (rAdh1) txertatu eta bareko B linfozitoak lortu egin ziren. Hauek mielomako tumore-zelulekin fusionatu ziren polietilenglikolaren (PEG) bidez; etengabeko hazteko gaitasuna duten

hibridoma deitutako zelulak sortzeko. Hibridoma bakoitzaren isolamenduaren bidez anti-Adh1 antigorputz klon desberdinak lortu ziren eta ELISAren bidez errektiboenak aukeratu. Hautatutako hibridomek ekoiztutako antigorputzen produkzio masiboa burutzeko, hibridomak saguen peritoneoan txertatu ziren eta egun batzuetara likido absizikoa erauzi zen. Antigorputzak A proteina erabiliz kromatografia bidez purifikatu ziren.

3.3 Hazkuntza kurbak

Antigorputzak *C. albicans* onddoaren hazkuntza dinamikan izan dezakeen eragina aztertzeko, legamia sabouraud saldan 1.5×10^3 zel/mL kontzentrazioa doitu zen. Ostean, 96 putzudun plaketan putzu bakoitzean esekidura horren 100 μ L gehitu ziren. Kontrol negatibo moduan, hiru putzu sabouraud medioaren 100 μ L-rekin bakarrik bete ziren. Kontrol positibo moduan, *C. albicans* soilik zuten putzuak erabili ziren. Beste putzuetan, antigorputza 1 pg/mL eta 10 μ g/mL tarteko kontzentrazioetan gehitu zen, bakoitzetik hiru erreplika egin zirelarik. Putzuetako absorbantzia 10 minuturo neurtu zen, 25 orduz eta 600nm-tan (Synergy HT, BioTek) plaka 37 °C-tan mantendu zelarik.

3.4 Hazkuntzaren inhibizioa

Antigorputzak *C. albicans* onddoaren hazkuntza inhibitzeko duen gaitasuna aztertzeko, 1.5×10^3 zel/mL inkubatu ziren fosfatodun gatz-indargetzailean (*Phosphate-buffered saline*, PBS ingelesez), 18 orduz, 37 °C-tan eta 120 rpm-etan. 1 ng/mL eta 20 μ g/mL tarteko antigorputz kontzentrazioak gehitu ziren eta kontrol positibo moduan, antigorputzik gabe inkubatutako lagina erabili zen. Inkubazioaren ostean, tratamendu bakoitzaren 100 μ L sabouraud agar plaketan inokulatu ziren (hiruna erreplika) eta plakak 18 orduz 37°C-tan inkubatu. Inkubazioaren ostean plaka bakoitzeko unitate kolonia-eratzailleak (*Colony-forming units*, CFU ingelesez) zenbatu ziren.

3.5 Kontzentrazio minimo inhibitzailearen (MIC, *minimum inhibitory concentration*) neurketa

Anti-Adh1ak, anfoterizina B eta flukonazolekin izan dezakeen efektu sinergikoa aztertzeko, EUCASTek (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) proposatzen duen MIC-aren protokoloa jarraitu zen. Lehenik eta behin, bi aldiz kontzentratutako RPMI 1640 (20,8 g/L) + MOPS (69,06 g/L) + glukosa (36 g/L) media prestatu zen (pH 7) zeini antifungikoa gehitu zitzaion diluzio desberdinak lortuz. Anfoterizina B-rentzako 0,03 mg/L eta 16 mg/L arteko kontzentrazioak erabili ziren eta flukonazolarentzako 0,12 mg/L eta 64 mg/L artekoak. Antifungikoen kontzentrazioak bikoiztuta prestatu ziren putzuetara legamia gehitzean erdira diluitzen baitira. Behin diluzioak prestatuta, putzu bakoitzari soluzio hauen 100 µL gehitu zitzaion.

Gero, *C. albicans* esperimentua baino 18-24 h lehenago sabouraud agar plaketan hazten jarri zen. Esperimentuaren egunean, 5 kolonia 3 mL ur destilatutan birsuspenditu ziren eta kontzentrazioa 5×10^5 zel/mL-tara doitu zen. Legamiei antigorputzaren 10 ng/mL eta 20 µg/mL arteko kontzentrazioak gehitu zitzaizkion. Ostean, soluzio horien 100 µL RPMI eta antifungikoa zuten putzuetara gehitu ziren bolumen totala 200 µL zelarik. Kontrol negatibo moduan, RPMI soilik zuten putzuak erabili ziren eta positibo moduan soilik *C. albicans* eta RPMI zutenak.

Azkenik, 96 putzuko plaka 37 °C-tan 24 orduz inkubatu eta inkubazioaren ostean absorbantzia 530 nm-tan neurtu zen. Anfoterizina B-rentzako MIC balioa zehazteko kontrolaren hazkuntzaren %90 inhibitzen zuen kontzentrazio baxuena hartu zen kontuan eta flukonazolarentzako %50 inhibitzen zuena.

3.6 Immunofluoreszentzia ez-zuzena (IIF, *indirect immunofluorescence*)

Anti-Adh1 MAb-ren bidezko *C. albicans*-en detekziorako onddoaren lagin zati bat 50 mM sodio metaperiodatorekin tratatu zen 30 minutuz eta iluntasunean zelula-hormaren karbohidratoak kentzeko. IIF egiteko erabiltzen den portan laginen 10 µL gehitu eta 18 orduz lehortzen utzi zen.

Hurrengo egunean, porta ur destilatuz garbitu zen gehiegizko sodio metaperiodatoa kentzeko. Porta lehortzen utzi ostean, 100 µg/mL kontzentrazioko 10 µL anti-Adh1

gehitu eta porta 90 minutuz 37 °C-tan inkubatu zen. Inkubazioaren ostean, porta hiru aldiz garbitu zen (10 minutuz aldi bakoitza) PBS (pH 7,5) soluzioarekin. Ondoren, Evans Blue %0.05 (w/v) eta Tween 20 %0.05 (v/v) zuen PBS soluzioan FITCekin markatutako anti-sagu IgG antigorputza gehitu zen 1:1000 diluzioa lortuz eta 30 minutuz inkubatu zen 37 °C-tan. Inkubazio ostean, porta PBSrekin hiru aldiz (10 minutuz) garbitu zen. Estalkia jartzeko Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich) erabili zen. Kontrol negatibo moduan anti-adh1 antigorputzarekin inkubatu gabeko lagina erabili zen. Zelulak Nikon Eclipse Ni fluoreszentzia mikroskopioa erabilia aztertu ziren eta argazkiak Andor Zyla sCMOS kamerarekin atera.

3.7 Metodo estatistikoak

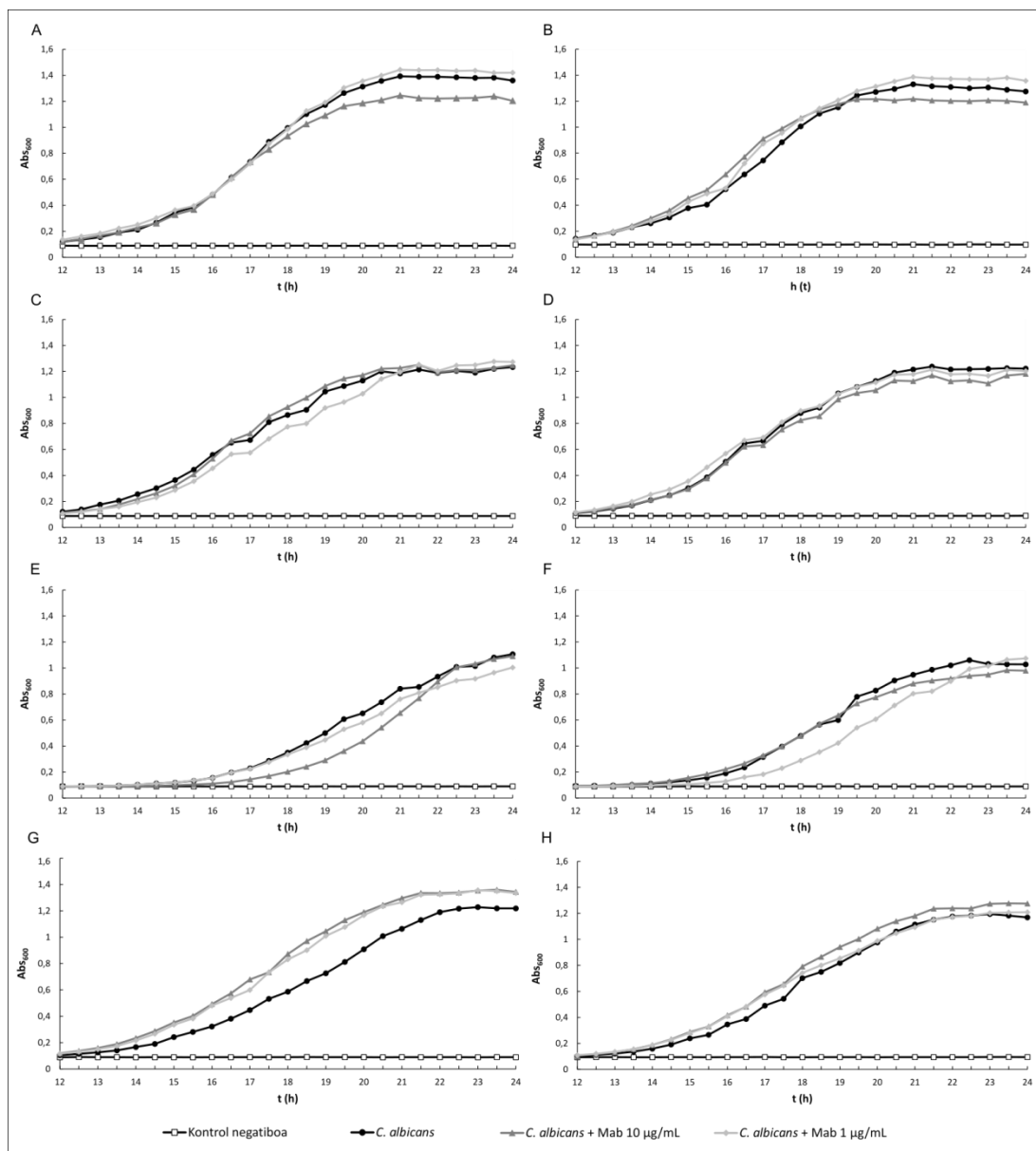
Esperimentu bakoitzean hiru saiakera independente egin ziren. Emaitzak batezbesteko \pm errore estandar moduan adierazi dira. Hauen tratamendu eta analisi estatistikorako, *IBM SPSS Statistics version 20* estatistika programa erabili zen. Datu ororentzako estatistiko deskriptiboak kalkulatu egin ziren normalitate probekin batera.

Lagin independenteen batezbestekoen interakzio azterketa datuen bariantza-analisiaren (*Analysis of Variance*, ANOVA ingelesez) bidez burutu zen. Beti %95eko konfiantza tartearekin lan egin zen $p \leq 0,05$ eko balioak adierazgarri kontsideratu zirelarik.

4. EMAITZAK

Antigorputzaren eragina aztertzeko hainbat esperimentu burutu ziren. Alde batetik, anti-Adh1ek *C. albicans* onddoaren hazkuntzan duen eragina aztertzeko hazkuntza kurbak eta hazkuntzaren inhibizioak egin ziren. Beste alde batetik, antigorputzak antifungikoekin izan dezakeen efektu sinergikoa aztertzeko MIC froga burutu zen. Azkenik, antigorputzaren lotura espezifikoa onddoaren zein lekutan ematen den eta antigorputzak egindako ezagutzea aztertzeko IFI froga egin zen.

4.1 Hazkuntza kurbak



2 Irudia. *C. albicans* andui desberdinen hazkuntza kurbak anti-Adh1 antigorputzaren presentzian.

Esperimentuan anti-Adh1aren bi isotipo desberdin erabili ziren, IgG1 eta IgG2. Emaitzetan, 24 orduz andui bakoitzak izandako hazkuntza irudikatzen da, absorbantzia 600_{nm}-tan irakurri zelarik (Synergy HT, BioTek). Lehenengo 12 orduetan ez zen hazkuntzarik eman, beraz datu horiek ez dira agertzen. (A) NCPF 3153 IgG1 isotipoa, (B) NCPF 3153 IgG2 isotipoa, (C) UPV 1413 IgG1 isotipoa, (D) UPV 1413 IgG2 isotipoa, (E) UPV 1360 IgG1 isotipoa, (F) UPV 1360 IgG2 isotipoa, (G) UPV 15-171 IgG1 isotipoa eta (H) UPV 15-171 IgG2 isotipoa.

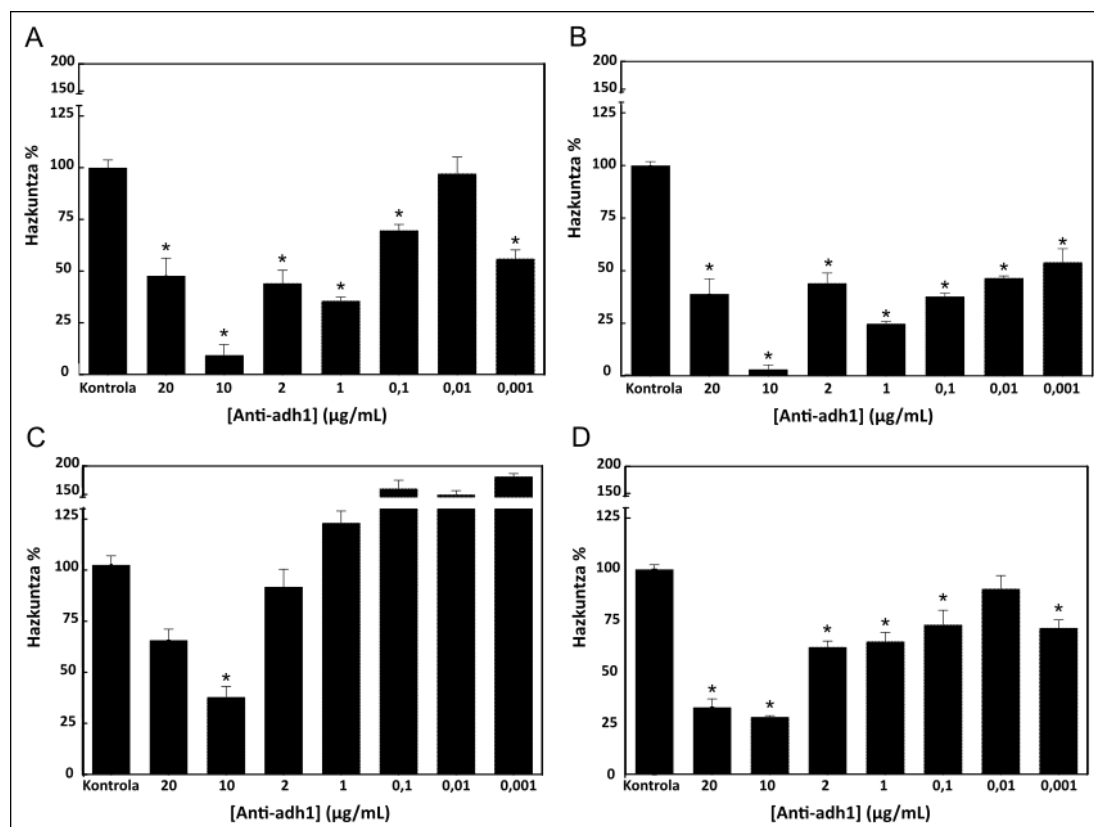
Sortutako anti-Adh1 antigorputzak onddoaren hazkuntzan izan zezakeen eragina aztertzeko asmoz, *C. albicans* andui desberdinen hazkuntza kurbak egin ziren.

2 Irudian ikusten den moduan, soilik NCPF 3153 anduiaren antzeman zen antigorputzaren eragina; hala ere, hazkuntzaren jaitsiera IgG1 isotipoarekin baino ez zen lortu. *C. albicans*-en kontzentrazioa eta absorbantziaren artean egindako korrelazioaren arabera (emaitzak ez dira aurkezten), NCPF 3153 anduiaren emandako 1,4 absorbantziatik 1,2rako jaitsierak zelula kontzentrazioa erdia murriztu zela suposatzen du. Beste anduietan antigorputzak ez zuen hazkuntzan aldaketarik sortu; kontrola eta anti-Adh1ekin tratatutakoen artean ez zen desberdintasunik eman.

Orokorrean hazkuntzaren hasiera 12 eta 13 orduen bitartean eman zen eta 21-23 orduetan, *C. albicans* fase geldikorrera heldu zen. UPV 1360 anduiaren hazkuntza patroia besteekin alderatuta desberdina da (**2E eta 2F Irudiak**); hazkuntza beranduago hasteaz gain (15-16 orduetan), beste anduiena baino irregularragoa eta baxuagoa izan zen, absorbantzia 1,2ra heldu ez zelarik. Kultibo solidoetan ere hazkuntza arraroa eman zen eta horregatik, hazkuntza patroia desberdin horrek emaitzetan eraginik izan ez zezan, hortik aurrera ez zen andui horrekin gehiago lan egin.

4.2 Hazkuntzaren inhibizioa

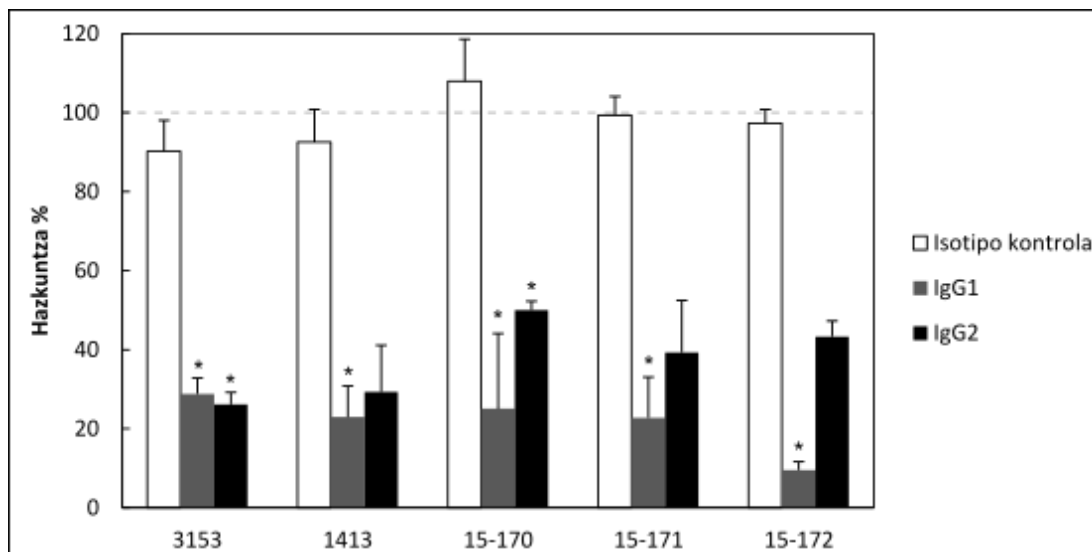
Bi esperimendu desberdin egin ziren; lehenengoan andui pare batekin baino ez zen lan egin eta antigorputzaren kontzentrazio tarte zabala erabili egin zen inhibizio maximoa lortzen zeneko anti-Adh1 kontzentrazio optimoa zehazteko; bigarreanean, kontzentrazio optimoa erabiliz lan egin zen andui gehiago frogatuz. Bigarren froga horretan, isotipo kontrola ere gehitu zen hazkuntzaren jaitsiera hori antigorputzaren espezifikotasurekin erlazionatuta zegoela konprobatzeko.



3 Irudia. *C. albicans* NCPF 3153 eta UPV 1413 anduien hazkuntza inhibizioaren esperimentua. Kontrol moduan antigorputzik gabeko *C. albicans* erabili zen; beste laginei antigorputzaren diluzio desberdinak gehitu zitzaizkien. (A) UPV 1413 IgG1, (B) UPV 1413 IgG2, (C) NCPF 3153 IgG1 eta (D) NCPF 3153 IgG2. (*) Estatistikoki adierazgarriak diren balioak.

Emaitzen arabera (**3 Irudia**), NCPF 3153 eta UPV 1413 anduietan, ondoaren hazkuntza antigorputz lehenengo bi kontzentrazioek (20 µg/mL eta 10 µg/mL) inhibitzen zuten gehien; batez ere 10 µg/mL kontzentrazioak zeinak %62 eta %97 bitarteko inhibizioa eragin zuen. Antigorputzak orokorrean joera berezia erakutsi zuen; behin hazkuntza minimoa lortuta, diluzio handiagoek ez zuten hazkuntzan eraginik eta kasu batzuetan (IgG1 isotipoarekin) kontrolean baino hazkuntza handiagoa eman zen. IgG1 eta IgG2 isotipoen emaitzak alderatuz gero, bien kontzentrazio inhibitzaile optimoa berdina izan zen. Aipatzekoa da, hala ere, IgG2 isotipoaren kasuan erabilitako kontzentrazio ia guztiek hazkuntzaren inhibizio estatistikoki esangarria eragin zutela aukeratutako bi anduietan.

Behin kontzentrazio optimoa zehaztuta (10 µg/mL), beste andui kliniko batzuk ere kontzentrazio horrekin frogatu ziren.



4 Irudia. Kontzentrazio optimoarekin egindako hazkuntza inhibizioaren froga. NCPF 3153, UPV 1413, UPV 15-170, UPV 15-171 eta UPV 15-172 anduiak frogatu egin ziren. Zuriz IgG1 isotipo kontrola agertzen da, grisez 10 µg/mL kontzentrazioa duen IgG1 antigorputzak eragindako inhibizioa eta beltzez 10 µg/mL kontzentrazioa duen IgG2 antigorputzak eragindakoa. Hazkuntzaren ehunekoak kontrolarekiko kalkulatu ziren. Marra etena kontrolari dagokio, %100. (*) Estatistikoki adierazgarriak diren balioak

Proba honetan inhibizioa antigorputzaren espezifikotasunaren ondorioa den jakiteko isotipo kontrol bat gehitu zen. **4 Irudian** agertzen den moduan, isotipoaren eta kontrolaren artean ez zen desberdintasun adierazgarririk eman; isotipoarekin hazkuntza ez zen modu esanguratsuan aldatu.

Emaitzak ikusita, orokorrean, anti-Adh1en IgG1 isotipoarekin IgG2arekin baino inhibizio handiagoa lortu zen, NCPF 3153 anduiaren kasuan izan ezik. Hala ere, errore estandarra kontuan hartuta desberdintasun horiek txikiak dira. Inhibizioaren adierazgarritasunari erreparatu gero, IgG1 isotipoaren kasuan guztiak izan ziren adierazgarriak, baina IgG2ren kasuan NCPF 3153 eta UPV 15-170 baino ez. Lortutako inhibizio guztiak %50 baino altuagoak izan ziren, hazkuntza txikiena UPV 15-172 anduia IgG1ekin inkubatzean lortu zelarik, zeinekin %90eko inhibizioa eman zen.

Andui guztien artean, NCPF 3153 eta UPV 1413 anduiak izan ziren bi isotipoek gehien eragin zituztenak; horregatik hortik aurrera esperimentuak egiteko bi andui hauek erabili egin ziren.

4.3 MIC, *minimum inhibitory concentration*

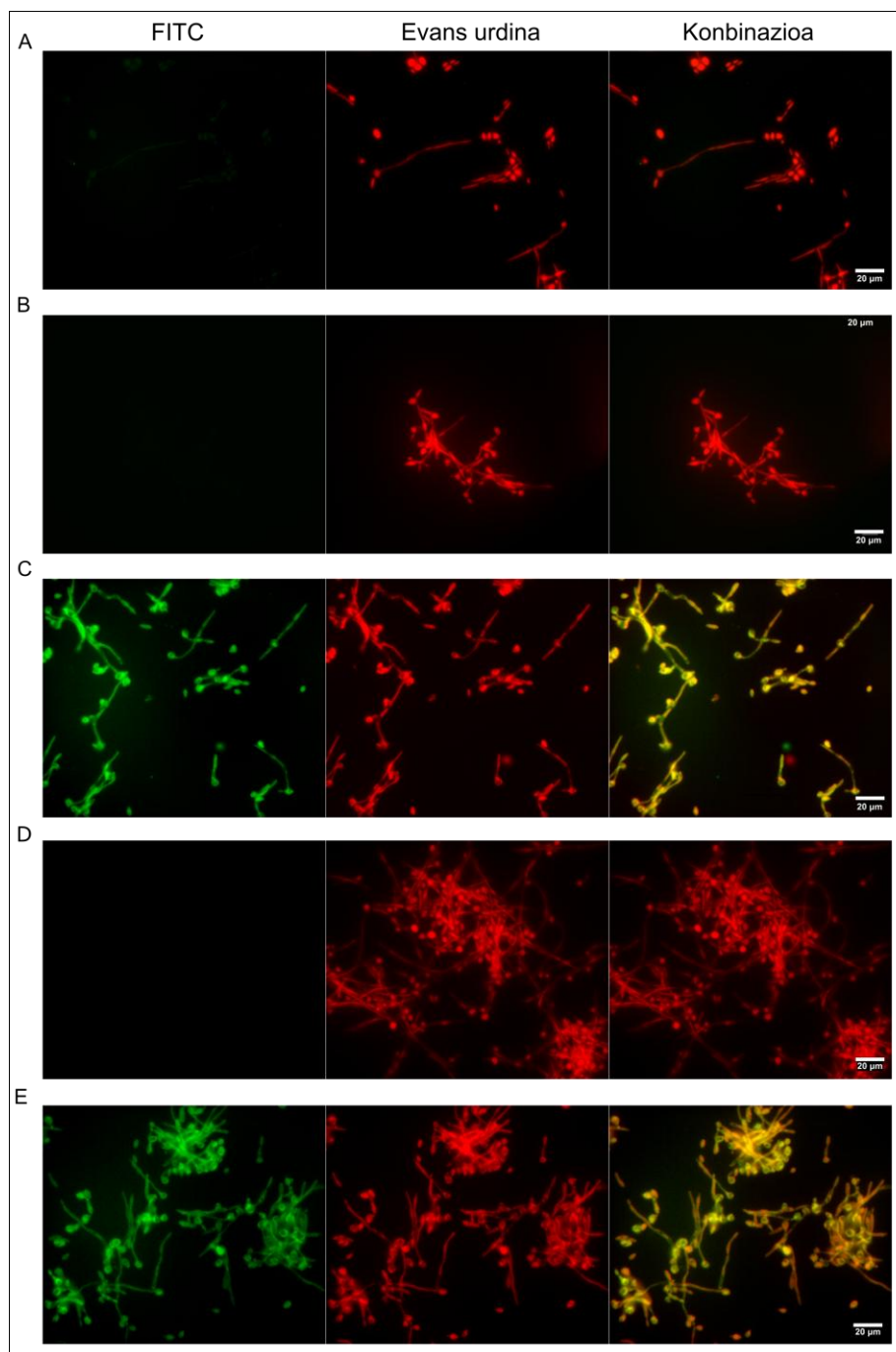
MICaren helburua anti-Adh1ak kandidiasia tratatzeko terapietan erabilitako antifungikoekin sinergia erlazorik duen aztertzea izan zen. Esan bezala, esperimentuak anfoterizina B eta flukonazol antifungikoekin egin ziren, baina soilik lehenengoarekin antzeman zen sinergia erlazio hori MIC balioa (kasu honetan hazkuntza %90ean murrizten zuen kontzentrazioa) 0,5 mg/L-tik 0,25 mg/L-ra jaitsi baitzen anti-Adh1 IgG1 antigorputzaren 1 ng/mL eta 20 µg/mL bitarteko kontzentrazioak anfoterizinarekin batera erabiltzean (**1 Taula**).

1 Taula. Anfoterizina B eta anti-adh1 IgG1 isotipoarekin egindako MIC froga. UPV 1413 anduia erabili zen. Inhibizio hiru tarte daude gris kolorearen intentsitatearen arabera sailkatuta; ilunetik argira %0-25 bitarteko inhibizioa, %25-70 bitartekoa eta %70-100 bitartekoa. Antigorputz kontzentrazio bakoitzarekin lortutako MIC balioari dagokion absorbantzia belztuta adierazita dago antigorputzaren kontzentrazio bakoitzean.

		Anfoterizina B (mg/L)									
		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
Anti-adh1 IgG1 (µg/mL)	0	0,142	0,102	0,103	0,106	0,107	0,106	0,636	1,014	1,152	1,275
	20	0,111	0,109	0,108	0,106	0,109	0,108	0,116	0,544	0,874	1,124
	10	0,109	0,107	0,104	0,109	0,108	0,108	0,133	0,714	1,026	1,050
	2	0,105	0,104	0,105	0,106	0,104	0,105	0,141	0,823	1,039	1,114
	1	0,103	0,103	0,102	0,105	0,106	0,105	0,140	0,849	1,028	0,981
	0,1	0,103	0,102	0,102	0,104	0,104	0,108	0,343	0,990	1,033	1,025
	0,01	0,096	0,099	0,102	0,105	0,103	0,109	0,731	1,017	1,018	1,072

4.4 IFI, *indirect immunofluorescence*

IFIaren bidez, antigorputzek ezagutzen duten *C. albicans* legamiaren atala detektatu daiteke eta antigorputz eta proteinaren arteko interakzioa hobeto deskribatu. Laginak sodio metaperiodatorekin ere tratatu ziren azaleko karbohidratoak kentzeko eta proteinen ezagutza errazteko.



5 Irudia. IFI irudiak. Fluoreszentzia mikroskopiaren bidez anti-Adh1 antigorputzaren eta UPV 1413 anduiaren arteko interakzioa aztertu zen. Ezkerretik eskumara, lehenengo argazkian antigorputzak ezagutzen duen lagina berdez (FITC-arekin) markatuta ikusten da, bigarreanean gorriz (Evans urdinarekin) markatuta non ondoaren zelula osoak ikusten diren eta azkenengoan aurreko bien gainjarpena azaltzen da. (A) Kontrol negatiboa; UPV 1413 anduia sodio metaperiodatorekin tratatu egin zen, baina ez zen anti-Adh1ekin inkubatu, (B) IgG1ekin tratatutakoa, (C) IgG1 eta sodio metaperiodatorekin tratatutakoa, (D) IgG2rekin tratatutakoa eta (E) IgG2 eta sodio metaperiodatorekin tratatutakoa.

Sodio metaperiodatoarekin tratatu gabeko laginetan ez zen detekzio espezifikorik ikusi, seinalea soilik argi gorriarekin ikusten zen. Sodio metaperiodatorekin tratatzean aldiz, paretako karbohidratoak kendu egin ziren eta antigorputza paretara lotu zen seinalea igorri zelarik. Bi isotipoekin emaitzak berdinak izan ziren. NCPF 3153rekin emaitzak berdintsuak lortu ziren (ikusi 1 Eranskina).

5. EZTABAIDA

Candida albicans legamia gaixotasun-espektrora zabala sortzeko gai da, azal eta mukosa infekzioak eta kandidiasia (infekzio sistemikoa) kasu. Izan ere, onddo hau hesi naturalak kaltetuak daudenean edota indibiduo immunosuprimituengan gaixotasun hilgarriak sortzeko gai da (Gow *et al.*, 2012).

Komentsalismo eta patogenesi prozesuetarako ostalariaren ehunekin atxikimendua ezinbesteko urratsa da zeinetan zelula-paretak funtzio garrantzitsua betetzen duen (Coleman *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2015). Alkohol deshidrogenasa (Adh1) onddoaren azalean kokatuta dagoen proteina da zeinak etanolaren metabolismoan parte hartzen duen. Katalizatzen duen erreazioetako bat azetaldehidoaren ekoizpena da (Tillonen *et al.*, 1999). Aurretik egindako ikerketa askok baieztatzen duten moduan, azetaldehidoa minbiziaren sorreran arrisku faktore garrantzitsuenetarikoa da, ehunak kaltetu eta tumoreen garapena errazten dituelako (Ramírez-García *et al.*, 2016).

Antifungikoen erabilerak dakartzan arazoak direla eta, erresistentzia eta toxizitatea nagusiki, azken hamarkadan tratamendu alternatiboen inguruan ikertzen ari da, antigorputzak irtenbide posibleen artean aurkitzen direlarik (Bugli *et al.*, 2013). Lan honetan, *C. albicans*-en aurkako antigorputzetan oinarritutako tratamendu bat topatzeko helburuarekin, anti-Adh1 antigorputz monoklonalak onddoaren bideragarritasunean duen eragina aztertu egin da. Horretarako, hainbat froga burutu dira; hala nola, hazkuntzaren inhibizioa, hazkuntza kurbak, MIC eta IFI.

Ikerketan egindako lehenengo froga hazkuntzaren inhibizioaren aztertzea izan zen. Horretarako, hazkuntza kurbak egin ziren antigorputzarekin eta antigorputzik gabe. Kasu honetan, anti-Adh1 MAb-ren IgG1 isotipoarekin eta NCPF 3153 anduiarekin baino ez zen hazkuntzaren jaitsiera nabaritu; erabilitako beste andui klinikoetan

antigorputzak ez zuen eraginik izan. Kasu honetan erabilitako medioa aberatsa zen, *Candida* hazi eta ugaltzea baimentzen zuena. Beraz, antigorputzak duen inhibizio ahalmena *C. albicans*-ek duen hazkuntzarako gaitasuna baino txikiagoa dela ondorioztatu daiteke. Horregatik nahiz eta antigorputzak efekturen bat izan, hau *Candidaren* hazkuntzagatik maskaratua geratzen da. Ziur aski, metodo honekin aurkitu ditugun arazoek literaturan hazkuntza kurben metodologiak daukan erabilera eskasa azaldu dezakete. Hala ere, esan beharra dago ikerketa batzuetan nahiz eta *in vitro* emaitza positiborik ez izan, *in vivo* antigorputzaren eragin inhibitzailea aztertu egin dela (Xin *et al.*, 2011). Gerta daiteke *in vivo* kasuetan immunitate-sistemak parte hartzen duenez antigorputzaren eragina faboratua egotea eta horregatik lortutako inhibizioa handiagoa izatea.

Hazkuntza kurbetan ez bezala, hazkuntzaren inhibizio probetan antigorputzaren eragina nabaritu egin zen. Antigorputzak inhibizio patroia berezia dauka eta kontzentrazio optimotik aldentzerakoan inhibizioa murriztu egiten da. Antzaenez, kontzentrazio txikienetan antigorputza diluituegia dago, ez da efektua sortu ahal izateko nahikoa eta kontzentrazio handiagoenetan aldiz, antigorputzen arteko agregatuak sortu egiten dira efektua galtzen delarik. Patroi hau antigorputzak erabilitako kasu gehiagotan errepikatzen da (Quadros *et al.*, 2010).

Andui klinikoak frogatzerakoan, inhibiziorik handiena UPV 15-172 anduiarekin lortu zen (%90) eta orokorrean %50 baino inhibizio altuagoak lortu ziren, %80 batezbestez. IgG1 eta IgG2 isotipoak alderatuz gero, lehenengoarekin inhibizio altuagoa lortu egin zen. Kasu honetan erabilitako dosia 10 µg/mL izan zen *C. albicans* 1.5 x 10³ zel/mL-ko. Lortutako inhibizioa beste ikerketa batzuetan lortutakoaren antzekoa da, baina kasu honetan erabilitako dosia 10 aldiz txikiagoa izan zen (Torosantucci *et al.*, 2009). Proba honetan, gainera isotipo kontrola erabili zen ezagutzaren espezifikotasuna zehazteko balio izan duena. Antigorputzen artean 5 isotipo desberdin daude: IgA, IgD, IgE, IgG eta IgM. Guk IgG isotipoa erabili genuen zeinak 4 azpiklase dituen: IgG1, IgG2, IgG3 eta IgG4; horietatik IgG1 eta IgG2 izan dira hautatuak. Bi isotipo horiek alkohol deshidrogenasarekiko espezifikoak dira. Isotipo kontrolarekin inhibizio adierazgarririk eman ezenez anti-Adh1 antigorputz monoklonalaren eragina espezifikoa dela ziurtatu daiteke.

MIC frogarako erabilitako UPV 1413 anduiak anfoterizina B-rekiko tarteko sentikortasuna du, antifungiko honek ez baitu EUCAS tek zehaztutako kontzentrazio guztietan hazkuntza %90ean inhibitzen. Eragin sinergikoa interesgarria da anti-Adh1 MAb 10 µg/mL eta 20 µg/mL kontzentrazioek anfoterizinaren dosia erdira (0,5 mg/L-tik 0,25 mg/L-ra) murriztea lortu zutelako. Lortutako dosi murrizketa hau oso garrantzitsua da antifungikoek daukaten toxizitatea kontuan hartuz gero. Hala ere, bibliografian deskribatuta dauden beste antigorputz batzuekin alderatura, emandako dosiaren murrizketa ez da oso altua. Adibidez, Mycograb antigorputzaren kasuan anfoterizina dosia 33 aldiz murriztu egin zen (Matthews *et al.*, 2003) antigorputz kontzentrazio antzekoa erabiliz (8 µg/mL). Benetan efektu sinergikorik ematen den zehazteko, antifungikoarekiko erresistentea den andui bat erabiltzea komeniko litzateke. Izan ere, *C. albicans* espeziea anfoterizina B antifungikoaren kasuan sentikor kontsideratzen da MIC balioa 1 mg/L baino txikiagoa baldin bada (Espinell-Ingroff *et al.*, 2015), gure kasuan gertatzen den moduan. Hala ere, beharrezkoa da *in vivo* frogak egitea kasu batzuetan lortutako emaitzak desberdinak direlako; nahiz eta *in vitro* efektu sinergikorik eta inhibiziorik ez ikusi *in vivo* antigorputzaren eragina nabaria izan da (Matthews *et al.*, 2003).

IFI froga burutzean antigorputzak ezagutzen duen *C. albicans*-en atala zehaztu zen. Sodio metaperiodatorekin tratamendua egin zen paretako karbohidratoak kendu eta hauek ezagupenean eraginik zuten aztertzeke. Kontrol negatiboan lagina sodio metaperiodatorekin tratatu egin zen, baina ez zuen anti-Adh1 MAb-rekin inkubaziorik izan.

Karbohidratoak kentzeko tratamendurik izan ez duten laginetan ez da FITC seinalerik igorri; horrek esan nahi du kasu horietan antigorputzak ez duela onddoa ezta molekularik ezagutu; sodio metaperiodatorekin tratatzean aldiz, seinalea agertu egiten da. Horrek suposatzen du Adh1 proteina eskuragarriago dagoela karbohidratorik ez dagoenean. Pentsa liteke proteina glikosilatuta dagoela eta lotuta dituen karbohidratoek ezagupena oztopatu egiten dutela. Adh1 *C. albicans*-en frakzio manoproteikoan topatu izanak (Ramírez-García *et al.*, 2011) glikosilatuta dagoen hipotesia indartu egiten du. Hala ere, analisi bioinformatikoak burutu egin direnean ez da glikosilazio seinalerik topatu; hau da, geneak ez du glikosilatua izateko sekuentziarik. Azalpen posibleetako bat Adh1 proteina manoproteina bati lotuta

purifikatu izana da; hau da, Concavalina Arekin afinitate kromatografia burutzean manoproteinak lortzeaz gain hauetara lotuta zeuden beste proteinak batzuk ere erauzi izana (Ramírez-García *et al.*, 2011). Beraz, litekeena da Adh1 proteina berez glikosilaturik ez egotea, baina zelula-azalean kokatuta dagoenez zelula-paretako beste proteinen karbohidratoek estaltzea; horregatik karbohidratoen presentzian antigorputzak ez du ezagutzen eta sodio metaperiodatorekin tratatu ostean ordea, bai. Proteinaren kokapenari dagokionez, onddoaren forma guztietan agertzen da antigorputzak bai hifa zein legamietan ezagutzen duelako Adh1. Hainbat ikerketen arabera alkohol deshidrogenasa proteina zelula-azalean, legamien zelula-paretan, hifen zelula paretan eta gune estrazelularrean kokatuta dago (Klotz *et al.*, 2001; Pitarch *et al.*, 2002; Crowe *et al.*, 2003; Gil-Bona *et al.*, 2015).

6. ONDORIOAK

Lan honetan anti-Adh1 antigorputz monoklonalak *Candida albicans* onddoaren bideragarritasunean duen eragina aztertu izan da. Antigorputz honek onddoaren garapen eta patogenesirako garrantzitsua den Adh1 proteina ezagutzen du.

Erabilitako antigorputza hazkuntza inhibitzeko eraginkorra da. Hazkuntza kurbetan efektu garrantzitsurik ikusi ez arren, beste metodologia baten bidez, zeinetan legamia medioan jarri baino lehen antigorputzarekin PBSan inkubatzen den, mikroorganismoaren hazkuntza %50 baino gehiago inhibitzen zen. Horrez gain, anfoterizina B antifungikoarekin erlazio sinergikoa duela frogatu da kontzentrazio minimo inhibitzailea erdira jaitsiz.

Antigorputzaren ezagupenari dagokionez, hifa eta konidioetara lotu egiten da beraz, Adh1 proteina onddoaren bi formetan agertu egiten da. Horrez gain, seinalea soilik karbohidratoak kentzeko tratamenduarekin igortzen zela eta proteina paretako manoproteinekin batera purifikatu zela kontuan hartuta, Adh1 paretaren alde sakonenean kokatuta dagoela ondoriozta daiteke.

Hau guztia kontuan hartuz, argi dago etorkizunean gehiago sakondu egin beharko dela, batez ere, *in vivo* frogak burutzean antigorputzak immunitate-sistema osoko osagaiekin batera duen eragina aztertzeko. Hala eta guztiz ere, lan honetan egindako probak antigorputza agente terapeutiko moduan erabili ahal izateko lehenengo

urratsak dira, eta lortutako emaitzak hurrengo urteetan ikerketa-lerro hau aurrera eramateko itxaropentsuak dira.

7. BIBLIOGRAFIA

Bertram, G., Swoboda, R.K., Gooday, G.W., Gow, N.A., Brown, A.J. 1996. Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast*. 12: 115-127

Bliss, J.M., Sullivan, M.A., Malone, J., Haidaris, C.G. 2003. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using recombinant human antibody single-chain variable fragments specific for hyphae. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1152-1160

Böheme, A., Ruhnke, M., Buchheidt, D., Cornely, O.A., Einsele, H., Enzensberger, R., Hebart, H., Heinz, W., Junghanss, C., Karthaus, M., Krüger, W., Kruq, U., Kubin, T., Pencak, O., Reichert, D., Reuter, S., Silling, G., Südhoff, T., Ullmann, A.J., Maschmeyer, G. 2009. Treatment of invasive fungal infections in cancer patients-recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann. Hematol.* 88: 97-110

Bugli, F., Cacaci, M., Martini, C., Torelli, R., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Sterbini, F.P. 2013. Human monoclonal antibody-based therapy in treatment of invasive candidiasis. *Clin. Dev. Immunol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/403121>

Coleman, D.A., Oh, S., Zhao, X., Zhao, H., Hutchins, J.T., Vernachio, J.H., Patti, J.M., Hoyer, L.L. 2009. Monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als3 that immunolabel fungal cells in vitro and in vivo and block adhesion to host surfaces. *J. Microbio. Meth.* 78: 71-78.

Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A., Booth, N.A. 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 47: 1637-1651

Elguezabal, N., Maza, J.L., Moragues, M.D., Ponton, J. 2009. Monoclonal antibody-mediated inhibition of adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human epithelial cells. *Eur. J. Oral Sci.* 117: 474-478

Espinel-Ingroff, A., Alvarez-Fernandez, M., Cantón, E., Carver, P.L., Chen, S.C., Eschenauer, G., Getsinger, D.L., Gonzalez, G.M., Govender, N.P., Grancini, A., Hanson, K.E., Kidd, S.E., Klinker, K., Kubin, C.J., Kus, J.V., Lockhart, S.R., Meletiadis, J., Morris, A.J., Pelaez, T., Quindós, G., Rodriguez-Iglesias, M., Sánchez-Reus, F., Shoham, S., Wengenack, N.L., Borrell Solé, N., Echeverria, J., Esperalba, J., Gómez-G de la Pedrosa, E., García García, I., Linares, M.J., Marco, F., Merino, P., Pemán, J., Pérez Del Molino, L., Roselló Mayans, E., Rubio Calvo, C., Ruiz Pérez de Pipaon, M., Yagüe, G., Garcia-Effron, G., Guinea, J., Perlin, D.S., Sanguinetti, M., Shields, R., Turnidge, J. 2015. Multicenter study of epidemiological cutoff values and detection of resistance in *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin using the Sensititre YeastOne colorimetric method. *Antimicrobiob. Agents Chemother.* 59: 6725-6732

Gainza-Cirauqui, M.L., Nieminen, M.T., Frazer, L.N., Aguirre-Urizar, J.M., Moragues, M.D., Rautemaa, R. 2013. Production of carcinogenic acetaldehyde by *Candida albicans* from patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *J. Oral Pathol. Med.* 42: 243-249

Gil-Bona, A., Parra-Giraldo, C.M., Hernáez, M.L., Reales-Calderon, J.A., Solis, N.V., Filler, S.G., Monteoliva, L., Gil, C. 2015. *Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction. *J. Proteomics.* 127: 340-351

Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., Netea, M.G. 2012. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 112-122

Han, Y. 2010. Efficacy of combination immunotherapy of IgM MAb B6.1 and amphotericin B against disseminated candidiasis. *Int. Immunopharmacol.* 10: 1526-1531

Homann, N., Tillonen, J., Meurman, J.H., Rintamäki, H., Lindqvist, C., Rautio, M., Jouusimies-Somer, H., Salaspuro, M. 2000. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis.* 21: 663-668

- Klotz, S.A., Pendrak, M.L., Hein, R.C. 2001. Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase. *Microbiology*. 147: 3159-3164
- Krogh, P. 1990. The role of yeasts in oral cancer by means of endogenous nitrosation. *Acta. Odontol. Scand.* 48: 85-88
- Krogh, P., Hald, B., Holmstrup, P. 1987a. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis*. 8: 1543-1548
- Krogh, P., Holmstrup, P., Thorn, J.J., Vedtofte, P., Pindborg, J.J. 1987b. Yeast species and biotypes associated with oral leukoplakia and lichen planus. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral Pathol.* 63: 48-54
- Lalla, R.V., Latortue, M.C., Hong, C.H., Ariyawardana, A., D'Amato-Palumbo, S., Fischer, D.J., Martof, A., Nicolatou-Galitis, O., Patton, L.L., Elting, L.S., Spijkervet, F.K., Brennan, M.T. 2010. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support. Care Cancer*. 18: 985-992
- Matsuda, K., Sakaguchi, K., Kobayashi, S., Tominaga, M., Hirayama, K., Kadosawa, T., Taniyama, H. 2009. Systemic candidiasis and mesenteric mast cell tumor with multiple metastases in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 229-232
- Matthews, R.C., Rigg, G., Hodgetts, S., Carter, T., Chapman, C., Gregory, C., Illidge, C., Burnie, J. 2003. Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 47: 2208-2216
- Mishra, N.N., Ali, S., Shukla, P.K. 2015. A monoclonal antibody against 47.2 kDa cell surface antigen prevents adherence and affects biofilm formation of *Candida albicans*. *World J. Microb. Biot.* 31: 11-21.
- Mukherjee, P.K., Mohamed, S., Chandra, J., Kuhn, D., Liu, S., Antar, O.S., Munyon, R., Mitchell, A.P., Andes, D., Chance, M.R., Rouabhia, M., Ghannoum, M.A. 2006. Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infect. Immun.* 74: 3804-16

- Norgaard, M., Thomsen, R.W., Farkas, D.K., Mogensen, M.F., Sorensen, H.T. 2013. *Candida* infection and cancer risk: a Danish nationwide cohort study. *Eur. J. Intern. Med.* 24: 451-455
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 133-163
- Pitarch, A., Diez-Orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sanchez, M., Gil, C., Nombela, C. 2001. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics.* 1: 550-559
- Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., Gil, C. 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell. Proteomics.* 1: 967-982
- Quadros, E.V., Nakayama, Y., Sequeira, J.M. 2010. Targeted delivery of saporin toxin by monoclonal antibody to the transcobalamin receptor, TCbLR/CD320. *Mol. Cancer Ther.* 9: 3033-3040.
- Ramírez-García, A., Arteta, B., Abad-Diaz-de-Cerio, A., Pellon, A., Antoran, A., Marquez, J., Rementeria, A., Hernando, F.L. 2013. *Candida albicans* increases tumor cell adhesion to endothelial cells in vitro: intraspecific differences and importance of the mannose receptor. *PLoS One.* 8: e53584. doi:10.1371/journal.pone.0053584
- Ramírez-García, A., Gallot, N., Abad, A., Mendoza, L., Rementeria, A., Hernando, F.L. 2011. Molecular fractionation and characterization of a *Candida albicans* fraction that increases tumor cell adhesion to hepatic endothelium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 133-145
- Ramírez-García, A., Rementeria, A., Aguirre-Urizar, J.M., Moragues, M.D., Antoran, A., Pellon, A., Abad-Diaz-de-Cerio, A., Hernando, F.L. 2016. *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? *Crit. Rev. Microbiol.* 42: 181-193
- Shen, H.D., Choo, K.B., Lee, H.H., Hsieh, J.C., Lin, W.L., Lee, W.R., Han, S.H. 1991. The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase:

molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Allergy*. 21: 675-681

Swoboda, R.K., Bertram, G., Delbruck, S., Ernst, J.F., Gow, N.A., Gooday, G.W., Brown, A.J. 1994. Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. *Mol. Microbiol.* 13: 663-672

Tillonen, J., Homann, N., Rautio, M., Housimies-Somer, H., Salaspuro, M. 1999. Role of yeast in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23: 1409-1415

Torosantucci, A., Chiani, P., Bromuro, C., De Bernardis, F., Palma, A.S., Liu, Y., Mignogna, G., Maras, B., Colone, M., Stringaro, A., Zamboni, S., Feizi, T., Cassona, A. 2009. Protection by anti- β -glucan antibodies is associated with restricted β -1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One*. 4: e5392. doi:10.1371/journal.pone.0005392

Wang, Z., Zhang, G., Zhang, X., Wu, S., Yin, X., Zhang, H. 2012. Proteomic analysis of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6: 1226-30

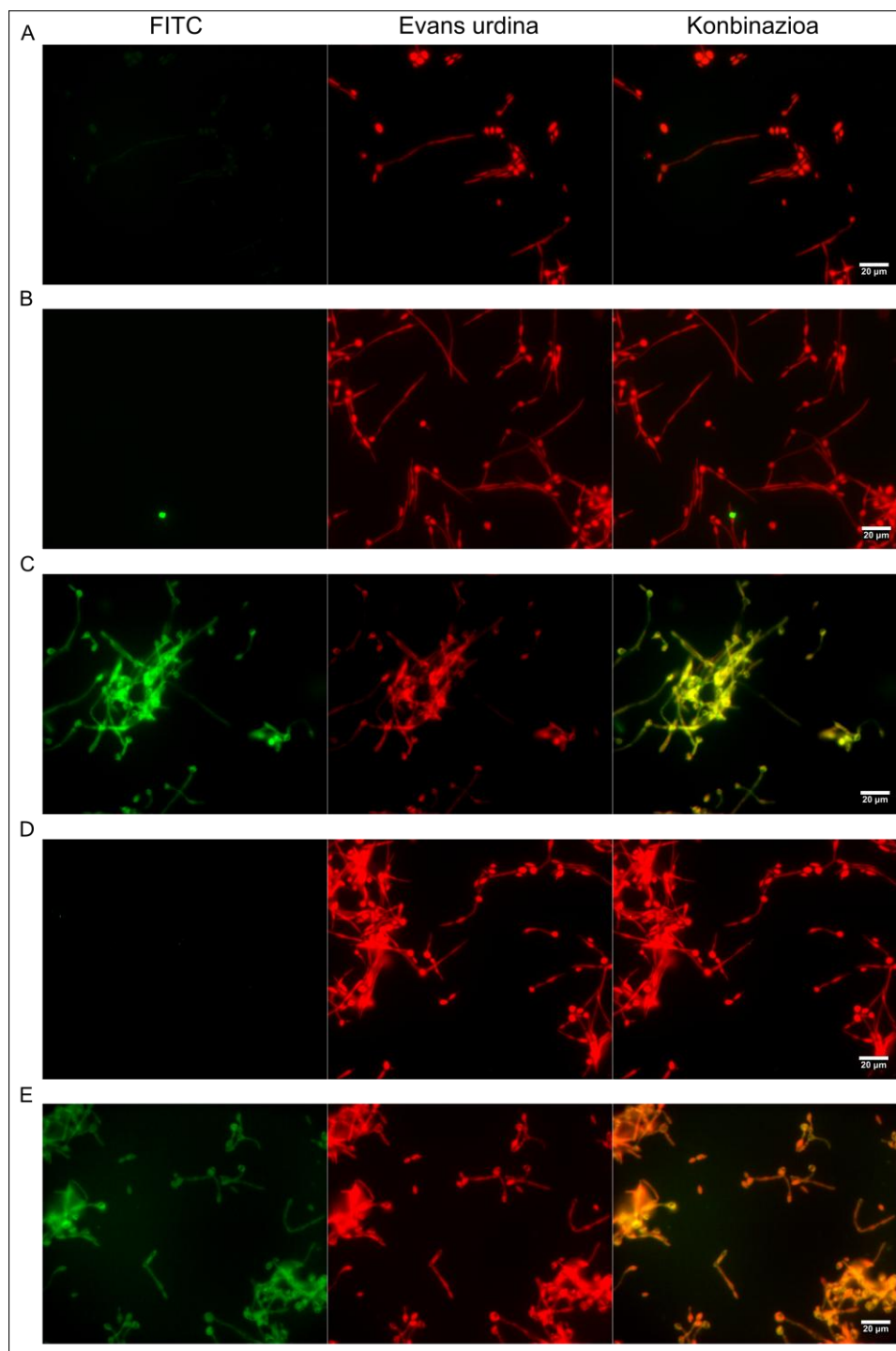
Williams, DW., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., Lewis, MA. 2011. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol.* 55: 250–265.

Xin, H., Cutler, J.E. 2011. Vaccine and monoclonal antibody that enhance mouse resistance to candidiasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 18: 1656-1667

Zirker, J., Klinker, H., Kuhn, A., Abele-Horn, M., Tappe, D., Turnwald D., Einsele, H., Heinz, W.J. 2012. Epidemiology of *Candida* blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors. *Med. Mycol.* 50: 50-55

Arnaud, M.B., Inglis, D.O., Skrzypek, M.S., Binkley, J., Shah, P., Wymore, F., Binkley, G., Miyasato, S.R., Simison, M., Sherlock, G. "Candida Genome Database" <http://www.candidagenome.org/>

I ERANSKINA



1 Irudia. IFI irudiak. Fluoreszentzia mikroskopiaren bidez anti-Adh1 antigorputzaren eta NCPF 3153 anduiaren arteko interakzioa aztertu zen. Ezkerretik eskumara, lehenengo argazkian antigorputzak ezagutzen duen lagina berdez (FITC-arekin) markatuta ikusten da, bigarrean gorritz (Evans urdinarekin) markatuta non ondoaren zelula osoak ikusten diren eta azkenengoan aurreko bien gainjarpena azaltzen da. (A) Kontrol negatiboa; NCPF 3153 anduia sodio metaperiodatorekin tratatu egin zen, baina ez zen anti-Adh1ekin inkubatu, (B) IgG1ekin tratatutakoa, (C) IgG2rekin tratatutakoa, (D) IgG1 eta sodio metaperiodatorekin tratatutakoa eta (E) IgG2 eta sodio metaperiodatorekin tratatutakoa.