



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**Acción de Validamicina A y los Antifúngicos de Uso
Clínico, Micafungina y Anfotericina B, sobre
*Candida albicans***

D. José Pedro Guirao Abad

2016



UNIVERSIDAD DE MURCIA

M^a Concepción Martínez-Esparza Alvargonzález, Profesora Titular de Inmunología de la Universidad de Murcia y **Juan Carlos Argüelles Ordóñez**, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Murcia.

CERTIFICAN: Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: "*Acción de la validamicina A y los antifúngicos de uso clínico, micafungina y anfotericina B, sobre Candida albicans*", que presenta el Licenciado en Bioquímica por la Universidad de Murcia **D. José Pedro Guirao Abad** para optar al Título de Doctor, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo nuestra dirección. Los contenidos relativos a Microbiología y Quimioterapia antifúngica se han llevado a cabo en los laboratorios del Área de Microbiología de la Facultad de Biología, mientras los contenidos relativos a Inmunología se han llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (B) de la Facultad de Medicina en la Universidad de Murcia.

Una vez examinado su contenido, consideramos que la Memoria cumple con los criterios de rigor y calidad científica exigibles. Por tanto, autorizamos su presentación y defensa públicas ante el Tribunal correspondiente.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente certificación.

Murcia a 27 de Enero de 2016.

Fdo. María Martínez-Esparza Alvargonzález

Fdo. Juan Carlos Argüelles Ordóñez

Parte de los resultados contenidos en la presente Memoria, han sido objeto de las siguientes publicaciones científicas especializadas:

1. **Guirao-Abad, J. P.**, Sánchez-Fresneda, R., Valentín, E., Martínez-Esparza, M. y Argüelles, J.-C. (2013). **Analysis of validamycin as a potential antifungal compound against *Candida albicans***. *Int Microbiol* **16**, 217–25.
2. **Guirao-Abad, J. P.**, González-Párraga, P. y Argüelles, J.-C. (2015). **Strong correlation between the antifungal effect of amphotericin B and its inhibitory action on germ-tube formation in a *Candida albicans* URA⁺ strain**. *Int Microbiol* **18**, 25–31.
3. **Guirao-Abad, J.P. et al.**, (2016). **Differential contribution of ROS production to the fungicidal action of amphotericin B and micafungin in *Candida albicans***. En preparación.

El trabajo experimental ha sido financiado, en parte, con cargo a los siguientes proyectos:

11926/PI/09. Fundación Séneca, Comunidad de Murcia.

PI12/01797. Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III.

Igualmente, deseamos manifestar nuestro agradecimiento al contrato de colaboración tecnológica (referencia 8190) con la empresa CESPAS, S.A y a VitalGaia S.A.

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento esperado de poder agradecer todo el apoyo recibido durante estos años de trabajo y esfuerzo. Y es que han sido muchas las personas que han influido de forma tanto directa como indirecta en mi día a día, ayudándome a completar este trabajo.

*Agradecer ante todo a mis directores, los **Dres. Juan Carlos Argüelles** y **María Martínez-Esparza**. Ellos me han enseñado y ayudado durante estos años que ha durado mi labor predoctoral. Es para mí un privilegio el poder formar parte de su grupo de investigación. Muchísimas gracias Juan Carlos por tu labor, preocupación y por haberme dado esta oportunidad. En un principio, yo no tenía pensado adentrarme en este mundo y, gracias a ti, me decidí a probar y seguir adelante con la investigación.*

*A mis compañeros de laboratorio o, más bien, a mis amigos de laboratorio: la **Dra. Ruth Sánchez-Fresneda**, mi maestra al principio, mi compañera y amiga después. Gracias por tu ayuda, tu paciencia y tus consejos tanto en lo profesional como en lo personal. A **Mar Collado**, ¿quién me iba a decir que echaría de menos tus protocolos infinitos? Cuantas horas de trabajo y cuantas risas acompañándolas. Así da gusto trabajar. A **Eloy Almenar**, no sabía que era posible en tan poco tiempo encontrar a un gran amigo. Ojalá todas las incorporaciones que tenga este grupo sean tan buenas como lo fue la tuya. A **Begoña Alburquerque**, mi compañera de carrera y ahora de laboratorio. Qué bien se trabaja contigo y qué buenos ratos pasamos durante las largas horas de trabajo. Nos alegras los días con tu presencia. A **Alejandra Argüelles**, la chica multiusos que lo domina todo. Como disfruto de las pullas que nos tiramos, las risas que nos echamos y las discusiones sobre los experimentos a realizar que tenemos. Sinceramente, no podía tener mejores compañeros.*

*A mis amigos, vecinos de departamento y compañeros de comidas: **Aranza, Dani, Diego, Silvia** (la gitánilla), **Elena, Maribel, Carlos, Jesús** (El Hombre Nature), **Pepe, Sergio, Pablo, Juanma, Loles** y, otra vez más, **Begoña**. Espero que sigamos yendo de cervezas, tapas, rutas, playa..., y jugando al fútbol. Muchísimas gracias porque me alegráis los días que paso en Murcia. Espero que nuestra amistad dure muchos años.*

*A mis compañeros de piso y amigos: **Ginés, Trung, David, Carlos, Alejandro, Owen** y **Fran**. Da gusto volver de trabajo y poder descansar, reír y hablar con vosotros.*

*A **Nines, Fran Hernández** y **Laura Grau**. Sois un auténtico apoyo para mí y admiro vuestra forma de ser, vuestra personalidad. No conozco mejores personas y os deseo lo mejor. Muchísimas gracias, de verdad.*

*A mis amigos de Cartagena (los de toda la vida): **Ana Cánovas, Aída, Patri, Egea, Esther Santi, Elena, Mawy, Leni, Mabel, David, Sergio, Andrés, José** y **Carol**. Porque siempre estáis ahí para lo bueno y para lo malo.*

*A los miembros del grupo de Whatsapp, **Afterwork: Alberto Fuentes, Fran, Mapi, María Ángeles Bonmatí, Samuel, Tere, Alberto Martínez, Ginés** y **Ana Arroyo**. Gracias por esas noches de cervezas y debate, y en especial a aquellos que me han acompañado más de cerca en este camino. He aprendido mucho de vosotros.*

*Gracias a los **Dres. José Hernández, Óscar Zaragoza y José Tudela** por su ayuda y asesoramiento. Gracias a la **Dra. Pilar González-Párraga** por aconsejarme y revisar esta Memoria.*

Gracias a los miembros del tribunal por leer esta Tesis y, en particular, a todos aquellos que no he mencionado, pero que de una forma u otra han participado en su elaboración.

*Y para finalizar, los más importantes. Los que me han ayudado día a día, han sido mi principal sustento y a los que quiero con toda mi alma. Gracias a mi padre, **Pedro José Guirao Marco**, a mi madre, **María Benilde Abad Martínez**, y a mi hermana, **Carmen María Guirao Abad**. Sin ellos este trabajo no habría sido posible. Gracias por vuestro cariño. Sois la mejor familia que se puede tener y me siento orgulloso de formar parte de vosotros.*

También gracias a mis abuelos y al resto de mi familia. Os llevo siempre en el corazón.

Me siento realmente afortunado y orgulloso de haberme adentrado en este camino viaje que tantas cosas buenas me ha aportado, que tantos buenos amigos me ha regalado. Gracias a todos porque voy con la confianza y entusiasmo que necesito para seguir adelante con mi camino.

*José Pedro Guirao Abad
31 de Enero de 2016*

A mis padres

*"No hay nada noble en ser superior a los demás.
La verdadera nobleza consiste en ser superior a tu antiguo yo"*
Ernest Hemingway

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Importancia actual de las micosis.....	7
1.2. Características del género <i>Candida</i>	8
1.2.1. Epidemiología.....	9
1.3. Biología general de <i>C. albicans</i>	11
1.3.1. Importancia clínica.....	13
1.3.2. Factores de riesgo	13
1.3.3. Factores de virulencia.....	14
✓ Adhesión celular y formación de biopelículas	14
✓ Secreción de enzimas hidrolíticas	16
✓ Composición de la pared celular.....	17
✓ Polimorfismo.....	19
1.4. Terapia antifúngica.....	21
1.4.1. Polienos.....	21
1.4.2. Equinocandinas	24
1.4.3. Azoles	26
1.4.4. Otros antifúngicos	27
1.5. Estrés en levaduras.....	29
1.5.1 Sistemas antioxidantes de defensa	32
✓ Catalasa.....	32
✓ Superóxido dismutasa	33
✓ Glutatión reductasa	34
1.7. La trehalosa: función y metabolismo.....	35
✓ Función protectora de la trehalosa frente a estrés	37
✓ La trehalosa como reserva energética	38
1.7.1. Biosíntesis.....	38
1.7.2. Hidrólisis.....	40
1.8. Inhibidores de las trehalasas fúngicas	41
1.9. Respuesta inmunitaria frente a infecciones	45
1.9.1. Monocitos y macrófagos.	46
1.9.2 Detección de las levaduras por las células del hospedador	47
1.9.3. Citoquinas	49
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1. Cepas de <i>C. albicans</i> , medios de cultivo y antifúngicos empleados.....	57
3.2. Cultivos primarios y líneas celulares humanas. Condiciones de cultivo.....	58
3.2.1. Cultivos primarios de macrófagos humanos de individuos sanos	58
✓ Obtención de macrófagos peritoneales	58
✓ Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM) de sangre periférica	59
✓ Condiciones de cultivo.....	59

✓ Determinación de la pureza de la muestra	60
3.2.2. Línea celular THP-1.....	61
3.3. Medida del crecimiento microbiano.....	62
3.3.1. Turbidimetría	62
3.3.2. Peso húmedo	63
3.3.3. Recuentos celulares	63
3.4. Tratamientos de estrés: viabilidad y sensibilidad.....	64
3.4.1. Ensayo de viabilidad	64
3.4.2. Ensayo de sensibilidad: formación de macrocolonias.....	64
3.5. Obtención de extractos celulares.....	65
3.6. Determinación colorimétrica de proteína	66
3.7. Ensayos enzimáticos	67
3.7.1. Determinación de la actividad catalasa (E.C.1.11.1.6).....	67
3.7.2. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR)	68
(E.C. 1.6.4.2).....	68
3.7.3. Determinación de las actividades superóxido dismutasa (SOD) (E.C.1.15.1.1)	69
3.7.4. Determinación de las actividades hidrolíticas de trehalosa: Trehalosas (E.C.3.2.1.28)....	70
3.8. Valoración analítica de glucosa: método de glucosa-oxidasa-peroxidasa	70
3.9. Determinación de la trehalosa endógena	72
3.10. Inducción de la transición dimórfica levadura-micelio	73
3.10.1. Medio líquido.....	73
3.10.2. Medio sólido	73
3.11. Determinación de las CMIs.....	74
3.12. Determinación de ROS y necrosis celular	76
3.13. Microscopia electrónica de transferencia.....	77
3.14. Estimulación de macrófagos por <i>C. albicans</i> y detección de citoquinas.....	77
3.14.1. Estimulación de macrófagos	77
3.14.2. Determinación de citoquinas mediante ELISA	77
3.15. Captura de imágenes	79
3.16. Soporte bioinformático, representación gráfica de los resultados y tratamiento estadístico de los datos	79
3.16.1. Análisis estadístico de los datos.....	80
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
A. ANÁLISIS DE LA VALIDAMICINA A COMO COMPUESTO ANTIFÚNGICO EN <i>C. albicans</i>	83
A.1. Efecto de Val. A sobre la cepa CAI-4 de <i>C. albicans</i>. Determinación de la CMI₅₀ y CMI₉₀.	85
A.2. Efecto de Val. A sobre la actividad Atc1p de <i>C. albicans</i>	88

A.3. Respuesta de la cepa CAI-4 de <i>C. albicans</i> a Val. A	89
A.3.1. Efecto de Val. A sobre el crecimiento, la sensibilidad en placa y la viabilidad celular de la cepa CAI-4 de <i>C. albicans</i>	89
A.3.2. Contenido de trehalosa intracelular en respuesta a la presencia de Val. A	92
A.4. Estudio comparativo de la acción antifúngica causada por Val. A y AmB en <i>C. albicans</i>: análisis fenotípico de la cepa CAI-4 y el mutante <i>atc1Δ/atc1Δ</i>, carente de actividad trehalasa ácida	94
A.4.1. Análisis del crecimiento celular en respuesta a la presencia de Val. A y AmB.....	94
A.4.2. Análisis de la viabilidad celular	96
A.4.3. Efecto de los agentes antifúngicos sobre el tamaño celular	98
A.4.4. Efecto de la Val. A en las actividades trehalasa (ácida y neutra) y catalasa	99
A.4.5. Medida de trehalosa intracelular tras el tratamiento con Val. A	101
A.4.6. Inducción de la filamentación con suero humano	102
A.4.7. Análisis del posible efecto sinérgico de Val. A con AmB.	105
A.5. Sensibilidad de las células humanas al efecto de Val. A	107
B. ESTUDIO DE LOS ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO MICA FUNGINA Y ANFOTERICINA B SOBRE <i>C. albicans</i>	111
B.1 Sensibilidad a la acción fungicida de MF y AmB en las cepas de referencia SC5314 y CAI-4 de <i>C. albicans</i>	113
B.2. Análisis de la formación intracelular de ROS como un componente de la acción antifúngica contra <i>C. albicans</i>	118
B.3. Alteraciones producidas por MF y AmB sobre la morfología de <i>C. albicans</i> ..	125
B.4 Efecto de AmB y MF sobre la transición dimórfica levadura-micelio	129
B.5. Determinación de las actividades trehalasa neutra y ácida, y del contenido de trehalosa endógena	135
B.6. Implicación de la MF en la respuesta de los macrófagos frente a <i>C. albicans</i> ..	136
C. IMPLICACIÓN DE LA RUTA HOG1 EN LA PROTECCIÓN A ESTRÉS PRODUCIDO POR AmB y MF	139
C.1. Sensibilidad del mutante <i>hog1Δ</i> a MF y AmB	143
C.2. Niveles de ROS intracelular en RM100 y <i>hog1Δ</i> tras la exposición a MF y AmB	146
C.3. Acumulación de trehalosa en células RM100 y <i>hog1Δ</i> en presencia de MF y AmB	150
C.4. Efecto de la rotenona sobre la capacidad antifúngica de AmB y MF	151
5. RESUMEN GENERAL	155
6. CONCLUSIONES	163

7. LISTA DE FIGURAS 167
8. LISTA DE TABLAS..... 173
2. BIBLIOGRAFÍA 177

LISTA DE ABREVIATURAS

5FC	5-fluorocitosina
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AmB	Anfotericina B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
Atc1p	Trehalasa ácida
<i>atc1Δ</i>	Mutante homocigótico carente del gen <i>ATC1</i>
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Adenosín trifosfato
BCR	Receptores de células B
BPK	Tampón fosfato potásico
CC	Control de crecimiento
CD	Antígeno de diferenciación
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DHF	Dihidrofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPI	Glicosidil fosfatidil inositol
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutaredoxina
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HOG	High osmolarity glicerol
<i>hog1Δ</i>	Mutante homocigótico carente del gen <i>HOG1</i>
HSPs	Proteínas de choque térmico
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IP	Yoduro de propidio
Ki	Constante de inhibición
MAP	Proteína activada por Mitogeno
MAPK	Proteína quinasa de tipo MAP
MAPKK	Proteína quinasa de una MAPK
MAPKKK	Proteína quinasa de una MAPKK
MCC	Medio de cultivo completo
M-DM	Macrófagos derivados de monocitos
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
MF	Micafungina
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MR	Receptores de manosa

Lista de abreviaturas

NK	Células <i>Natural Killers</i>
NO	Óxido Nítrico
Ntc1p	Trehalasa neutra de <i>C. albicans</i>
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Ión peroxinitrito
PAMPs	Patrones Moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PMA	Forbol-12-meristato-14-acetato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPP	Ruta de las pentosas fosfato
PRRs	Receptores para el reconocimiento de PAMPs
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies de oxígeno reactivo
Rot	Rotenona
STRE	Elementos de respuesta a estrés
T	Tiourea
T6P	Trehalosa-6-fosfato
TCR	Receptores de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tps1p	Trehalosa-6P-sintetasa
Tps2p	Trehalosa-6P-fosfatasa
UDP	Uridina difosfato
UFC	Unidades formadoras de colonias
Ura-/+	Auxótrofo/Protótrofo para uracilo
Val. A	Validamicina A
YPD	Extracto de levadura, peptona y glucosa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia actual de las micosis

En la epidemiología clásica, las micosis producidas por ciertos hongos microscópicos que afectan al hombre y los animales homeotermos, han representado un problema clínico menor, debido a las siguientes razones: (i) hay relativamente pocos hongos patógenos, en comparación con las bacterias; (ii) las infecciones fúngicas solían ser leves y de pronóstico favorable, salvo complicaciones. En consecuencia la quimioterapia antifúngica ha tenido un desarrollo muy inferior respecto de la antibacteriana.

Este escenario ha cambiado drásticamente en las dos últimas décadas. La morbilidad y mortalidad causada por las micosis invasivas han aumentado de modo alarmante, hasta convertirse en un problema sanitario muy grave, pese a la mejora en los protocolos de diagnóstico y la disponibilidad clínica de nuevos antifúngicos (Pfaller y Diekema, 2010; Pfaller y Castanheira, 2015). En la actualidad, se han identificado alrededor de 600 especies fúngicas consideradas patógenas de humanos, generalmente oportunistas, que afectan especialmente a pacientes inmunodeprimidos o de avanzada edad.

Tan preocupante escenario se complica por el limitado arsenal disponible de antifúngicos eficaces y seguros, y por el creciente número de cepas fúngicas que muestran resistencia a los antibióticos convencionales (Brown *et al.*, 2012). En función de su evolución clínica, las micosis se clasifican en superficiales o sistémicas. Las superficiales afectan a la piel y capas mucosas, tienden a ser benignas y autolimitantes (tiñas, dermatitis o queratitis). Por el contrario, las micosis sistémicas cursan con diseminación por el torrente circulatorio e invasión de órganos, pueden entrañar riesgo vital.

Diversos asilados hospitalarios de *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans* o *Pneumocystis jirovecii*, junto con distintos hongos dimórficos (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis/posadasii* o *Blastomyces dermatidis*) están siendo identificados con mayor frecuencia, como responsables de brotes nosocomiales. También es importante reseñar la emergencia como patógenos oportunistas de hongos que, anteriormente, carecían de relevancia clínica, caso de las especies “no-albicans” de *Candida*, o las pertenecientes a los géneros *Trichosporon* y

Rhodotorula, así como especies “no-neoformans” de *Cryptococcus* (Pfaller *et al.*, 2014; Tlamçani y Er-rami, 2013). Este inesperado auge se debe al aumento de las quimioterapias antitumorales agresivas, los tratamientos inmunosupresores para contrarrestar ciertas enfermedades autoinmunes, los trasplantes, las prácticas profilácticas antimicrobianas, etc.

No obstante, de entre todos los hongos infecciosos, *Candida albicans* y *Aspergillus spp.* siguen siendo los agentes etiológicos fúngicos con mayor prevalencia clínica (Badiee y Hashemizadeh, 2014; Low y Rotstein, 2011; Pfaller y Diekema, 2010; Tlamçani y Er-rami, 2013). Por esta razón, la presente Memoria se ha centrado en *C. albicans* como modelo de investigación experimental.

1.2. Características del género *Candida*

El género *Candida* engloba un conjunto de especies de levaduras eucariotas comensales que se clasifican taxonómicamente dentro del orden *Saccharomycetales*, perteneciendo a la familia *Saccharomycetaceae* (Figura 1.1). Pueden presentar diversas formas: globosa, ovoide, cilíndrica o alargada, raramente apiculada, ojival, triangular o con forma de frasco (Kreger-van Rij, 1984). Los miembros del género *Candida* se caracterizan porque sus colonias suelen presentar coloración visible por la presencia de pigmentos carotenoides, cuyo rango de colores varía entre crema y amarillento (Eggimann *et al.*, 2003; Kreger-van Rij, 1984). Las células levaduriformes carecen de ciclo sexual verdadero y se reproducen, habitualmente, por gemación multilateral. Poseen en su ciclo biológico estructuras pseudomiceliales que, en su caso, pueden ser rudimentarias o estar bien desarrollados (Eggimann *et al.*, 2003). Según la especie, la textura colonial puede ser pastosa, suave y brillante, o seca, arrugada y sin brillo. Determinadas especies de *Candida* forman parte de nuestra microbiota intestinal, se encuentran en alimentos u objetos inanimados como catéteres, aunque sólo un 10% son responsables de infecciones en humanos (Eggimann *et al.*, 2003; Sardi *et al.*, 2013; Yapar, 2014).

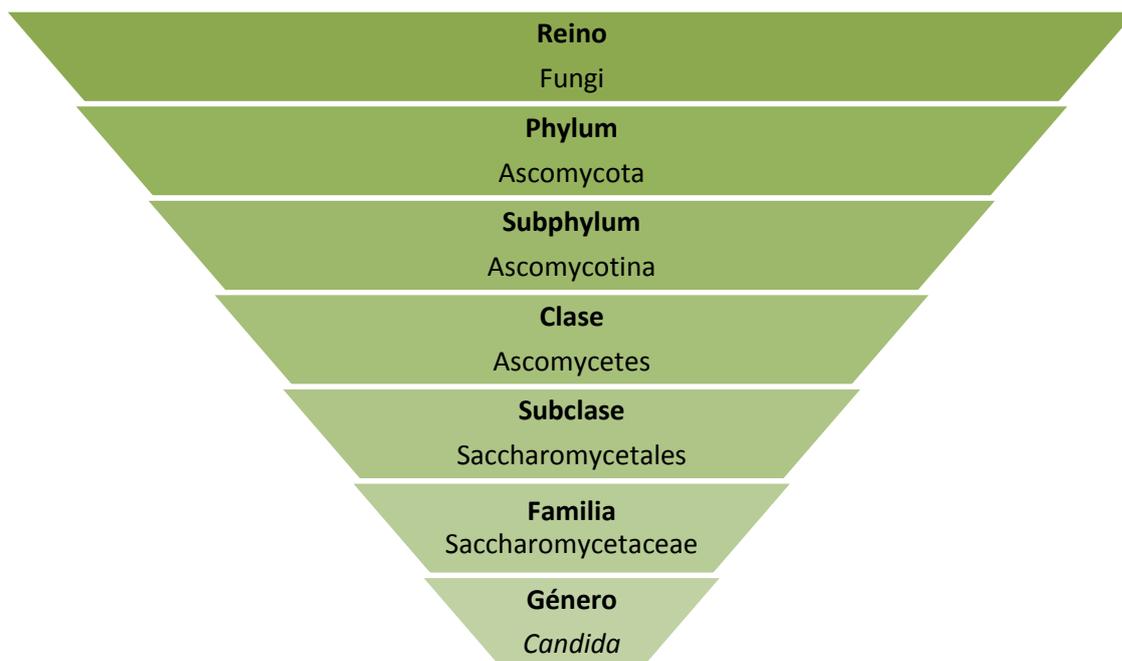


Figura 1.1. Taxonomía de *C. albicans*

1.2.1. Epidemiología

Se conocen más de 150 especies del género *Candida*, pero sólo un pequeño número es responsable de infecciones en humanos, destacando: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis* (McManus y Coleman, 2014; Pfaller *et al.*, 2014). Según la información proporcionada por las prestigiosas instituciones de Estados Unidos, CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*) y NHSN (*National Healthcare Safety Network*), las especies pertenecientes al género *Candida* ocupan el quinto puesto entre los patógenos adquiridos en centros hospitalarios y el cuarto lugar como responsables de infecciones del torrente sanguíneo. Entre ellas, *C. albicans* destaca como el hongo con mayor frecuencia en aislados hospitalarios, responsables de infecciones tanto superficiales como sistémicas en humanos (Yapar, 2014). Sin embargo, en los últimos años su incidencia ha ido disminuyendo, mientras que las especies “no-albicans” han ido adquiriendo cada vez mayor relevancia (Tabla 1.1) (Ortega *et al.*, 2011; Pfaller *et al.*, 2014; Sardi *et al.*, 2013).

Tabla 1.1. Distribución de las especies aisladas de *Candida* en estudios globales (%)

Año	Descripción	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida krusei</i>
1997-2007	Laboratorio: ARTEMIS	65,3	7,2	6,0	11,3	2,4
	• 1997-2000	70,9	5,4	4,8	10,2	2,2
	• 2001-2004	62,9	7,5	6,9	11,5	2,5
	• 2005-2007	65	8,0	5,6	11,7	2,5
2003	Laboratorio: SENTRY	48,7	10,9	17,3	17,2	1,9
2008-2009	Laboratorio: SENTRY	48,4	10,6	17,1	18,2	2,0
2007-2011	Hospital: Pediatría	44		22	11	3

Por tanto, *Candida sp.* es responsable de las infecciones fúngicas más importantes en personas hospitalizadas de todo el mundo (Pfaller y Castanheira, 2015). No obstante, los agentes etiológicos concretos varían entre regiones y países. Así, la distribución observada en Europa y Estados Unidos es muy parecida, siendo *C. albicans* el microorganismo predominante, responsable de algo más del 50% de los casos de candidemia, seguido por *C. glabrata* (14%) y *C. parapsilosis* (12%), *C. tropicalis* (7%) y *C. krusei* (2%) (Lockhart, 2014; Sardi *et al.*, 2013). Australia sigue una tendencia similar a Europa y Estados Unidos pero con una ligera predominancia de *C. parapsilosis* sobre *C. glabrata*. Sin embargo, en Latinoamérica, *C. tropicalis* ocupa el segundo lugar como principal organismo por encima de *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Sorprendentemente, en ciertas áreas de Asia, como India o Pakistan, *C. tropicalis* es la especie más abundante seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, mientras *C. albicans* ocupa el cuarto lugar (Lockhart, 2014).

Respecto a España, *Candida sp.* es la cuarta causa de infecciones sanguíneas en pacientes hospitalizados con una incidencia del 3,7 %, por detrás de patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.* o *Pseudomonas aeruginosa* (Vallés *et al.* 2008). Según un estudio realizado por FUNGEMYCA entre el año 2009 y 2010 en 43 hospitales de toda España, *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia en pacientes que sufren fungemia (Fig.1.2), aunque su tasa de incidencia está por debajo del 50%, a diferencia de la mayoría de países europeos, siendo *C. parapsilosis* la más común entre las especies clasificadas como “no-albicans” (Yapar, 2014).

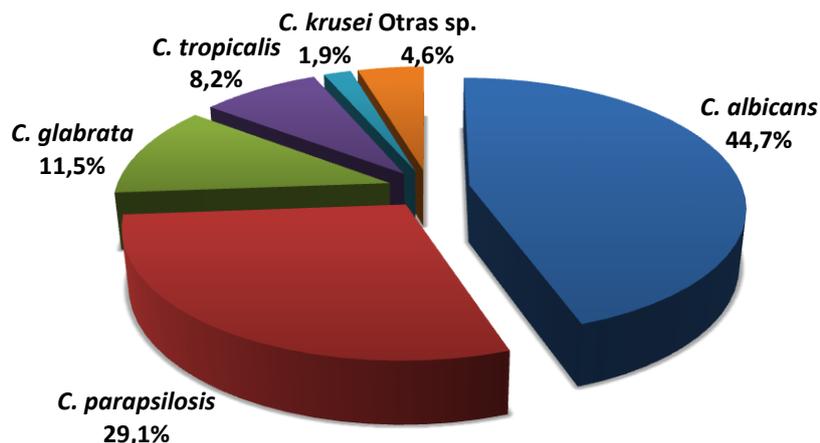


Figura 1.2. Porcentaje de aislamientos clínicos detectados en España de distintas especies del género *Candida* según un estudio realizado por FUNGEMYCA (2009-2010). Gráfico elaborado en función a los datos obtenidos por Yapar, 2014.

1.3. Biología general de *C. albicans*

C. albicans es un hongo diploide permanente, perteneciente al grupo de levaduras ascomicetas que carecen de un ciclo sexual verdadero (Kreger-van Rij, 1984). Se comporta como una levadura patógena oportunista y es considerada como el hongo de mayor prevalencia clínica junto a *Aspergillus sp.*, entre los individuos sanos. Las candidiasis afectan principalmente a la cavidad oral (muguet infantil), piel, tracto gastrointestinal y vaginal en individuos sanos. Su importancia reside en la alta virulencia desarrollada contra la población inmunodeprimida, causando infecciones invasivas en afectados de SIDA, pacientes receptores de trasplantes, neonatos, ancianos e individuos sometidos a terapia antitumoral o a tratamiento con antibióticos (Lockhart, 2014; Pfaller y Diekema, 2010; Sardi *et al.*, 2013; Yapar, 2014).

Es un microorganismo mesófilo, ya que crece bien en un rango de temperaturas comprendido entre 25 y 42°C, con un óptimo a 37°C (Verduyn Lunel *et al.*, 1999). El rango de pH que permite su crecimiento oscila entre 2,2 y 9,6, siendo más apropiado el situado entre 5,1 y 6,4 (Kreger, 1954; Skinner y Fletcher, 1960). Su principal fuente de reserva hidrocarbonada es el glucógeno aunque también sintetiza trehalosa (Shepherd *et al.*, 1985; Sullivan *et al.*, 1983). *C. albicans* fermenta glucosa, maltosa y galactosa con producción de ácido y gas. La sacarosa

Introducción

sólo da ácido y no fermenta lactosa, criterio distintivo con otras especies de *Candida* (Kreger-van Rij, 1984).

En cuanto a su morfología, *C. albicans* es un hongo polimórfico que puede encontrarse bien como célula levaduriforme (blastoconidio) o como estructuras miceliares (hifa o/y pseudohifa), dependiendo de las condiciones nutricionales y de distintos factores ambientales (Fig. 1.3). Además, es capaz de realizar un cambio fenotípico espontáneo (*white-opaque switching*) (Soll *et al.*, 2003), inductor de diversas alteraciones en la morfología colonial y posible factor de virulencia. Por último, *C. albicans* puede formar biopelículas (o *biofilms*), estructuras que consisten en un entramado de células unidas y embebidas en una matriz extracelular de proteínas y polisacáridos (Sardi *et al.*, 2013). Todos estos cambios conformacionales y estructurales están relacionados con la capacidad infectiva de la levadura, y serán analizados con más detalle a continuación.

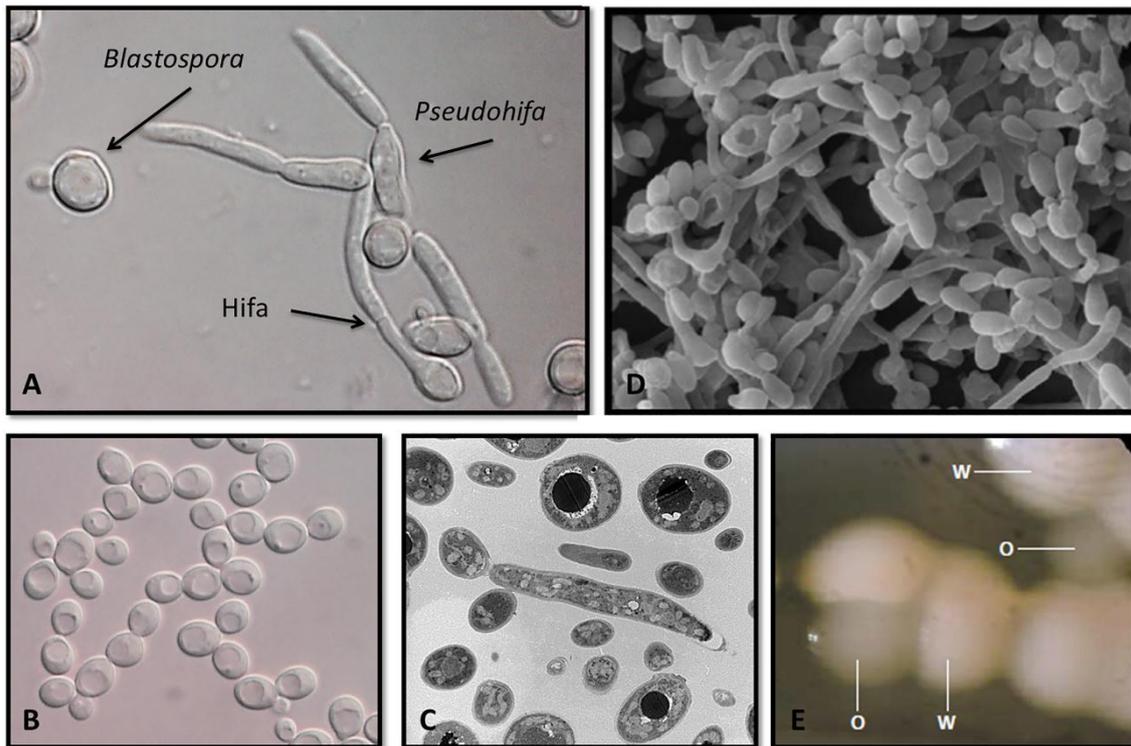


Figura 1.3. Micrografías de las distintas morfologías que presenta *C. albicans* en su ciclo biológico. A y B: Imágenes donde se pueden observar tanto blastosporas (A y B) como hifas o pseudohifas (A) al microscopio óptico utilizando el contraste interferencial de Nomarsky (elaboración propia). C: Micrografías de blastosporas y pseudohifa obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (elaboración propia). D: Biofilms de *C. albicans* observados al microscopio electrónico (Sardi *et al.*, 2013). E: Un ejemplo de transición blanco-opaca (*white-opaque switching*). Las colonias constituidas por células blancas se indican con una “W” y las opacas con un “O” (Berman y Sudbery, 2002).

1.3.1. Importancia clínica

C. albicans es un habitante común de la boca, el tracto gastrointestinal y genitourinario, así como de la microbiota mucocutánea. En individuos sanos, vive en equilibrio con su hospedador sin causarle ningún efecto perjudicial. Sin embargo, al producirse un debilitamiento del sistema inmunitario, *C. albicans* se convierte en un agente patógeno muy virulento.

Genéricamente, se denominan **candidiasis** a las infecciones producidas por los miembros del género *Candida* que, a pesar del uso de tratamientos antifúngicos, son responsables de un importante porcentaje de muertes, afectando principalmente a este segmento de población inmunodeprimida. Las candidiasis se pueden clasificar en dos tipos, en función de su localización y zona de afectación.

- **Superficiales:** Ocurren principalmente en la piel y epidermis, extendiéndose a las uñas y el cuero cabelludo, causando queratitis. También pueden ocasionar otitis externas. Otras manifestaciones comunes tienen lugar en las mucosas, provocando úlceras bucales, estomatitis atrófica crónica, candidiasis mucocutánea y vulvovaginitis. Los daños son muy limitados en hospedadores que no están inmunodeprimidos. Los cuadros clínicos causados por este tipo de candidiasis suelen ser benignos, de progresión suave, y se curan de forma espontánea con medidas de higiene básica. Sólo en algunos casos particulares se requiere tratamiento con antibióticos (Fidel *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2014; Vazquez y Sobel, 2002).
- **Sistémicas:** Debidas a una proliferación masiva del agente patógeno en sangre, colonizando algún órgano vital (cerebro, pulmón, corazón, hígado...) y dando lugar a septicemias extensivas (o **candidemias**) sobre todo en pacientes inmunodeprimidos.

1.3.2. Factores de riesgo

Existen numerosos **factores de riesgo** responsables de las infecciones producidas en humanos que se clasifican en: **mecánicos**, si se producen por la pérdida de las barreras epiteliales y de las mucosas; **fisiológicos**, si se deben a

alteraciones en el funcionamiento normal del organismo; o **iatrogénicos**, cuando las infecciones están relacionadas con los tratamientos aplicados o el uso de material médico (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Clasificación y principales factores de riesgo (Klepser, 2011; Pfaller y Castanheira, 2015; Yapar, 2014).

Factores de riesgo		
Mecánicos	Fisiológicos	Iatrogénicos
<ul style="list-style-type: none">• Quemaduras• Prótesis dentales• Cirugía• Heridas	<ul style="list-style-type: none">• Edad• Malnutrición• Embarazo• Menstruación• Hiperglucemia• Neutropenia• Fallo renal• Pancreatitis aguda• Hospitalizaciones prolongadas en Cuidados Intensivos	<ul style="list-style-type: none">• Permanencia de catéteres venosos• Quimioterapia• Hemodiálisis• Nutrición parenteral• Abuso de antifúngicos o antibióticos de amplio espectro• Uso de agentes inmunosupresores

1.3.3. Factores de virulencia

También es importante analizar los distintos **factores de virulencia** en *C. albicans*, que representan todas aquellas características genéticas y fisiológicas responsables de su interacción con el hospedador y la evasión de sus mecanismos defensivos, así como la resistencia al tratamiento antifúngico o la lesión de las células y tejidos invadidos. A continuación, se comentan los principales factores de virulencia.

✓ Adhesión celular y formación de biopelículas

El primer paso para la colonización del hospedador consiste en el reconocimiento de la superficie del mismo y la posterior adhesión. En este proceso intervienen distintos elementos como la hidrofobicidad de la pared celular, cuya composición será analizada más adelante, junto a un grupo de proteínas denominadas **adhesinas** (Filler, 2013). De entre ellas, **ALS 3** destaca como la principal adhesina implicada en la unión e invasión de las células del hospedador

(Fig. 1.4). Está presente en las hifas y pertenece a la familia de proteínas de pared celular con alta glicosilación, que se anclan mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI), denominadas *Agglutinin-Like-Sequence* (ALS). Otra adhesina importante es **Hwp1**, manoproteína específica de la pared de las hifas que se unen a las células epiteliales y sirven como sustrato a las transglutaminasas de mamífero, dando lugar a la unión hifa-hospedador. Existen otras adhesinas que son independientes de la morfología celular, como las proteínas de unión a GPI (**Eap1**, **Iff4** y **Ecm33**), las proteínas que no están unidas de forma covalente a la pared (**Mp65**, una glucanasa, y **Phr1**, una β -1,3-glucanosil transferasa), las proteasas asociadas a la superficie celular (**Sap9** y **Sap10**) e **Int1**, proteína similar a las integrinas. Además, Als3, Hwp1 y Eap1 también cumplen una función muy importante en la formación de biopelículas (Lopez *et al.*, 2014; Mayer *et al.*, 2013).

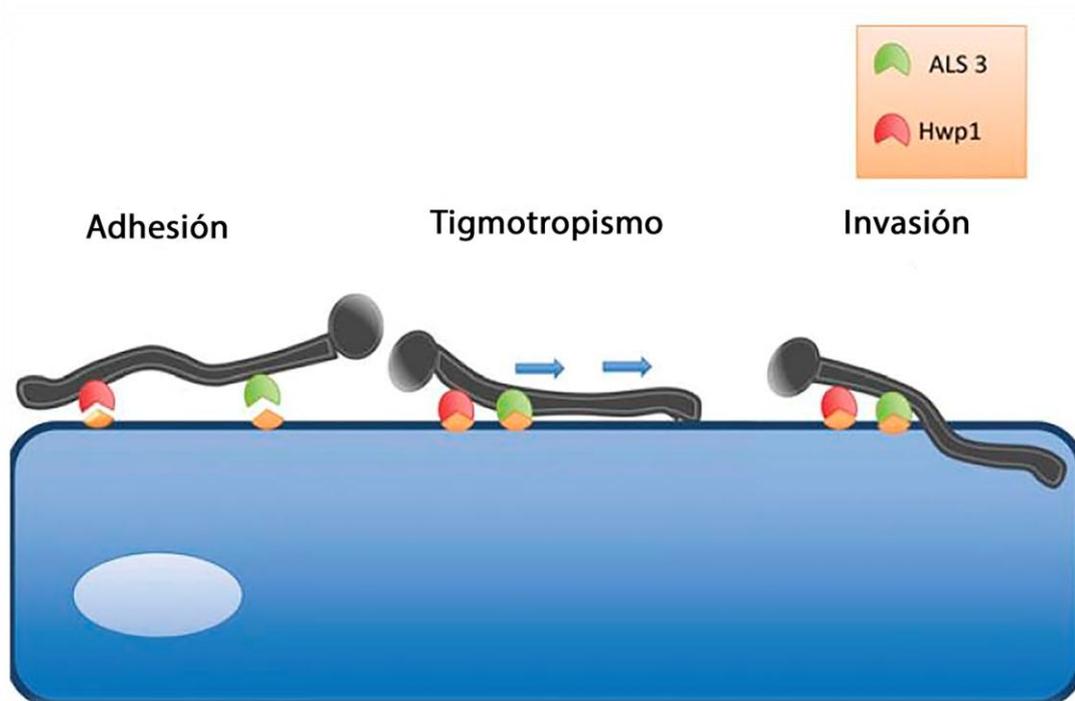


Figura 1.4. Fases de la adhesión y penetración celular. *Candida* reconoce y se une a las células epiteliales mediante la interacción de moléculas de adhesión específicas (como ALS3 y Hwp1) con las cadherinas celulares (glucoproteínas transmembranales responsables de las uniones entre células). Por medio de tigmotropismo, las hifas se dirigen hacia las áreas más débiles de las células. La secreción de hidrolasas permite la invasión celular y la liberación de nutrientes. Figura adaptada de (O'Donnell *et al.*, 2015).

Las **biopelículas** son estructuras que tienen un papel muy importante en la patogénesis. En el tejido del hospedador y otras superficies, *C. albicans* se encuentra mayoritariamente formando biopelículas, siendo casi inexistentes las levaduras aisladas (forma plactónica) (Soll, 2008). Estas comunidades organizadas de células están embebidas en una matriz extracelular autoproducida, rica en diferentes tipos de proteínas y carbohidratos (Fig. 1.5). Su formación y composición depende de las condiciones ambientales, como la composición del medio, el pH, el oxígeno y el tipo de especie o cepa fúngica (Sardi *et al.*, 2013). Son, por tanto, estructuras de protección capaces de evadir el sistema inmunitario del hospedador, resistir los tratamientos antifúngicos y mejorar la competitividad con otros microorganismos. La capacidad de *C. albicans* de formar biopelículas en prótesis, catéteres e instrumental médico, está directamente relacionada con su potencial para producir enfermedades. Así, las infecciones debidas a estas biopelículas formadas en catéteres, representan la causa de mayor morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados (DiDone *et al.*, 2011).

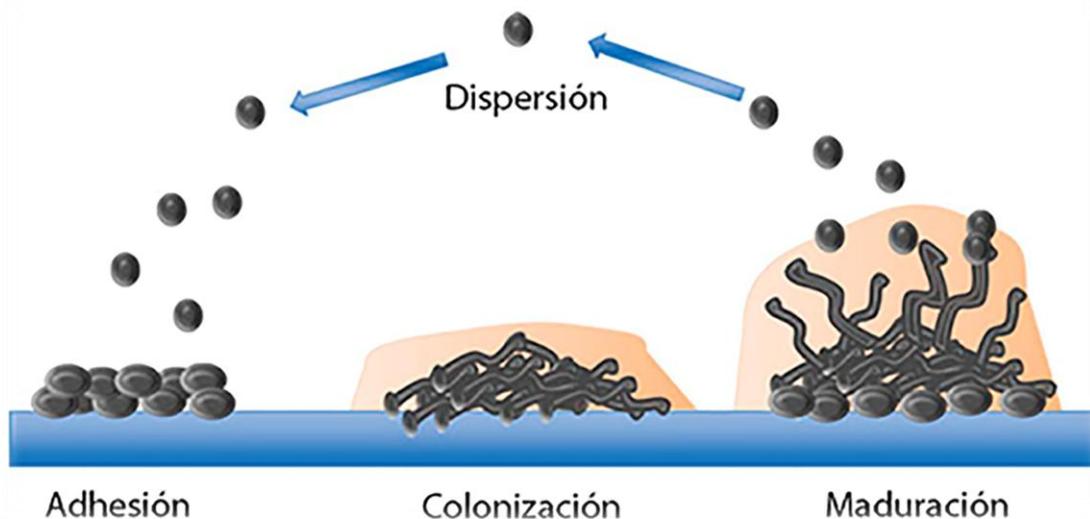


Figura 1.5. Fases de desarrollo de las biopelículas. Las células se unen a la superficie correspondiente (adhesión) y comienzan a dividirse y proliferar (colonización). La formación de hifas y de una matriz extracelular (maduración) da lugar a biopelículas estables que dispersarán las levaduras, dando lugar a nuevas colonias y posibilitarán el desarrollo de futuras biopelículas. Figura adaptada de O'Donnell *et al.*, 2015.

✓ **Secreción de enzimas hidrolíticas**

Están implicadas en la invasión de los tejidos, así como en la evasión del sistema inmunitario del hospedador y la obtención de nutrientes del mismo. Estas enzimas incluyen las **lipasas**, que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos;

proteasas, que degradan las proteínas extracelulares provocando daño tisular, invasión del epitelio oral y la epidermis, o infecciones sistémicas; y **fosfolipasas**, que degradan los grupos éster de los glicerolfosfolípidos de las membranas celulares del hospedador facilitando la invasión (Mayer *et al.*, 2013).

✓ **Composición de la pared celular**

La estructura y composición de la **pared celular** está considerada como uno de los factores de virulencia más importantes, por ello, su estudio tiene una especial importancia. La pared celular de levaduras constituye aproximadamente el 30% del peso seco de la célula, estando formada fundamentalmente por proteínas y carbohidratos (Gow *et al.*, 2012; Valentin *et al.*, 2000) recogidos en la Tabla 1.3 junto a las posibles funciones que desempeñan en la misma.

Tabla 1.3. Composición y posible papel funcional de los principales polisacáridos que constituyen la pared celular. Este esquema ha sido elaborado a partir de las siguientes referencias: Calderone, 1993; Chaffin *et al.*, 1998; Gow *et al.*, 2012; Ibata-Ombetta *et al.*, 2003.

Polisacáridos	Composición	Funciones
Manoproteínas	Polímeros de manosa (mananos) covalentemente unidos a péptidos	<ul style="list-style-type: none"> • Estructural y de defensa. • Induce la apoptosis de macrófagos. • Otras funciones inmunosupresoras que colaboran en la supervivencia del hongo.
β -1,3-glucano β -1,6-glucano	Polímeros de glucosa	<ul style="list-style-type: none"> • Estructural. • Responsable de las interacciones fisicoquímicas entre la levadura y el hospedador. • Reconocidos como “no propios” por el sistema inmune innato y adaptativo. • Suponen el 40 y 20% del peso seco de la pared celular, respectivamente.
Quitina	Polímero de N-acetil-glucosamina	<ul style="list-style-type: none"> • Estructural. • Responsable de la adhesión a los tejidos y la inmunogenicidad. • Importantes en la porosidad de la pared. • Constituye el 2% del peso seco de la pared celular.

Introducción

El esqueleto de la capa interna de la pared celular está formado fundamentalmente por quitina y β -1,3-glucano, que se encuentra unidos covalentemente y son responsables de la forma y rigidez de las células (Fig. 1.6). Esta estructura sirve de anclaje a las manoproteínas, localizadas en la parte más externa de la pared, que conectan con el esqueleto de polisacáridos mediante GPI con los β -1,6-glucanos, más flexibles (Fig. 1.6). En conjunto, estos componentes dan lugar a una estructura en dos capas, situándose las proteínas en la superficie externa, y los glucanos y quitina en la interna. Todas estas moléculas, por tanto, interaccionan entre ellas formando una red tridimensional que combina flexibilidad y rigidez, ya que la pared celular presenta un gran dinamismo (Calderone, 1993; Gow *et al.*, 2012; Klis *et al.*, 2001). En *C. albicans* la pared cumple una serie de funciones importantes como mantener la integridad y la forma celular, proteger contra el estrés físico o químico, servir de anclaje para proteínas externas, y estar involucrada en la patogénesis, al contener diversos antígenos y ser responsable de la unión a las células hospedadoras (Gow *et al.*, 2012; Klis *et al.*, 2001; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

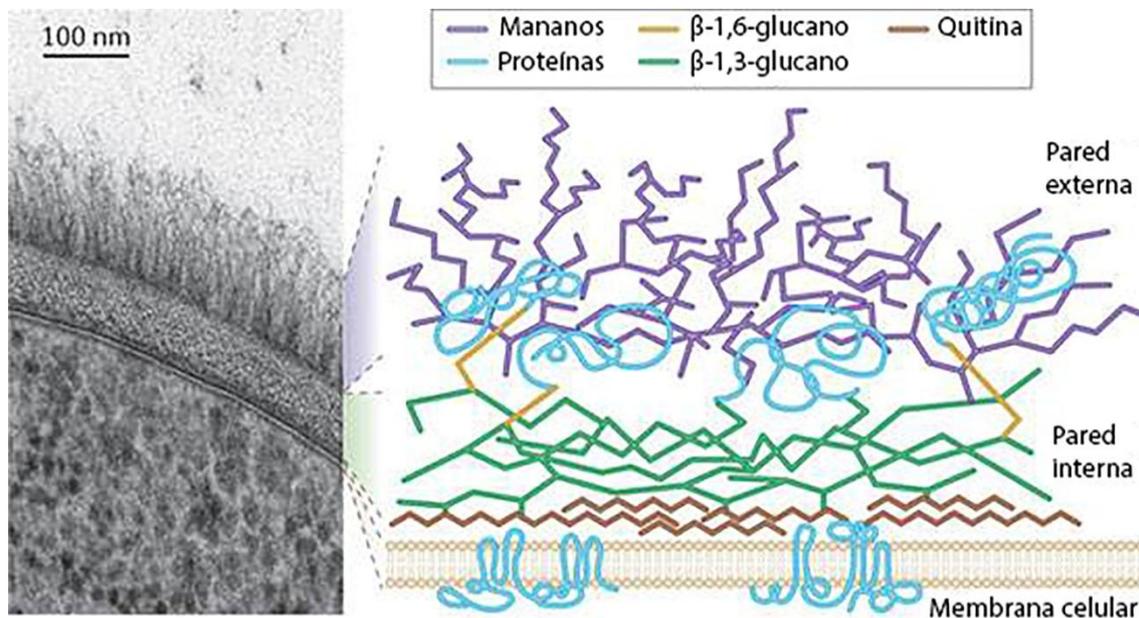


Figura 1.6. Representación de la organización estructural que adoptan los distintos componentes de la pared celular de *C. albicans*. Figura adaptada de Gow *et al.* (2012).

✓ **Polimorfismo**

Ya hemos comentado que *C. albicans* se considera un hongo polimórfico, con una amplia variedad de morfologías (Fig. 1.7), por lo que en la naturaleza se presenta bajo diferentes formaciones celulares macroscópicas (blastoconidios, pseudohifas, hifas o clamidiosporas), según las condiciones ambientales y/o nutritivas del medio. Además, la morfología también se relaciona con su capacidad para invadir y colonizar el cuerpo humano (Haynes, 2001; Sudbery *et al.*, 2004; Whiteway y Bachewich, 2007). Los principales tipos morfológicos básicos son:

1. Las **blastosporas o blastoconidios**. Se originan por un proceso asexual de gemación multilateral y se caracterizan por presentar una morfología elipsoidal u ovoidea generalmente de entre 2 y 4 μm de diámetro.
2. Las **pseudohifas**. Son estructuras alargadas, formadas por la unión de las células elipsoidales dando lugar a una conformación septada, que puede seguir un patrón de ramificación determinado para favorecer la toma de nutrientes del medio. Por lo tanto, se pueden encontrar con apariencia de cadenas cortas o de racimos. Están constituidas por células hijas unidas a la célula madre tras un proceso de gemación múltiple. No existe ningún tipo de comunicación citoplasmática entre las células.
3. Las **hifas** verdaderas. Muestran una apariencia más homogénea, sin que se aprecie la constricción entre las células. Tienen una disposición más alargada y están fuertemente polarizadas. Están formadas por tabiques alargados separados por septos entre los que sí se produce comunicación citoplasmática mediante poros, a diferencia de las pseudohifas. El conjunto de hifas constituye el micelio.
4. Las **clamidiosporas**. Son formas de resistencia frente a distintos tipos de estrés. Permanecen en estado de latencia mientras las condiciones sean desfavorables. Se caracterizan por su gruesa pared y su alto contenido en lípidos y carbohidratos. Se forman a partir de las conformaciones anteriores, cuando las poblaciones han entrado en estado estacionario.

Aunque todas estas formas se encuentran presentes en los hospedadores infectados por *C. albicans*, la forma filamentada es la más común en candidiasis efectivas. No obstante, parece que la relación directa entre infección productiva y filamentación podría no ser absoluta (Pedreño *et al.*, 2007). De hecho, es conocido que las formas levaduriformes predominan en la expansión de *C. albicans* por el torrente sanguíneo, por lo que también están implicadas en el proceso de invasividad, pudiendo llegar a colonizar órganos vitales, como corazón, riñón y cerebro (Saville *et al.*, 2003).

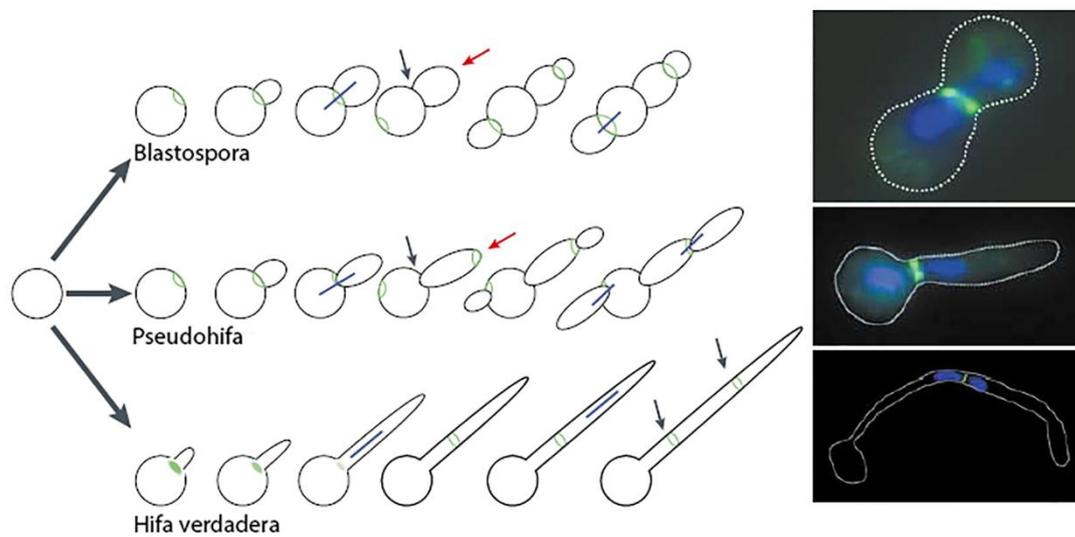


Figura 1.7. Representación de las distintas morfologías desarrolladas por *C. albicans*. En esta imagen, se puede observar propiedades importantes, comunes a las distintas conformaciones como el grado de polaridad del crecimiento, la posición del anillo de septina (verde) y el movimiento del núcleo (azul) relativo a la célula madre; además del grado de separación de las células hijas respecto de la célula madre para adoptar formas individuales. La imagen ha sido adaptada de Berman y Sudbery, 2002.

Por último, es preciso destacar la transición blanco-opaca (***white-opaque switching***). Se trata de un cambio fenotípico espontáneo y reversible, donde las células que componen las colonias opacas presentan una morfología alargada y rugosa; mientras que las células constitutivas de las colonias blancas son ovaladas y lisas. Las células de las colonias opacas ocasionan mayor patogenicidad en las infecciones superficiales que en las sistémicas; por el contrario las células de las colonias blancas son más virulentas en infecciones sistémicas (Berman, 2006; Sudbery *et al.*, 2004; Whiteway y Bachewich, 2007).

1.4. Terapia antifúngica

La identificación precoz de las candidiasis invasivas y su adecuado tratamiento con antifúngicos resulta de vital importancia, porque reduce el riesgo de mortalidad notablemente (Armstrong-James, 2007; Pfaller y Castanheira, 2015). Sin embargo, estas enfermedades a veces son difíciles de diagnosticar, confundándose al inicio con sepsis bacterianas, lo que conlleva retrasos en la aplicación del tratamiento correcto y aumenta los pronósticos desfavorables. Además, la analogía estructural y metabólica existente entre las células fúngicas y hospedadoras, ambas con organización eucariótica, limita en gran medida el arsenal de compuestos antifúngicos disponibles, reduciendo su toxicidad selectiva y favoreciendo la aparición de efectos secundarios y/o nocivos en el paciente (Maubon *et al.*, 2014).

En la actualidad, disponemos de tres grandes familias de antifúngicos efectivos contra *Candida spp.* y, más concretamente, sobre *C. albicans*: **polienos**, **azoles** y **equinocandinas**. Cada familia engloba una serie de fármacos con estructura, propiedades y modo de acción similares. No obstante, se conocen otros compuestos antifúngicos no incluidos en ninguna de las familias citadas, que también han demostrado una buena eficacia contra *C. albicans*, caso de la 5-fluorocitosina y la terbinafina (Gómez-López *et al.*, 2008; Maubon *et al.*, 2014; Odds *et al.*, 2003; Pfaller y Diekema, 2010). A continuación, se resumen las principales características de cada una.

1.4.1. Polienos

Se trata de un grupo de antifúngicos aislados a partir de cultivos puros de distintas especies del género *Streptomyces*. Presentan una estructura tipo macrólido con largas cadenas insaturadas y, posiblemente, poseen el mayor espectro de actividad. De entre todos los compuestos poliénicos, la mayor utilidad clínica corresponde a la **anfotericina B** y la **nistatina**. Sin embargo, la alta toxicidad de la nistatina sobre las células del hospedador, condiciona que sólo se pueda emplear en ungüentos o soluciones para el tratamiento de infecciones superficiales (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

La **anfotericina B** (AmB) es un producto natural sintetizado por *Streptomyces nodosus*. Su estructura consta de un anillo macrólido de cuarenta átomos de carbono con dos regiones bien diferenciadas; una con un número definido de dobles enlaces y la otra con numerosos grupos hidroxilo (Fig 1.8). Esta organización estructural confiere a los polienos un carácter anfipático, con una región hidrofílica y otra hidrofóbica. Además, el anillo macrólido consta de una lactona y está unido a un aminoazúcar, la micosamina, que está situado muy próximo a un grupo carboxilo, confiriéndole un perfil anfótero adicional (Catalán y Montejo, 2006; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

AmB presenta una potente actividad antifúngica contra *C. albicans*, ya sean blastoconidios aislados o formaciones de biopelículas (Delattin *et al.*, 2014; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). El mecanismo de acción de los polienos consiste en la unión específica al ergosterol, lípido esencial y mayoritario de las membranas fúngicas, y análogo del colesterol de las células animales. Dicha unión altera la permeabilidad de la membrana fúngica, generando canales por donde la célula pierde iones y macromoléculas vitales como azúcares o proteínas, junto a otros daños celulares (Fig. 1.8). Al final se produce una descompensación osmótica que desencadena la muerte celular. No obstante, la capacidad fungicida de estos compuestos depende de la concentración empleada, comportándose como fungistáticos cuando las dosis son muy bajas (Maubon *et al.*, 2014; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

Estudios recientes sugieren que el principal mecanismo fungicida de la AmB reside en la unión al ergosterol, quedando la formación de poros relegada a un segundo plano, como mecanismo complementario (Gray *et al.*, 2012). Además, la resistencia a AmB entre las especies de *Candida* es bastante rara, produciéndose en casos donde la cantidad de ergosterol de membrana disminuye, o se establece un cambio en la diana de unión a membrana, lo que respalda la hipótesis anterior (Ellis, 2002; Sanguinetti *et al.*, 2015; Vincent *et al.*, 2013).

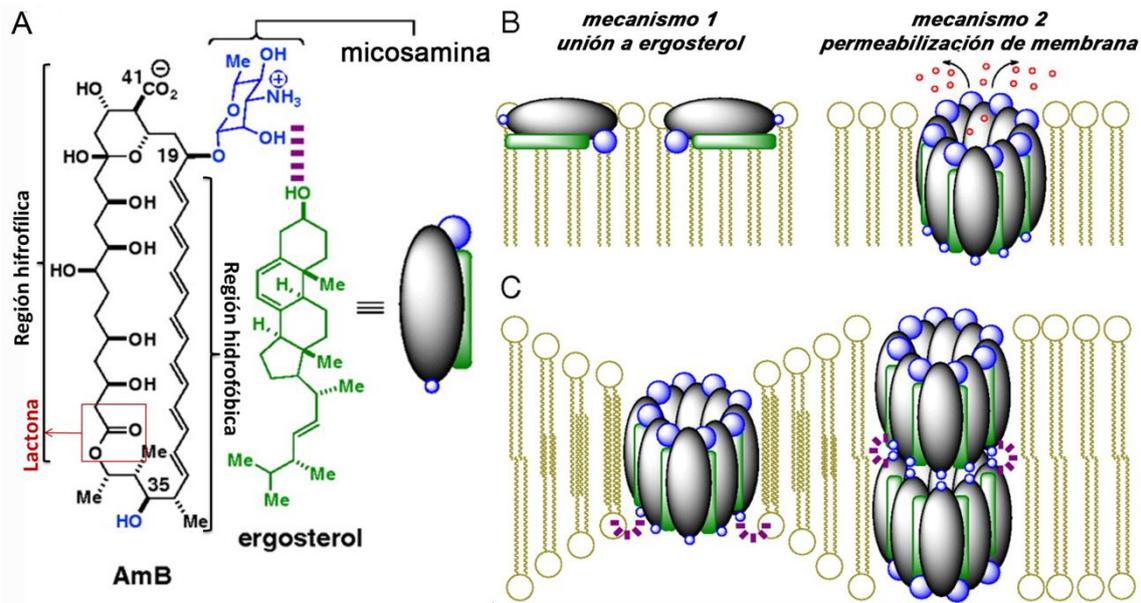


Figura 1.8. Estructura química y mecanismo de acción de la AmB. A. Estructura molecular del polieno y zona de unión al ergosterol (verde), a través del aminoazúcar, micosamina (azul), y la región hidrofóbica. B. Mecanismos de acción antifúngica: 1. unión al ergosterol, 2. permeabilización de la membrana. C. Representación de dos posibles modelos de la formación de los poros en membrana: barril simple (izquierda) o barril doble (derecha). En ambos casos, el grupo hidroxilo del carbono 35 cumple un papel esencial, ya sea anclando el barril de moléculas de AmB en la bicapa lipídica (izquierda) o permitiendo la unión de dos barriles anclados a cada mitad de la bicapa lipídica (derecha). Imagen adaptada de Gray *et al.*, 2012.

La región hidrofóbica de la AmB es responsable de su afinidad por los esteroides de membrana. Sin embargo, también le otorga cierta afinidad, aunque menor, por el colesterol. De modo que la AmB presenta baja toxicidad selectiva, dando lugar a cuadros de nefrotoxicidad y otros efectos secundarios en el paciente (Klepser, 2011). Para intentar paliar estos efectos adversos, se han diseñado distintas formulaciones del polieno, como la desoxicolato, el complejo lipídico o la AmB liposómica. Los mejores resultados se han obtenido con la formulación liposomal, por su menor toxicidad sin ver alterado su potencial antifúngico, lo que permite aplicar tratamientos más prolongados o aumentar las dosis, evitando la aparición de efectos secundarios (Klepser, 2011; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

1.4.2. Equinocandinas

Es un grupo de antifúngicos de reciente implantación clínica, con una estructura molecular muy compleja constituida por un núcleo hexapeptídico cíclico y una cadena lateral acil lipídica, responsable de su efecto antifúngico, que aporta hidrofobicidad al compuesto. A pesar de tratarse de moléculas anfipáticas, el gran tamaño de su núcleo peptídico permite su disolución en agua. Son compuestos semisintéticos, producidos por diferentes hongos filamentosos y posteriormente modificados (Chen *et al.*, 2011; Denning, 2003). Tanto la “Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas”, como la “Sociedad de Microbiología Clínica”, recomiendan el uso de equinocandinas como primera línea de tratamiento para los pacientes con candidiasis invasivas, dada su gran eficacia, los perfiles de seguridad y tolerabilidad, así como su baja interacción con otras drogas y los escasos efectos adversos en el paciente (Perlin, 2011; Sanguinetti *et al.*, 2015).

A diferencia de los polienos que alteran la membrana celular, las equinocandinas inhiben la síntesis de la pared fúngica (Fig. 1.9). Actúan como inhibidores competitivos del complejo enzimático β -1,3-glucano sintasa (situado en la membrana celular), bloqueando la síntesis de β -1,3-glucano, una molécula ausente en mamíferos (Denning, 2003; Maubon *et al.*, 2014; Perlin, 2011). Además, se ha descrito un segundo mecanismo inhibitorio que impide la formación de β -1,6-glucano, aunque en menor medida (Chen *et al.*, 2011). Dado que estos polisacáridos cumplen un papel esencial en la integridad y rigidez de la pared celular (Ver Tabla 1.3), las equinocandinas detienen el crecimiento y división de las levaduras, al no poder éstas renovar su pared, actuando como fungistáticos. Concentraciones elevadas infieren un fuerte estrés osmótico que puede provocar lisis celular mostrando, por tanto, un fuerte carácter fungicida (Chen *et al.*, 2011; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Es importante señalar que a pesar de su reciente introducción clínica, ya se han detectado formas de resistencia espontánea (Sanguinetti *et al.*, 2015).

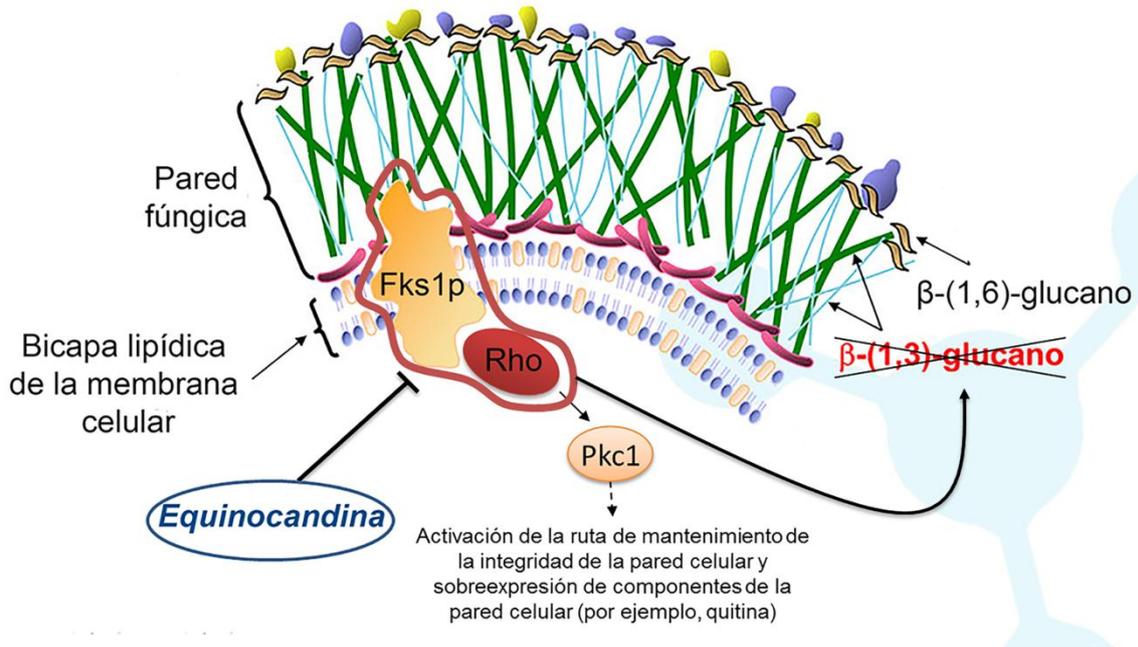


Figura 1.9. Mecanismo de acción antifúngica de las equinocandinas. Las equinocandinas inhiben el complejo enzimático β-1,3-glucano sintasa, constituido por al menos dos subunidades: Fks1p (sintetizada por los genes *FKS1*, *FKS2* y *FKS3*) y Rho1p (Rho). La transcripción de *FKS1* está implicada en la remodelación de la pared celular y la de *FKS2* es dependiente de calcineurina. Rho regula la síntesis de β-1,3-glucano y contribuye a la resistencia activando distintos mecanismos de respuesta a estrés, como la sobreexpresión de quitina. Por tanto, el antifúngico se une al centro activo de Fks1p, inhibiendo la síntesis del polisacárido y activando distintas rutas de respuesta a estrés (Chen *et al.*, 2011; Maubon *et al.*, 2014). Para la elaboración de la figura, se ha utilizado como modelo la imagen obtenida de Kartsonis *et al.*, 2003.

Dentro de esta familia destacan la **casprofungina**, la **micafungina** o la **anidulafungina**, como miembros más representativos. Comparten un núcleo común, y se diferencian por la composición de su cola hidrofóbica, aunque también presentan diferente toxicidad, siendo micafungina y anidulafungina las que muestran un comportamiento más favorable. No obstante, se dispone de escasa información sobre estas dos últimas, que están siendo intensamente investigadas por varios laboratorios.

La **micafungina** (MF) se obtiene a través de modificaciones químicas del hexapéptido FR901370 obtenido de *Coleophoma empetri* (Fig 1.10). La cadena lateral acil lipídica que

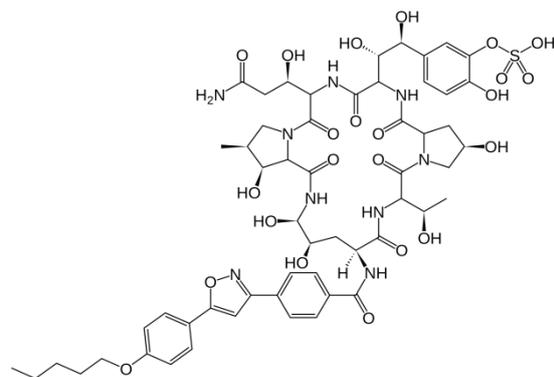


Figura 1.10. Estructura molecular de la MF.

conforma su estructura es un complejo aromático que se une al núcleo proteico y le confiere un elevado potencial antifúngico. Por tanto, esta cadena se intercala en la bicapa lipídica de la membrana celular y le permite ejercer su efecto inhibitorio sobre la β -1,3-glucano sintasa (Chen *et al.*, 2011; Perlin, 2011). En diversos experimentos *in vitro*, MF bloqueó la adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales y mostró una actividad óptima sobre biopelículas de esta levadura. En consecuencia, se trata de un compuesto idóneo para la preservación y tratamiento de posibles infecciones causadas por la implantación de prótesis y catéteres. Además, MF mejoró la actividad fungicida *in vitro* de los neutrófilos sobre pseudohifas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Chandrasekar y Sobel, 2006; Delattin *et al.*, 2014; Gil-Lamaignere *et al.*, 2004). En relación al resto de equinocandinas, MF presenta un perfil de toxicidad inferior al de caspofungina, favoreciendo su empleo en la práctica clínica (Chandrasekar y Sobel, 2006; Klepser, 2011). Sin embargo, muestra una fuerte tendencia a unirse con las proteínas del suero (>99% de proteínas séricas) frente a la caspofungina (84-96%) o la anidalo fungina (>94%), lo que reduce ligeramente su actividad antifúngica en suero respecto a los otros compuestos (Perlin, 2011). Los casos de resistencia a MF en *C. albicans* son muy raros, siendo más frecuentes en *C. parapsilosis* (Chandrasekar y Sobel, 2006).

1.4.3. Azoles

Son una familia de antifúngicos con un amplio espectro de actividad. Se trata de moléculas sintéticas, formadas por un anillo aromático con átomos de nitrógeno en su estructura, derivada del imidazol, unidos a otros anillos aromáticos. Se clasifican en dos grupos en función de las moléculas de nitrógeno que conforman su anillo azólico: (i) azoles de primera generación: constituidos por dos nitrógenos, cuyo precursor es el imidazol (Fig. 1.11) y (ii) azoles de segunda generación: con tres moléculas de nitrógeno, siendo el triazol la molécula base (Fig. 1.11) (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

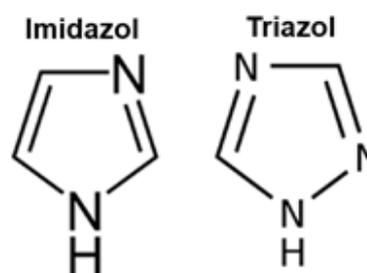


Figura 1.11. Estructura de los distintos anillos azólicos.

Estos compuestos son capaces de unirse a los grupos hemo presentes en muchas enzimas, incluyendo algunas implicadas en la síntesis del ergosterol, que tiene lugar mayoritariamente en el retículo endoplasmático liso. Por tanto, su mecanismo de acción consiste en la unión específica a dichas proteínas, fundamentalmente la lanosterol 14- α -demetilasa (citocromo P450_{14DM}). La carencia de ergosterol provoca la pérdida de fluidez y permeabilidad de la membrana, además de producir cambios en ciertas proteínas con dominios transmembranales, responsables de la síntesis de componentes de la pared. Finalmente, provoca la acumulación de 14- α -metil-3,6-diol, compuesto muy tóxico, y la activación de rutas alternativas que dan lugar a la síntesis de otros esteroides, también tóxicos. Todos estos fenómenos producen tanto la detención del crecimiento de la célula fúngica, como la muerte celular (Maubon *et al.*, 2014; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009; Sanguinetti *et al.*, 2015).

Entre los principales imidazoles están el **ketoconazol**, el más utilizado en la actualidad, y el **miconazol**. A su vez, entre los triazoles destacan el **itraconazol**, menos tóxico que los anteriores, y el **fluconazol** que al ser soluble en agua presenta una mejor absorción intestinal, siendo el menos tóxico. A partir de los triazoles se han obtenido los llamados azoles de tercera generación, como el **voriconazol**, derivado del fluconazol, o el **posaconazol**, obtenido del itraconazol. Estos últimos azoles son más potentes y estables, menos tóxicos y con escasa interacción con otras drogas. En general, la toxicidad de esta familia de antifúngicos depende de su afinidad por el citocromo P450 de mamíferos, ya que al unirse al mismo impediría que dicho citocromo ejerza su acción fisiológica en el paciente (Allevato *et al.*, 2007; Mast *et al.*, 2013; Odds *et al.*, 2003).

1.4.4. Otros antifúngicos

Aparte de estas tres familias, existen otros compuestos antifúngicos de uso clínico eficaces contra *Candida spp.* En algunos casos, aún se desconoce la diana celular o el mecanismo de acción aunque todos ellos presentan una gran actividad antifúngica con una toxicidad aceptable en el paciente. Destacan, entre otros, la **terbinafina** que inhibe la síntesis de ergosterol, las **sordarinas** que interfieren en la síntesis de distintos factores de elongación o el **ciclopirox**, cuyo mecanismo de

acción no se conoce con exactitud aunque se cree que actúa a nivel de membrana y de pared, bloqueando el transporte activo, e interaccionando con sistemas fisiológicos importantes para las células como la reparación del ADN o la división celular (Florez *et al.*, 2008; Odds *et al.*, 2003).

Otro antifúngico de importancia es la **flucitosina** o **5-fluorocitosina**, un derivado fluorado de la citosina con efecto fungistático. Penetra en la célula fúngica al interactuar con la citosina permeasa de membrana y, posteriormente, se transforma en fluorouracilo por acción de la citosina desaminasa, dando lugar a la molécula activa. Ejerce su acción antifúngica en el núcleo mediante la inhibición de la replicación del ADN y la transcripción a ARN (Fig. 1.12) (Catalán y Montejo, 2006; Maubon *et al.*, 2014; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Apenas presenta efectos secundarios, ya que el nivel de conversión a fluorouracilo en células de mamíferos es muy bajo. No obstante, se han descrito algunos efectos nocivos a dosis altas (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

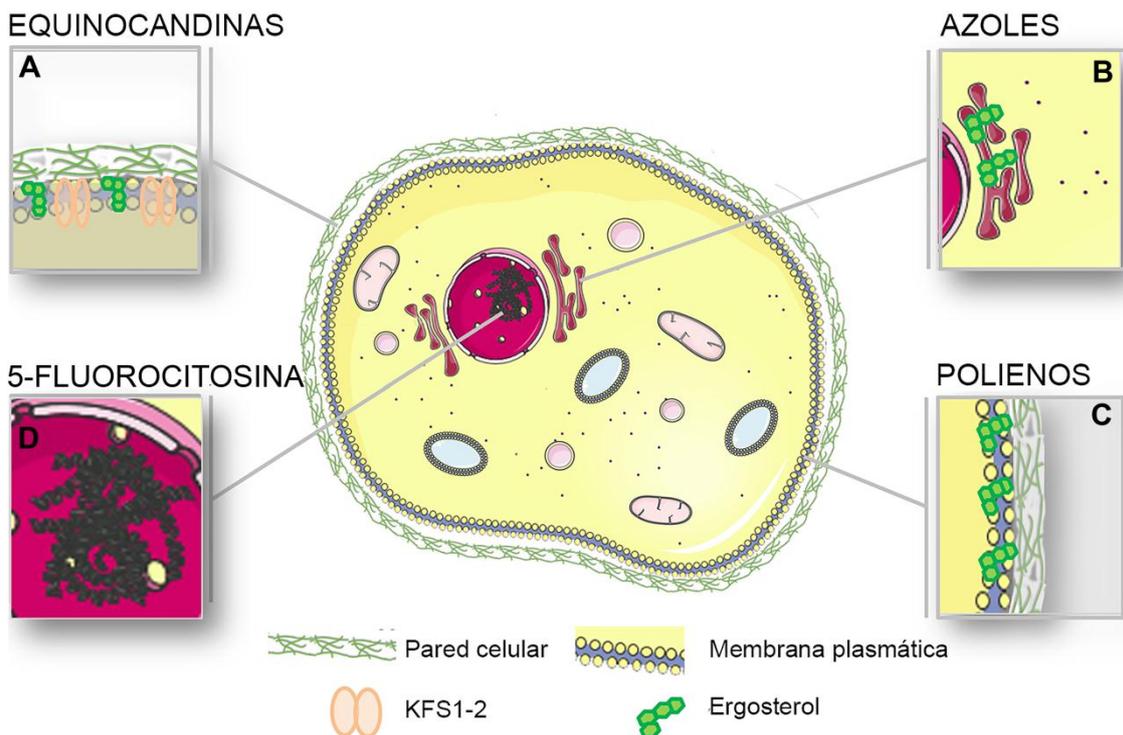


Figura 1.12. Dianas celulares de los principales antifúngicos eficaces contra *C. albicans*. A. Las equinocandinas afectan a la pared celular inhibiendo la síntesis del complejo enzimático β -1,3-glucano sintasa, situado en la cara interna de la membrana plasmática. B. Los azoles inhiben las enzimas implicadas en la síntesis del ergosterol, localizadas en el retículo endoplasmático. C. Los polienos se unen al ergosterol de membrana alterando su permeabilidad selectiva. D. La flucitosina actúa en el núcleo inhibiendo la síntesis de ADN y ARN. Imagen adaptada de Maubon *et al.*, 2014.

1.5. Estrés en levaduras

Todos los organismos vivos, a lo largo de su ciclo vital, están sometidos a cambios bruscos en las condiciones ambientales y/o fisiológicas de su medio, conocidas globalmente como estrés, que pueden llegar a tener carácter letal. Frente al estrés, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos moleculares defensivos con el fin de reparar los daños producidos y protegerse frente a futuras agresiones ambientales imprevistas, o de origen interno. En los microorganismos patógenos, esta respuesta protectora y adaptativa, está ligada a su capacidad para colonizar al hospedador vivo o diseminarse en otros ambientes.

Por su condición de eucariotas unicelulares, las levaduras han sido ampliamente utilizadas como un modelo para estudiar este fenómeno. Las células de levaduras son particularmente sensibles a la disponibilidad de nutrientes, así como a grandes e imprevistas fluctuaciones en su ambiente físico, desarrollando eficaces respuestas de protección y tolerancia. Estas respuestas están reguladas a nivel transcripcional mediante la presencia de secuencias promotoras conservadas, conocidas como “**elementos de respuesta a estrés**” (STRE). Son activadas por perturbaciones metabólicas y/o ambientales, y coordinan la expresión inducida de un conjunto de genes frente al estrés. De este modo, se produce un mecanismo de “respuesta general a estrés” que garantiza la adecuada protección celular, así como la adquisición de tolerancia frente a cualquier condición adversa (Estruch, 2000; Hohmann y Mager, 2003; Mager y Ferreira, 1993).

Entre los eucariotas, las rutas MAPKs (*Mitogen Activating Protein Kinases*) han sido estrictamente conservadas como un mecanismo principal de transducción intracelular de señales provocadas por estímulos externos, dando lugar a una respuesta de reprogramación génica a nivel transcripcional (Alonso-Monge *et al.*, 2006). En levaduras, los estreses ambientales más ampliamente investigados son el oxidativo, osmótico y térmico. Además el estrés oxidativo junto con el nitrosativo son producidos por las células fagocitarias del sistema inmunitario (Mayer *et al.*, 2013).

El **estrés térmico** se desencadena por cambios bruscos en la temperatura fisiológica de crecimiento (las levaduras patógenas son mesófilas). Es responsable del plegamiento conformacional inadecuado de las proteínas, así como de un incremento en la fluidez de la membrana plasmática y de un deterioro de las moléculas de ARN. En consecuencia, las células responden induciendo la síntesis de una serie de proteínas llamadas "*Heat Shock Proteins*" (HSPs) y también del disacárido trehalosa, que actúan como chaperonas moleculares (Singer y Lindquist, 1998). Su acción es muy importante, ya que evitan la tendencia de las proteínas a desnaturalizarse y la agregación de proteínas parcialmente desnaturalizadas tras el aumento de la temperatura, restableciendo la estructura nativa de las mismas y evitando la alteración de las membranas biológicas (Leach y Cowen, 2013; Mayer *et al.*, 2013; Singer y Lindquist, 1998).

Por su parte, el **estrés osmótico** (salino) tiene lugar cuando las células se ven expuestas a altas concentraciones de sales u otros compuestos como NaCl, KCl, sacarosa o sorbitol, creando un ambiente hiperosmótico. El resultado es una disminución del crecimiento celular, debido a la pérdida de turgencia y, finalmente, la muerte por lisis. Para contrarrestar la salida de agua, las células sintetizan y acumulan glicerol y trehalosa, eliminan el exceso de iones del espacio extracelular mediante distintos sistemas de transporte, e incrementan la carbonilación de proteínas y la peroxidación de lípidos de membrana (Estruch, 2000; Garre *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2013; Sharma, 1997). Además, el ión Na⁺ no sólo es responsable del estrés osmótico sino también de la llamada toxicidad sódica, denominada "estrés salino" (Hohmann y Mager, 2003; Mayer *et al.*, 2013).

El **estrés oxidativo** en organismos aerobios se debe a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado del metabolismo celular oxidativo (principalmente respiración o β -oxidación de ácidos grasos), junto a la adición de agentes oxidantes externos (peróxido de hidrógeno, menadiona, diamida), metales pesados, o la luz ultravioleta (Halliwell, 2006; Jamieson, 1998; Morano *et al.*, 2012).

Las especies reactivas de oxígeno son productos obtenidos a partir de la reducción del oxígeno molecular (O₂), un bi-radical libre que posee dos electrones

no apareados en su capa exterior, pudiendo aceptar hasta un par de electrones. Su reducción completa requiere, por tanto, 4 electrones hasta la producción de una molécula de agua. Sin embargo, también puede ocurrir reducción en pasos univalentes dando lugar a los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y al peróxido de hidrogeno (H_2O_2), citados de mayor a menor toxicidad (Fig. 1.13). El O_2 también se puede excitar dando lugar al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), un poderoso oxidante (Morano *et al.*, 2012).

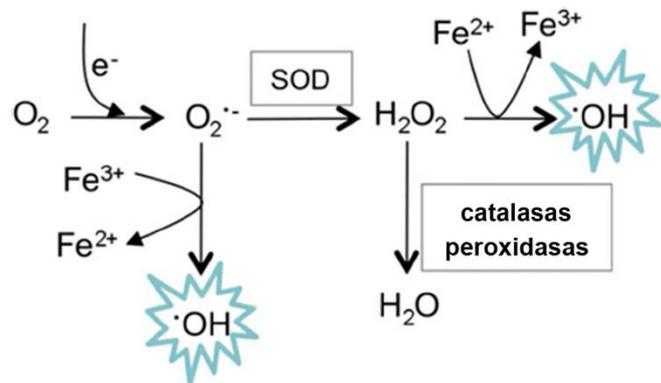


Figura 1.13. Formación de especies reactivas de oxígeno. El oxígeno molecular, al recibir un electrón, se reduce dando lugar al anión $\text{O}_2^{\cdot-}$. A su vez, este anión puede dar lugar a $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton o dismutarse, espontáneamente o por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) a H_2O_2 . Por medio de catalasas o peroxidasas, el H_2O_2 puede detoxificarse dando lugar a H_2O o reducirse hasta $\cdot\text{OH}$ por la reacción de Haber-Weiss, donado electrones al Fe^{3+} . Figura adaptada de Morano *et al.*, 2012.

Los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno son muy importantes en la destrucción de diferentes patógenos localizados en la superficie de las mucosas, llevada a cabo por la acción de las células fagocitarias del sistema inmunitario (macrófagos y neutrófilos) que dañan componentes esenciales para la supervivencia celular como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014; González-Párraga *et al.*, 2008; Jamieson, 1998; Morano *et al.*, 2012). Así, la peroxidación de lípidos disminuye la fluidez y la integridad de la membrana celular; el $\text{O}_2^{\cdot-}$ oxida enzimas que contienen centros de hierro-azufre (Fe/S), perdiendo su funcionalidad; o se pueden oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos por acción del H_2O_2 (Dantas *et al.*, 2015; Stadtman y Levine, 2003). El daño causado sobre el ADN se produce por modificaciones químicas de las bases nitrogenadas, alteraciones estructurales, roturas dobles y simples de la doble hélice, o la formación de uniones cruzadas (Dantas *et al.*, 2015).

En las células humanas, las perturbaciones causadas por ROS están asociadas a enfermedades de gran relevancia clínica, como el Parkinson, la diabetes o la esclerosis lateral, cáncer, artritis, enfermedades cardiovasculares o envejecimiento (Berlett y Stadtman, 1997; Morano *et al.*, 2012). Debido a su alta toxicidad, muchos organismos han desarrollado mecanismos específicos de defensa contra ROS, como la síntesis o activación de ciertas moléculas o enzimas protectoras. Algunos serán analizados en detalle en la presente Memoria.

Por último, el **estrés nitrosativo** tiene lugar por la acumulación de especies reactivas de nitrógeno (RNS), producidas durante el estallido respiratorio de las células fagocíticas. Las principales RNS formadas en el fagolisosoma son el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y los peroxinitratos ($\text{ONOO}\cdot$). *C. albicans* es capaz de eliminar estas RNS gracias a la enzima Yhb1p, una flavoproteína capaz de detoxificar $\text{NO}\cdot$. Esta enzima está implicada en la virulencia de la levadura (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014; Mayer *et al.*, 2013)

1.5.1 Sistemas antioxidantes de defensa

Para protegerse del daño oxidativo, las levaduras poseen mecanismos defensivos que incluyen la activación de sistemas antioxidantes enzimáticos (glutatión reductasas y peroxidasas, catalasas superóxido dismutasas, glutarredoxinas, tioredoxinas, etc), junto con sistemas antioxidantes no enzimáticos (glutatión, carotenoides, tocoferol y las vitaminas C y E, entre otros compuestos) (França *et al.*, 2007; Moradas-Ferreira y Costa, 2000).

En la presente Memoria, se han estudiado primordialmente varias enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa), por lo que centraremos nuestro análisis en la revisión de estos mecanismos.

✓ Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una hemoenzima tetramérica, cuyos monómeros presentan un grupo Fe (III) en su centro catalítico. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, estando presente en todos los microorganismos aerobios, plantas y células animales. Su actividad se localiza

principalmente en los peroxisomas, aunque también puede aparecer soluble en el citosol, mitocondrias y retículo endoplasmático (Aebi, 1984; Hamilton y Holdom, 1999).

En levaduras cumple una función esencial como reguladora de los niveles de H₂O₂, formado tras la dismutación del radical superóxido (O₂^{•-}) por varios tipos de oxidasas. La gran potencia catalítica de la catalasa hace que sea efectiva en ambientes con concentraciones muy elevadas del agente oxidante. *C. albicans* posee una catalasa (Cta1p) que le confiere resistencia frente a H₂O₂ y es importante para la virulencia (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014). La catalasa ejerce una doble función al catalizar las siguientes reacciones:

1. Descomposición del H₂O₂ a H₂O y O₂.



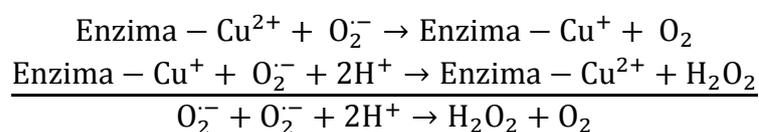
2. Oxidación de los donadores de H⁺ como el metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles, con la degradación simultánea de un mol de peróxido.



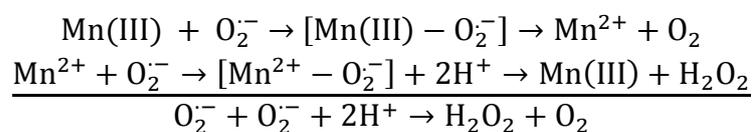
✓ Superóxido dismutasa

Las superóxido dismutasas (SOD) (EC. 1.15.1.1) conforman un grupo de metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido (O₂^{•-}), produciendo H₂O₂ y O₂ a través de reacciones de reducción y oxidación del metal de transición en el centro activo. En levaduras se ha descrito la presencia de dos isoenzimas con distinta actividad, codificados por seis genes (*SOD1-6*), clasificados en función del cofactor metálico que presentan (Frohner *et al.*, 2009; Gralla y Kosman, 1992; Jamieson *et al.*, 1996):

1. **Cu-Zn SOD**, presente en el citoplasma (Sod1) o anclada por GPI a la superficie celular (Sod4, Sod5 y Sod6). Es sensible a CN⁻ y H₂O₂. Responsable del 84% de la actividad SOD total en *C. albicans*.



2. **Mn SOD** (Sod2 y Sod3), se localiza en la mitocondria y es resistente a cianuro (CN⁻) y H₂O₂. Supone el 16% de la SOD total de *C. albicans*.



Sod1 y Sod4 protegen frente a los O₂⁻ producidos por los macrófagos y están implicados en la virulencia en un modelo murino, al igual que Sod5, inducida en la transición levadura micelio e implicada en la detoxificación de los radicales formados por las células dendríticas, así como durante la fase logarítmica y el crecimiento hifal. Sod2, Sod3 y Sod6 no tienen efecto sobre la virulencia pero protegen de los radicales superóxido formados intracelularmente (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2002, 2003; Martchenko *et al.*, 2004).

✓ **Glutación reductasa**

El glutati3n (γ -glutamyl-cisteinyl-glicina, GSH) es el tripéptido ti3lico no proteico m3s abundante en las c3lulas eucariotas y se localiza en el citoplasma. Destaca su funci3n como antioxidante, debido a su interacci3n directa con las especies reactivas de ox3geno, o como donador de electrones procedentes de NADPH para la actividad de enzimas reductoras como la glutati3n peroxidasa (GPX) o las glutaredoxinas (Grx) (Fujii *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2009; Toledano *et al.*, 2013).

La glutati3n reductasa (GR) (E.C. 1.6.4.2) es una flavoprote3na oxido-reductasa localizada en el citosol. Est3 constituida en levaduras por dos subunidades id3nticas de 60 kDa, con un pH 3ptimo de 7,1 (Grant *et al.*, 1996). Forma parte del sistema glutarrodoxina que transfiere electrones a trav3s del GSH a unas prote3nas citos3licas denominadas glutarrodoxinas (implicadas en la reducci3n de los puentes disulfuro de prote3nas oxidadas), dando lugar a glutati3n oxidado (GSSG), formado por la uni3n de dos mol3culas GS \cdot mediante enlaces S-S (Fig. 1.14) (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014; Fujii *et al.*, 2011).

La función de la GR es volver a reducir el GSSG a GSH, usando NADPH como donador de electrones (procedente en su mayoría de la ruta de las pentosas fosfato):



A su vez, el GSH formado puede ser también oxidado por GPX, donando electrones en este caso para la reducción de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos e hidroperóxidos lipídicos a sus correspondientes compuestos alcohólicos (Fujii *et al.*, 2011; Toledano *et al.*, 2013).

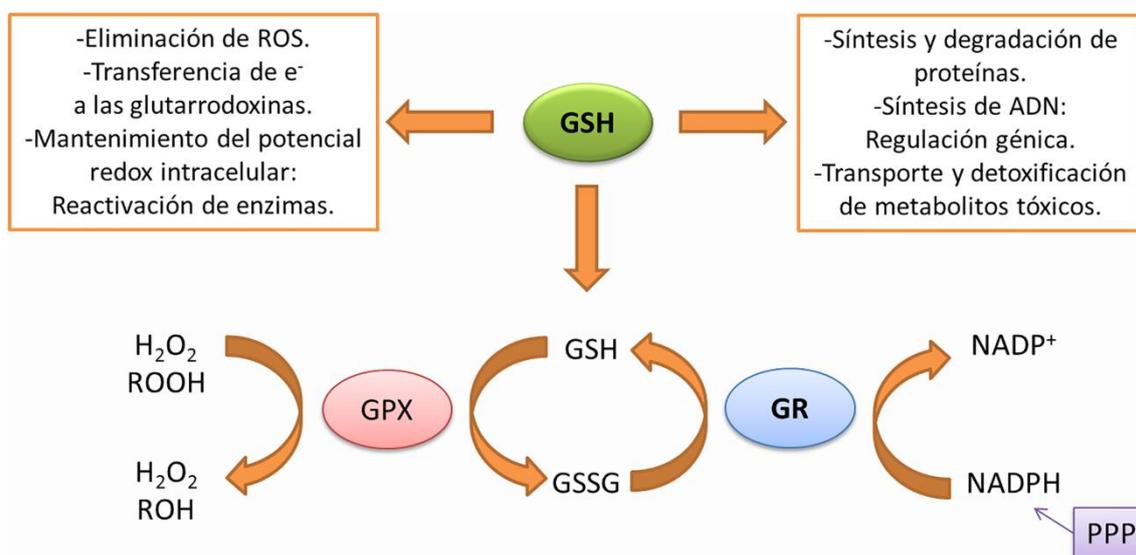


Figura 1.14. Funciones y metabolismo del glutatión. El glutatión (GSH) desempeña diversas funciones en levaduras. Su oxidación por acción de la glutatión peroxidasa (GPX) permite la reducción de distintos hidroperóxidos. A su vez, el glutatión oxidado (GSSG) puede volver a su forma reducida gracias a la glutatión reductasa (GR) usando el NADPH como donador de electrones, procedente en su mayoría de la ruta de las pentosas fosfato (PPP).

1.7. La trehalosa: función y metabolismo

La trehalosa es un disacárido no reductor constituido por dos moléculas de glucosa unidos por un enlace α : 1-1 (α -D-glucopiranosil 1,1 α -D-glucopiranosido). Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y ha sido aislado de varias especies de bacteria, hongos, invertebrados y plantas. Sin embargo, está ausente en mamíferos (Argüelles, 2014; Elbein, 2003; Nwaka y Holzer, 1998).

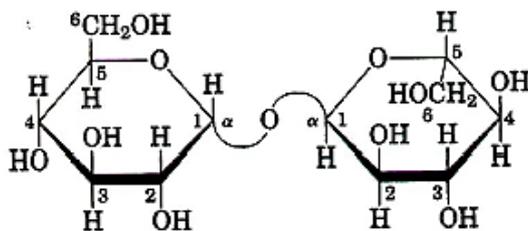


Figura 1.15: Estructura molecular del disacárido trehalosa.

La trehalosa posee una serie de propiedades físicas singulares y exclusivas, como una alta hidrofiliidad y estabilidad química, formación de cristales no higroscópicos y la ausencia de puentes de hidrogeno internos (Argüelles, 2000; Richards *et al.*, 2002). Estas características hacen que este disacárido constituya uno de los principales mecanismos de defensa frente a diferentes formas de estrés (Argüelles, 2000, 2014; Estruch, 2000; Iturriaga *et al.*, 2009).

Estas propiedades fisicoquímicas le confieren gran potencialidad en aplicaciones biotecnológicas, que le permiten su utilización como aditivo alimentario para preservar las características organolépticas de frutas y vegetales; mantener la estabilidad y propiedades de ciertos complejos macromoleculares. En cosmética sirve para eliminar malos olores emitidos por la piel humana; y como profiláctico se emplea en la preservación de tejidos y órganos, alimentos, enzimas, vacunas, células, etc. A nivel fisiológico, la trehalosa también está involucrada en la regulación del metabolismo del carbono, la ruta de las pentosas fosfato y la fotosíntesis, así como en varias etapas del desarrollo de las plantas, como la formación de los embriones o la floración (Argüelles, 2014; Eleutherio *et al.*, 2015; Iturriaga *et al.*, 2009)

En relación con los objetivos de esta Memoria, un aspecto destacable de la trehalosa proviene de ser un factor de patogenicidad, tanto en micobacterias como en hongos patógenos. Observaciones previas de otros laboratorios, así como trabajos previos de nuestro grupo en la levadura oportunista *C. albicans*, han puesto de manifiesto que los genes *TPS1* (trehalosa-6P sintetasa) y *TPS2* (trehalosa-6P-fosfatasa) responsables de la síntesis de trehalosa, son determinantes de virulencia. A su vez, los correspondientes mutantes

homocigóticos interrumpidos (*tps1Δ* y *tps2Δ*) experimentan un notable descenso de su capacidad infectiva, son sensibles a estrés oxidativo severo y muestran alteraciones tanto en la arquitectura de la pared celular como en el desarrollo de micelios funcionales (Van Dijck *et al.*, 2002; González-Párraga *et al.*, 2011; Martínez-Esparza *et al.*, 2007, 2009; Pedreño *et al.*, 2007; Tournu *et al.*, 2013; Zaragoza *et al.*, 1998, 2002).

✓ **Función protectora de la trehalosa frente a estrés**

Las levaduras también son un modelo en estudios de infectividad relacionados con el estrés celular, por su capacidad para desarrollar procesos de respuesta adaptativa. En consecuencia, soportan la acción de agentes potencialmente letales, mejorando su nivel de supervivencia en condiciones adversas de estrés (limitación de nutrientes, altas y bajas temperaturas, fuerte acidificación, presencia xenobióticos, condiciones de hipoxia o estrés oxidativo), siempre y cuando hayan sido previamente sometidas a una exposición moderada del estrés. En la mayoría de los casos, la implicación de la síntesis de trehalosa durante estos procesos ha sido inequívocamente demostrada, suficiente para garantizar dicha respuesta adaptativa (Argüelles, 2014; Elbein, 2003; González-Párraga *et al.*, 2011; Van Laere, 1989; Thevelein, 1996; Wiemken, 1990). Adicionalmente y sólo en algunas especies, los genes involucrados en la síntesis e hidrólisis de trehalosa contienen elementos de respuesta a estrés (STRE) en la región promotora (Argüelles, 2000; Eleutherio *et al.*, 2015; Estruch, 2000; Hohmann y Mager, 2003; Mager y Ferreira, 1993).

La trehalosa interviene en la estabilización de membranas celulares y en el mantenimiento de la estructura nativa de las proteínas; así como evitando la agregación de proteínas parcialmente desnaturalizadas; también parece estar implicada en los mecanismos de diferenciación y desarrollo celular. Además, mejora la fermentación de las levaduras e incrementa la producción de etanol. Actúa como sustituto del agua, durante periodos prolongados de deshidratación, uniéndose a las cabezas polares de los fosfolípidos para preservar las propiedades de una membrana funcional. También parece actuar como antioxidante ya que disminuye la carbonilación de proteínas en levaduras sometidas estrés con

peróxido y superóxido. Es importante señalar que la hidrólisis enzimática del disacárido es necesaria durante la recuperación del estrés para permitir que las chaperonas lleven a cabo su acción de renaturalización sobre las proteínas dañadas (Eleutherio *et al.*, 2015; Singer y Lindquist, 1998; Thevelein, 1996).

✓ La trehalosa como reserva energética

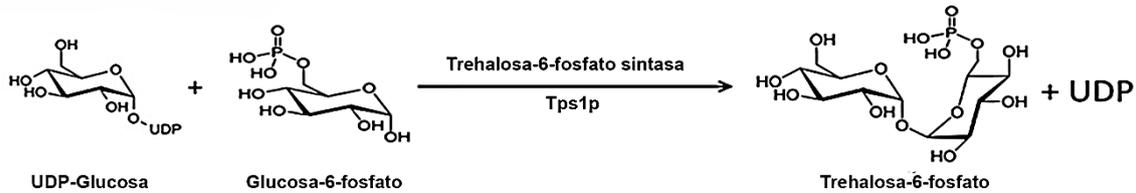
La trehalosa desempeña una importante función como reserva de carbono y energía, acumulándose en determinadas etapas del ciclo de crecimiento, cuando un almacenamiento de energía resultaría beneficioso, caso de la fase estacionaria, el ayuno provocado o la esporulación. Esta misma función de reserva energética es clásicamente desempeñada por el glucógeno, quedando relegada la degradación de la trehalosa a periodos donde ya han sido agotadas las reservas del mismo: fase de muerte celular, reanudación del crecimiento en medio fresco o germinación de las esporas (Argüelles, 2000; Elbein, 2003). El glucógeno es almacenado durante la fase exponencial cuando hay exceso de glucosa exógena; mientras que la síntesis de trehalosa no tiene lugar hasta que los niveles de glucosa están próximos al agotamiento y las células entran en fase estacionaria.

Como queda resaltado, los mecanismos de síntesis y degradación de este disacárido y su regulación, tienen gran importancia a distintos niveles. Por tanto, procederemos a comentar con detalle sus características principales.

1.7.1. Biosíntesis

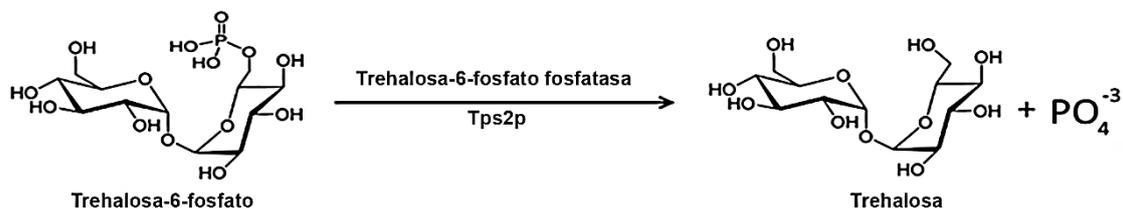
La concentración de trehalosa intracelular en levaduras apenas es detectable en fase logarítmica de crecimiento sobre azúcares fermentables. Por el contrario, altos niveles de este disacárido se acumulan en fase estacionaria y en esporas. Además, las células cultivadas en medios con fuentes de carbono no fermentables presentan altos niveles de trehalosa, independientemente del estadio de crecimiento (Van Dijck *et al.*, 1995; Eleutherio *et al.*, 2015; Nwaka y Holzer, 1998). Este incremento de trehalosa intracelular se debe a la activación de la maquinaria biosintética en el citosol (Wiemken, 1990). La biosíntesis de trehalosa tiene lugar en dos etapas fundamentales (Cabib y Leloir, 1958):

Primera etapa: La enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (Tps1p) (E.C. 2.4.1.15) cataliza la transferencia de glucosa desde el donador UDP-glucosa a glucosa-6-fosfato, obteniendo trehalosa-6-fosfato (T6P). Se trata de una reacción irreversible. Tps1p es codificada por el gen *TPS1* y es una enzima dependiente de Mg^{2+} que presenta un máximo de actividad a pH 6,6.



Adicionalmente, se ha demostrado que T6P actúa como una molécula de señalización, modulando la glicolisis en ciertas levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* o *Kluyveromyces lactis*), mediante inhibición de las hexoquinas 1 y 2 responsables de la fosforilación de glucosa al inicio de la glucolisis (Blázquez *et al.*, 1993; Eleutherio *et al.*, 2015; Thevelein, 1996).

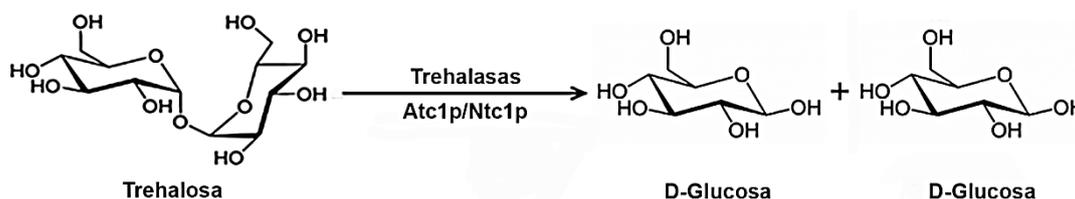
Segunda etapa: se desfosforila el grupo fosfato de T6P obteniendo trehalosa libre y fosfato inorgánico, responsable de la activación enzimática (De Virgilio *et al.*, 1993). Esta reacción está regulada por la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2p) codificada en levaduras por el gen *TPS2* (Gancedo y Flores, 2004; Iturriaga *et al.*, 2009; Singer y Lindquist, 1998).



También se ha descrito la presencia de otras dos proteínas reguladoras (Tps3p y Tts1p). Son necesarias para la estabilización y máxima actividad del complejo trehalosa sintasa (Eleutherio *et al.*, 2015).

1.7.2. Hidrólisis

La hidrólisis de trehalosa tiene lugar por la acción de una serie de enzimas pertenecientes al grupo de las α -glucosidasas, ampliamente distribuidas en la biosfera y con estricta especificidad de sustrato, que se denominan trehalasas (E.C. 3.2.1.28) cuya estructura está altamente conservada (Barraza y Sánchez, 2013). El catabolismo de la trehalosa da lugar a dos moléculas de α -D-glucosa. Su función es la de movilizar el disacárido para proporcionar energía y/o sustratos a las células (Eleutherio *et al.*, 2015; Iturriaga *et al.*, 2009). Se trata de una reacción reversible *in vitro* aunque *in vivo* el equilibrio tiende a la degradación de la trehalosa.



C. albicans presenta dos tipos diferentes de trehalasas, distinguibles por su localización celular, sus propiedades catalíticas, su función y los mecanismos de regulación: la enzima neutra y la enzima ácida.

Trehalasa neutra (Ntc1p): presenta una actividad óptima a pH aproximadamente neutro (6,5-7,0). Está codificada por el gen *NTC1* y regulada por fosforilación dependiente de AMPc. Se trata de una enzima citosólica que interviene en la movilización de trehalosa endógena en distintas etapas del ciclo celular; o en respuesta a la acción de diversos estímulos, como la recuperación de un choque térmico o la reanudación del crecimiento de cultivos procedentes de fase estacionaria (Argüelles, 2000). No está involucrada en la formación de hifas, patogenicidad o resistencia a estrés oxidativo (Eck *et al.*, 1997). Se activa por la acción de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mn^{2+} , mostrando valores catalíticos máximos en presencia de azúcares fermentables, siendo fuertemente inhibida por ATP (Nwaka y Holzer, 1998; Thevelein, 1996).

Trehalasa ácida (Atc1p): su actividad óptima se da a pH ácido (4,0-5,0), aunque también presenta un grado de actividad notable a pH neutro (Sánchez-Fresneda *et al.*, 2009). Codificada por el gen *ATC1*, no está regulada por

fosforilación y se localiza embebida en la pared celular. Tampoco resulta estimulada por cationes divalentes ni inhibida por la acción del ATP. Esta enzima está sujeta a represión catabólica por glucosa y su función es, principalmente, la hidrólisis de la trehalosa exógena. Se ha sugerido un posible papel en la virulencia, aunque es prescindible para el dimorfismo. Este hecho, unido a que la proteína posee un teórico péptido señal hidrofóbico en la región N-terminal y 20 sitios potenciales de N-glicosilación, sugiere que la disrupción del gen *ATC1* altera, probablemente, la estabilidad de la superficie celular con la correspondiente reducción de infectividad. Asimismo, se ha comprobado que la mutación homocigótica nula en el gen *ATC1*, confiere a *C. albicans* una mayor capacidad de resistencia frente a estrés oxidativo, térmico y salino, así como un retraso en el inicio de la transición dimórfica levadura-micelio (Pedreño *et al.*, 2004, 2007).

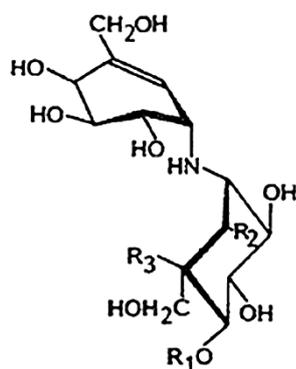
Por último, es importante señalar que la actividad trehalasa ácida (Atc1p) tiende a aumentar en fase estacionaria, coincidiendo con la acumulación de trehalosa endógena. En cambio, la actividad neutra es elevada en cultivos en fase exponencial y disminuye en fase estacionaria. Además, la secuencia del gen *ATC1* no muestra semejanza reseñable con la secuencia de *NTC1* (Argüelles, 2000; Pedreño *et al.*, 2004, 2006, 2007).

1.8. Inhibidores de las trehalasas fúngicas

Desde hace varios años, nuestro grupo de trabajo está muy interesado en la investigación de las enzimas involucradas en el metabolismo de trehalosa como dianas potenciales para la obtención de nuevos antibióticos con acción antifúngica. En consecuencia, resulta interesante y tiene carácter prioritario la investigación centrada en compuestos naturales que puedan inhibir las rutas implicadas en la biosíntesis y/o hidrólisis del disacárido. Los argumentos esenciales que sustentan esta hipótesis son: A) este azúcar no reductor está presente en bacterias, hongos, plantas e invertebrados, pero está ausente en mamíferos; B) la acumulación intracelular de trehalosa ocurre durante infecciones *in vivo* por hongos y en respuesta a la adición de anfotericina B; C) en *C. albicans*, la interrupción de genes que codifican las enzimas biosintéticas de trehalosa reduce la virulencia.

A continuación, se presenta una breve revisión de los principales inhibidores naturales de las trehalasas o del complejo trehalosa sintetasa, centrándose con más de detalle en la validamicina A, compuesto de estudio en la presente Memoria.

Validamicinas: el complejo “validamicina” es producido por la subespecie *limoneus* de *Streptomyces hygroscopicus*. Dentro de esta familia encontramos a las validamicinas A, B, C, D, E, F y G que contienen como fracción aglicona validoxilamina A, B o G según el tipo (Figura 1.16). De todas, la **validamicina A** es el componente principal de la familia y uno de los más activos contra el tizón de la vaina de arroz provocado por *Rhizoctonia solani*, junto con la trehazolina (Asano *et al.*, 1987). El efecto de la validamicina A es específico para trehalosa, y no produce una inhibición significativa sobre las α -glicohidrolasas en conjunto (Asano *et al.*, 1987), aunque parece reprimir la inducción de varias hidrolasas fúngicas (Robson *et al.*, 1989).



Validoxilamina A (VA-A)	$R_1=R_2=R_3=H$
Validoxilamina B (VA-B)	$R_1=R_3=H$ $R_2=OH$
Validoxilamina G (VA-G)	$R_1=R_2=H$ $R_3=OH$
Validamicina A (Val A)	$R_1=\beta$ -D-Glucopiranosil $R_2=R_3=H$
Validamicina B	β -D-Glucopiranosil-VA-B
Validamicina C, E y F	α -D-Glucopiranosil-Val A
Validamicina D	α -D-Glucopiranosil-VA- A
Validamicina G	$R_1= \beta$ -D-Glucopiranosil $R_2=H$ $R_3=OH$

Figura 1.16. Estructura general de las distintas validamicinas.

La validamicina A es un compuesto aminociclitol con probada actividad fungicida en algunos sistemas. Está constituido por la unión, mediante un enlace β -glucosídico, de validoxilamina A y D-glucosa (Figura 1.6), reacción catalizada por la acción de una pseudoglicosiltransferasa (Asamizu *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2004).

El componente validoxilamina A se caracteriza por ser estructuralmente similar al disacárido trehalosa y, por tanto, es un potente inhibidor de las trehalasas, ya que compite con el sustrato, trehalosa, por ocupar el centro activo de la enzima. En estudios previos realizados con *Rhizoctonia solani* (Asano *et al.*, 1987), se observó que la validamicina A es transportada por la célula más eficazmente que la validoxilamina A, y es posteriormente hidrolizada por una β -glucosidasa, generando validoxilamina A.

Es de gran interés el hecho de que tanto validamicina A como otros compuestos semejantes afectan a las trehalasas de insectos, provocando anomalías morfológicas letales durante la metamorfosis, mostrando un importante potencial como insecticidas (Asano *et al.*, 1990). También inhibe la trehalasa de algunas plantas como se ha descrito en numerosos estudios. Así, Müller *et al.* (1995), demuestran que validamicina A provoca un incremento del contenido endógeno de trehalosa, junto con la disminución simultánea de sacarosa y del "pool" de almidón en los nódulos de soja (*Glycine max* L. Merr.), sin afectar a la fijación de nitrógeno. Datos similares se obtuvieron en plántulas y nódulos de frijoles (*Vigna unguiculata* L.). Del mismo modo, los microtubérculos de patata y las plantas de tabaco acumulan cantidades significantes de trehalosa cuando son cultivados con validamicina A, mientras que las muestras control sin el inhibidor no presentaban niveles reseñables de trehalosa (Godijn *et al.*, 1997).

Trehazolina: es considerada como el inhibidor de trehalasas más potente y, como la validamicina A, es utilizada comúnmente para controlar el tizón de la hoja de la vaina de arroz, producida por el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Se trata de un inhibidor competitivo, reversible, lento y de fuerte unión (Ando *et al.*, 1995). Tanto la trehazolina como sus análogos se caracterizan por tener una importante aplicación potencial en inmunología, virología y oncología. La trehazolina fue aislada y purificada de los caldos de cultivo de la cepa SANK 62390 de *Micromonospora* spp. (Ando *et al.*, 1991).

Trehalosamina: pertenece a la familia de los antibióticos aminoglicósido disacáridicos, que presentan un enlace 1,1'-glicosídico. Es una familia amplia y heterogénea de aminoglucósidos, que son aislados de fuentes naturales, o

sintetizados químicamente. Tienen un gran potencial como nuevos antibióticos de valor clínico. El principal miembro de la familia es la α,α -trehalosamina aislada de *Streptomyces* (Hui y Chang, 2002; Umezawa y Hooper, 1982).

Nojirimicina: el antibiótico nojirimicina es producido por varias cepas de *Streptomyces* y su forma reducida, 1-deoxinojirimicina, es sintetizada por ciertas especies de *Bacillus*. Tanto nojirimicina como deoxinojirimicina son inhibidores específicos de glucosidasas (Fuhrmann *et al.*, 1985).

Calisteginas: fue aislado inicialmente de raíces de *Calystegia sepium* (Tepfer *et al.*, 1988) como un metabolito secundario. Desde entonces los miembros de su familia se han localizado en frutas, vegetales, polillas y mariposas. Este compuesto es un inhibidor específico de la actividad glicosidasa, particularmente glucosidasas y galactosidasas, y son usados en medicamentos quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer, en infecciones virales y trastornos metabólicos como la diabetes (Kaliappan *et al.*, 2009).

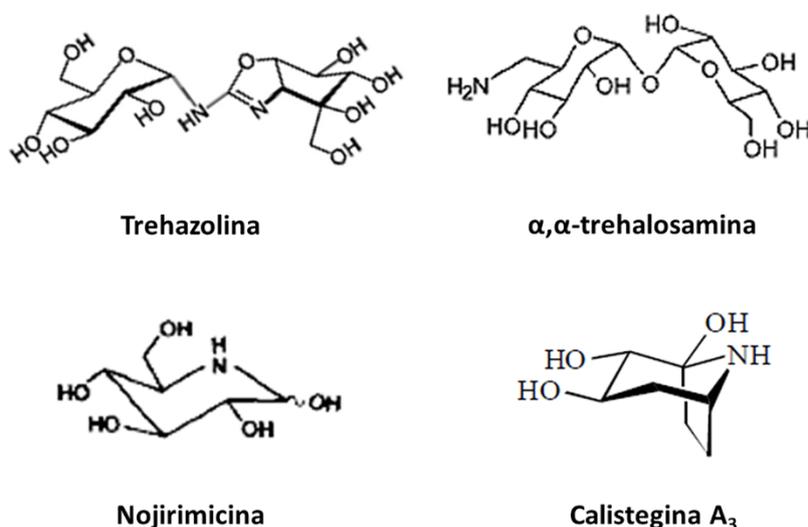


Figura 1.17. Estructura molecular de los principales inhibidores de trehalasas.

La mayoría de estos inhibidores específicos de las trehalasas (Fig. 1. 17) todavía no están disponibles en formato comercial accesible. En consecuencia, el capítulo de la presente Memoria dedicado a estos estudios se ha basado exclusivamente en evidencias experimentales con la validamicina A.

1.9. Respuesta inmunitaria frente a infecciones

El ser humano dispone de una amplia variedad de mecanismos defensivos contra infecciones fúngicas que necesitan de una gran coordinación.

La **inmunidad innata** constituye el primer sistema de defensa del organismo y está muy conservado filogenéticamente, apareciendo en casi todos los organismos multicelulares (Hoffmann *et al.*, 1999). No requiere sensibilización previa por lo que actúa de forma inmediata, teniendo una especial relevancia en la protección contra infecciones. La piel y las mucosas son las primeras barreras naturales defensivas que posee el organismo. Además, en este tipo de inmunidad también participan fagocitos (neutrófilos y macrófagos), las células dendríticas, las células “natural killers” (NK), diversas proteínas del complemento y otras mediadoras de la inflamación, y las citoquinas (Fig. 1.18).

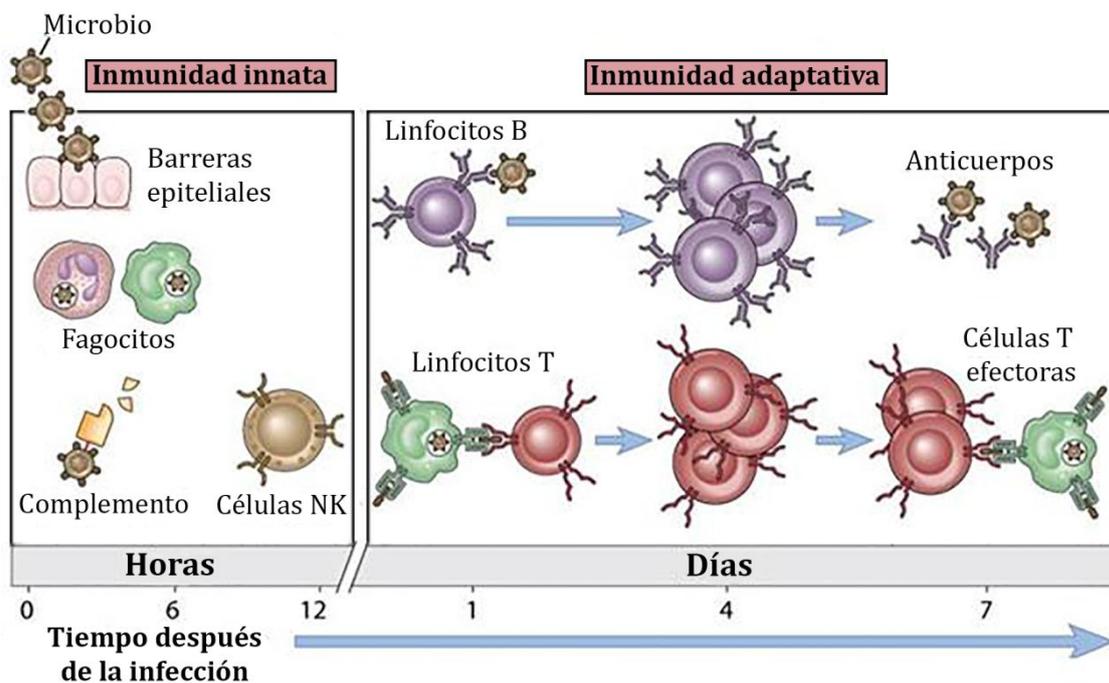


Figura 1.18. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra las infecciones, activándose posteriormente la inmunidad adaptativa (Abbas *et al.*, 2012).

La **inmunidad adaptativa** se inicia después de la innata. Los principales componentes son los linfocitos (T y B), y sus productos de secreción como los anticuerpos (Fig. 1.18). Estas células presentan receptores específicos en su superficie con distribución clonal -TCR para los linfocitos T, y BCR o inmunoglobulina (Ig) de membrana para los linfocitos B-, capaces de reconocer de forma muy específica una gran diversidad de moléculas extrañas a nuestro organismo. Las células B están involucradas en la respuesta inmunitaria humoral, mientras que las células T lo están en la respuesta inmunitaria mediada por células. Estos linfocitos B y T no sólo actúan como células efectoras para la eliminación de los microorganismos, sino que además desarrollan memoria inmunológica, por lo que son capaces de “recordar” y responder con más fuerza y eficacia en la siguiente exposición al mismo microorganismo (Abbas *et al.*, 2012).

La inmunidad adaptativa tarda días en desarrollarse, por lo que los dos tipos de inmunidad descritos tienden a actuar de forma acoplada y sinérgica. Los defectos producidos en ambos casos predisponen a contraer micosis superficiales o sistémicas, siendo las alteraciones de los fagocitos el factor de riesgo principal para padecer aspergilosis o candidiasis diseminada (Mansour y Levitz, 2002).

1.9.1. Monocitos y macrófagos.

Los monocitos y los macrófagos son células fagocíticas que pertenecen a una estirpe común. Los **monocitos** son los primeros tipos celulares que entran en la sangre después de abandonar la médula ósea y no están diferenciados por completo. Una vez que han penetrado en los tejidos, se diferencian y se convierten en **macrófagos** (Fig. 1.19). Estos macrófagos pueden ejercer múltiples funciones, lo que revela la existencia de diferentes tipos en los estados maduros: de defensa del hospedador, de reparación tisular y de regulación inmunitaria (Abbas *et al.*, 2012; Geissmann *et al.*, 2010; Mosser y Edwards, 2008; Zimmermann *et al.*, 2012).

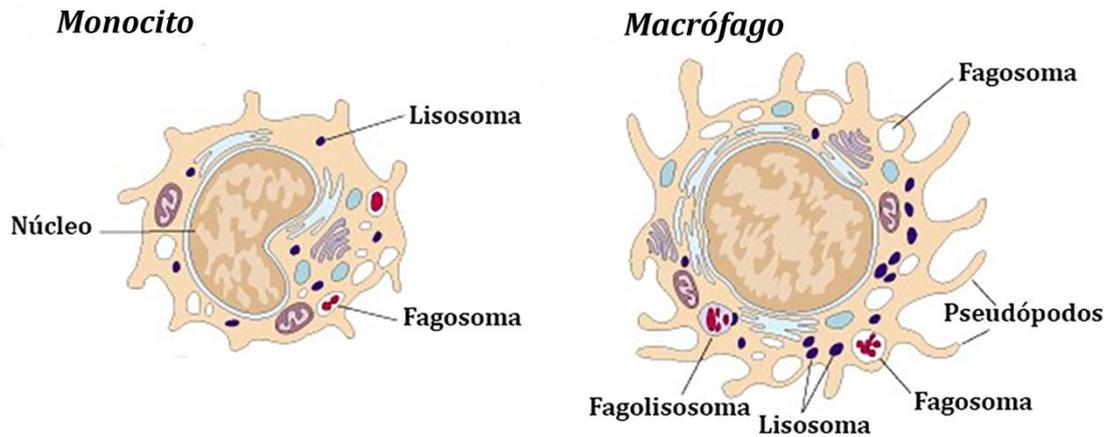


Figura 1.19. Morfología típica de un monocito y un macrófago. Los macrófagos son de 5 a 10 veces más grandes que los monocitos y contienen más orgánulos, especialmente lisosomas.

Los macrófagos intervienen en las interacciones bidireccionales entre la inmunidad innata y adaptativa. En la innata, sus principales funciones consisten en la fagocitosis de partículas extrañas (reconociéndolas directamente mediante receptores presentes en su membrana, o indirectamente a través de receptores de complemento, cuando esas partículas están cubiertas por proteínas del complemento). También producen enzimas y especies reactivas tanto de oxígeno como de óxido nítrico, para eliminar y controlar la diseminación de las infecciones; así como citoquinas, que reclutan otras células inflamatorias en los focos de infección, para controlar la infección y poner en marcha la reparación de los tejidos dañados. En la inmunidad adaptativa, los macrófagos actúan como células presentadoras de antígeno para que sean reconocidos por los linfocitos T. Además, fagocitan antígenos extraños recubiertos de anticuerpos indirectamente a través de receptores de inmunoglobulinas y producen citoquinas que estimulan la proliferación y diferenciación de estos linfocitos (Sharif *et al.*, 2007).

1.9.2 Detección de las levaduras por las células del hospedador

Las células del sistema inmunitario innato presentan un número limitado de receptores, que sirven para el reconocimiento de múltiples patógenos, denominados **PRRs** (*PAMP-Recognition Receptors*). Gracias a estos receptores las células pueden reconocer directamente moléculas conservadas y/o esenciales para la supervivencia de los patógenos denominadas **PAMPs** (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que no están presentes en mamíferos, desarrollando así una

Introducción

defensa genérica inmediata, que previene rápidamente la división de los patógenos dentro del hospedador (Gauglitz *et al.*, 2012; Seider *et al.*, 2010).

Los receptores más importantes implicados en el reconocimiento de *C. albicans*, mostrados en la Fig.1.20, son: receptor de manosa (MR), receptores tipo Toll (TLR), la Dectina-1, Dectina-2, Galectina-3, Mincle y DC-SIGN (Gauglitz *et al.*, 2012; Jouault *et al.*, 2009; Seider *et al.*, 2010).

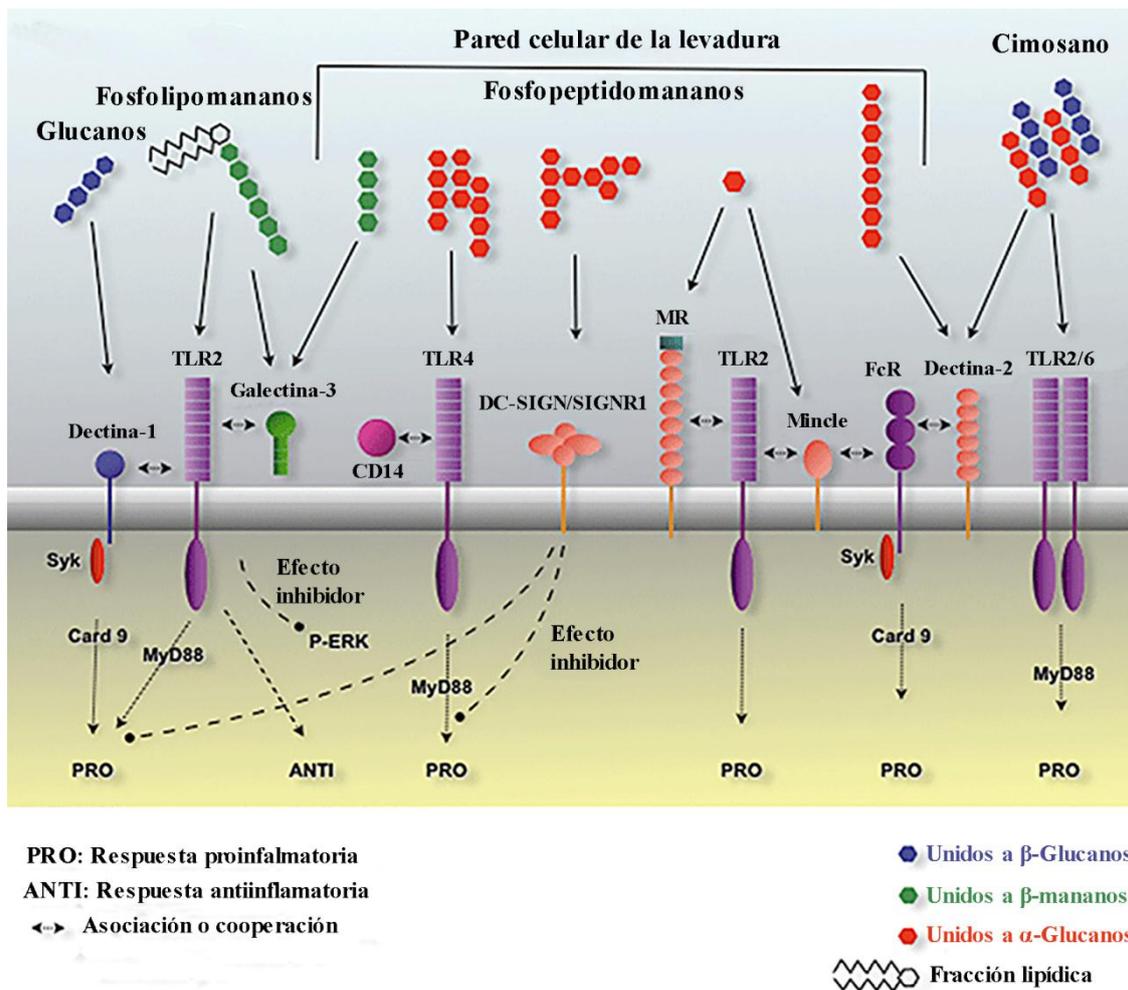


Figura 1.20. Receptores y señalización implicada en la interacción de los fagocitos con *C. albicans*. En la parte superior se muestran los PAMPs expresados por *C. albicans*, sobre la membrana del fagocito, los PRRs implicados en su reconocimiento, y en el interior celular, la vía de señalización y la respuesta que inducen. Adaptado de Jouault *et al.*, (2009).

Diferentes PRRs reconocen y unen diferentes PAMPs activando distintas rutas de transducción de señales que promueven la función antimicrobiana e inflamatoria de las células en las que se expresan (Janeway y Medzhitov, 2002). Tras el reconocimiento de las levaduras, se pueden producir tanto citoquinas proinflamatorias como anti-inflamatorias dependiendo de los PAMPs expresados. El

balance final entre protección e infección es el resultado de un complejo equilibrio molecular entre los componentes de *C. albicans* accesibles a las células del hospedador y los receptores del hospedador con los que interaccionan (Jouault *et al.*, 2009).

1.9.3. Citoquinas

Las **citoquinas** son un grupo de polipéptidos sintetizados y secretados por ciertas células, en respuesta a microorganismos y otros antígenos. Una misma citoquina puede ser sintetizada por diversos tipos celulares. Su función es mediar y regular las reacciones inmunitarias e inflamatorias, actuando como modificadores de la respuesta biológica. Así, las citoquinas se unen a receptores de membrana específicos en las células diana llevando a cabo su acción biológica, de forma local o sistémica. Provocan cambios en la expresión génica que inducen nuevas funciones celulares y, a veces, la proliferación de las células diana. Además, pueden influir en la síntesis y actividad de otras citoquinas de forma aditiva, sinérgica o antagónica.

Las citoquinas proinflamatorias más importantes producidas por los macrófagos son: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6 e IL-12. Dentro de las citoquinas antiinflamatorias destacan IL-10 y TGF- β . A continuación se describen las características más importantes de algunas de ellas:

- **TNF- α :** Citoquina proinflamatoria producida por monocitos y macrófagos, linfocitos T activados, células NK, mastocitos y hepatocitos. Es responsable de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos infecciosos, y de las consecuencias sistémicas de las infecciones graves. Se encarga de estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activar dichas células para erradicar los microorganismos (Tayal y Kalra, 2008). Los efectos de TNF- α son críticos para las respuestas inflamatorias contra los microorganismos, ya que en cantidades inadecuadas puede producirse fracaso en la contención de la infección.
- **IL-10:** Citoquina antiinflamatoria sintetizada por macrófagos activados y linfocitos T reguladores. Inhibe la respuesta inmunitaria del huésped, actuando particularmente como un regulador de retroalimentación negativo para los macrófagos. Inhibe la producción de citoquinas pro-

inflamatorias como TNF, IL-1, IL-12 y quimiocinas por los macrófagos, además de reducir o bloquear las funciones accesorias de éstos en la activación de linfocitos T. El efecto neto de estas acciones es inhibir la inflamación inmunitaria innata y específica mediada por células T (Couper *et al.*, 2008).

- **IL-17A:** Citoquina proinflamatoria producida por células T, macrófagos, células dendríticas, células NK y linfocitos tisulares (Korn *et al.*, 2009). Es esencial en la respuesta del hospedador a *C. albicans*, activando la producción de péptidos antimicrobianos, quimiocinas procedentes de neutrófilos y otras citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α e IL-1 β (Conti *et al.*, 2009; Hernández-Santos y Gaffen, 2012; Huppler *et al.*, 2015). Además, actúa de forma sinérgica con TNF- α e IL-1 incrementando la respuesta inflamatoria aguda (Conti y Gaffen, 2010; Onishi y Gaffen, 2010).

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Las micosis se han convertido en un problema sanitario de primera magnitud, debido al asilamiento creciente de hongos -previamente clasificados entre las especies no patógenas-, como responsables de brotes nosocomiales, principalmente entre la población inmunocomprometida. No obstante, *C. albicans* continúa siendo la especie fúngica más prevalente, responsable de infecciones tanto superficiales como sistémicas en humanos (Yapar, 2014). Además, los antifúngicos actualmente disponibles presentan ciertas limitaciones: coste económico elevado, baja toxicidad selectiva, efectos secundarios en los pacientes, dificultades de administración, interacciones entre distintas drogas, espectro de actividad limitado o una creciente aparición de formas de resistencia (Brown *et al.*, 2012). **Este complejo escenario plantea la necesidad de obtener nuevos compuestos antifúngicos más efectivos y seguros, así como profundizar en el mecanismo de acción y la mejora de las drogas aplicadas en la práctica clínica.**

En este contexto, la experiencia previa del grupo de investigación, ha demostrado que las enzimas implicadas en hidrólisis del disacárido trehalosa son dianas antifúngicas muy interesantes. Determinadas sustancias que provocan su inhibición inducen una notable actividad fungicida contra ciertas especies fitopatógenas como *R. solani*; (Asano *et al.*, 1987). Por tanto, estos compuestos deben ser considerados como potenciales candidatos para desarrollar nuevos antifúngicos contra *C. albicans*.

Por otra parte, un creciente número de evidencias resalta la importancia de ciertas vías secundarias, independientes del mecanismo principal, en la acción de importantes antifúngicos de uso clínico, que potencian su efecto fungicida. Es el caso de la formación de ROS intracelular (Delattin *et al.*, 2014; González-Párraga *et al.*, 2011; Mesa-Arango *et al.*, 2014; Sokol-Anderson *et al.*, 1986). Por tanto, sería conveniente abordar un minucioso estudio de las alteraciones morfológicas y fisiológicas que desencadenan estos compuestos durante la interacción patógeno-hospedador.

En consecuencia, a partir de estas premisas, la presente Memoria se ha estructurado sobre el planteamiento de los siguientes **objetivos generales**:

1. Analizar la hipotética acción antifúngica de la validamicina A contra CAI-4 de *C. albicans* y estudiar si ese posible efecto está mediado a través de interacciones directas con la trehalasa ácida de esta levadura. Para ello, se utilizará el mutante isogénico *atc1Δ/atc1Δ*.
2. Estudiar de modo comparativo los efectos producidos por los antifúngicos de aplicación clínica, anfotericina B (polieno) y micafungina (equinocandina), en un conjunto de cepas de *C. albicans*. A tal fin, nos centraremos en las alteraciones producidas sobre su morfología, la transición dimórfica levadura-micelio, y el metabolismo de la trehalosa. Adicionalmente, se analizará la participación de ROS intracelular como potenciador de la capacidad fungicida de dichos compuestos.
3. Investigar la implicación de la ruta MAP quinasa de transducción de señales, *HOG1*, que desempeña una función crucial en la fisiología de *C. albicans*, en la respuesta defensiva de este patógeno frente a anfotericina B y micafungina, incluyendo la probable participación del estrés oxidativo en dicha respuesta. Se realizará una aproximación genética con el mutante homocigótico interrumpido *hog1Δ/hog1Δ*, deficiente en dicha ruta.
4. Analizar la interacción de los compuestos de estudio con el sistema inmunitario, con el fin de determinar la sensibilidad de los macrófagos humanos a las distintas drogas y su capacidad de respuesta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de *C. albicans* , medios de cultivo y antifúngicos empleados

En el desarrollo del presente estudio se utilizaron las cepas de *C. albicans* recogidas en la Tabla 3.1, cuyo genotipo ha sido caracterizado. Dichas cepas se conservaron a -80 °C con glicerol al 50% (v/v). A partir de ellas, se realizaron subcultivos periódicos en YPD sólido que se mantuvieron a 4°C para ser usados de forma regular en el laboratorio.

Tabla 3.1. Cepas de *C. albicans* empleadas en la presente Memoria: genotipo y procedencia.

Cepa	Genotipo	Referencia
SC5314	Cepa Silvestre	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
<i>tps2Δ/tps2Δ</i>	<i>tps2Δ::hisG/tps2Δ::hisG URA+</i>	(Zaragoza <i>et al.</i> , 2002)
CEY.1	<i>ura3Δ::imm⁴³⁴/ura3Δ::imm⁴³⁴</i> <i>RP10::URA3</i>	(Pedreño <i>et al.</i> , 2007)
CAI-4	<i>ura3Δ::imm⁴³⁴/ura3Δ::imm⁴³⁴</i>	(Fonzi y Irwin, 1993)
<i>tps1Δ/tps1Δ</i>	<i>ura3Δ::imm⁴³⁴/ura3Δ::imm⁴³</i> <i>tps1Δ::hisG/tps1Δ::hisG</i>	(Zaragoza <i>et al.</i> , 1998)
<i>atc1Δ/atc1Δ</i>	<i>atc1Δ::hisG/atc1Δ::hisG</i> <i>ura3Δ::imm⁴³/ura3Δ::imm⁴³⁴</i>	(Pedreño <i>et al.</i> , 2004)
RM-100	<i>ura3Δ::imm⁴³⁴/ura3Δ::imm⁴³⁴</i> <i>his1Δ::hisG/his1Δ::hisG-URA3-hisG</i> <i>ura3Δ::imm⁴³⁴/ura3Δ::imm⁴³⁴</i>	(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 2003)
<i>hog1Δ/hog1Δ</i>	<i>his1Δ::hisG/his1Δ::hisG</i> <i>hog1::hisG-URA3-hisG/hog1::hisG</i> <i>ura3Δ::imm⁴³⁴/ura3Δ::imm⁴³⁴</i>	(San José <i>et al.</i> , 1996)
Hog1 ⁺	<i>his1Δ::hisG/his1Δ::hisG</i> <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i> <i>LEU2/leu2::HOG1 URA3</i>	(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 1999)

Los medios de cultivo empleados se prepararon con agua destilada y se sometieron a esterilización por calor húmedo en autoclave de vapor (120°C durante 20 min). La composición de los diferentes medios utilizados para el crecimiento de las distintas cepas de levaduras, se detalla en la Tabla 3.2. Los ensayos en medio sólido mantienen la misma relación p/v anterior, pero añadiendo un 2% de agar.

Los cultivos líquidos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer, los cuales se rellenaron con 1/3 de volumen para favorecer la aireación. Salvo que se indique lo contrario, los preinóculos o cultivos “overnight” de *C. albicans* fueron crecidos de forma rutinaria a 28°C y los cultivos refrescados a 37°C, tanto en medio sólido

como en líquido. Los incubadores usados fueron el CERTOMAT H (Braun) y el Medilow-P (Selecta), dotados de agitación orbital (210 rpm).

Tabla 3.2. Medios de cultivos utilizados para el cultivo de las cepas *C. albicans*.

Medio	Composición	Utilidad	Referencia
YPD	20 g/l de glucosa, 20 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura.	Medio complejo que contiene todos los ingredientes necesarios para el crecimiento rutinario de levaduras.	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
RPMI 1640	Medio rico en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa al que se añade suero bovino fetal (10%), glutamina y antibióticos (penicilina/estreptomina (1%)).	Medio rico para el cultivo de células eucariotas.	Gibco
Medio Spider	Caldo nutritivo 10 g/l manitol 10 g/l K ₂ HPO ₄ 2 g/l agar 20 g/l	Medio sólido empleado en los ensayos de filamentos.	(Liu <i>et al.</i> , 1994)

Todos los procesos de manipulación microbiológica han sido llevados a cabo en una cámara de flujo laminar CAPTAIR que incorpora gas, luz y ventilación para asegurar unas condiciones de esterilidad óptimas.

Los compuestos empleados en la Memoria fueron: el pseudo-oligosacárido validamicina A (Duchefa Biochemie), y los antifúngicos anfotericina B (AppliChem GmbH) y micafungina, en el formato farmacológico de micamina (Astellas Pharma Europe B.V.), suministrada amablemente por la profesora Genoveva Yagüe (Hospital Clínico Universitario.Virgen de la Arrixaca).

3.2. Cultivos primarios y líneas celulares humanas. Condiciones de cultivo

3.2.1. Cultivos primarios de macrófagos humanos de individuos sanos

✓ Obtención de macrófagos peritoneales

Los macrófagos humanos procedentes de la cavidad peritoneal fueron obtenidos en el servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Las células se extrajeron de la cavidad peritoneal de pacientes ginecológicas sometidas a intervención quirúrgica para ligadura de trompas por laparoscopia, mediante lavados con suero salino. La muestra se mantuvo a 4°C y en esterilidad, hasta su recogida del quirófano y posterior procesamiento.

✓ Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM) de sangre periférica

Las muestras de sangre de voluntarios sanos se obtuvieron del Centro de Hemodonación de la región de Murcia. La extracción de sangre no se realizó en ningún caso para la obtención de muestras de estudio, sino que originariamente se realizó la extracción para donación y, al no poder ser empleadas en transfusiones debido a que no alcanzan o exceden el peso óptimo, fueron cedidas a la investigación.

Para llevar a cabo la separación de la porción linfo-monocítica de la sangre, se diluyó la misma con tampón fosfato salino (PBS) (PBS 5X= 40g NaCl, 1g KCl, 0.6g KH_2PO_4 , 1.55g Na_2HPO_4 , pH 7,2 diluido en 1L de agua destilada) estéril, en proporción 1:1, y se depositaron 35 mL de esta mezcla sobre 15 mL de Ficoll (Axis-Shield PoC As Oslo, Noruega) en tubos Falcon. La separación en gradiente de Ficoll se realizó mediante centrifugación a temperatura ambiente a 2000 rpm durante 20 min, sin emplear el freno al descender la velocidad para no deshacer el gradiente.

✓ Condiciones de cultivo

Tanto los macrófagos peritoneales como la porción linfo-monocítica obtenida de la sangre periférica se lavó con medio de cultivo completo (MCC) (medio DMEM con glutaMAX (GIBCO Invitrogen, Paisley, Reino Unido)), suplementado con un 10% de suero bovino fetal, previamente descomplementado por calentamiento a 56°C durante 30 min, y con 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Flow Laboratories, Irvine, Reino Unido). Tras el lavado se procedió al recuento de leucocitos en una cámara Neubauer utilizando azul tripán para poder descartar la población no viable de la muestra.

Las células fueron sembradas a la concentración requerida, en función del análisis a realizar, en MCC. Tras incubación durante la noche a 37°C, las células fueron lavadas con MCC fresco para eliminar aquellas células no adherentes, obteniendo de esta forma sólo la fracción de macrófagos o M-DM que crecen

adheridos al fondo del pocillo. La pureza celular en los cultivos fue evaluada posteriormente, como se indica a continuación, resultando mayor del 95%.

✓ Determinación de la pureza de la muestra

La pureza de la muestra se determinó por citometría de flujo, mediante criterios de tamaño, morfología y expresión de marcadores de superficie celular. Se empleó el anticuerpo de ratón anti-CD14 humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD14-FITC (eBioscience, San Diego, CA, EEUU), y el anticuerpo de ratón anti-IgG1 humano marcado con FITC como isotipo control, IgG1-FITC (BD-Pharmingen, NJ, EEUU). El marcaje se realizó en placas microtiter de 96 pocillos de fondo en V (Microtiter plate Bioster SPA) empleando $0,3 \times 10^6$ células/pocillo en un volumen de 100 μ L. Para llevar a cabo la tinción, las células se lavaron con PBS y suero bovino fetal al 2%, se centrifugaron a 4°C, 5 min a 1200 rpm y, manteniendo la placa en oscuridad con hielo, se adicionaron 5 μ L del correspondiente anticuerpo monoclonal. Tras incubar 15 min en frío y oscuridad, se lavaron las células en la placa (2 veces) como se ha indicado anteriormente para eliminar el exceso de anticuerpo. Tras los lavados, se adquirieron las muestras directamente en el citómetro o se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) al 0,4%, pH 7,2, preparado en PBS, y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta el momento de su adquisición, que se realizó como máximo 24h después.

En el momento de adquirir las muestras en el citómetro, las células procesadas fueron resuspendidas en PBS y transferidas a un tubo de propileno (Aulabor, España). La adquisición y el análisis de las muestras se realizaron en un citómetro de flujo Epics XL (Beckman Coulter) de tres colores usando para el análisis el programa Flowing Software 2. El número de leucocitos adquiridos y analizados osciló entre 50000 y 100000. La población de leucocitos fue seleccionada mediante parámetros FCS (tamaño) y SSC (granularidad o complejidad celular), representados en escala lineal (Fig. 3.1). Posteriormente, las subpoblaciones de leucocitos fueron seleccionadas en base a su morfología y expresión de CD14⁺ para macrófagos.

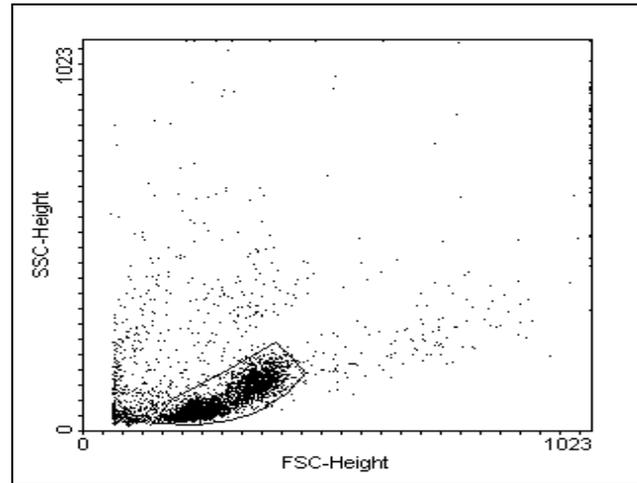


Figura 3.1. Ejemplo de selección de población linfo-monocítica atendiendo al tamaño (SSC) y complejidad (FSC) en diagrama de puntos, obtenido mediante citómetro de flujo.

3.2.2. Línea celular THP-1

Se utilizó la línea celular humana THP-1, procedente de una leucemia monocítica aguda obtenida de la sangre periférica de un varón de un año de edad. Para su conservación, las células se mantuvieron en medio de cultivo completo con 20% de suero de ternera fetal y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU), congeladas a -196°C en nitrógeno líquido.

La línea celular THP-1 se cultivó en suspensión en frascos para cultivos ventilados de 25 o 75 cm^3 (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania), en una estufa de cultivos celulares a 37°C con un 5% de CO_2 . El medio de cultivo empleado, fue igual que el descrito anteriormente, sustituyendo el DMEM por RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen, Paisley, Reino Unido). De forma rutinaria se mantuvieron las células en cultivo, refrescando el mismo cada dos días. Para realizar un nuevo subcultivo, se retiró el medio con las células en suspensión del frasco de cultivo, se centrifugaron a 1200-1500 rpm, 5 min a 4°C y fueron resuspendidas en MCC fresco. Tras el recuento celular en hemocitómetro, se comenzó el nuevo subcultivo con una concentración de 0.1×10^6 células/ml.

Para llevar a cabo la diferenciación a M-DM, se sembraron 2×10^6 células/pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos en MCC y se incubaron durante 24h con forbol-12-miristato-14-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) a concentración de 10 ng/mL. Esta sustancia es un

análogo al activador natural de la enzima proteína quinasa C, el diacilglicerol, que juega un papel crucial en la activación de cascadas de transducción de señales como regulador de la transcripción, mediador de la respuesta inmune y regulador del crecimiento celular, entre otros. Durante las 24h de incubación, las células que estaban en suspensión se adhirieron al fondo del pocillo adquiriendo la morfología característica de los macrófagos (Fig. 3.2). Posteriormente, se eliminó el medio con el PMA, se adicionó MCC fresco y se dejó descansar el cultivo durante un periodo de 24 h. Transcurrido este tiempo, los M-DM diferenciados fueron empleados para los ensayos pertinentes.

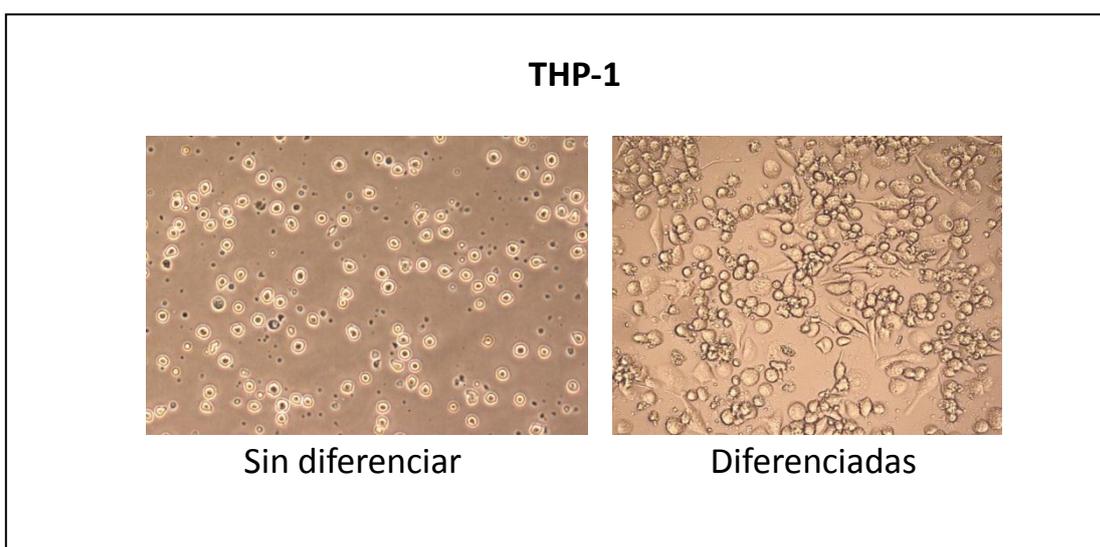


Figura 3.2. Morfología típica de la línea celular THP-1 tras la diferenciación con PMA. Las fotografías fueron obtenidas mediante el acoplamiento de una cámara digital Olympus 4.1 Megapixel al microscopio óptico Olympus IX70 con un objetivo de 20X.

3.3. Medida del crecimiento microbiano

3.3.1. Turbidimetría

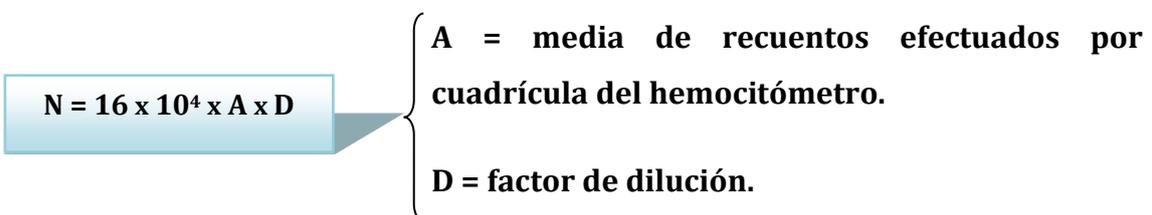
El crecimiento de los blastoconidios en cultivo líquido se determinó mediante turbidimetría, realizando medidas de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda (λ) de 600 nanómetros (nm) en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1203. Para ello, se practicaron previamente las diluciones adecuadas, de forma que la medida de densidad óptica estuviera en el intervalo de linealidad entre el valor medido y el número de células real del cultivo.

3.3.2. Peso húmedo

Para la determinación del peso húmedo, alícuotas de 1 ml del cultivo se recogieron en tubos Eppendorf de 1,5 ml, que previamente se pesaron vacíos, (peso vacío = p0). Se centrifugaron a 3000xg a 4°C durante 7 min y se retiró el sobrenadante por decantación, eliminando cuidadosamente los restos del mismo con papel absorbente. Después los tubos fueron pesados de nuevo, obteniendo el peso del precipitado (pP). El cálculo del contenido en masa celular se efectuó por diferencia entre las dos medidas (pP-p0). Esta prueba se realizó por duplicado en cada experimento.

3.3.3. Recuentos celulares

Los recuentos celulares a diferentes tiempos de incubación se llevaron a cabo en un hemocitómetro NEUBAUER, utilizando un microscopio de contraste de fases Nikon u Olympus BH-2. La densidad celular se calculó como número de células por mililitro (N) según la ecuación:



$N = 16 \times 10^4 \times A \times D$

A = media de recuentos efectuados por cuadrícula del hemocitómetro.

D = factor de dilución.

Para efectuar el recuento de los macrófagos, se verificó su nivel de viabilidad, mediante la técnica de exclusión con azul tripán (para 100 ml: 0,81g NaCl; 0,66g KH₂PO₄, y 0,4g azul tripán, pH 7,2 Sigma Chem. Comp., St. Louis, MO, EEUU) en una proporción 1:1 (v:v) de suspensión celular: azul tripán. Las células muertas, con la membrana deteriorada, permiten el paso del colorante y se tiñen intensamente. El número de células vivas de la muestra se calculó contabilizando las células no teñidas.

3.4. Tratamientos de estrés: viabilidad y sensibilidad

Según el tipo y los objetivos de cada experimento específico, se diseñaron varios tratamientos experimentales de estrés a distintas concentraciones y distintas temperaturas. Salvo que se indique lo contrario, el protocolo básico fue el siguiente: se dispuso un preinóculo en medio YPD, incubado a 28°C en agitación continua durante toda la noche. Al día siguiente, se refrescó el cultivo con YPD, diluyéndolo hasta una D.O. baja (normalmente de 0,3) y se dejaron crecer hasta fase exponencial ($D.O._{600nm}=0,8-1,0$), momento en que se dispusieron distintas alícuotas idénticas, sobre las que, posteriormente, se aplicaría el tratamiento correspondiente (menos en la alícuota control).

3.4.1. Ensayo de viabilidad

El efecto provocado en los cultivos de las cepas estudiadas por cada tipo de estrés y por las drogas empleadas, se determinó mediante un análisis comparativo entre la viabilidad registrada en ensayos control y los sometidos a tratamientos específicos. Con tal fin, se recogieron muestras de 1 ml de cada cultivo en condiciones estériles, y se realizaron varias diluciones con agua destilada estéril, en función de la $D.O._{600nm}$ alcanzada (en el rango de 10^1-10^6). Se dispensaron 100 μ l de cada dilución en duplicado sobre placas Petri conteniendo medio sólido YPD. La suspensión se extendió en césped por toda la placa mediante agitación suave con perlas de vidrio (3 mm de diámetro).

Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y de inmediato se efectuó un recuento del número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), contando entre 30 y 300 colonias por placa. En cada caso, se hallaron los valores promedio y el porcentaje de células viables se refirió a una muestra control, sin exposición al estrés respectivo, que representaba el 100% de viabilidad.

3.4.2. Ensayo de sensibilidad: formación de macrocolonias

Se trata de un ensayo complementario para determinar el crecimiento y el comportamiento de las cepas de estudio en un medio sólido que contiene el tratamiento específico. Con este objetivo, se realizaron diluciones seriadas 1/10 de

cultivos crecidos hasta una D.O._{600nm} de 1,0 (10^7 cels/ml). Seguidamente, se depositaron gotas de 5 μ l de cada dilución sobre placas Petri con YPD solido más los agentes estresantes. Un crecimiento colonial suficiente se obtuvo tras incubar las placas a 37°C durante 1 día, momento en que se fotografiaron. Como control se dispusieron placas con medio solido sin tratar, sobre las que se añadieron los inóculos correspondientes.

3.5. Obtención de extractos celulares

Para la determinación de las actividades enzimáticas se llevaron a cabo los siguientes pasos: (i) Obtención de los extractos celulares, recogiendo volúmenes de 45 ml de cada medio de cultivo en tubos Falcon, en condiciones estériles. Las muestras siempre son mantenidas en frío para evitar la desnaturalización de las enzimas (ii) A continuación, las alícuotas se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 5°C, desechando el sobrenadante por decantación y lavando dos veces el precipitado celular con agua destilada fría, siendo rápidamente resuspendido en 1,25 ml de tampón 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 100 mM a pH 6, incluyendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM y cisteína 5 mM; aditivos importantes por su capacidad de estabilizar las proteínas de bajo peso molecular e inhibir a las proteasas, respectivamente. (iii) Acto seguido, se procedió a la rotura mecánica en tubos de hemolisis (0,5 cm de diámetro) mediante perlas Ballotini (0,45 mm de diámetro), durante 7 ciclos de rotura de 45 seg con reposos de 1 min en hielo, para impedir la desnaturalización enzimática por el efecto del calor producido por la fricción.

Una vez completada la rotura, se recogieron los extractos mediante pipetas Pasteur y se vertieron en tubos Eppendorff marcados y mantenidos siempre en hielo. Los extractos se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada MSE a 13000 rpm durante 7 minutos a 4°C. De esta manera, se obtuvo un precipitado (fracción particulada: fragmentos de pared, membranas y orgánulos, principalmente) y un sobrenadante (fracción citosólica), separados por decantación en nuevos tubos Eppendorff. La fracción particulada se lavó con 1 ml de agua destilada fría para eliminar los posibles restos de citosol, y se resuspendió

posteriormente en 1 ml del tampón MES de rotura. Todas las muestras, tanto de citosol como de pared, se etiquetaron y guardaron a -20°C .

Por último, indicar que se efectuó una comprobación del grado de rotura celular, observando los extractos al microscopio y comprobando como la mayor parte de las células habían sido rotas por vibración mecánica.

3.6. Determinación colorimétrica de proteína

El contenido total de las proteínas presentes en los extractos celulares se calculó mediante el método de Lowry *et al.* (1951). Permite cuantificar las proteínas presentes en la muestra de estudio gracias al color formado tras interaccionar el reactivo Folin-Ciocalteau con determinados aminoácidos. La intensidad del color de la disolución resultante es proporcional a la concentración de proteínas, dentro de un rango de linealidad, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas:

1. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de complejo con el tartrato.
2. La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteau por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteau es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Las soluciones químicas empleadas fueron las siguientes:

A) Solución alcalina de cobre:

-Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 N

-CuSO₄ al 1% en agua destilada

-Sal de Seignette (tartrato sódico-potásico) al 2% en agua destilada.

Las soluciones se preparan y conservan por separado, y se mezclan inmediatamente antes de su uso en la proporción 98/1/1 (v/v/v).

B) Solución de Folin-Ciocalteu: Reactivo comercial diluido en una proporción 1:1. Para la reacción se utiliza agua destilada.

El procedimiento para la determinación de proteína consiste en añadir a 1 ml de la solución problema, 3 ml de la solución alcalina de cobre y dejar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Se añaden a continuación 0,3 ml de la solución Folin-Ciocalteu y al cabo de 30 min el color desarrollado se lee de inmediato a 540 nm. Como patrón de referencia se empleó una solución de albúmina bovina (Sigma). El método es lineal en un rango de 10 a 90 µg/ml de proteína. En la prueba se realizan duplicados de cada solución problema y los blancos correspondientes con agua destilada.

3.7. Ensayos enzimáticos

3.7.1. Determinación de la actividad catalasa (E.C.1.11.1.6)

La catalasa es una enzima antioxidante que lleva a cabo la descomposición del H₂O₂ en dos moléculas de agua y oxígeno.

En el ensayo se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Aebi, (1984). Para ello, se dispuso de un blanco con 1,5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7, ajustado en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1203 equipado con un accesorio de termostatación. Se tomó un volumen de 0,975 ml de la mezcla tampón (BPK⁺ 50 mM a pH 7 con 10,6 mM de H₂O₂) en una cubeta de

cuarzo de 1,5 ml e inmediatamente se añadieron 25 μ l del sobrenadante citosólico correspondiente, previamente centrifugado para eliminar posibles restos de pared y otras partículas. Una vez introducida y agitada la muestra en la cubeta, se inició la reacción en el espectrofotómetro y registrando los valores de pendiente.

El ensayo se realizó a 25°C y está basado en la disminución de la detección de absorbancia a 240nm (Abs_{240nm}) debido a la disociación del H_2O_2 . La actividad enzimática, expresada en μ moles \times min^{-1} \times ml^{-1} , se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción ($\Delta Abs_{240nm}/min$) y de un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de $39,58 M^{-1} \times cm^{-1}$ (Del Río *et al.*, 1977).

3.7.2. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR)

(E.C. 1.6.4.2)

Para la determinación de la actividad glutatión reductasa (GR) se utilizó el método descrito por (Edwards *et al.*, 1990), basado en la disminución de absorbancia a 340nm (Abs_{340nm}) debido a la oxidación del NADPH durante el paso de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), por acción de la glutatión reductasa (GR).

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo UV-1203. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.8; 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); 3 mM $MgCl_2$; 0,5 mM de glutatión oxidado y 100 μ l de muestra. Los ensayos se realizaron en cubetas de cuarzo de 1,5ml.

La reacción se inicia por la adición de 100 μ l de GSSG 4 mM a la mezcla de reacción con NADPH 4 mM, monitorizando su oxidación durante 2 min frente a un blanco de muestra que contenía el tampón Tris-HCl 100 mM, 100 μ l de muestra y 50 μ l de NADPH 4 mM, pero carente de GSSG.

A cada medida se le restó el blanco de muestra para eliminar interferencias con otras posibles vías que pudieran producir la oxidación del GSH. La actividad enzimática se expresa en nmoles de NADPH oxidado \times min^{-1} \times ml^{-1} , y se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar de $6,22 mM^{-1} cm^{-1}$ para el NADPH.

3.7.3. Determinación de las actividades superóxido dismutasa (SOD) (E.C.1.15.1.1)

Se empleó el método descrito por (McCord y Fridovich, 1969), basado en la inhibición de la reducción de citocromo c por el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), generado por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa.

Se partió de una mezcla de reacción con citocromo c y xantina (ambos a $10^{-3}M$), en tampón fosfato potásico 50 mM; pH 7,8; EDTA-NA 0,1 mM; saturado en aire. Para evitar posibles interferencias en la reducción del citocromo c, se adicionó NaCN 10 μM a la mezcla.

El primer paso consistió en efectuar una reacción control en cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico. Para ello, se ajustó a cero el espectrofotómetro termostaticado a 25°C con 1ml de la mezcla de reacción con cianuro y se adicionó la xantina oxidasa, iniciándose la reacción. En este momento se siguió la reducción del citocromo c durante 2 min a 550 nm. El volumen de xantina oxidasa requerido varía entre 4,5 y 8,5 μl , eligiendo el más idóneo para obtener un $\Delta Abs_{550nm}/min$ comprendido entre 0,024 y 0,026. Para la reacción problema se añadieron 10-50 μl de muestra y la cantidad de xantina oxidasa determinada previamente en el ensayo control. La xantina oxidasa es la responsable del inicio de reacción.

Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inducir una inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo c por los radicales libres del O_2 en el ensayo control. La actividad enzimática viene dada en Unidades/ml y se calculó en función del porcentaje de inhibición producido por la muestra, según la expresión:

$$\%I = \frac{\Delta Abs_{550nm}/min(\text{control}) - \Delta Abs_{550nm}/min(\text{problema})}{\Delta Abs_{550nm}/min(\text{control})}$$

$$\text{Unidades SOD/ml} = \frac{\% \text{Inhibición}}{50\% \times V} \times Fd$$

V=Volumen de la muestra utilizada en ml; Fd=Factor de dilución;
 Abs_{550nm} =Incremento de absorbancia a 550 nm.

3.7.4. Determinación de las actividades hidrolíticas de trehalosa: Trehalosas (E.C.3.2.1.28)

La determinación analítica de la actividad trehalasa mide la glucosa generada a partir de la hidrólisis del sustrato, trehalosa (Merck, Fluka) y se llevó a cabo según el método descrito previamente (San Miguel y Argüelles, 1994).

Para la determinación tanto de la actividad ácida (Atc1p) como de la neutra (Ntc1p), se añadieron 50 µl del extracto celular correspondiente, por duplicado. Se prepararon blancos carentes de enzima y de sustrato, respectivamente; así como ensayos control detenidos a tiempo 0, que se dispusieron en paralelo para descartar potenciales autohidrólisis o interferencias del ensayo. Los blancos se hirvieron durante 10 minutos a 95°C, para desnaturalizar las enzimas. El ensayo de actividad Ntc1p contenía como fuente de enzima 50 µl de sobrenadante citosólico junto con 200 µl de trehalosa 200 mM preparado en tampón MES 25 mM, pH 7,1, conteniendo CaCl₂ 125 µM. A su vez, para medir la actividad trehalasa ácida se preparó trehalosa 200 mM en tampón citrato-fosfato 0,2 mM a pH 4,5, suplementado con EDTA 2 mM. El ensayo contenía 200 µl junto con 50 µl de la fracción particulada. Ambas reacciones se incubaron a 30°C durante 30 min y se detuvieron por inmersión en un baño de agua hirviendo durante 10 min.

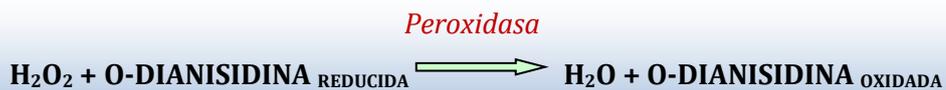
La glucosa liberada en el sobrenadante se midió aplicando el protocolo de valoración con glucosa-oxidasa-peroxidasa, detallado en el epígrafe 3.8. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de producir 2 µmoles de glucosa por minuto a 30°C. La actividad específica se expresa como nanomoles de glucosa liberados por minuto por miligramo de proteína.

3.8. Valoración analítica de glucosa: método de glucosa-oxidasa-peroxidasa

La glucosa remanente en el medio de cultivo o la liberada en las reacciones enzimáticas, es oxidada directamente a ácido glucónico por medio de la enzima glucosa oxidasa.



En la siguiente etapa, el peróxido formado se reduce en un ensayo acoplado con peroxidasa y un cromógeno oxidable (orto-dianisina), que es incoloro en su forma reducida y coloreado en su forma oxidada.



Tras realizar la primera reacción “estándar” de trehalasa descrita en el epígrafe anterior, a distintos tiempos, se añadió al tubo de ensayo 1 ml del reactivo formado por las siguientes soluciones, mezcladas en la proporción 20:1 (v/v), inmediatamente antes de cada valoración:

- a) Solución de glucosa oxidasa** (E.C. 1.1.3.4) tipo V + peroxidasa (E.C.1.11.1.7) (Sigma), compuesta por 1 ml de glucosa oxidasa y 5,25 mg de peroxidasa en 1 l de tampón fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0.
- b) Solución de O-dianisidina:** 600 mg de o-dianisidina-HCl (Sigma) disueltos en 100 ml de agua destilada. Esta solución se mantiene a 4°C protegida de la luz.

La incubación del ensayo de valoración se realizó a 30°C durante 30 min y se detuvo por adición de 1 ml de HCl 6N. De esta forma, se desnaturaliza la solución de glucosa oxidasa-peroxidasa y el complejo coloreado de o-dianisidina oxidada vira a color rosa. Las lecturas han de efectuarse de inmediato, a fin de evitar posibles alteraciones de color, debidas a la oxidación espontánea y progresiva de la o-dianisidina en presencia de aire.

Los valores procedentes de ensayos experimentales se refirieron a una recta patrón de glucosa (Fig. 3.3) y se midieron en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1203) a 540 nm ($\text{Abs}_{540\text{nm}}$), estableciéndose un rango de linealidad entre 10 y 100 μg de glucosa/200 μl .

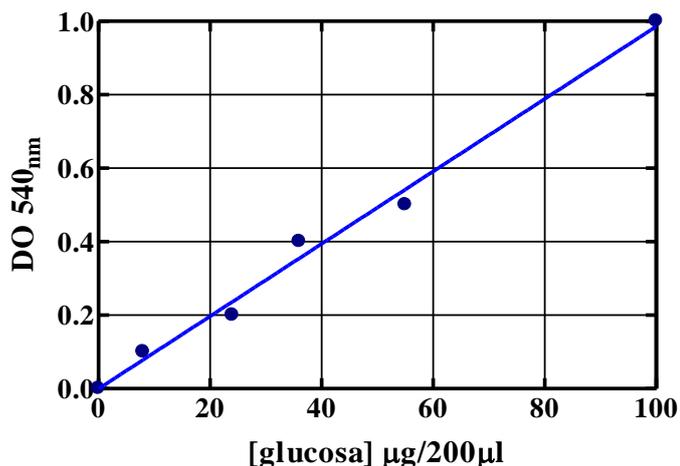


Figura 3.3. Recta patrón de valoración de glucosa con el método glucosa oxidasa-peroxidasa.

3.9. Determinación de la trehalosa endógena

La determinación de trehalosa endógena se realizó según el protocolo descrito por Blázquez *et al.* (1994). Los extractos se prepararon a partir de muestras de cultivo celular (15 ml), centrifugadas, lavadas en agua fría y resuspendidas en 1 ml de agua destilada, pudiendo ser conservadas a -20°C hasta su análisis. Los tubos se introdujeron en un baño de agua a 95°C durante 30 min. Este tratamiento térmico provoca la lisis celular y libera el contenido interno de trehalosa al medio exterior. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante diez minutos, recuperándose el sobrenadante.

La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 200 µl, 90 µl de tampón acetato sódico 25 mM pH 5,6, 100 µl de las muestras correspondientes a los extractos libres de células y 10 µl de trehalasa comercial (Sigma, 2 unidades/ml) que hidroliza una molécula de trehalosa a dos moléculas de glucosa a pH 5,6 y 37°C.

Paralelamente, se dispuso una mezcla control preparada de igual manera, pero sustituyendo las muestras problema por trehalosa comercial (1-5 mM, recta patrón). En los blancos, la trehalasa comercial es reemplazada por agua destilada, debiendo incluirse al menos un blanco y dos medidas de referencia por cada valoración distinta. La incubación se realizó a 37°C durante toda la noche. El método mide la cantidad de glucosa generada a partir de la hidrólisis de trehalosa,

siendo valorada mediante la reacción acoplada con glucosa oxidasa-peroxidasa antes indicada (Apartado 3. 8).

3.10. Inducción de la transición dimórfica levadura-micelio

3.10.1. Medio líquido

Para inducir la emisión de tubos germinativos, primera etapa de la conversión de levadura a hifa en *C. albicans*, se empleó el método descrito por Argüelles *et al.* (1999), consistente en la adición de suero humano (10%) procedente de muestras clínicas (Hospital General Reina Sofía Murcia). Una breve descripción sería la siguiente: Los cultivos se incubaron en medio YPD a 28°C hasta alcanzar fase exponencial temprana ($D.O._{600nm} = 0,3-0,5$). Las muestras (5-10 ml) se recogieron y lavaron rápidamente con agua destilada fría estéril y se resuspendieron a una densidad de 0,8-1,0 mg/ml (peso seco) en medio YPD fresco conteniendo suero humano al 10% (v/v), siendo transferidas de inmediato a 37°C. Antes de ser suplementado, el suero clínico fue esterilizado por filtración (0,45 μ m, Millipore). Un control adicional del cambio dimórfico consistió en mantener una alícuota a 28°C sin suero humano añadido.

La aparición de tubos germinativos se monitorizó mediante el uso de un hemocitómetro Neubauer, utilizando un microscopio de contraste de fases (Nikon u Olympus BH-2), que permite distinguir entre los blastoconidios agrupados tras su división (pseudohifas) y las hifas verdaderas. En cada recuento, fueron examinadas un mínimo de 200 células y el porcentaje de dimorfismo se representa como la relación entre el número de células que formaron tubos germinativos respecto al número total de células presentes en la cuadrícula del hemocitómetro.

3.10.2. Medio sólido

Cultivos en medio YPD de las cepas objeto de estudio fueron recogidos y lavados con PBS, ajustándose su $D.O._{600nm}$ a 1,0. A partir de diluciones seriadas, se plaquearon aproximadamente 100 colonias en placas de medio Spider, cuya composición es específica para inducir la miceliación. Tras 7 días de incubación a 37°C, la morfología macroscópica de las colonias obtenidas fue fotografiada.

3.11. Determinación de las CMI

Las distintas cepas fueron cultivadas en placas de YPD a 37°C durante 24h antes de realizar el test. Al día siguiente se preparó el inóculo, que consistió en dispensar al menos 5 colonias (con un diámetro mínimo de 1mm) de cada cepa en 5 ml de agua destilada estéril. La turbidez de esta suspensión se midió en un espectrofotómetro y se ajustó, añadiendo más suspensión celular o diluyendo con agua estéril, según fuera necesario, hasta una D.O_{600nm} de 0,1 ($1-5 \times 10^6$ cels/ml).

Para determinar la menor concentración de antifúngico necesaria para inhibir el 50% y el 90% del crecimiento de *Candida* (CMI₅₀ y CMI₉₀, respectivamente), respecto a un control sin tratar, se siguieron varios protocolos diferentes a lo largo de la presente Memoria:

- 1. Técnica turbidimétrica:** en microplacas de 96 pocillos (Nunclon™ Δ Surface) se depositaron 100 µl del compuesto a ensayar, a diferentes concentraciones aplicando diluciones seriadas (1/2) en medio estándar RPMI (PAA Laboratories GmbH, Austria). luego, cada pocillo recibió un inóculo de 100 µl con 10^5 células de levadura/ml en medio MCC (RPMI 1640, 10% suero bovino fetal, 10% penicilina/estreptomicina). Las microplacas se incubaron a 37°C y las CMIs se midieron a 24h y 48h determinando la turbidez mediante un lector de placas ELISA a 550nm (Asys Jupiter).
- 2. Reacción con MTT.:** El ensayo con MTT se emplea para valorar la viabilidad y estado de proliferación de las células. El MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU], es un compuesto que se incorpora en las células y es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, generando un producto metabólico denominado azul de formazán, que precipita al ser insoluble. Las células en estado proliferativo necesitan mayor cantidad de ATP para llevar a cabo la replicación de su material genético. Por tanto, cuanto más elevado sea el estado metabólico celular, mayor número de cristales de formazán se formarán, asumiendo que la intensidad del color es proporcional al número de células viables y en estado proliferativo.

Para la obtención de las CMI en función de la viabilidad celular determinada por MTT a las 24 y/o 48 horas de incubación, se añadió 20 µl del reactivo MTT (resuspendido en PBS a una concentración de 2 mg/ml) a las microplacas preparadas como se indica en la técnica turbidimétrica, siendo incubadas durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, y para disolver los cristales de azul de formazán formados como consecuencia de la actividad metabólica celular, se adicionaron 100 µl de solución de isopropanol, HCl 0,04N y Tween-20 al 0,1 %. Para determinar la intensidad de color resultante de la reacción anterior, se realizó la lectura de la DO a 550 nm en el lector de placas de ELISA.

3. Viabilidad en placa: Los cultivos refrescados como se indica en el epígrafe 3.4 se trataron con distintas concentraciones del compuesto de estudio. Tras 24h o 48h de tratamiento, las diversas alícuotas se sometieron a un ensayo de viabilidad en placa (ver epígrafe 3.4.1).

4. Método de microdilución en placa M27-S4 del CLSI (*Clinical Laboratory Sciences Institute*). Se dispusieron placas de 96 pocillos con las diluciones seriadas de los antifúngicos en medio RPMI (con glutamina y sin bicarbonato), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164M (ICN, Sigma), ajustado a pH 7,0±0,1, más 0,2% de glucosa. Posteriormente, se adicionó a cada pocillo 100 µl de la suspensión de las levaduras previamente diluidas 1000 veces en RPMI hasta obtener 1-5x10³ cels/ml. Por tanto, la concentración final de células en el pocillo es de 0,5-2,5x10³ cels/ml.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24h, en ambiente húmedo para prevenir la evaporación del medio. Trascorrida la incubación, se procedió a la lectura visual de las CMI en función de la intensidad colonial en el fondo del pocillo. En cada placa se incluyó un control de calidad, consistente en una cepa de levadura procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que contienen CMI conocidas y definidas en los protocolos normalizados de EE.UU para los antifúngicos más empleados en la práctica clínica (Tabla 3.3). Los criterios de aceptación o rechazo de los resultados dependen de los valores que se obtengan con las cepas control, que deben encajar en unos determinados intervalos, recogidos en la Tabla 3.3. Cada ensayo se realizó por triplicado, utilizándose los datos más representativos.

Tabla 3.3. Intervalos de las CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad a las 24h, obtenidas por el método de microdilución M27-S4.

Antifúngico	Intervalos de CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019	<i>C. krusei</i> ATCC® 6258
Anfotericina B	0,25-2	0,5-2
Anidulafungina	0,25-2	0,03-0,12
Caspofungina	0,25-1	0,12-1
Micafungina	0,5-2	0,12-0,5
Fluconazol	0,5-4	8-64
Itraconazol	0,06-0,5	0,12-1
Ketoconazol	0,03-0,25	0,12-1
Posaconazol	0,03-0,25	0,06-0,5
Voriconazol	0,016-0,12	0,06-0,5
5-fluorocitosina	0,06-0,25	4-16

3.12. Determinación de ROS y necrosis celular

Cultivos exponenciales de las cepas de *C. albicans* (10^7 cels/ml) se resuspendieron en el medio pertinente (PBS 1x a pH 7,0, o YPD) y se trataron con los antifúngicos en estudio durante 1h a 37°C. Para la determinación de ROS, las células tratadas se lavaron con PBS1X y a continuación, se les añadió dihidrofluoresceína diacetato (DHF) 40 μM durante 30 min a 37°C. Este compuesto se escinde en fluoresceína al interaccionar con los radicales libres, emitiendo fluorescencia verde, medible en un citómetro de flujo en el canal FL1.

Alícuotas idénticas a las utilizadas para determinar ROS intracelular, se trataron con yoduro de propidio (IP) 20 μM durante 5 min. Este compuesto se intercala entre las bases del ADN emitiendo fluorescencia en rojo, que es medible por citometría de flujo en el canal FL2 o FL3. Sin embargo, las membranas celulares son impermeables al IP y, por tanto, el compuesto sólo es capaz de penetrar en células muertas (necróticas) cuya membrana está dañada.

Se utilizó el citómetro FC500 del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. En todos los casos se procesaron 5000 células. Los resultados fueron analizados con el software Flowing Software 2.5.1.

3.13. Microscopia electrónica de transferencia

Las levaduras exponenciales se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4°C. Tras desechar el sobrenadante, el precipitado resultante se fijó de forma inmediata con glutaraldehído (Serva) al 2,5% en 0,1M de tampón cacodilato (pH 7,2-7,4) durante 8h a 4°C. Posteriormente, se realizó un postfijado con OsO₄ al 1% y se embebió en Epon antes de realizar los cortes con un ultramicrotomo (Reichert Jung). Los distintos cortes ultrafinos obtenidos fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Por último, las secciones fueron examinadas en un microscopio electrónico Philips Tecnai12, con una cámara digital incorporada.

3.14. Estimulación de macrófagos por *C. albicans* y detección de citoquinas

3.14.1. Estimulación de macrófagos

Para el estudio de la producción de citoquinas mediante el método ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) se sembraron 0.2 x 10⁶ macrófagos/pocillo en placas de 96 pocillos y se estimularon durante 4 h con *C. albicans* en un ratio 1:5 (es decir, 5 levaduras por cada macrófago presente en el pocillo). Posteriormente se procedió a la recogida de los sobrenadantes de cultivo, que se congelaron a -20°C hasta su análisis.

3.14.2. Determinación de citoquinas mediante ELISA

La cuantificación de las citoquinas IL-10, IL-17A y TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos en presencia o ausencia de levaduras, se realizó mediante ELISA, utilizando kits específicos comerciales de eBioscience (San Diego, CA, EEUU). Los ensayos se verificaron por triplicado siguiendo las instrucciones del fabricante.

En primer lugar la placa fue tapizada con anticuerpo primario o anticuerpo de captura a una dilución 1/250 en tampón de captura proporcionado en el kit comercial, y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se recuperó la placa, eliminando mediante lavados con PBS-Tween 0,05% el anticuerpo de captura que

no hubiera quedado adherido a la placa. Posteriormente se incubó durante 1h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo del kit comercial, para asegurar que el pocillo queda cubierto de proteínas y evitar una posible unión inespecífica posterior de otras proteínas.

Tras eliminar el tampón de bloqueo de los pocillos, se añadieron los patrones para obtener la recta de calibrado y las muestras problema a analizar. Los patrones se prepararon mediante diluciones seriadas a partir del más concentrado. Estos estándares sirvieron para poder relacionar concentración de citoquina con absorbancia, y así disponer de una recta de calibrado con la que poder determinar la concentración de citoquina presente en la muestra problema.

Tras la incubación durante 2h a temperatura ambiente, se procedió a lavar con PBS-Tween. En esta ocasión, los 2 primeros lavados se realizan eliminando el contenido de cada pocillo con una punta independiente para evitar contaminaciones, y los 3 posteriores mediante inversión rápida de la placa y secado sobre papel, una práctica habitual en el laboratorio.

Posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario también denominado anticuerpo de detección. Dicho anticuerpo va unido a estreptavidina, y se emplea a una dilución 1/250 en tampón de bloqueo. Se incubó 1h a temperatura ambiente, se lavó con PBS-Tween, y se añadió la peroxidasa conjugada a la avidina (avidina-HRP) a dilución 1/250 en tampón de bloqueo, dejando incubar durante 30 min a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados de la placa con PBS-Tween y se añadió el sustrato (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina) a cada pocillo, incubándose 15 min en oscuridad, ya que este sustrato es fotosensible y se oxida en presencia de luz. La reacción se detiene adicionando ácido sulfúrico 2N (Panreac Química S.A., Barcelona, España).

La absorbancia de cada pocillo fue medida directamente en un espectrofotómetro lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm y corregida en 570 nm. Con los datos de concentración y absorbancia obtenidos con estos estándares, se realizó una recta de calibrado de la que se extrapolaron los valores de concentración de las muestras problema. En la Figura 3.4 se muestra un ejemplo de la recta de calibrado obtenida para el ELISA específico de TNF- α .

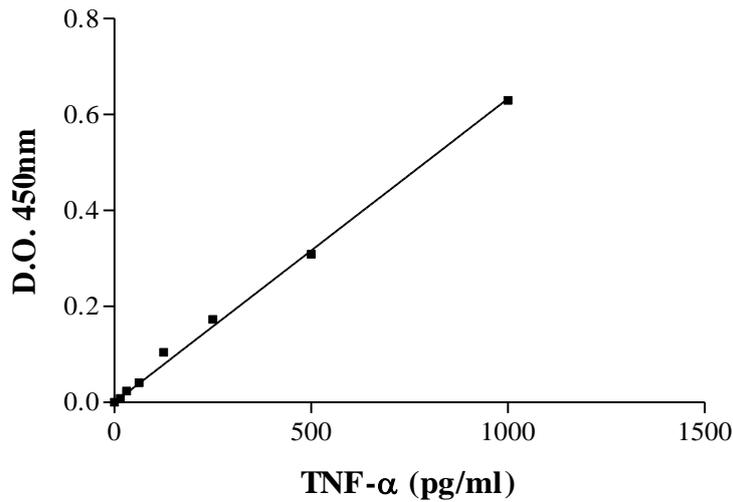


Figura 3.4. Recta de calibrado para medida de TNF- α mediante ELISA.

3.15. Captura de imágenes

Las imágenes de los diferentes tratamientos fueron captadas con un microscopio Leica DM6000B, que incorpora una cámara Leica DFC280 conectada a un PC, con el software de adquisición Leica Application Suite V 2.5.0 R1. Las imágenes se capturaron en microscopía de campo claro, utilizando el objetivo de 40X y 100X. Cuando fue necesario se aplicó el contraste interferencial de Nomarski.

3.16. Soporte bioinformático, representación gráfica de los resultados y tratamiento estadístico de los datos

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se han empleado las siguientes herramientas bioinformáticas disponibles en internet:

Pubmed: Base de datos de revistas científicas de la biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Google Académico: Buscador de bibliografía especializada de Google. <https://scholar.google.es/>

Flowing Software 2: Programa gratuito diseñado para el análisis y representación de datos obtenidos por citometría de flujo. <http://www.uskonaskel.fi/flowingsoftware/>.

Prism Graph Pad 5: Programa de representación de datos y análisis estadístico.

ImageJ: software de libre distribución para el procesado y análisis de imágenes desarrollado por el NIH. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Mendeley: Gestor bibliográfico de libre acceso que permite insertar, referenciar y organizar los artículos científicos citados en esta Memoria. <https://www.mendeley.com>.

3.16.1. Análisis estadístico de los datos

Las muestras de cada ensayo se analizaron por triplicado, repitiendo cada experimento un mínimo de tres veces. En las correspondientes gráficas aparece representado el valor medio de los datos y su desviación estándar. La distinción entre los valores medios obtenidos fue estadísticamente significativa en $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), en función del test de rango múltiple de Duncan o de Mann Whitney, según se indique en cada Figura. Cuando los datos se presentan a través de imágenes, éstas son representativas de los resultados obtenidos en al menos tres experimentos independientes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**A. ANÁLISIS DE LA VALIDAMICINA A
COMO COMPUESTO
ANTIFÚNGICO EN *C. albicans***

La validamicina A (Val. A) es un heteroglucósido formado por una fracción aglicona (validoxilamina A) y el monosacárido D-glucosa unidos por un enlace β -glucosídico. Las validoxilaminas se han descrito como potentes inhibidores de la actividad trehalasa en distintos sistemas biológicos. En concreto, Val. A actúa como un inhibidor competitivo de la trehalasa citosólica en hongos fitopatógenos, al presentar una estructura similar a la trehalosa (Asano *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 2004). Por este motivo, y dado el interés de nuestro grupo en el estudio de las enzimas involucradas en el metabolismo de la trehalosa como potenciales antibióticos antifúngicos, hemos considerado a Val. A como una molécula potencialmente interesante, susceptible de ser probada frente al patógeno oportunista *C. albicans*, principal objetivo del presente capítulo. Dichos análisis fueron realizados sobre los fondos genéticos URA⁺ y URA⁻ de la cepa CAI-4 de *C. albicans* y sus correspondientes mutantes isogénicos (*atc1 Δ /atc1 Δ*) carentes de trehalasa ácida (ver Materiales y Métodos). Debido a la obtención de unos resultados similares, sólo mostraremos los resultados obtenidos en el fondo genético URA⁻ de *C. albicans* en el presente capítulo. No obstante, los datos referentes al fondo URA⁺ se pueden encontrar en Guirao-Abad *et al.* (2013).

A.1. Efecto de Val. A sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans*. Determinación de la CMI₅₀ y CMI₉₀.

En primer lugar procedimos a analizar si Val. A tenía algún efecto sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans* y, en tal caso, determinar la concentración mínima de Val. A necesaria para reducir a la mitad la población celular, así como la concentración mínima necesaria para diezmarla (CMI₅₀ y CMI₉₀). En la Figura A.1A, se observa como Val. A tiene un efecto inhibidor sobre el crecimiento celular de *C. albicans*.

Al realizar dicho estudio en base a la actividad metabólica analizada por MTT se observó una mayor sensibilidad de la cepa CAI-4 frente a las distintas concentraciones de Val. A en los tiempos mencionados (Fig A.1B). Por tanto, las CMIs se calcularon a través de los datos obtenidos por MTT obteniendo una CMI₅₀ de 3,2 y 6,4 mg/ml y una CMI₉₀ de 6,4 y 12,8 mg/ml en función al tiempo de incubación (24 y 48h, respectivamente).

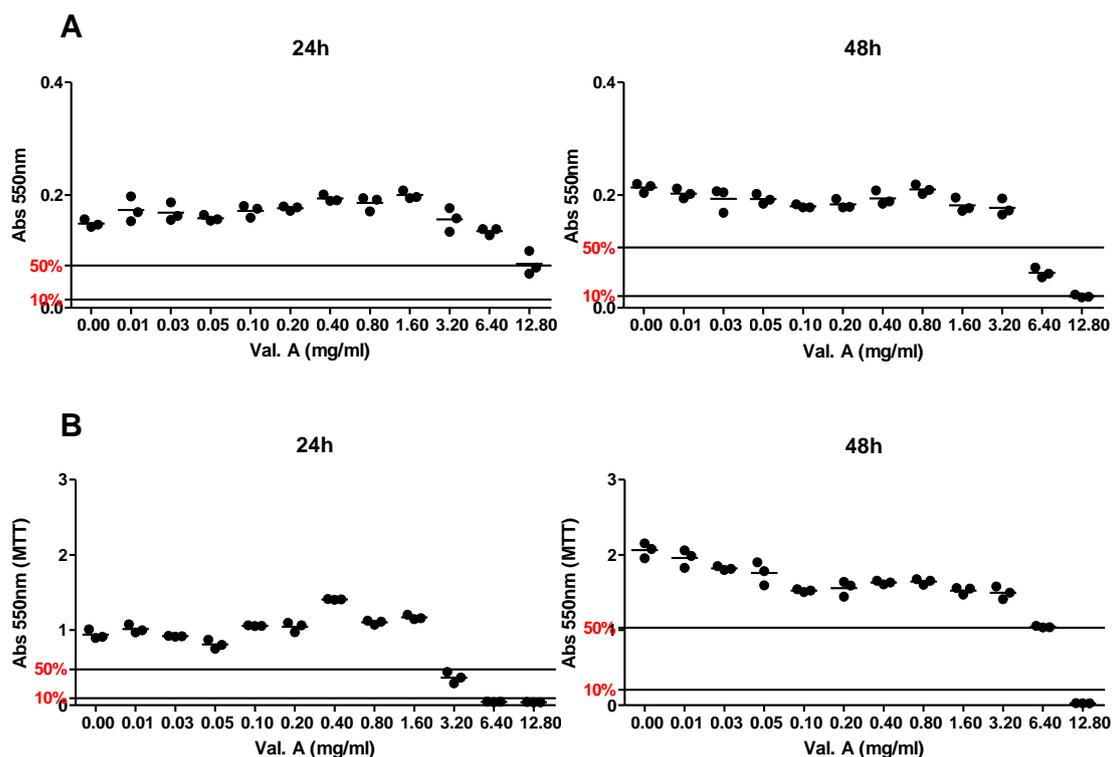


Figura A.1. Determinación del efecto de Val. A sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans*. Las células se incubaron durante 24 y 48 horas en medio RPMI a 37°C con distintas concentraciones de Val. A (ver Materiales y Métodos). La determinación se realizó de las siguientes formas: A) En base al incremento de la turbidometría y B) en función de la actividad metabólica determinada por el método de MTT.

Una vez comprobada la sensibilidad de la cepa CAI-4 al efecto de Val. A en medio RPMI, procedimos a analizar este mismo efecto sobre YPD debido a que es el medio de cultivo principal en el que realizamos los distintos ensayos sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans* y, por tanto, es fundamental analizar alguna posible modificación de la sensibilidad celular frente a Val. A. Para ello, acotamos el rango de concentraciones centrándonos en aquellas donde Val. A empezaba a mostrar un efecto antifúngico moderado en RPMI (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 mg/ml). Como podemos ver en la Tabla A.1, el efecto antifúngico de Val. A sobre la población celular varió en función de la técnica empleada, siendo el ensayo de viabilidad celular en medio sólido donde se detectó una mayor sensibilidad, seguido del ensayo por MTT y, por último, el ensayo turbidimétrico que fue el menos sensible para detectar dicho efecto. Por tanto, las CMI₅₀ se obtuvieron a partir de los ensayos de viabilidad en placa, obteniendo una CMI₅₀ de 0,5 mg/ml a 24h y 48h, y una CMI₉₀ de 4 mg/ml a 48h (Fig. A.2). Debido a que la CMI₅₀ en medio YPD se sitúa en torno a 0,5 mg/ml de Val. A, decidimos trabajar con concentraciones supra e

infrainhedoras (0,1 y 1 mg/ml, respectivamente) para analizar el efecto de este inhibidor de trehalasas sobre el metabolismo del disacárido trehalosa

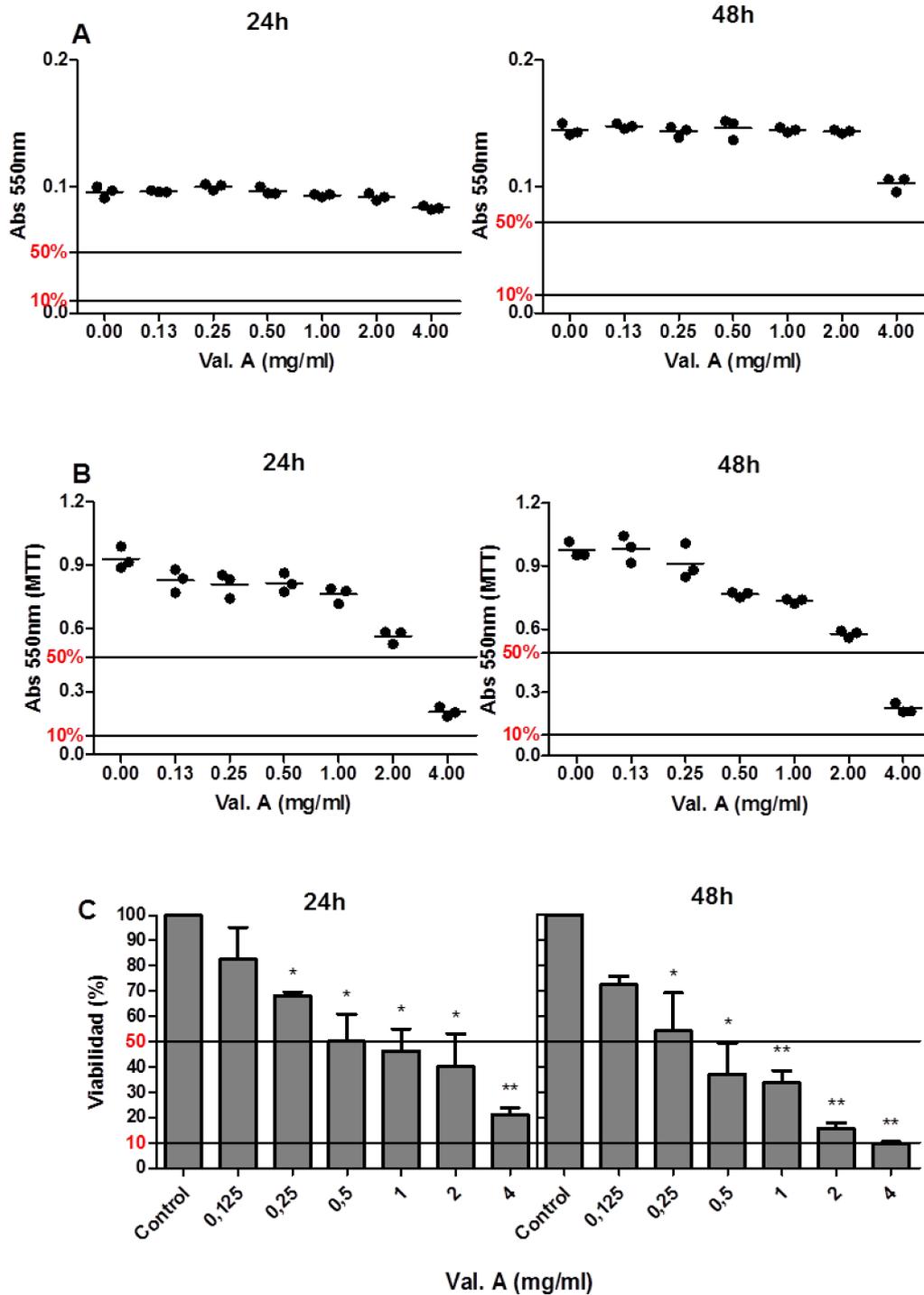


Figura A.2. Determinación del efecto de Val. A sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans*. Las células se incubaron en agitación durante 24 y 48 horas en medio YPD a 37°C con distintas concentraciones de Val. A. La determinación se realizó de las siguientes formas: A) En base al incremento de la turbidimetría, B) de la actividad metabólica analizada por MTT y C) del porcentaje de supervivencia celular en medio sólido. P<0,05 (*), P<0,01 (**), según la prueba de rango múltiple de Duncan.

Tabla A.1. Determinación de las CMI de Val. A en la cepa CAI-4 de *C. albicans*. Para la determinación de la CMI₅₀ y CMI₉₀ a 24 y 48h se empleó las siguientes metodologías descritas en Materiales y Métodos: i) Técnica turbidimétrica, ii) Método de MTT y iii) Viabilidad en placa.

Método	CMI ₅₀ (mg/ml)		CMI ₉₀ (mg/ml)	
	24h	48h	24h	48h
Turbidimetría	12,8	6,4	>12,8	12,8
MTT	3,2	6,4	6,4	12,8
YPD	0,5	0,5	>4	4

A.2. Efecto de Val. A sobre la actividad Atc1p de *C. albicans*

A continuación se procedió investigar el posible efecto inhibitorio de Val. A sobre la actividad trehalasa ácida, y su naturaleza,. Los resultados se representaron mediante una gráfica de Dixon (Figura A.3) que muestra la tipología del efecto inhibitorio causado por Val. A sobre la trehalasa ácida, ligada a la pared celular de *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004), a diferentes concentraciones de trehalosa (1-100 mM). De acuerdo con la representación de Dixon, Val. A se comportó como un inhibidor competitivo de esta actividad Atc1p externa, con una constante de inhibición (K_i) aparente de 1,7 mM (3,42 x 10⁻⁶ M). Esta K_i resulta muy superior a la determinada para la validoxilamina A (componente aglicona de Val. A) sobre la trehalasa miceliar del hongo *R. solani*, probablemente debido a que se trabajó con muestras purificadas (Asano *et al.*, 1987).

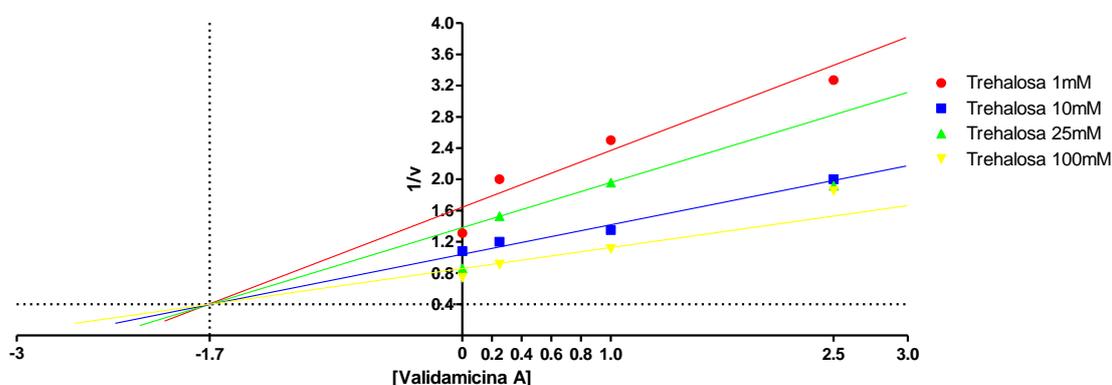


Figura A.3. Inhibición de Val. A sobre la actividad trehalasa ácida (Atc1p) de la cepa CAI-4 de *C. albicans*.

A.3. Respuesta de la cepa CAI-4 de *C. albicans* a Val. A

A.3.1. Efecto de Val. A sobre el crecimiento, la sensibilidad en placa y la viabilidad celular de la cepa CAI-4 de *C. albicans*

Una vez verificado el efecto inhibitorio de Val. A sobre la actividad Atc1p, el siguiente paso obligado consistió en analizar el posible efecto bloqueante de Val. A sobre el crecimiento y la fisiología de *C. albicans*. De modo específico, se pretendió investigar si este compuesto es capaz de alterar la viabilidad de dicha levadura patógena, y la posible afectación de sustancias protectoras, como el contenido intracelular de trehalosa; así como establecer las dosis más adecuadas para posteriores estudios.

Para la realización de estos ensayos, cultivos exponenciales de la cepa parental (CAI-4) se trataron con 0,1 mg/ml y 1mg/ml de Val. A, dejando un control de referencia sin tratar paralelamente. Las células se incubaron durante una hora con las distintas concentraciones de la droga a una temperatura de 37°C, por corresponder a las condiciones fisiológicas del cuerpo humano y ser *C. albicans* un patógeno oportunista. Se tomaron muestras cada dos horas para monitorizar el crecimiento durante 12 horas y otras muestras para los ensayos de viabilidad, sensibilidad en placa y contenido de trehalosa endógena, a 1 y 6 horas del inicio del tratamiento. Indicar por último que también se utilizaron igualmente concentraciones de Val. A de 0,01 mg/ml y 10 mg/ml (datos no mostrados), que fueron descartadas por no presentar diferencias significativas con respecto a las concentraciones de referencia.

En primer lugar, el crecimiento celular se midió como el incremento turbidimétrico de la densidad celular. Como se observa en la Figura A.4, Val. A causó una disminución significativa del crecimiento celular, que fue dependiente de la dosis aplicada, siendo ligeramente inferior en el ensayo con una concentración de Val. A de 0,1 mg/ml, y algo más notable en las muestras con la concentración 10 veces mayor.

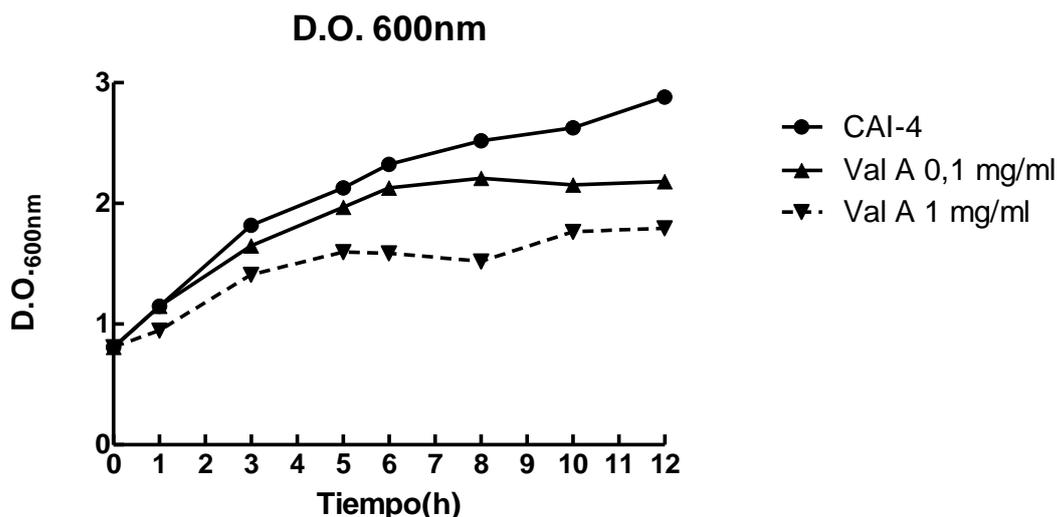


Figura A.4. Efecto de Val. A sobre el crecimiento celular en cultivos de la cepa CAI-4 de *C. albicans*. Los cultivos se refrescaron en YPD a 37 °C y se dejó crecer hasta una $D.O_{600nm} \approx 0,8$. A continuación, se realizaron tres alícuotas: 1. Control sin tratamiento; 2. Cultivo con 0,1 mg/ml de Val. A; 3. Cultivo con 1 mg/ml de Val. A. Las muestras se tomaron cada dos horas durante un intervalo de 12 h. El crecimiento fue estudiado mediante medidas de la densidad óptica en los cultivos a 600 nm.

Otro método para analizar el posible efecto de Val. A sobre *C. albicans*, consistió en realizar un ensayo de sensibilidad en placa para observar si hay algún cambio apreciable en la formación y tamaño macroscópico de las colonias en muestras tratadas a distintos tiempos, al compararlas con el control. Atendiendo a las imágenes de la Figura A.5, se puede comprobar cómo tras 1 hora de tratamiento, sólo la muestra tratada con la concentración mayor de Val. A (1 mg/ml), indujo una disminución relativa en el número y apariencia de las colonias, respecto al control; mientras 0.1 mg/ml de Val. A no produjo efecto aparente. Por el contrario, a las 6 horas del ensayo, las muestras sometidas a ambas dosis de Val. A presentaron leves diferencias con respecto la muestra control. Dichas diferencias fueron más visibles a partir de la dilución 10^{-4} (Fig. A.5).

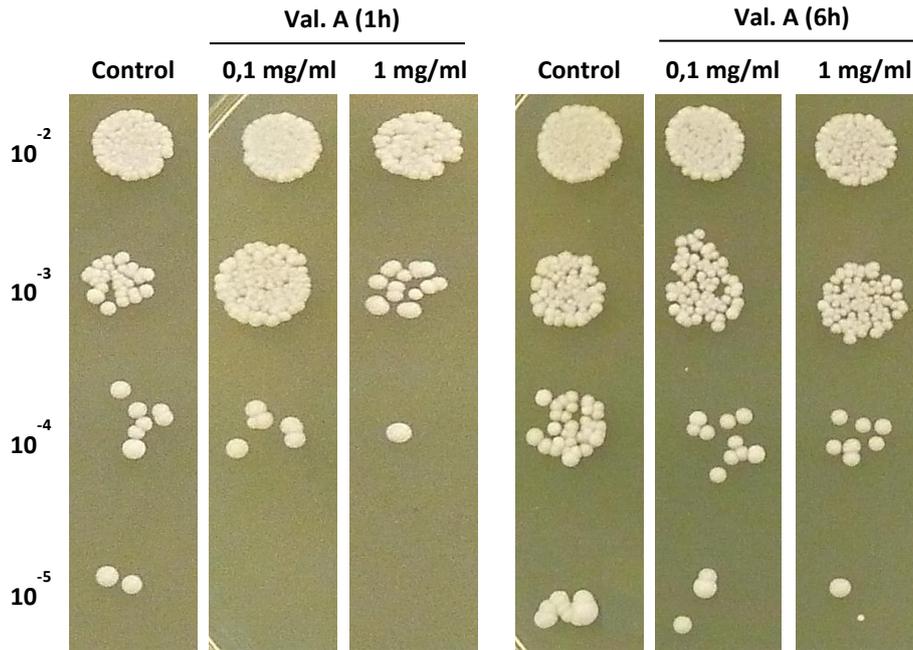


Figura A.5. Estudio de la sensibilidad en placa de *C. albicans* al tratamiento con Val. A. Los blastoconidios CAI-4 se trataron con Val. A 0,1 mg/ml y 1 mg/ml a 37°C en YPD líquido. Las muestras se recogieron tras 1 hora y 6 horas de tratamiento a 37°C, practicando las diluciones seriadas indicadas y depositando 5 µl de cada una. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24h antes de ser fotografiadas.

Por su parte, para la determinación de la viabilidad celular en medio líquido YPD se partió igualmente de cultivos en fase exponencial sometidos a 1 y 6 horas de tratamiento con Val. A. Los resultados recogidos en la Figura A.6 no permitieron apreciar una acción inhibitoria significativa de la concentración menor de Val. A (0,1 mg/ml) sobre la viabilidad celular. Este resultado podría deberse, posiblemente, a que no transcurrió tiempo suficiente para que Val. A afectara de forma conspicua al metabolismo y la fisiología de la población celular tratada. Estos datos están en consonancia con los relativos al crecimiento celular en medio YPD (Fig. A.4), donde tras 1 hora de tratamiento, no se registraron diferencias en el crecimiento. Sin embargo, a una concentración de 1 mg/ml, el porcentaje de viabilidad celular disminuyó más de un 30%. A su vez, transcurridas 6 horas de tratamiento, la concentración más baja de Val. A sí redujo de manera significativa la viabilidad (casi un 40%); mientras que, la más elevada, siguió dañando a la población celular, de la que solo sobrevivió en torno a un 30% (Fig. A.6).

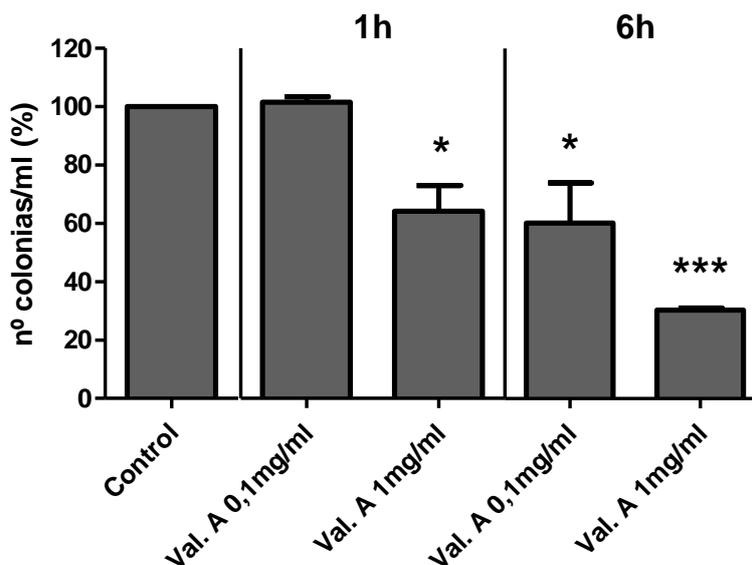


Figura A.6. Porcentaje de supervivencia de células CAI-4 frente al tratamiento con Val. A. Las muestras se recogieron a 1h y 6h tras la administración de Val. A en YPD a 37°C y se procesaron como se indica en Materiales y Métodos. $P < 0,05$ (*), $P < 0,001$ (***), según la prueba de rango múltiple de Duncan.

A.3.2. Contenido de trehalosa intracelular en respuesta a la presencia de Val. A

Como ya se ha mencionado anteriormente en Introducción, el disacárido no reductor trehalosa, cumple una función muy importante como fuente energética de reserva y como protector celular frente a distintos tipos de estrés. La síntesis endógena de trehalosa se produce en respuesta a distintas agresiones nutricionales y ambientales (Argüelles, 2000; Estruch, 2000; Iturriaga *et al.*, 2009). En consecuencia, decidimos estudiar la hipotética acumulación de trehalosa como posible mecanismo defensivo de células CAI-4, al ser sometidas a distintas concentraciones del inhibidor de la actividad trehalasa, Val. A.

Como se puede observar en la Tabla A.2, se produjo un aumento significativo del contenido endógeno de trehalosa (55% sobre los niveles basales) cuando se suministró una concentración de Val. A de 0,1 mg/ml. Sorprendentemente, a concentraciones superiores este aumento no fue apreciable o no se produjo (Tabla A.2). Probablemente, el exceso de Val. A junto a la analogía estructural existente entre la droga y el disacárido, podrían provocar una

inhibición de las enzimas implicada en la síntesis de trehalosa y, por tanto, la población celular vería mermada su capacidad de producir trehalosa *de novo*. No obstante, un descenso de los niveles de trehalosa almacenada en presencia de Val. A ha sido descrito en *Fusarium verticillioides* por Boudreau *et al.* (2013), aunque se desconoce el motivo por el cual se produce este fenómeno.

Tabla A.2. Contenido de trehalosa intracelular almacenado por células CAI-4 en respuesta a Val. A. Los cultivos exponenciales se trataron con Val. A 0,1 mg/ml y 1 mg/ml a 37°C en YPD durante 6h. Los números entre paréntesis representan la actividad relativa normalizada en relación al control para cada parámetro. También se indica la desviación estándar de las medidas. P<0,05 (*) según la prueba de rango múltiple de Duncan. [[†]nmoles trehalosa (mg peso húmedo)⁻¹].

6h	CAI-4
Tratamiento	Trehalosa Endógena [†]
Control	6,74 ± 0,95 (1,0)
Val. A 0,1mg/ml	10,45 ± 1,50* (1,55)
Val. A 1mg/ml	6,99 ± 1,25 (1,03)

Los datos obtenidos hasta ahora, especialmente los referentes al contenido de trehalosa endógena, junto con los descritos por otros autores en la bibliografía (Asano *et al.*, 1987), nos llevan a considerar, de forma preliminar, que la concentración de Val. A de 0,1 mg/ml, podría ser la más idónea para la realización de futuros ensayos. Por tanto, esta dosis será utilizada preferentemente en futuros estudios sobre la respuesta de *C. albicans* a este inhibidor de trehalasa.

A.4. Estudio comparativo de la acción antifúngica causada por Val. A y AmB en *C. albicans*: análisis fenotípico de la cepa CAI-4 y el mutante *atc1Δ/atc1Δ*, carente de actividad trehalasa ácida

Con el fin de evaluar la dimensión real de la capacidad antifúngica desarrollada por Val. A contra *C. albicans*, sugerida por los experimentos descritos, resultó imprescindible emplear un control positivo de referencia. El antibiótico escogido fue el polieno anfotericina B (AmB). Las formulaciones liposomales de AmB son, actualmente, utilizadas en la práctica clínica, incluyendo la quimioterapia contra candidiasis superficiales y sistémicas (Pfaller *et al.*, 2014). AmB se une al ergosterol (análogo del colesterol), induciendo alteraciones en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática que, eventualmente, conducen a la formación de poros, pérdida de agua y metabolitos esenciales y lisis celular (Baginski *et al.*, 2005; Sangalli-Leite *et al.*, 2011).

A.4.1. Análisis del crecimiento celular en respuesta a la presencia de Val. A y AmB

En este caso, se diseñaron un conjunto de experimentos para medir comparativamente el efecto de las dos drogas sobre el crecimiento de *C. albicans*. Además, junto a la cepa parental CAI-4, se incluyó en estos ensayos el mutante isogénico *atc1Δ/atc1Δ*, al que nos referiremos como *atc1Δ*, interrumpido en el gen *ATC1* que codifica para la actividad trehalasa ácida en *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004, 2007). Por consiguiente, sería teóricamente esperable que dicho mutante fuera insensible a Val. A, puesto que carece de Atc1p, la enzima sensible a esta sustancia (Fig. A.3).

Para estos ensayos se trabajó con una sola alícuota de Val. A (0,1 mg/ml) añadiendo simultáneamente un control positivo con AmB 0,5 µg/ml. Dicha concentración de AmB ha sido previamente empleada en otros trabajos por este grupo de investigación (González-Párraga *et al.*, 2011) y es utilizada como referencia. Se recogieron muestras cada dos horas durante un intervalo de 12 horas para monitorizar el crecimiento celular y, en paralelo, se determinaron las

dos actividades trehalasa y la trehalosa intracelular a las 5 horas de tratamiento. También se llevó a cabo el ensayo de viabilidad y de sensibilidad en placa correspondientes.

Respecto a la monitorización turbidimétrica, los resultados obtenidos se recogen en la Figura A.7. Como se puede observar, Val. A produjo una ligera inhibición en el crecimiento de la cepa parental. Dicha inhibición, sin embargo, fue muy inferior o prácticamente nula en el mutante *atc1Δ* (Fig. A.7), lo que parece indicar un carácter resistente al efecto del inhibidor de Val. A sobre la trehalasa ácida. Por otro lado, AmB produjo una fuerte reducción del crecimiento celular, mostrando el potente carácter antifúngico de este antibiótico poliénico (Fig. A.7).

Los datos de absorbancia celular aquí expuestos dan una primera indicación de la capacidad de Val. A como posible agente antifúngico, aunque su acción letal sea mucho más leve que la provocada por AmB. Seguidamente, abordamos un estudio comparativo sobre la sensibilidad causada por Val. A sobre la viabilidad celular, en comparación con AmB.

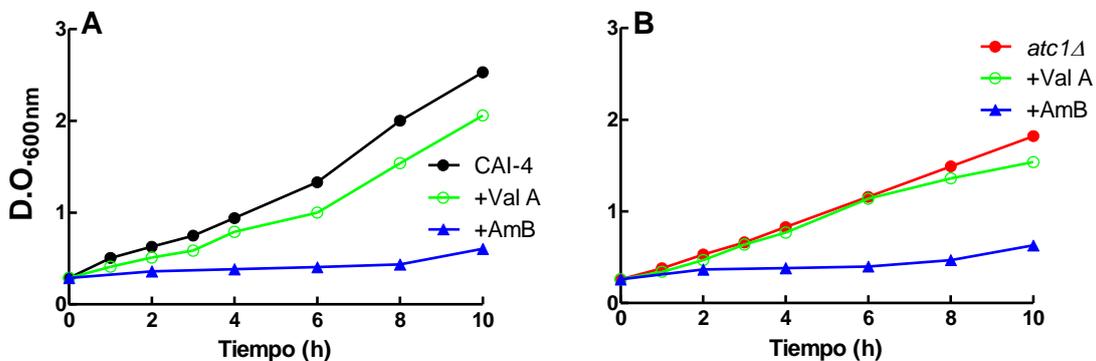


Figura A.7. Efecto de Val. A y AmB sobre el crecimiento de CAI-4 y *atc1Δ*. Cultivos CAI-4 (A) y *atc1Δ* (B) en fase exponencial temprana ($D.O_{600nm} \approx 0,3$) se trataron con Val. A (0,1mg/ml) y AmB (0,5 μ g/ml) en medio YPD a 37°C. Las muestras se tomaron cada dos horas aproximadamente, durante un periodo de tiempo de 10 horas. El crecimiento fue monitorizado mediante medidas de la densidad óptica de los cultivos a 600nm en un espectrofotómetro.

A.4.2. Análisis de la viabilidad celular

En los ensayos realizados para determinar la sensibilidad de *C. albicans* a Val. A, se utilizó siempre un control positivo, consistente en una dosis potencialmente letal de AmB, refiriendo los resultados a un control negativo, cuyas células han crecido en medio YPD sin sufrir ningún tipo de tratamiento dañino. Al determinar el porcentaje de viabilidad celular en respuesta a la aplicación de las dos sustancias, se advirtió un marcado efecto fungicida de Val. A sobre la población inicial de la cepa CAI-4, produciendo una disminución de la misma, en torno al 30%, en comparación con la muestra de referencia (Fig. A.8). Dicho efecto, sin embargo, fue mucho más acusado en las muestras tratadas con AmB (Fig. A.8), que dio lugar a la eliminación cuasi total de las células viables quedando patente la intensa acción fungicida que ejerce sobre este patógeno oportunista.

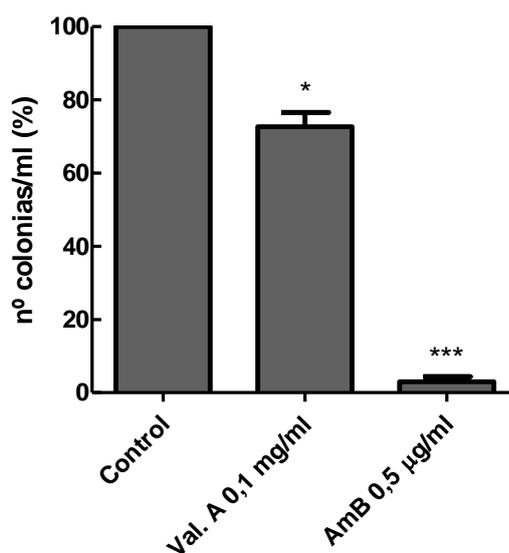


Figura A.8. Porcentaje de supervivencia de la cepa CAI-4 tras la exposición a Val. A y AmB. Las muestras se tomaron tras 5 horas de tratamiento con Val. A 0,1 mg/ml y AmB 0,5 µg/ml a 37°C en YPD. Al control se le asignó el 100%, y los valores de los otros parámetros obtenidos fueron normalizados en relación a éste. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), según la prueba de rango múltiple de Duncan.

El estudio comparativo del mutante *atc1Δ* respecto a su cepa parental, en lo referente a la viabilidad celular, merece una atención especial dada la resistencia mostrada por las células *atc1Δ* a la acción bloqueante de Val. A (Fig. A.9). Debido a variaciones en la absorbancia inicial, en este ensayo las alícuotas se recogieron a dos tiempos (5 y 7 horas). Los datos mostrados en la Figura A.9 muestran una

significativa disminución (tras aplicar la prueba de rango múltiple de Duncan) de la viabilidad celular al cabo de 7 horas de tratamiento en el mutante, dicha pérdida sería algo inferior al 20% (Fig. A.9). Por tanto, la sensibilidad de las células *atc1Δ* nulas ante la presencia de Val. A fue inferior a la mostrada por la cepa parental, corroborando las observaciones de crecimiento turbidimétrico en medio YPD, estudiado en el epígrafe anterior (Fig. A.7), que evidencian una mayor resistencia del mutante al inhibidor de trehalasa, y en consecuencia, mejores tasas de crecimiento.

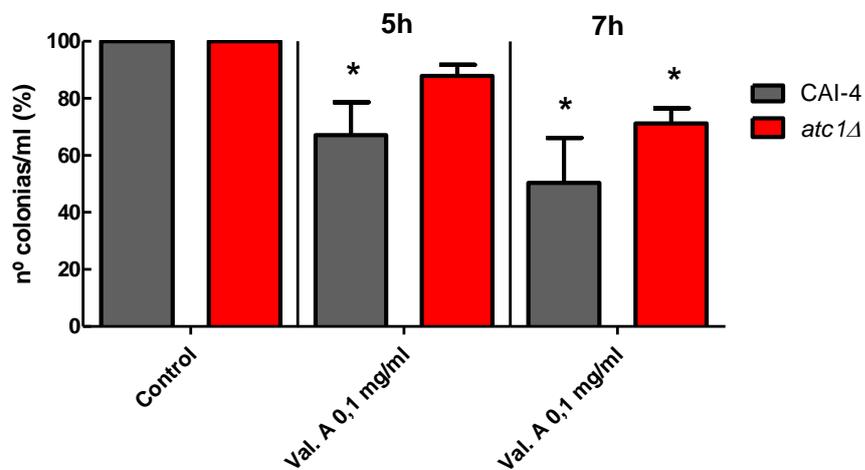


Figura A.9. Porcentaje de viables en células CAI-4 y *atc1Δ* tratadas con Val. A. Los cultivos exponenciales se trataron con Val. A 0,1mg/ml durante 5h y 7h en YPD a 37°C. El control si tratar corresponde al 100% de supervivencia y los valores de los otros parámetros están normalizados en relación con el control. $P < 0,05$ (*) según el test de rango múltiple de Duncan.

En este experimento, el efecto de AmB sobre la viabilidad del mutante no se ha incluido, puesto que la acción letal de este antibiótico fue incluso superior a la observada sobre la cepa parental (Fig. A.9), registrándose una pérdida de viabilidad casi absoluta (en torno a un 0,01% de población viable).

A.4.3. Efecto de los agentes antifúngicos sobre el tamaño celular

El análisis de las distintas muestras tratadas al microscopio óptico parecían sugerir un posible efecto directo de los dos agentes antifúngicos (Val. A y AmB) sobre el tamaño celular, tal y como se puede intuir al comparar las imágenes representadas en la Figura A.10, tomadas con la misma escala de amplificación. Dicho efecto morfológico fue particularmente conspicuo sobre todo a las 10 horas de tratamiento (Fig. A.10E y F).

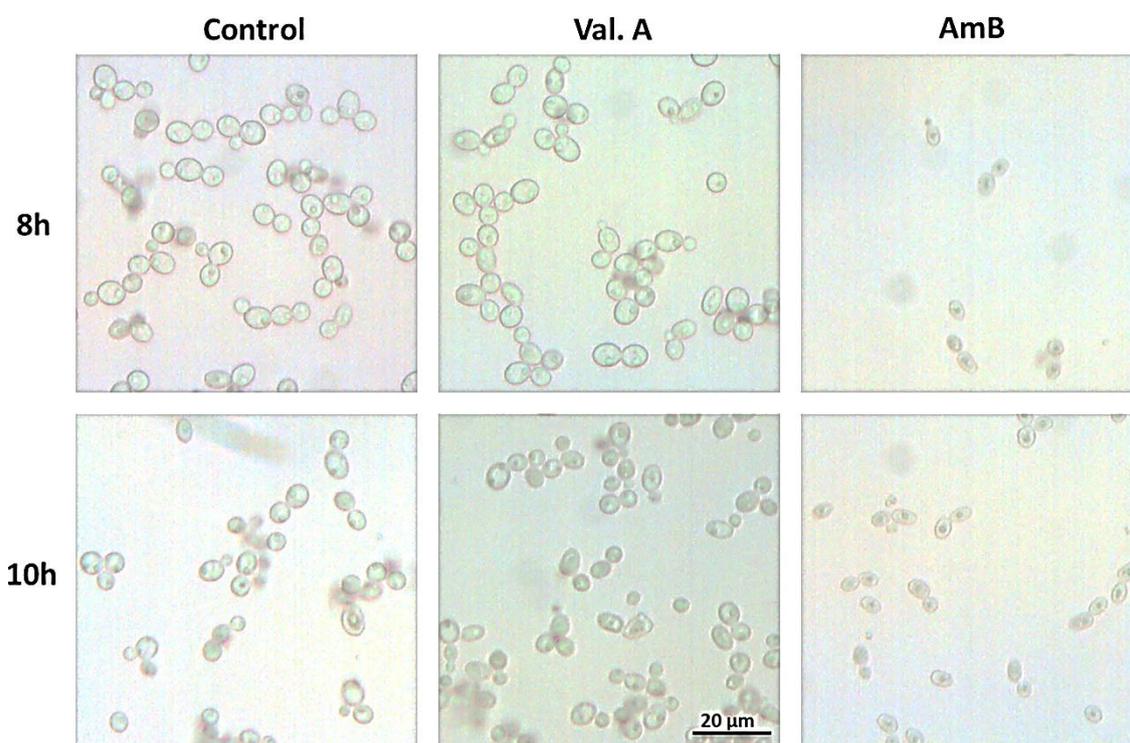


Figura A.10. Micrografías ópticas de la cepa CAI-4 de *C. albicans* tratadas con Val. A y AmB. Los cultivos exponenciales se trataron con Val. A 0,1 mg/ml y AmB 0,5 μg/ml durante 8h (paneles superiores) y 10 h (paneles inferiores) a 37°C. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de contraste de fases Leica DM6000B.

Esta observación nos llevó a realizar una medida concreta del tamaño celular siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos. Como la diferencia en el tamaño celular se hacía más evidente a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento, centramos nuestro estudio exclusivamente en las células recogidas a las 10 horas de exposición con las drogas. Se calculó la media de las áreas obtenidas, y se aplicó la desviación estándar para cada grupo de medidas, obteniendo los datos representados en la Tabla A.3.

Tabla A.3 Efecto de Val. A y AmB sobre el tamaño celular en CAI-4. Las células exponenciales se trataron con Val. A 0,1 mg/ml y AmB 0,5 µg/ml durante 10h a 37 °C. Los números entre paréntesis hacen referencia a la desviación estándar obtenida a partir del grupo de medidas que se utilizaron para calcular la media. Los datos de área vienen expresados en µm². P<0,001 (***) según el test de rango múltiple de Duncan.

10h	CAI-4
Tratamiento	Área
Control	24,02 (±5,7)
Val. A	17,64 (±4,13)***
AmB	16,06 (±3,16)***

Así, como podemos ver en la Tabla A.3, se estableció una correspondencia entre el tamaño celular y el tipo de lesión irreversible o estrés que estaban sufriendo las levaduras; de tal modo que las células tratadas con AmB presentaron un área menor que las tratadas con Val. A, siendo el tamaño de éstas últimas inferior al de la población control, que no estuvo sometida a ningún tratamiento en específico.

A.4.4. Efecto de la Val. A en las actividades trehalasa (ácida y neutra) y catalasa

Como ya ha quedado demostrado, Val. A es un potente inhibidor de trehalasas (Fig. A.3) (Asano *et al.*, 1987), efecto probablemente debido a uno de sus componentes: la fracción aglicona o validoxilamina A que tiene una estructura similar a la trehalosa. Por este motivo, es de gran importancia estudiar el efecto que posee esta molécula sobre la actividad trehalasa global de *C. albicans*, y someter a dicho análisis tanto a la trehalasa ácida de pared (Atc1p) como a la trehalasa neutra de citosol (Ntc1p), las dos actividades enzimáticas presentes en esta levadura patógena. Adicionalmente, en este estudio también incluimos la actividad catalasa, con el fin de observar si tiene lugar la inducción de alguna actividad antioxidante cuando las células fueron tratadas con Val. A. Los ensayos se realizaron de forma comparativa con células parentales CAI-4 y con las del mutante *atc1Δ*, con la intención de confirmar la aparición de esa mayor resistencia al efecto de Val. A que se ha mostrado en las experiencias llevadas a cabo hasta el momento.

Al examinar en detalle los valores recogidos en la Tabla A.4, se apreció un efecto inhibitor de Val. A sobre ambas actividades, siendo más potente su acción sobre la trehalasa neutra que sobre la ácida. Sin embargo, la actividad ácida no presentó variaciones realmente significativas en células CAI-4. Estos resultados obedecen, probablemente, a que en fase exponencial la actividad Atc1p posee unos niveles de actividad basales muy bajos a causa de la represión catabólica por D-glucosa que sufre el gen *ATC1* en el medio de cultivo YPD fresco (Pedreño *et al.*, 2004, 2007; Sánchez-Fresneda *et al.*, 2009). Al comparar con el mutante, observamos una inhibición ligeramente inferior de la enzima neutra respecto al tipo parental (Tabla A.4). Como cabría esperar, los valores registrados de la trehalasa ácida fueron virtualmente indetectables en el mutante.

Como hemos verificado a lo largo de nuestro trabajo experimental previo, el efecto de AmB sobre la viabilidad celular de las distintas cepas estudiadas fue devastador, dando lugar a unos niveles de supervivencia muy pobres de la población tratada con este antifúngico durante 5h. Por tanto, los datos obtenidos referentes a la acción de AmB sobre las distintas actividades enzimáticas medidas no son válidos en absoluto, ya que no se han podido determinar de forma conveniente debido a esta alta tasa de muerte celular reseñada.

Tabla A.4. Niveles de actividad trehalasa ácida, trehalasa neutra y catalasa en cultivos CAI-4 y *atc1Δ* tratados con Val. A. Los cultivos se trataron con Val.A 0,1 mg/ml durante 5h a 37°C en YPD. Los números en paréntesis representan la actividad relativa normalizada en relación al control para cada parámetro. P<0,05 (*), P<0,01 (**), según la prueba de rango múltiple de Duncan. [^xnmol glucosa (mg proteína)⁻¹; [‡]mmoles min⁻¹·(mg proteína)⁻¹].

5h	CAI-4			<i>atc1Δ</i>		
	Atc1p [*]	Ntc1p [*]	Catalasa [‡]	Atc1p [*]	Ntc1p [*]	Catalasa [‡]
Control	1,53 (1,0)	17,55 (1,0)	0,68 (1,0)	<0,3	9,13 (1,0)	0,91 (1,0)
Val. A	1,17 (0,76)	9,79** (0,56)	0,58 (0,85)	<0,3	5,82* (0,64)	0,80 (0,88)

En lo referente a la actividad catalasa, no se encontraron variaciones significativas entre las muestras tratadas con Val. A respecto a los controles en ninguno de los dos tipos celulares ensayados (Tabla A.4), según el test estadístico de Duncan. Esto sugiere la ausencia de activación de la respuesta antioxidante inmediata por parte de la célula al someterla a la acción del inhibidor de trehalasas (González-Párraga *et al.*, 2003). Por tanto, concluimos de forma preliminar que la inducción de catalasa no tiene ninguna relevancia apreciable en la protección de la integridad celular frente a este tratamiento. Sin embargo, y como ya habíamos observado en ensayos previos con distintos agentes estresantes (oxidativo y térmico) la catalasa presentó niveles basales de actividad más elevados en el mutante carente de actividad *Atc1p*, que en la cepa parental, este hecho se correlaciona con la mayor resistencia de las células *atc1Δ* al estrés oxidativo (Pedreño *et al.*, 2007).

A.4.5. Medida de trehalosa intracelular tras el tratamiento con Val. A

Para completar este procedimiento experimental, analizamos el contenido de trehalosa endógena. La exposición con 0,1 mg/ml de Val. A provocó casi la duplicación del contenido intracelular de trehalosa en células parentales como podemos observar en la Tabla A.5. Es importante señalar que el mutante nulo *atc1Δ* experimentó un incremento similar al de la cepa parental (Tabla A.5), a pesar de la mayor resistencia mostrada a la droga.

Tabla A.5. Niveles de trehalosa endógena en cultivos CAI-4 y *atc1Δ* tratados con Val. A. Las levaduras se incubaron en presencia de Val. A 0,1 mg/ml durante 5h en YPD a 37°C. Las muestras fueron recogidas y el contenido de trehalosa determinado como se indica en Métodos. Los números entre paréntesis representan el valor normalizado en relación al control para cada parámetro. $P < 0,05$ (*), según la prueba de rango múltiple de Duncan. [[†] nmoles trehalosa (mg peso húmedo)⁻¹]

5h	Trehalosa Endógena[†]	
Tratamiento	CAI-4	<i>atc1Δ</i>
Control	5,33 (1,0)	5,42 (1,0)
Val. A	9,22* (1,72)	9,40* (1,73)

A.4.6. Inducción de la filamentación con suero humano

Se dispone de varios protocolos para inducir la transición levadura-hifa en *C. albicans*, que incluyen modificaciones en el pH y la temperatura, o la adición de diversas sustancias (azúcares y aminoácidos) o condiciones específicas (suero, vitaminas o ayuno previo en agua). En nuestro caso, el cambio dimórfico fue promovido mediante la adición de suero humano estéril al 10% (v/v), y la transferencia simultánea a 37 °C de blastoconidios de *C. albicans* que se hallan creciendo activamente. Se monitoriza con un hemocitómetro la emisión de tubos germinativos *in vitro* que representa la primera etapa en la formación de hifas. Esta aproximación *in vitro* tiene gran importancia ya que puede ser un fiel reflejo de la transición levadura/micelio que ocurre en el interior del cuerpo humano, durante el transcurso de un proceso infeccioso por este patógeno oportunista.

El procedimiento de inducción dimórfica seguido se explica con detalle en Materiales y Métodos. Esta técnica ha sido previamente empleada con éxito en nuestro laboratorio con otros fondos genéticos de *C. albicans* (Alvarez-Peral y Argüelles, 2000; Argüelles *et al.*, 1999; Collado-González *et al.*, 2012; González-Párraga *et al.*, 2005; Pedreño *et al.*, 2007). Se partió, por tanto, de cultivos con una densidad óptica similar, tanto de la cepa parental CAI-4 como del mutante homocigótico *atc1Δ* sometidos a exposición con Val. A, comparando el porcentaje de filamentación respecto a muestras de referencia sin la droga. Un control adicional del cambio dimórfico consistió en mantener una alícuota a 28°C sin suero humano añadido.

Como se puede comprobar en la Figura A.11, apenas se observaron diferencias reseñables en los recuentos de tubos germinativos efectuados entre los ensayos tratados con Val. A y sus respectivos tratamientos que no contienen la sustancia, sugiriendo que dicho inhibidor de trehalasas no debe ejercer ningún tipo de influencia que sea visualmente apreciable sobre la capacidad de transición dimórfica en *C. albicans*.

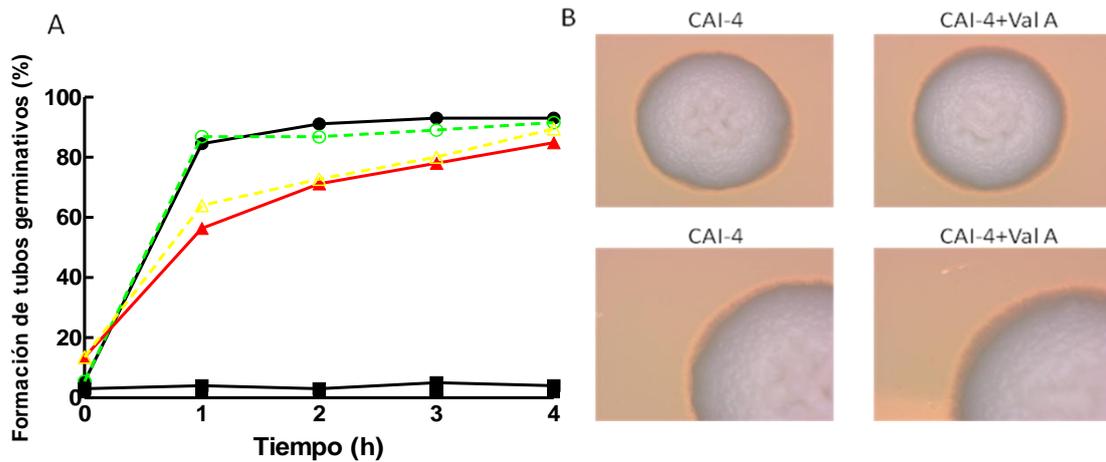


Figura A.11. Efecto de Val. A en la formación de tubos germinativos. A) Porcentaje de tubos germinativos formados inducidos por suero humano. Los cultivos exponenciales de las cepas CAI-4 (círculos negros) y *atc1Δ* (triángulos rojos) fueron suplementados con suero humano esteril (10%) e incubados a 37°C en presencia (símbolos rellenos) o ausencia (símbolos huecos) de Val. A 0,1 mg/ml. Paralelamente, células CAI-4 crecieron a 28°C sin suero (cuadrados rellenos) como control negativo de filamentación. Los valores representan el promedio de tres determinaciones. B) Formación de tubos germinativos inducidos en medio Spider. La morfología colonial de las cepas CAI-4 fue analizada en dicho medio después de 7 días de incubación a 37°C, en presencia y ausencia de 0,1 mg/ml de Val. A. En el panel superior se muestra la colonia entera mientras que el detalle del borde se muestra en el panel inferior.

Es importante señalar la rápida inducción de la formación de hifas experimentada por las células de la cepa parental, alcanzando más del 80% de filamentación al cabo de una hora. Dicho porcentaje no se vio sustancialmente modificado por la adición de Val. A. Además, el nivel de filamentación en las colonias CAI-4 observadas en medio Spider no se vio alterado bajo el tratamiento con el inhibidor (Fig. A.11B). Por el contrario, la cepa mutante mostró un ligero descenso inicial en los niveles de filamentación. Sin embargo, la formación de hifas continuó aumentando progresivamente con el tiempo de incubación; de forma que terminó igualándose con la exhibida por la cepa CAI-4 (Fig. A.11). Este comportamiento concuerda con el mostrado en los medios de inducción Spider y Lee (Pedreño *et al.*, 2007).

En cambio, cuando se determinó la síntesis intracelular de trehalosa en los controles durante la formación de hifas, resultó que el mutante *atc1Δ* acumuló más trehalosa endógena que las células CAI-4, aunque la variabilidad entre los valores registrados no fue significativa (Tabla A.6). No obstante, estos datos contrastan con los obtenidos por Pedreño *et al.* (2007), donde las células del mutante presentaban un contenido ligeramente superior de trehalosa al de las parentales. El incremento en la producción de trehalosa tras el tratamiento con Val. A fue similar en ambas cepas (Tabla A.6). Por tanto, el conjunto de los datos disponibles confirma la conclusión de que la hidrólisis enzimática de la concentración intracelular de trehalosa no es un requerimiento energético necesario para la entrada a la transición dimórfica en *C. albicans* (Argüelles, 2000; Argüelles *et al.*, 1999; Zaragoza *et al.*, 1998).

Tabla A.6. Concentración de trehalosa intracelular almacenada en cultivos miceliares CAI-4 y *atc1Δ* tratados con Val. A. Los cultivos se incubaron en presencia o ausencia de Val. A 0,1 mg/ml en medio YPD suplementado con suero humano al 10% durante 4h a 37°C. Los números en paréntesis representan la actividad relativa normalizada en relación al control para cada parámetro, donde el tratamiento control es tomado como 1. $P < 0,05$ (*), según la prueba de rango múltiple de Duncan. [[†] nmoles trehalosa (mg peso húmedo)⁻¹]

4h Tratamiento	Trehalosa Endógena [†]	
	CAI-4	<i>atc1Δ</i>
Control	3,61 (1,0)	4,76 (1,0)
Val. A 0,1mg/ml	6,88* (1,91)	9,70* (2,04)

A fin de ilustrar las distintas etapas secuenciales en la conversión levadura-hifa de *C. albicans*, a continuación se muestran una serie consecutiva de imágenes representativas de dicha transición dimórfica. Las micrografías ópticas han sido tomadas en la cepa CAI-4 sin tratamiento con Val. A.

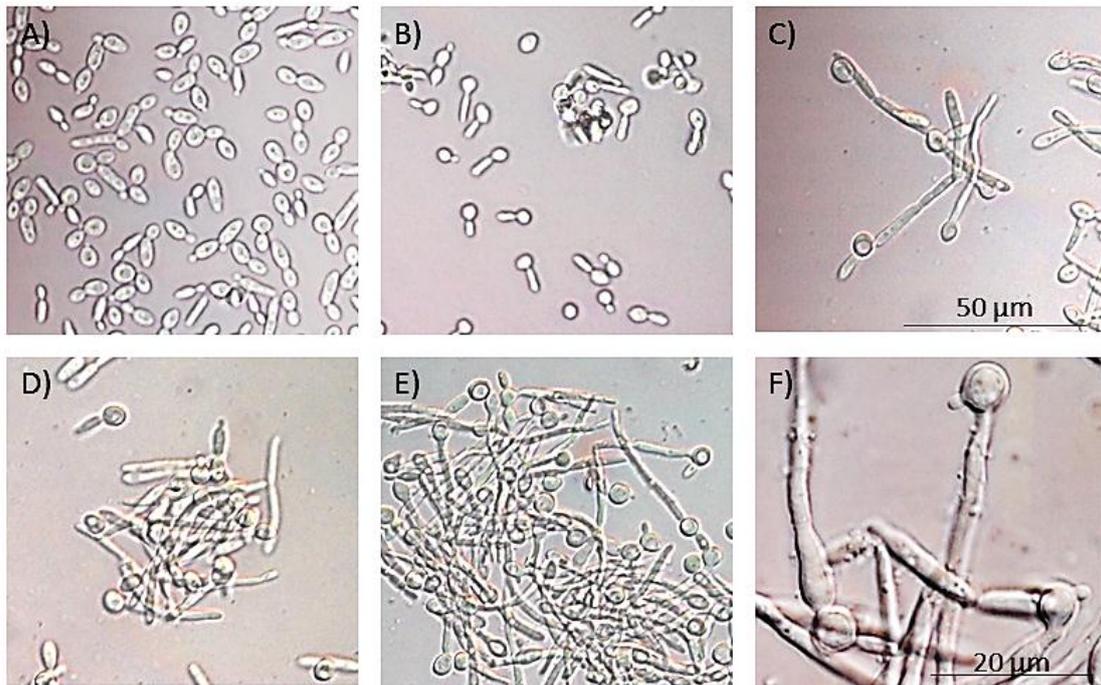


Figura A.12. Micrografías ópticas de células CAI-4, usando la técnica de contraste interferencial de Nomarski, que ilustran las distintas etapas en la transformación de la respectiva fase levaduriforme, hasta estructura miceliar. Los cultivos fueron incubados a 28°C en medio YPD y posteriormente se centrifugaron y precalentaron en YPD a 37°C, suplementado con suero humano al 10%. Las muestras y tamaño de imagen al microscopio correspondientes fueron: **A)** 0h (40x), **B)** 1h (40x), **C)** 2h (40x), **D)** 3h (40x), **E)** 4h (40x), **F)** 4h (100x).

A.4.7. Análisis del posible efecto sinérgico de Val. A con AmB.

Como se ha podido observar a lo largo del presente capítulo, Val. A presentó un débil poder antifúngico si la comparamos con AmB, sobre los mismos cultivos celulares CAI-4 (Fig. A.8). Sin embargo, el comportamiento de Val. A como inhibidor de trehalasas podría favorecer un posible efecto sinérgico al usar ambas drogas y, por tanto, incrementar significativamente su potencial antifúngico. En tal caso, la posible reducción de la dosis necesaria de AmB para lograr un efecto letal en *C. albicans* sería de gran importancia clínica debido a la elevada toxicidad del polieno. Para ello, se utilizó una concentración de AmB 10 veces menor que la usada hasta el momento (0,05 µg/ml), con el fin poder apreciar un posible efecto sinérgico. Sin embargo, no se estableció tal efecto entre ambas drogas cuando se analizó la viabilidad celular (Fig A.13), mostrando las células tratadas con AmB (0,05 µg/ml) una mayor citotoxicidad, independientemente de su uso junto con Val. A (Fig A.13). Del mismo modo, 0,1 mg/ml de Val. A siguió mostrando una

ligera reducción de la supervivencia celular incluso cuando las células fueron pretratadas durante una hora con AmB (Fig. A.13)

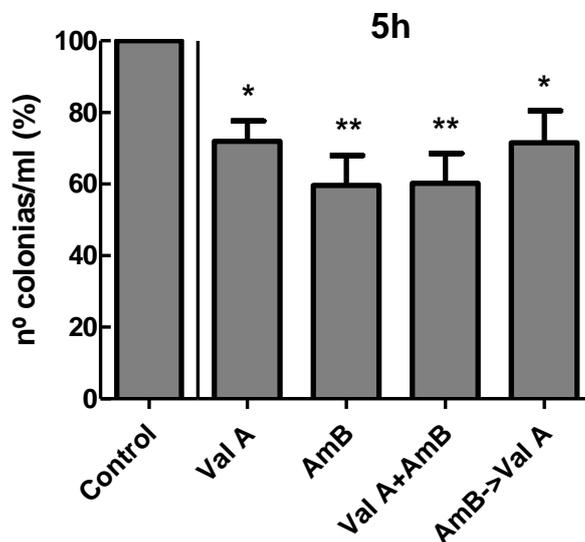


Figura A.13. Efecto de la combinación de Val. A y AmB sobre la viabilidad celular de la cepa CAI-4. Los cultivos fueron tratados durante 5h a 37°C con ambas drogas individualmente (Val. A 0,1 mg/ml y AmB 0,05 µg/ml), conjuntamente (Val. A 0,1 mg/ml + AmB 0,05µg/ml) o preincubándolos durante una hora con AmB 0,05µg/ml, seguido de 5h con Val. A 0,1 mg/ml. Los cultivos sin tratar se mantuvieron a 37°C como control. Los valores muestran la media ± DE de tres medidas independientes. P<0,05 (*), P<0,01 (**), según el test de rango múltiple de Duncan.

A pesar de que no se estableció un efecto sinérgico entre Val. A y AmB sobre la viabilidad celular de la cepa CAI-4 de *C. albicans*, Val. A afectó a las actividades trehalasa neutra y ácida, experimentando éstas una disminución de su actividad incluso cuando fueron tratadas conjuntamente con AmB (Tabla A.7). Por su parte, la trehalosa almacenada aumentó su concentración intracelular en presencia de Val. A, siendo dicho aumento mayor con AmB, como ya esperábamos (Tabla A.7). Sin embargo, al aplicar conjuntamente Val. A y AmB sobre los cultivos, el incremento del disacárido fue prácticamente idéntico al observado en los cultivos tratados únicamente con el polieno (Tabla A.7). Por tanto, sigue sin establecerse un efecto sinérgico al analizar el efecto conjunto de ambos compuestos sobre los cultivos. Esto nos llevó a pensar que la inhibición de las actividades trehalasas producida por Val. A no es letal para la levadura, pudiendo activar otras rutas metabólicas que le permitan contrarrestar su incapacidad para hidrolizar trehalosa.

Tabla A.7. Niveles de actividad trehalasa ácida, trehalasa neutra y catalasa en cultivos CAI-4 tratados con Val. A y AmB de forma combinada. Los cultivos se incubaron durante 5h a 37°C con ambas drogas individualmente (Val. A 0,1 mg/ml y AmB 0,1µg/ml), conjuntamente (Val. A 0,1 mg/ml + AmB 0,1µg/ml) o preincubándolos durante una hora con AmB 0,1µg/ml, seguido de 5h con Val. A 0,1 mg/ml. Los números en paréntesis representan la actividad relativa normalizada en relación al control para cada parámetro. P<0,05 (*), P<0,01 (**), según el test de rango múltiple de Duncan. [^xnmol glucosa (mg proteína)⁻¹; [‡]mmoles min⁻¹(mg proteína)⁻¹; [†]nmoles trehalosa (mg peso húmedo)⁻¹].

5h	CAI-4			
Tratamiento	Atc1p ^x	Ntc1p ^x	Catalasa [‡]	Trehalosa Endógena [†]
Control	1,4 (1)	10,25 (1)	1,32 (1)	5,74 (1)
Val. A 0,1 mg/ml	1,06 (0,76)	6,87** (0,67)	1,33 (1,01)	9,77* (1,70)
AmB 0,1 µg/ml	1,45 (1,04)	11,18 (1,09)	1,29 (0,98)	13,42* (2,34)
Val. A + AmB	1,1 (0,79)	7,2** (0,7)	1,24 (0,94)	13,18* (2,3)
AmB -> Val. A	1,12 (0,76)	6,46** (0,63)	1,34 (1,02)	9,51* (1,66)

Como ya hemos demostrado en la presente Memoria, la actividad catalasa no fue estimulada en presencia de Val. A 0,1 mg/ml aunque tampoco de AmB 0,05 µg/ml tras 5h de tratamiento, ya que no se pudo observar un aumento significativo de dicha actividad (Tabla A.7).

A.5. Sensibilidad de las células humanas al efecto de Val. A

Dada la baja toxicidad selectiva de ciertos antifúngicos empleados clínicamente para mitigar o erradicar las infecciones producidas por *C. albicans* (Catalán y Montejo, 2006), es importante estudiar la susceptibilidad de las células humanas a Val. A. Para ello, se realizaron una serie de ensayos empleando la técnica de MTT sobre la línea celular humana THP-1, y se detectó a partir de que concentraciones la Val. A es dañina para dichas células. En la Figura 3.14 apreciamos como concentraciones superiores a 0,8mg/ml afectan a la viabilidad celular, de forma dosis-dependiente, tanto a las 24h como a las 48h de incubación. Es importante señalar que la citotoxicidad mostrada es similar a la observada sobre las células CAI-4 de *C. albicans* en la Fig. A.1.

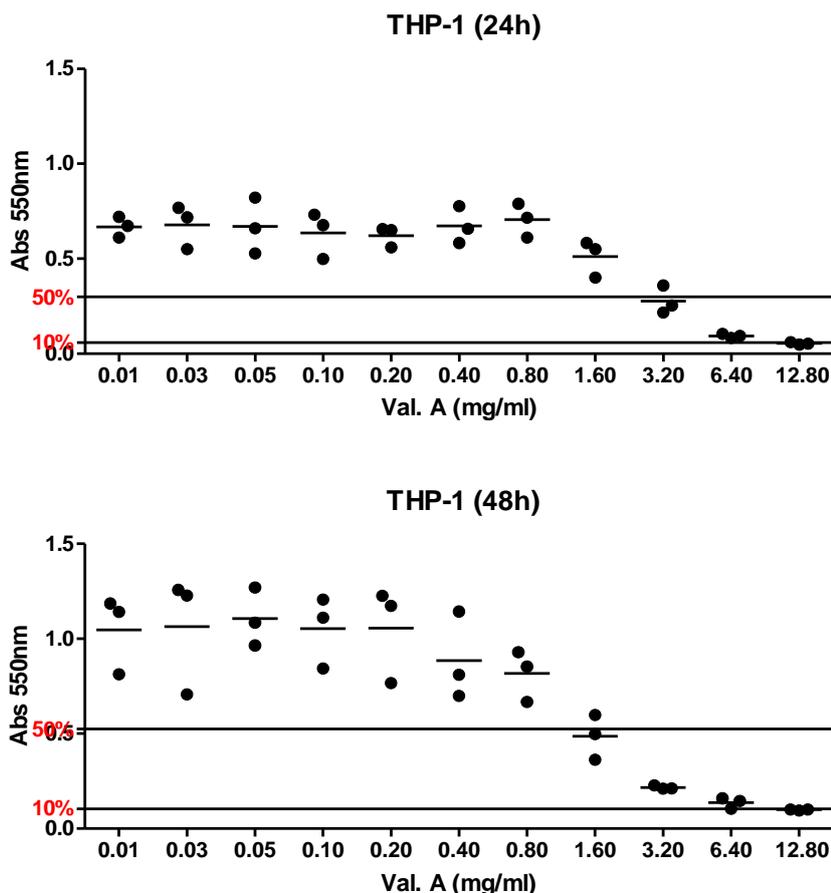


Figura A.14. Estudio de la toxicidad de Val. A sobre células THP-1. Las células THP-1, diferenciadas a macrófagos tras ser tratadas 24h con PMA, fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 cél/ml en medio RPMI, y sometidas a distintas concentraciones de Val. A durante 48h a 37°C. La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante el método de MTT.

Del mismo modo, se analizó el efecto de la Val. A sobre cultivos primarios humanos, con el fin de comprobar posibles diferencias existentes en la resistencia o sensibilidad de células sanas a la droga, respecto a las células tumorales. Para ello, se obtuvieron linfocitos y macrófagos procedentes de la sangre de voluntarios sanos. Los datos de toxicidad obtenidos por MTT mostraron el mismo patrón de sensibilidad que el observado en las células THP-1 (Fig. 3.15), obteniéndose una MIC_{50} de 1,6 mg/ml. En conjunto, estos datos sugieren que el uso clínico de la Val. A sería limitado, ya que su toxicidad sobre las células humanas es muy similar a la que produce en las levaduras (Fig. A.1)

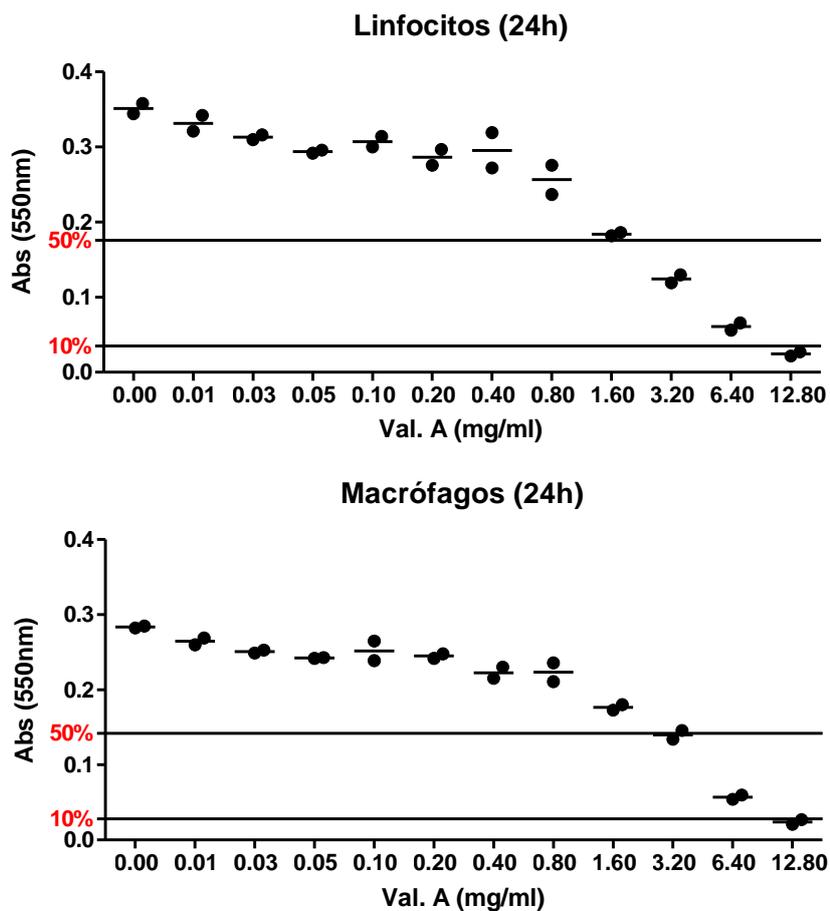


Figura A.15. Efecto de distintas concentraciones Val. A sobre linfocitos y macrófagos procedentes de la sangre periférica de pacientes sanos. Las células fueron cultivadas a una concentración de 5×10^4 cél/ml en placas de 96 pocillos en medio RPMI a 37°C con distintas concentraciones de Val. A. Tras 24h de incubación se determinó la viabilidad por el método de MTT.

**B. ESTUDIO DE LOS ANTIFÚNGICOS DE
USO CLÍNICO MICAFUNGINA Y
ANFOTERICINA B SOBRE *C. albicans***

La micafungina (MF) es un antifúngico perteneciente a la familia de las equinocandinas, muy utilizadas actualmente para el tratamiento de infecciones fúngicas, entre ellas las candidiasis invasivas (Maubon *et al.*, 2014; Perlin, 2011; Pfaller *et al.*, 2008). Como se ha revisado ampliamente en la Introducción, el modo de acción principal de las equinocandinas consiste en la inhibición de la actividad β -1,3-D-glucano sintasa, enzima implicada en la síntesis de β -1,3-D-glucano, un polímero necesario para mantener la estructura e integridad de la pared celular (Chandrasekar y Sobel, 2006; Chen *et al.*, 2011; Denning, 2003; Perlin, 2011).

Sin embargo, la información referente a las alteraciones fisiológicas producidas por estas drogas sobre *C. albicans* es escasa, a pesar de su amplio uso clínico; existiendo la posibilidad de que las equinocandinas posean otros mecanismos de acción complementarios o alternativos a los descritos, aún no caracterizados. Todo ello convierte a la MF en un compuesto antifúngico muy atractivo para ser investigado en nuestro sistema modelo. Por otra parte, dada la importancia de la AmB como terapia alternativa frente a candidiasis, así como las evidencias que demuestran inequívocamente nuevas dianas secundarias en su acción fungicida (González-Párraga *et al.*, 2011; Mesa-Arango *et al.*, 2014), la AmB ha sido incluida como control antifúngico positivo, realizando un análisis comparativo de ambos compuestos. De este modo, pudimos dilucidar y comparar el modo de acción de un polieno y una equinocandina sobre *C. albicans*.

B.1 Sensibilidad a la acción fungicida de MF y AmB en las cepas de referencia SC5314 y CAI-4 de *C. albicans*

La primera aproximación fue determinar las CMIs de ambos compuestos en las distintas cepas de *C. albicans* objeto de estudio. En esta ocasión y gracias a nuestra mayor experiencia, se siguió un método estandarizado para el cálculo de las CMIs, de acuerdo con el protocolo CLSI (Ver Materiales y Métodos). Para ello, fue incluida la cepa control de calidad, *C. parapsilosis* ATCC® 22019, cuyos puntos de corte están recogidos en el manuscrito M27-S4. En nuestras determinaciones, la CMI obtenida para la cepa control de calidad está dentro del rango delimitado por lo puntos de corte (0,5-2 μ g/ml para MF y 0,25-2 μ g/ml para AmB), demostrando

que los compuestos son estables y de calidad biológica comparativa con los productos empleados por otros laboratorios de referencia (ver Tabla B.1).

Tabla B.1. Cálculo de las CMI para MF y AmB correspondientes a las distintas cepas usadas en esta Memoria. Se siguió el protocolo CLSI (ver Materiales y Métodos) en cultivos tratados en RPMI analizados a las 24h de exposición a los antifúngicos. Para MF, la CMI es aquella cuya tasa de muerte celular es $\geq 50\%$ a las 24h, mientras que para AmB la CMI equivale al 100%.

CMI (24h)				
Especie	Cepa	CC*	Antifúngico	
			MF ($\mu\text{g/ml}$)	AmB ($\mu\text{g/ml}$)
			CMI ₅₀	CMI ₁₀₀
<i>C. parapsilosis</i> (Control de calidad)	ATCC® 22019	+	1	0,25
<i>C. albicans</i>	SC5314	+	0,016	0,12
	<i>tps2Δ/tps2Δ</i>	+	0,0078	0,12
	CAI-4	-	n.d.	n.d.
	<i>atc1Δ/atc1Δ</i>	-	n.d.	n.d.
	<i>tps1Δ/tps1Δ</i>	-	n.d.	n.d.
	RM100	+	0,016	0,12
	<i>hog1Δ/hog1Δ</i>	+	0,016	0,06

*Control de crecimiento

En conjunto, las CMIs de las cepas empleadas guardan una correlación positiva con los resultados previamente descritos por otros grupos de investigación (Tabla B.1). Así, los valores registrados en la cepa silvestre SC5314, están en el mismo rango de magnitud que los obtenidos en diferentes aislados clínicos de *Candida sp.* (Chen *et al.*, 2011; Delattin *et al.*, 2014; Mesa-Arango *et al.*, 2014; Richards *et al.*, 2008; Slater *et al.*, 2011). Debe destacarse como la cepa parental CAI-4 y los mutantes isogénicos derivados crecieron muy pobremente en el medio de cultivo empleado con esta técnica (RPMI 1640 suplementado con glutamina y 0,2% de glucosa, pero sin bicarbonato). No obstante, CAI-4 fue incluida como cepa control a lo largo del presente capítulo ya que, en un principio, se intentó realizar un análisis comparativo de dicha cepa con el mutante homocigótico carente de trehalasa ácida, *atc1Δ*, al igual que en el capítulo anterior (Capítulo 3.A) pero, en este caso, en experimentos de respuesta a MF. Sin embargo, los estudios preliminares realizados no mostraron ninguna diferencia significativa entre los dos tipos celulares al ser tratados con la equinocandina (Fig B.1).

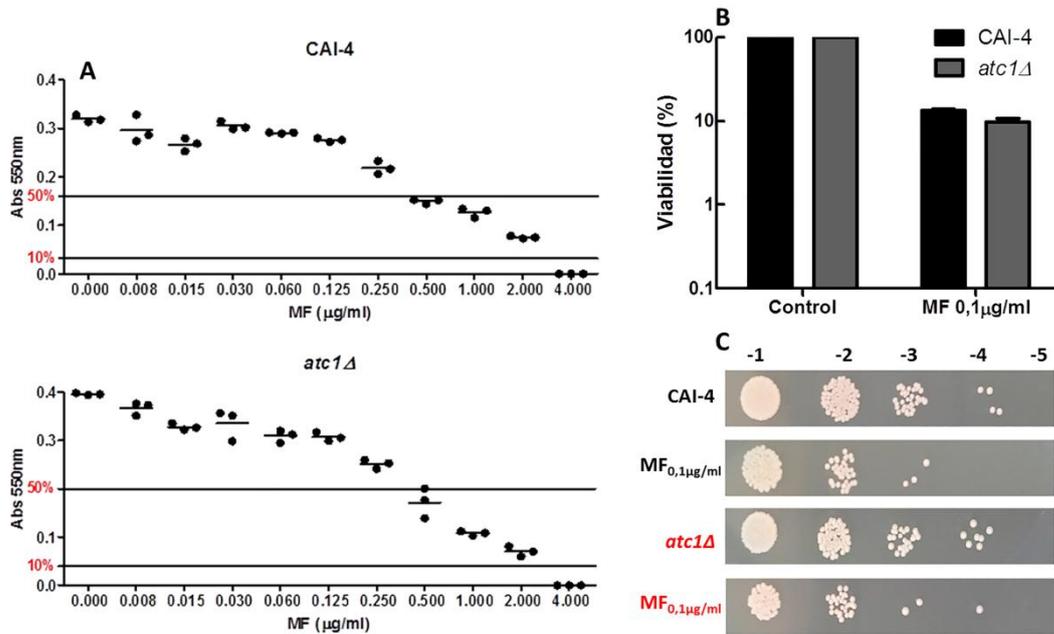


Figura B.1. Análisis del efecto de MF sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans* y el mutante isogénico *atc1Δ*. Se emplearon las siguientes técnicas: (A) Determinación de la actividad metabólica por MTT tras el tratamiento de las células con distintas concentraciones de MF (μg/ml) sobre CAI-4 y *atc1Δ*, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Porcentaje de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) en placa (C) y crecimiento de colonias en medio sólido por el método de goteo en placa con las diluciones indicadas (D) de las cepas en estudio al ser tratadas con MF (0,1 μg/ml) respecto a un control sin tratamiento. Tanto en C como en D, las muestras se refrescaron en medio YPD a baja densidad óptica (0,3) y se dejaron crecer a 37°C con agitación hasta fase exponencial. Posteriormente, se trataron con MF durante 1h y se recogieron muestras para hacer los ensayos. Los resultados mostrados representan la media ± DE de tres medidas independientes.

Respecto a las otras cepas de *C. albicans* analizadas (Tabla B.1), es de resaltar el elevado poder antifúngico de MF que mostró CMIs más bajas respecto a AmB (Tabla B.1). Además, se detectó una mayor sensibilidad al efecto de MF del mutante *tps2Δ*, que codifica una trehalosa-6P-fosfatasa específica implicada en la síntesis de trehalosa (Zaragoza *et al.*, 2002), respecto a su cepa parental (0,078 μg/ml frente a 0,16 μg/ml). A su vez, el mutante *hog1Δ/hog1Δ*, responsable en *C. albicans* de la respuesta a estrés osmótico y oxidativo, entre otras actividades fisiológicas (Alonso-Monge *et al.*, 1999, 2003), fue muy susceptible a la acción de AmB comparado con su cepa parental (0,06 frente a 0,12). Este comportamiento fue objeto de estudio en el Capítulo 3.C de la presente Memoria.

A partir del nivel de sensibilidad antifúngica aportado por los valores de las CMI, resultó factible plantear ensayos específicos para determinar la cinética de supervivencia de las poblaciones celulares y, simultáneamente, obtener datos relativos a las alteraciones fisiológicas sufridas por cada cepa. A tal fin, se midió inicialmente la resistencia de células CAI-4 a los dos antifúngicos mediante el recuento de viabilidad celular (ufc/ml) tras **una hora de tratamiento** a 37°C en medio YPD. Para ello, se inició un preinóculo que, al día siguiente, se refrescó a baja densidad óptica (0,3) y se dejó crecer hasta fase exponencial temprana ($D.O_{600nm} \approx 0,6$), momento en que se crearon alícuotas donde se añadió el antifúngico correspondiente. Para comprobar la sensibilidad de CAI-4 y puesto que procede isogénicamente de la cepa silvestre SC5314, se aplicó un rango de concentraciones por encima y por debajo de la CMI obtenida en la cepa SC5314 de referencia según el método del CLSI (Tabla B.1 y Fig. B.2).

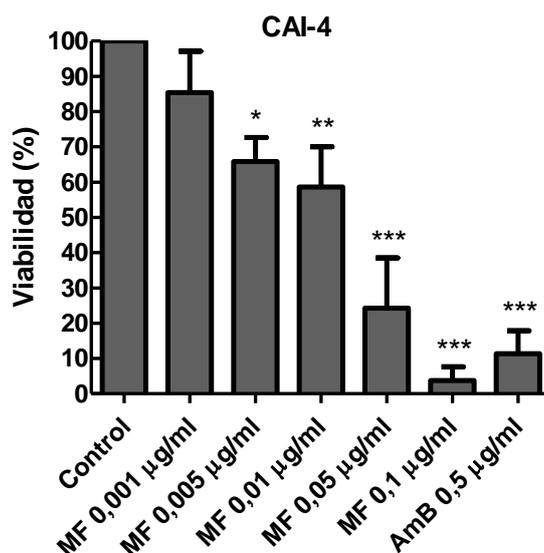


Figura B.2. Efecto de MF y AmB sobre la viabilidad celular de CAI-4. Las células se trataron durante 1h con distintas dosis de MF y AmB (0,5 µg/ml) en medio YPD a 37°C. Los valores muestran la media \pm DE de tres medidas independientes. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), según el test de Mann Whitney.

De acuerdo con los datos recogidos en la Figura B.2, se observa una clara disminución de la viabilidad celular en la cepa CAI-4 al ser tratada con MF. Dicha disminución fue dependiente de la dosis empleada, resultando especialmente evidente a las concentraciones de 0,05 y 0,1 µg/ml. Según nuestros estudios previos con AmB en las mismas cepas (González-Párraga *et al.*, 2011), la dosis de

0,5 µg/ml se escogió como la más adecuada para el análisis de los posibles cambios fisiológicos producidos en las células y fue utilizada como referencia en los distintos ensayos. MF suministrada a 0,05 µg/ml tuvo un efecto tóxico sobre la viabilidad celular similar al causado por AmB a una dosis 10 veces superior y, por tanto, fue considerada en lo sucesivo como la concentración más conveniente para realizar los análisis comparativos. Por su parte, la mayor dosis de MF (0,1 µg/ml) redujo la viabilidad celular hasta el 5%, aproximadamente.

La cepa silvestre SC5314 mostró un comportamiento similar a CAI-4 al aplicar las mismas condiciones y concentraciones de antifúngicos, mostrando una respuesta dosis dependiente al efecto de MF (Fig. B.3). Además, se aplicaron dosis de AmB por debajo de 0,5 µg/ml para comprobar su citotoxicidad a distintas concentraciones (Fig. B.3). Por tanto, este comportamiento de SC5314 corrobora la validez de los resultados obtenidos hasta el momento en CAI-4.

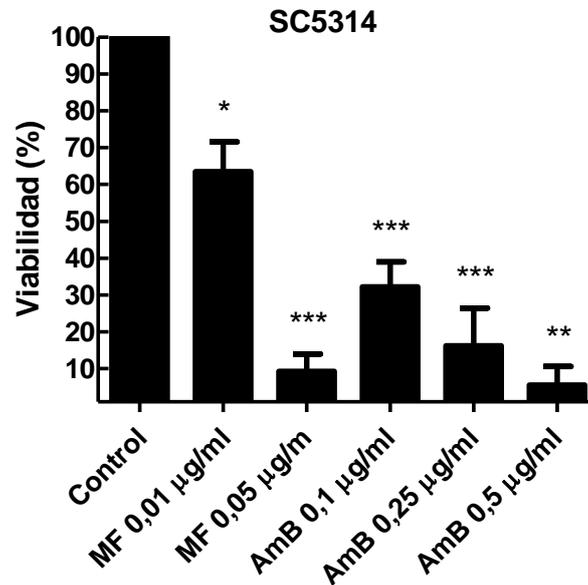


Figura B.3. Efecto de MF y AmB sobre la viabilidad de SC5314. Los cultivos se trataron durante 1h con los antifúngicos a las dosis indicadas, en medio YPD a 37°C. Los valores muestran la media ± DE de tres medidas independientes. P<(0,05) (*), P<(0,01) (**), P<(0,001) (***), según el test de Mann Whitney.

B.2. Análisis de la formación intracelular de ROS como un componente de la acción antifúngica contra *C. albicans*

Las investigaciones recientes sobre el mecanismo de acción de los principales antifúngicos de aplicación clínica, revelan un escenario más complejo del que tradicionalmente se había considerado (Kontoyiannis y Lewis, 2002; Patterson, 2005). Un ejemplo representativo lo constituye la AmB. Clásicamente, los esteroides de la membrana plasmática han sido la principal diana celular de los polienos (Akins, 2005; Brajtburg *et al.*, 1990). La unión específica de AmB promueve la formación de poros y la subsecuente pérdida de iones y electrolitos, causando alteraciones en la permeabilidad selectiva e inestabilidad osmótica de la membrana que, inevitablemente, conducen a la muerte celular (Kontoyiannis y Lewis, 2002). Sin embargo, estudios recientes cuestionan la formación de poros como requerimiento necesario para la acción fungicida de AmB (Palacios *et al.*, 2007), mientras la pérdida de potasio no correlaciona con la lisis fúngica (Mesa-Arango *et al.*, 2014).

Por otra parte, un conjunto de evidencias concluyentes, permite establecer cómo la generación de estrés oxidativo interno mediado por la formación de ROS constituye un mecanismo de acción universal de AmB contra distintas levaduras patógenas de origen clínico, y contribuye a la acción fungicida de esta droga (Delattin *et al.*, 2014; González-Párraga *et al.*, 2011; Mesa-Arango *et al.*, 2014; Sokol-Anderson *et al.*, 1986). En consecuencia, un objetivo central de esta Memoria ha sido investigar si este componente oxidativo de la acción fungicida es exclusivo de polienos, o por el contrario, extensible a otros antifúngicos de uso terapéutico, caso de las equinocandinas. En concreto, nuestro trabajo se ha centrado en la MF.

Para la detección de ROS intracelular mediante el uso de DHF se siguió el protocolo descrito por Sangalli-Leite *et al.* (2011). Este compuesto se escinde en fluoresceína al interactuar con los radicales libres, emitiendo fluorescencia verde que es medible en un citómetro de flujo. Con el fin de detectar un posible efecto dosis-dependiente, se empleó un amplio rango de concentraciones tanto de MF (0,001-10 µg/ml) como de AmB (0,05-5 µg/ml). La Figura B.4 representa una serie de las dosis utilizadas, ya que la tendencia se mantuvo idéntica en todos los casos.

Los cultivos tratados con la equinocandina vieron levemente alterada la producción interna de ROS, mostrando tan sólo un ligero incremento respecto a los controles (Fig. B.4). En cambio, la AmB indujo niveles de producción de ROS intracelular notablemente superiores en las mismas condiciones (Fig. B.4), incluso a bajas concentraciones del polieno.

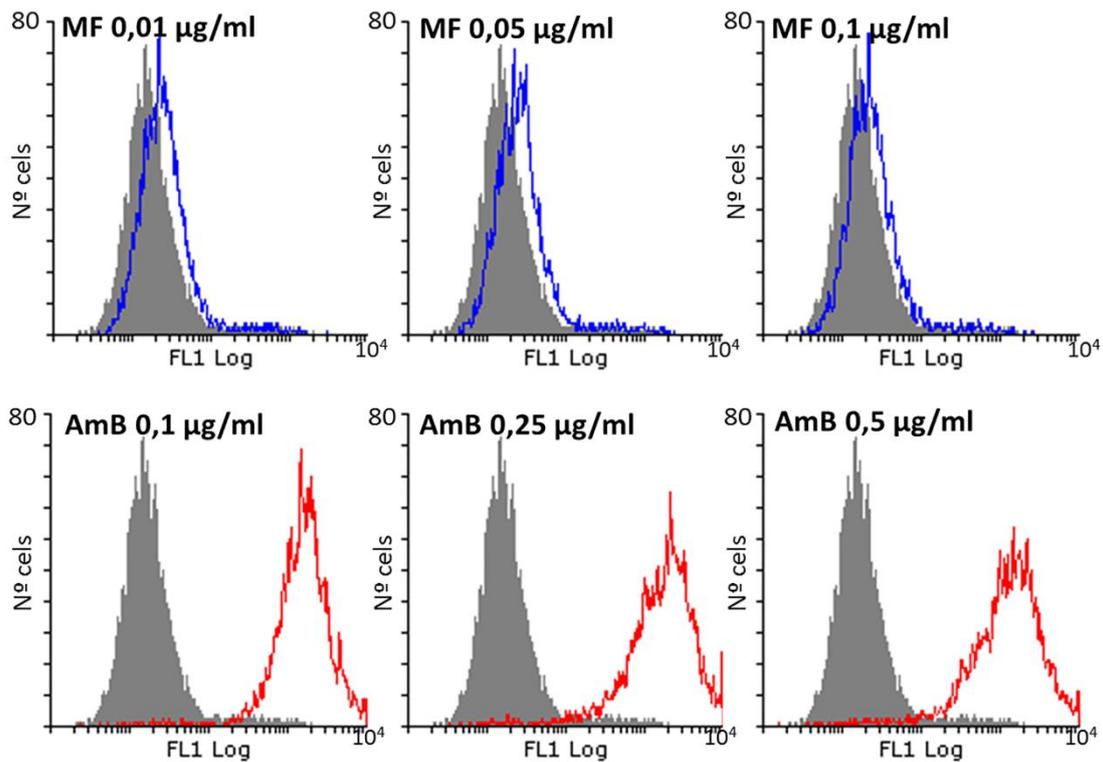


Figura B.4. Acumulación intracelular de ROS tras el tratamiento de las levaduras CAI-4 con MF y AmB en PBS. Los cultivos se trataron con los distintos agentes durante 1h a 37°C en PBS. Las muestras fueron procesadas para la determinación de ROS como se describe en Materiales y Métodos. Los histogramas grises corresponden a las células control, los azules a las células tratadas con MF y los rojos a las células tratadas con AmB. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células para cada tratamiento.

No obstante, los resultados obtenidos no concuerdan con los datos descritos por otros investigadores en diferentes cepas de *C. albicans* tratadas con caspofungina -otra equinocandina-. Este compuesto provocó un incremento más notorio de la concentración de ROS endógeno en función de la dosis empleada (Belenky *et al.*, 2013; Delattin *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2013). Además, recientemente se ha demostrado que biofilms de *C. albicans* y *C. parapsilosis* experimentaron un notable incremento de la formación de ROS en presencia de MF (Shirazi y

Kontoyiannis, 2015). Se trata, por tanto, de resultados diferentes a los aquí registrados con MF, que sólo promovió un aumento moderado de radicales libres (Fig. B.4). Sin embargo, en los citados trabajos, el fármaco se aplicó sobre células procesadas en medio rico, mientras en el presente caso, el análisis de las células se realizó en PBS. En consecuencia, decidimos estudiar también la síntesis de ROS sobre muestras tratadas directamente en cultivos creciendo activamente en medio YPD. De este modo, se dan las mismas condiciones experimentales utilizadas para determinar la supervivencia celular (Fig. B.2); pudiendo establecer una relación comparativa correcta entre viabilidad celular y formación de ROS en respuesta a la exposición con antifúngicos.

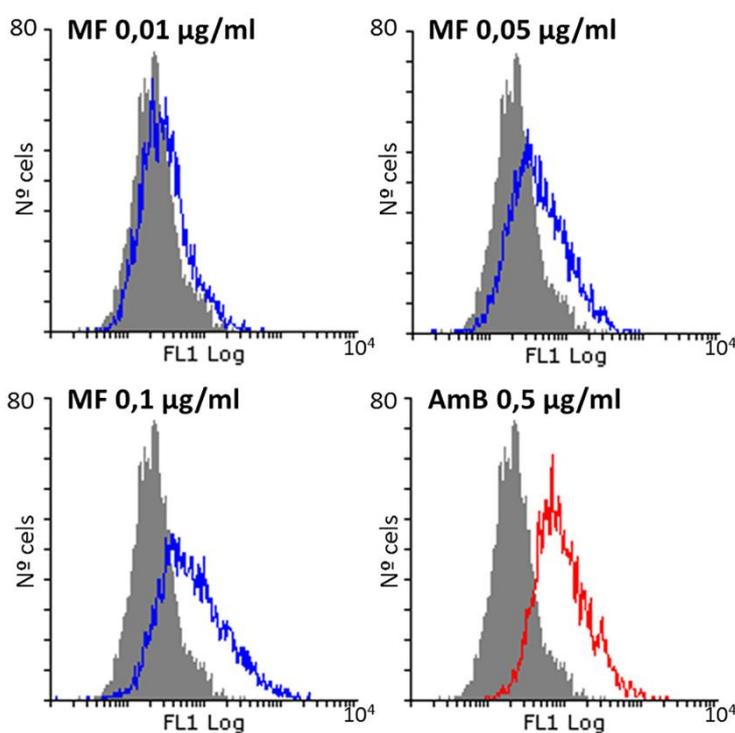


Figura B.5. Acumulación interna de ROS tras el tratamiento de la cepa CAI-4 con MF y AmB en YPD. En este ensayo, los cultivos de CAI-4 se trataron con las distintas drogas en medio YPD (1h a 37°C). La detección de ROS se realizó por citometría de flujo. Las muestras control corresponden a los histogramas grises, las tratadas con MF se representa en azul y las tratadas con AmB en rojo. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células para cada tratamiento.

Como se representa en la Figura B.5, fue apreciable un claro aumento dependiente de la dosis de ROS intracelular al tratar las células con MF en YPD. La AmB, por su parte, mostró niveles inferiores respecto al procesamiento celular en

PBS, posiblemente debido a alteraciones del pH, aunque la inducción de ROS endógena siguió siendo patente (Fig. B.4; B.5).

Paralelamente a las determinaciones de ROS, se analizó la necrosis celular con yoduro de propidio (IP). En estos ensayos, la MF no indujo cambios perceptibles al mantener las células en PBS respecto al control, en todas las concentraciones empleadas (Fig. B.6). Al aplicar la equinocandina en levaduras creciendo en YPD, se obtuvo un importante nivel de muerte celular al aplicar concentraciones de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. B.6), las mismas que indujeron una marcada producción de ROS (Fig. B.5). El polieno, sin embargo, mostró una actividad fungicida similar tanto en YPD como en PBS al aplicar IP (Fig. B.6) pero menor que la observada con MF en YPD (Fig. B.6). No obstante, AmB promovió siempre mayores valores de ROS, como se ha demostrado anteriormente (Fig. B.4 y B.5). Por tanto, los resultados obtenidos con el polieno parecen indicar que, probablemente, el grado de explosión oxidativa no siempre va asociado a un efecto fungicida inmediato de las drogas.

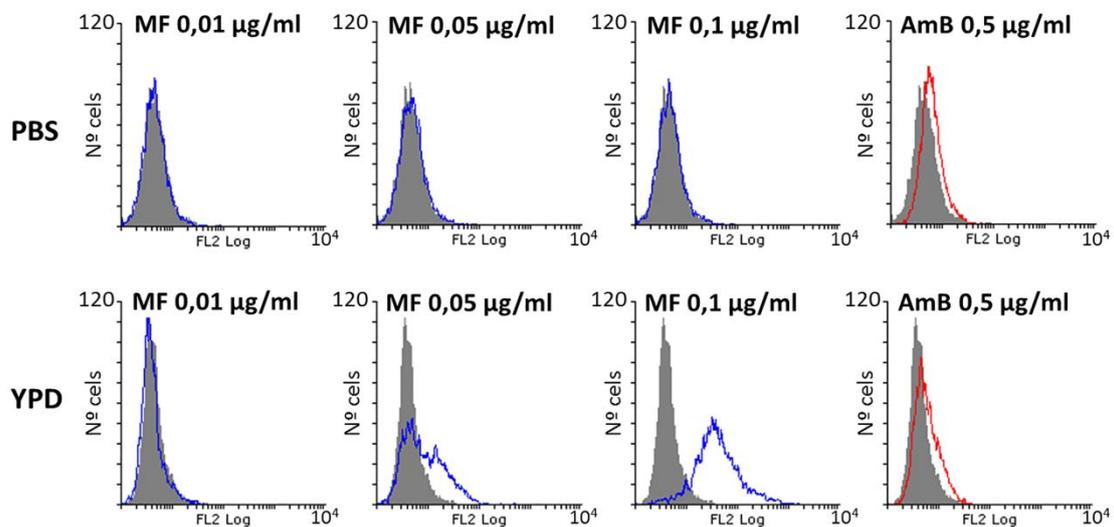


Figura B.6. Análisis de la viabilidad celular mediante la tinción con IP sobre células CAI-4 tras el tratamiento con MF y AmB. Las levaduras se procesaron y trataron con MF y AmB en PBS o YPD durante 1h a 37°C. Las muestras fueron tratadas con IP y la fluorescencia emitida analizada por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Las células control corresponden a los histogramas grises, las tratadas con MF se representan en azul y las tratadas con AmB en rojo. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células para cada tratamiento.

En el caso de células tratadas con la equinocandina, parece establecerse una relación directa entre la riqueza nutritiva del medio empleado y el potencial antifúngico de la droga, la cual muestra una citotoxicidad más baja cuando las células se procesaron en PBS (Fig. B.7). Además, estos datos concuerdan con los observados en la Figura B.6 con IP, donde MF a una concentración de 0,05 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tiene un mayor potencial fungicida en YPD que en PBS. Según Marcos-Zambrano *et al.* (2014), en biofilms de *C. albicans*, las levaduras con mayor actividad metabólica mostraron una susceptibilidad más elevada al antifúngico. Esto podría explicar la menor eficacia de la MF en PBS, ya que al ser un medio carente de nutrientes las células presentarán una actividad metabólica menor.

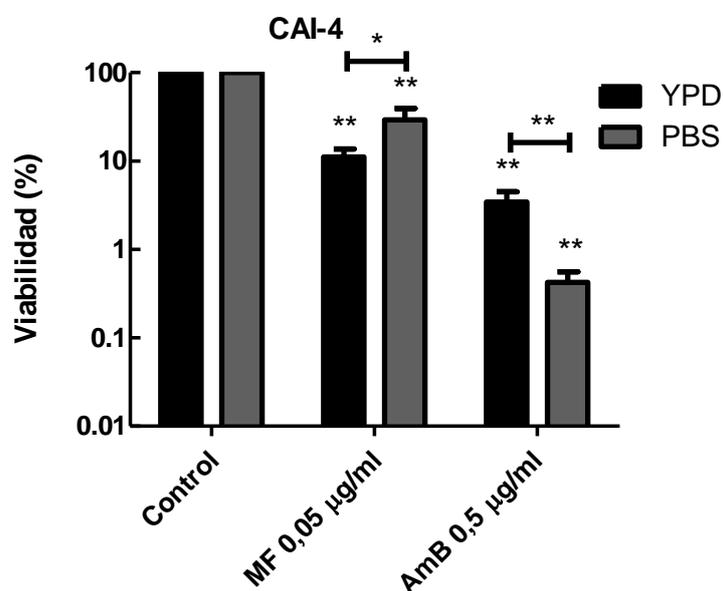


Figura B.7. Efecto del medio de cultivo empleado en la actividad antifúngica de MF y AmB sobre células CAI-4. Las células se trataron con MF 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y AmB $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1h y se recogieron muestras para hacer ensayos de viabilidad en placa como se indica en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron en medio YPD líquido y en PBS a 37°C. Los valores muestran la media \pm DE de tres medidas independientes. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), según el test de Mann Whitney.

A pesar de tener una sensibilidad similar a los antifúngicos de estudio, analizamos la liberación de ROS y la necrosis inducida por MF en la cepa silvestre SC5314 en los distintos medios. Como era de esperar, los cultivos exponenciales de SC5314 mantuvieron la misma tendencia observada hasta el momento en CAI-4, al aplicar las mismas concentraciones del antifúngico (Fig. B.8).

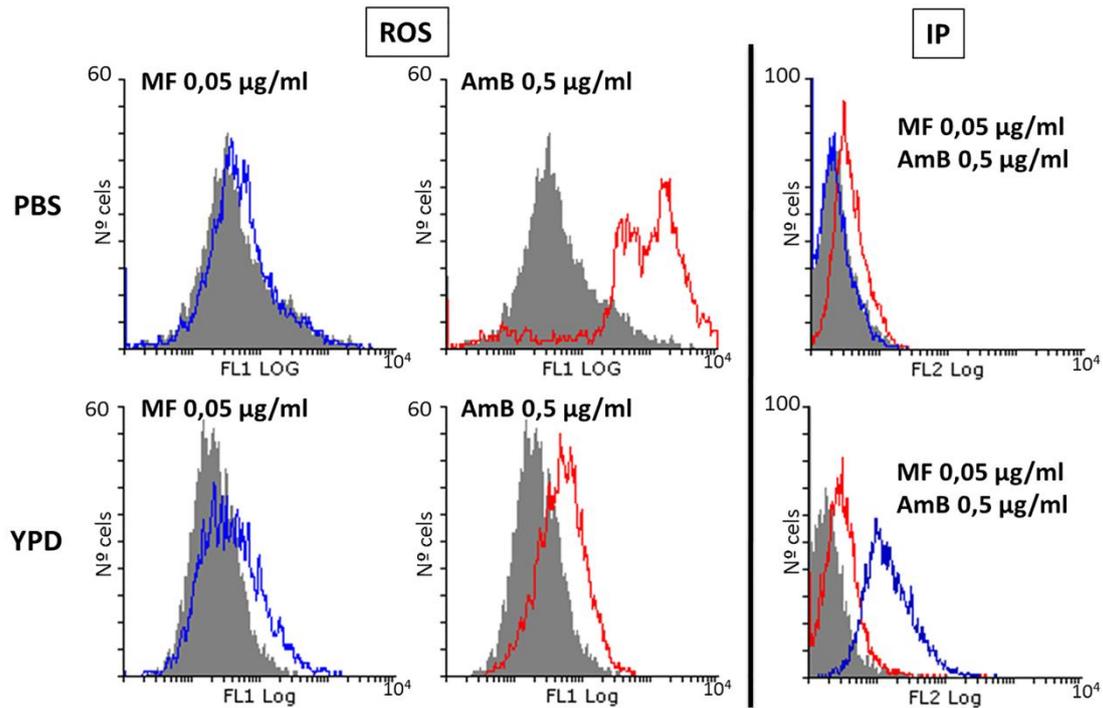


Figura B.8. Producción intracelular de ROS y viabilidad celular en respuesta a MF y AmB en células SC5314 cultivadas en YPD o PBS. Las células se trataron con los fármacos en PBS (paneles superiores) o YPD (paneles inferiores) durante 1h a 37°C. Los histogramas grises representan las células control mientras que los azules muestran las células tratadas con MF y los rojos, con AmB. Los cuatro paneles de la izquierda corresponden a la producción de ROS y los dos de la derecha a la viabilidad determinada por IP. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células para cada tratamiento.

La toxicidad causada por ROS altera y daña gravemente macromoléculas esenciales de la célula, como proteínas, lípidos y el ADN, activando los mecanismos de apoptosis y provocando la muerte celular (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014; Morano *et al.*, 2012). Por tanto, el incremento de radicales libres podría ser considerado un importante mecanismo de acción lítica, complementario al efecto fungicida de los antibióticos analizados, como ya se ha descrito en el caso de AmB (Belenky *et al.*, 2013; Delattin *et al.*, 2014; Mesa-Arango *et al.*, 2014). Con el fin de verificar esta hipotética implicación sinérgica entre ROS y la actividad antifúngica, blastoconidios exponenciales de CAI-4 fueron expuestos a 50 mM de tiourea, un sequestrador de radicales hidroxilo. A pesar de mostrar una ligera toxicidad sobre la población control, las muestras tratadas con tiourea presentaron una menor susceptibilidad al daño fungicida de MF y AmB junto a un descenso en la formación de ROS (Fig. B.9). Una protección similar se ha observado igualmente en varias

especies de bacterias y hongos pretratados con tiourea, para ser expuestos seguidamente con distintos compuestos antimicrobianos (Belenky *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2012; Kohanski *et al.*, 2007). En conjunto, estas evidencias refuerzan la contribución de los radicales libres a la citotoxicidad producida por los antifúngicos examinados, un efecto que podría ser extrapolable a los antibióticos en general.

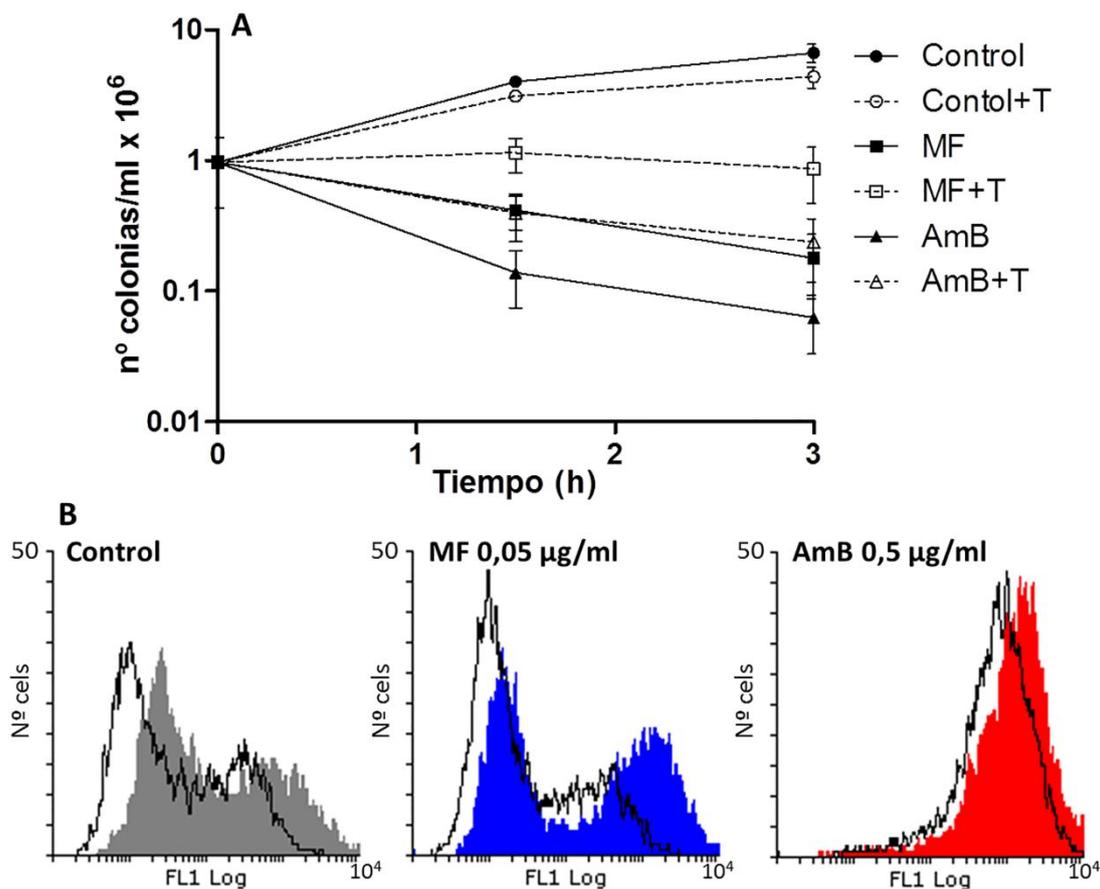


Figura B.9. Efecto protector de la tiourea sobre la actividad antifúngica de AmB y MF. Blastoconidios de la cepa CAI-4 se refrescaron a una densidad óptica de 0,3 y se dejaron crecer con agitación orbital hasta una $D.O_{600nm} \approx 0,6$. Previamente al tratamiento con los antifúngicos, las alícuotas correspondientes se expusieron durante 30 min con tiourea (T) 50 mM. A) Resultados de viabilidad en placa tras el tratamiento de las células en YPD a 1,5 y 3h. B) Producción de ROS intracelular tras 3h de tratamiento en PBS. Los histograma para células control se indican en gris, tratadas con MF 0,05 µg/ml en azul y con AmB 0,5 µg/ml en rojo, en ausencia, o presencia de tiourea (negro). Las figuras mostradas en B representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica (se analizaron 5000 células por tratamiento). Los valores de viabilidad muestran la media \pm DE de tres medidas independientes.

B.3. Alteraciones producidas por MF y AmB sobre la morfología de *C. albicans*

A continuación, se llevó a cabo un examen por microscopía óptica de las alteraciones morfológicas y estructurales producidas por los fármacos de estudio (Fig. B.10). Muestras de cultivos exponenciales sometidas a una y tres horas de tratamiento con los antifúngicos, se visualizaron mediante la técnica de microscopia interferencial de Nomarski. El efecto sobre la morfología celular fue especialmente evidente a las tres horas de tratamiento, detectándose, en presencia de MF, acúmulos de células pequeñas con apariencia de haber sufrido lisis (Fig. B.10) y otras más hinchadas con forma de pera (Fig. B.10). En el caso de AmB, las células se presentaron aisladas y no formando acúmulos, con mayor granulosidad interna y un volumen celular inferior al observado en células control, tal y como se indicó en el capítulo anterior (Epígrafe A.4.3).

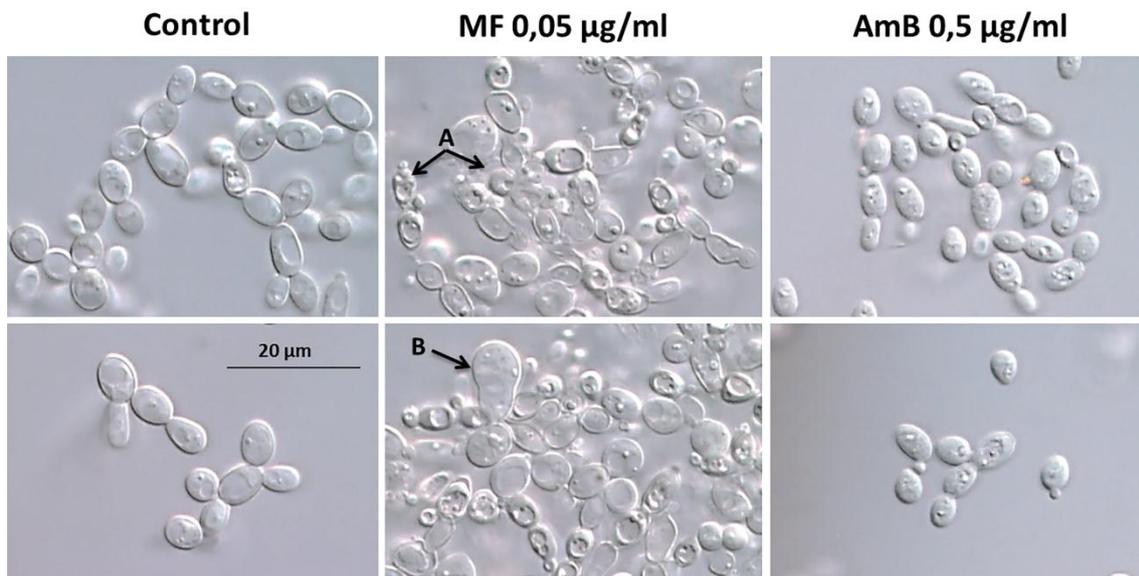


Figura B.10. Análisis de las alteraciones morfológicas producidas por MF y AmB. Las células exponenciales CAI-4 se observaron al microscopio óptico tras ser tratadas durante 3h con los antifúngicos a las dosis indicadas en la imagen. La incubación se realizó en YPD a 37°C. La observación microscópica se realizó mediante contraste interferencial de Nomarsky. Se muestran dos imágenes representativas para cada tratamiento donde A indica células con apariencia lisada y B una célula hinchada con forma de pera.

Con el fin de abordar en mayor profundidad el posible efecto tóxico de las drogas sobre *C. albicans*, las levaduras fueron analizadas al microscopio electrónico de transferencia (MET). Cultivos exponenciales se trataron con MF durante 1h, y se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. En este ensayo se utilizó una concentración más elevada de MF (0,1 µg/ml), siendo una hora de exposición tiempo suficiente para registrar un efecto evidente de la misma respecto a las células sin tratar. Estas levaduras control presentaron la clásica morfología oval de *C. albicans*, con una pared celular dispuesta en tres capas: una externa de apariencia electrodensa, otra capa intermedia amorfa y la más interna en contacto con la membrana celular (Fig. B.11A, B y C). También fue visible la presencia de orgánulos membranosos presentes en el citoplasma (Fig B.11) y se obtuvieron imágenes de células sin tratar, tomadas en distintas fases de división celular (Fig B.11D, E y F).

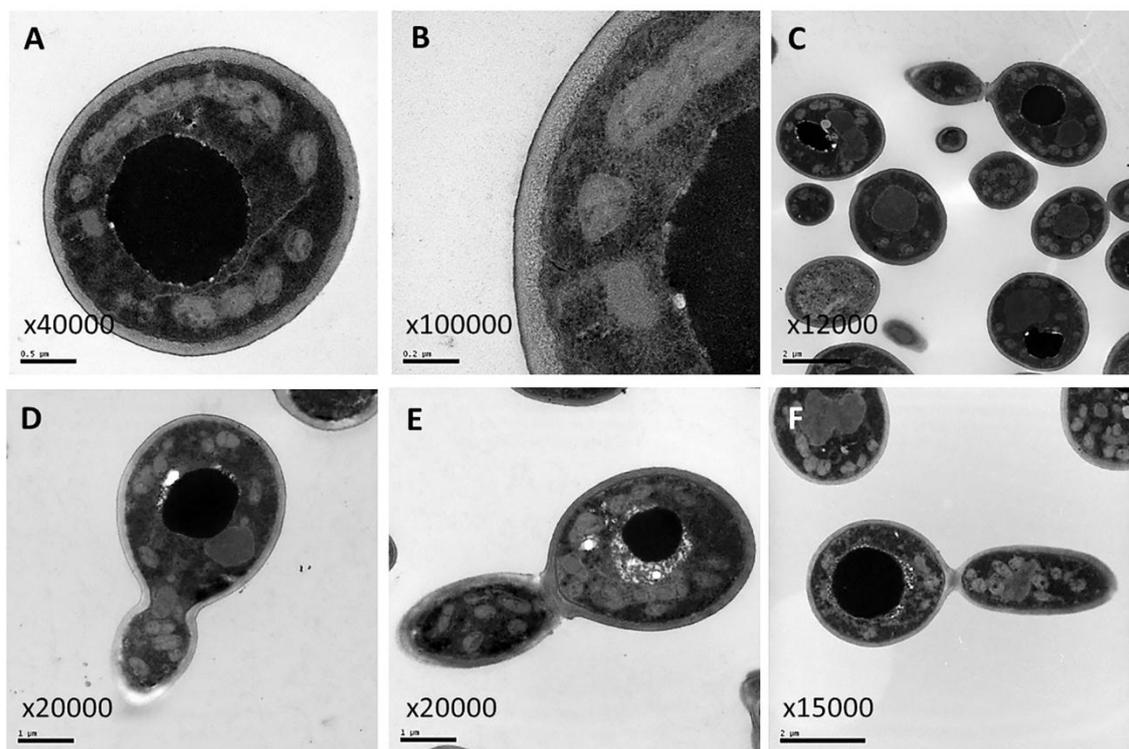


Figura B.11. Análisis morfológico de levaduras CAI-4 mediante MET. Las células CAI-4 en fase exponencial se cultivaron en medio YPD durante 1h sin tratamiento alguno. En Materiales y Métodos se recoge el procedimiento seguido para la obtención de las secciones analizadas.

Las levaduras tratadas con MF mostraron una morfología deforme, con la pared celular dañada específicamente en la zona apical, donde tiene lugar la gemación (Fig. B.12). Estas alteraciones estructurales fueron claramente visibles al microscopio electrónico, destacando un grosor menor de la capa intermedia, mientras las capas externa e interna aparecían ausentes o muy degradadas (Fig. B.12A, B y D). Además, las células mostraron un citosol prácticamente vacío, con pérdida evidente de contenido y orgánulos. En cambio, el espacio extracelular presentaba una “suciedad” característica, quizá proveniente del contenido citoplasmático liberado al medio, a causa de la lisis osmótica sobrevenida a la rotura de la pared. También pudimos apreciar malformación de septos (Fig. B.12E), así como una división celular anormal, con las células hijas permanentemente unidas a sus progenitoras lisadas, al no poder degradar los componentes del septo. Una imagen equivalente también se ha obtenido de cultivos tratados con caspofungina, donde las levaduras forman agregados de células hijas en división unidas a las células madres muertas (Rueda *et al.*, 2014).

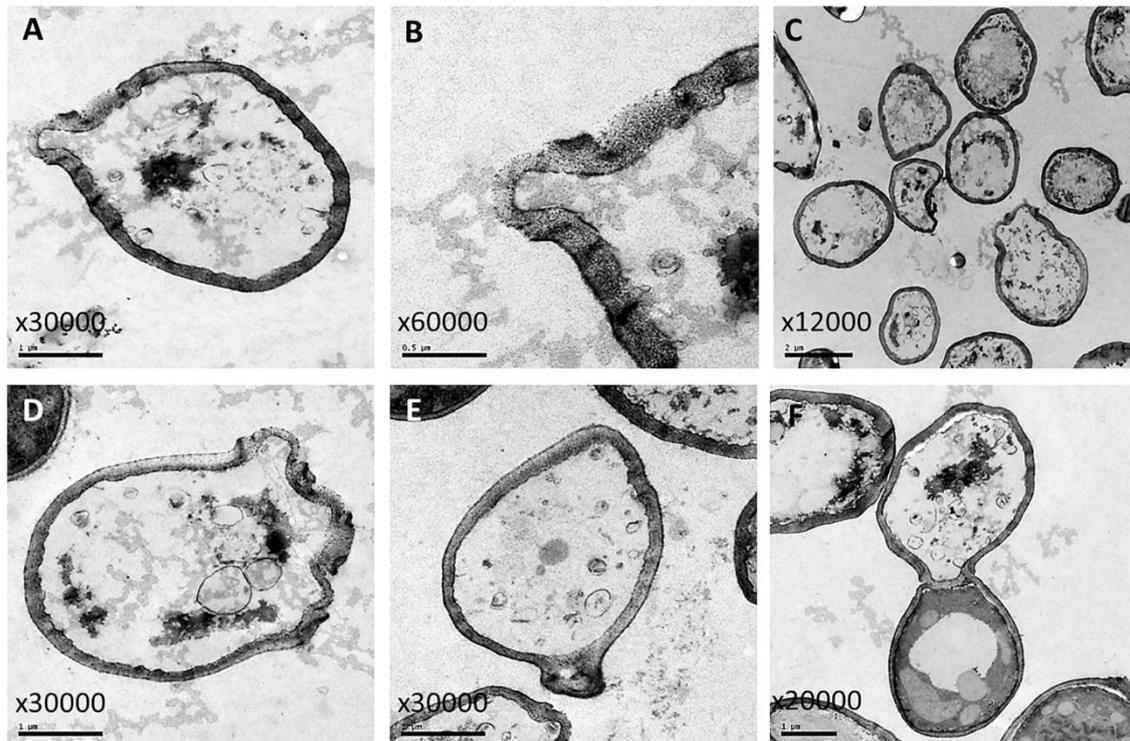


Figura B.12. Micrografías al MET de células CAI-4 tratadas con MF. Las células exponenciales se trataron durante 1h con MF 0,1 µg/ml en YPD a 37°C. Para otros detalles, consultar Materiales y Métodos.

La importancia del β -1,3-glucano en el mantenimiento de la estructura, tamaño y rigidez de la pared queda de manifiesto, ya que el efecto inhibitorio de la MF sobre la síntesis de este polímero conlleva la debilitación y rotura de la pared y la consiguiente lisis celular. Sin embargo, dicho efecto fue especialmente intenso en la zona apical de la levadura, donde tiene lugar la gemación asexual, probablemente debido a ser el lugar con mayor actividad biosintética de los componentes de pared.

Nuestros datos concuerdan con lo observado por Nishiyama *et al.* (2002). Estos autores comprobaron adicionalmente como el tratamiento con sorbitol 0,8 M se traducía en la supresión de la acción fungicida de MF, incluso a altas concentraciones. Probablemente, este estabilizador osmótico permite contrarrestar la fragilidad de la pared celular tras la acción de MF, evitando su lisis. Además, el fluoróforo **Fungiflora Y**, que se une a la quitina y los β -glucanos, continuaba emitiendo fluorescencia incluso después de la perturbación celular provocada por la exposición a MF. Estos datos confirman una actuación directa de la equinocandina sobre la enzima implicada en la síntesis del polisacárido, sin llegar a degradarlo. No obstante, según Nguyen *et al.* (2010), las células tratadas con el fármaco durante un hora y posteriormente refrescadas en medio nuevo carente de MF, mantenían la pared celular alterada en su totalidad tras 8 horas de crecimiento en ausencia del agente. Estos datos sugieren que concentraciones fungicidas de MF producen alteraciones irreversibles de la pared celular.

En lo referente a AmB, un amplio estudio sobre las alteraciones celulares observadas por microscopía electrónica ha sido realizado previamente por nuestro grupo (González-Párraga *et al.*, 2011). En dicho trabajo, se demuestra la inducción por AmB del incremento en la abundancia de orgánulos citoplasmáticos junto a un aumento del tamaño de las vesículas. Además, se observó la clara formación de poros en la membrana plasmática producidos por el polieno, tal y como se ha descrito en Introducción.

B.4 Efecto de AmB y MF sobre la transición dimórfica levadura-micelio

Para abordar este apartado, nos centramos en primer lugar sobre la acción de AmB. Estudios realizados por otros grupos de investigación han descrito como diversas cepas de *C. albicans* tratadas con concentraciones subletales del polieno experimentan una importante reducción en la formación de tubos germinativos (Ellepola y Samaranayake, 1998; Vale-Silva *et al.*, 2007), aunque se desconoce el mecanismo causal de esta inhibición. No obstante, habría que distinguir si dicho fenómeno se debe a la acción específica del antifúngico sobre los componentes implicados en la transición dimórfica, o bien es consecuencia de su elevada toxicidad sobre las levaduras, siendo ésta una cuestión relevante. Con tal fin, se analizó la citotoxicidad de distintas concentraciones de AmB sobre blastoconidios incubados con suero humano al 10%, determinando en paralelo el porcentaje de tubos germinativos formados. Debido a que la auxotrofia *ura3* podría alterar la fisiología e infectividad de *C. albicans* (Shepherd, 1985) y dada la importancia de las estructuras miceliales en la virulencia de la levadura, para abordar este apartado empleamos la cepa CEY.1 (CAI-4 *URA3*⁺).

Como se observa en la Figura B.13, concentraciones de AmB por debajo de la CMI (0,05 y 0,1 µg/ml) afectaron de forma moderada tanto a la viabilidad celular como al número de tubos germinativos emitidos, cuya inducción se vio ralentizada respecto al control, en función de la dosis empleada (Fig B.13A y B). En consonancia, al aplicar altas concentraciones del polieno se produjo una drástica y progresiva pérdida de viabilidad celular (Fig. B.13A), acompañada de un notable descenso en la formación de hifas (Fig. B.13B). Las células examinadas al microscopio óptico presentaron una correcta inducción de tubos germinativos en los cultivos tratados con AmB 0,05 µg/ml durante una hora (Fig. B.13C), mientras que una concentración 10 veces mayor del fármaco bloqueó claramente al proceso de transición dimórfica, posiblemente debido a la detención del ciclo celular (Fig. B.13D).

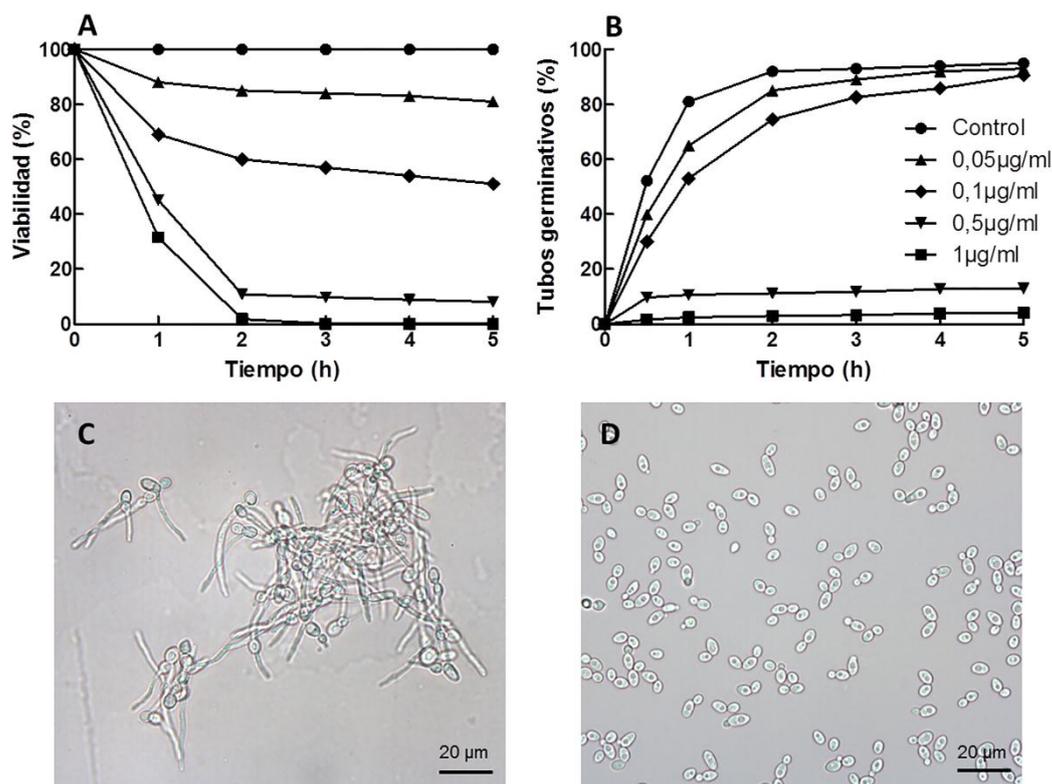


Figura B.13. Efecto de concentraciones crecientes de AmB sobre células CAI-4 sometidas a un proceso de inducción dimórfica. Se analizó el efecto producido en la viabilidad celular (A), la formación de tubos germinativos (B) y la morfología celular (C y D). Las células exponenciales ($D.O \approx 0,3$) se incubaron en YPD líquido con suero humano al 10% a 37°C. Los protocolos de tratamiento con el polieno y de emisión de tubos germinativos con suero humano se describen en Materiales y Métodos. Las concentraciones de AmB empleadas y el tiempo de exposición se indican en la propia gráfica. Las barras de error se omitieron para aumentar la resolución, siendo la desviación estándar inferior al 12% en todos los casos.

Para confirmar que el efecto inhibitorio producido por el fármaco sobre la filamentación es debido a su toxicidad, se pretrataron cultivos exponenciales con dosis tóxicas de AmB (0,5 µg/ml) durante 30 o 60 min. A continuación, se eliminó el antifúngico por lavado y, rápidamente, las células se resuspendieron en YPD fresco suplementado con suero humano al 10% y se incubaron a 37°C. La densidad celular de las distintas alícuotas se ajustó a 0,3 ($D.O. 600_{nm}$), determinando tanto la viabilidad celular como la formación de tubos germinativos (Fig. B.14A). Los datos obtenidos fueron esclarecedores. Inicialmente se registró una disminución en la viabilidad de células pretratadas con AmB durante 30 o 60 min. Sin embargo, tras eliminar el fármaco, se produjo la reanudación del crecimiento por parte de la población superviviente (Fig. B.14A), acompañada de un aumento progresivo en la formación de hifas (Fig. B.14B). Como era de esperar, el cultivo sometido

permanentemente a AmB 0,5 $\mu\text{g/ml}$, vio reducida su viabilidad de forma drástica (Fig. B.14A) junto a una pérdida simultánea en la capacidad de formar tubos germinativos (Fig. B.14B). En cambio, el cultivo control, incubado sin AmB en YPD con suero a 37°C, superó el 80% de emisión de estructuras miceliales aparentes a las dos horas. Como control negativo de filamentación, un cultivo fue mantenido sin suero a 37°C, siendo la producción de tubos germinativos en torno al 10-20% (Fig. B.14B).

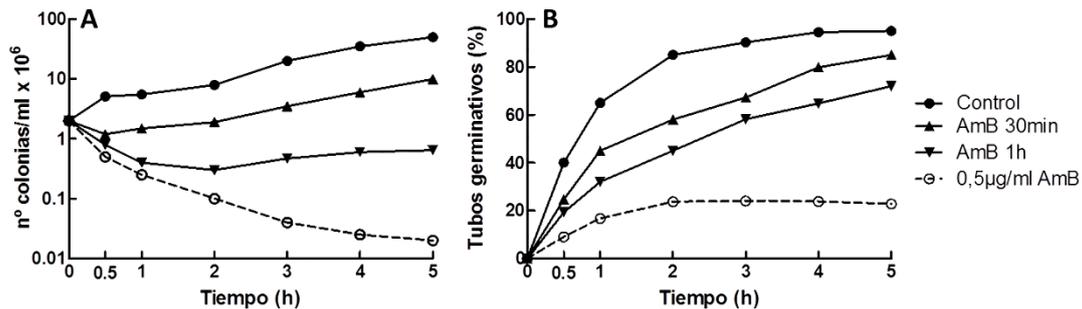


Figura B.14. Acción reversible de la AmB sobre la viabilidad celular y la formación de tubos germinativos inducida por suero humano en blastoconidios de la cepa CAI-4. Un cultivo exponencial ($D.O \approx 0,3$) crecido en YPD, se dividió en alícuotas idénticas. Dos muestras se trataron con AmB 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min y 60 min, respectivamente. A continuación, se retiró la AmB por lavado y se resuspendieron las células rápidamente en YPD suplementado con suero humano (10%) a 37°C (tiempo cero), momento en el que se comenzó a determinar la viabilidad celular (A) y los tubos germinativos formados (B) a los tiempos indicados. Dos alícuotas, con y sin AmB, se mantuvieron como control. Las barras de error se han omitido para aportar mayor claridad a la representación, siendo la desviación estándar inferior al 12% en todos los casos.

Esta aproximación experimental se completó con el análisis del efecto causado por un antibiótico fungistático sobre el cambio dimórfico, dado que AmB es un fármaco fungicida. El compuesto utilizado fue la 5-fluorocitosina (5FC), un análogo de pirimidina que se incorpora al ADN e interfiere en su síntesis durante la replicación y la transcripción del ARNm (Hope *et al.*, 2004). La 5FC apenas afectó a la población celular expuesta a una concentración alrededor de su CMI (0,25 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. B.15A), tampoco se apreciaron diferencias en el nivel de filamentación del cultivo (Fig. B.15B). Al aplicar dosis mayores de 5FC, la viabilidad sólo se vio alterada de forma moderada aunque permanente con el transcurso del tiempo (Fig. B.15A). Sin embargo, la capacidad del cultivo para entrar en el programa de conversión levadura-micelio, no experimentó una reducción

importante en presencia del compuesto respecto al control, mostrando únicamente un ligero retraso (Fig. B.15B).

Por su parte, la incorporación de AmB (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como control, indujo una disminución notable del porcentaje de células viables junto al bloqueo significativo en la emisión de tubos germinativos (Fig. B.15A y B). Estos datos ponen de manifiesto que la potente capacidad supresora de la AmB sobre la formación de tubos germinativos es, probablemente, la consecuencia de un efecto colateral de su actividad letal, y no se debe a la acción directa sobre componentes involucrados en el proceso de filamentación.

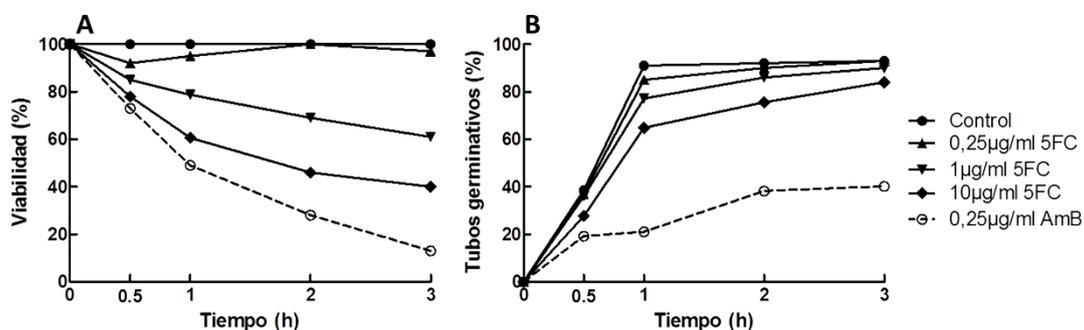


Figura B.15. Efecto de 5FC sobre levaduras sometidas a un proceso de inducción dimórfica. Se determinó la supervivencia celular (A) y el porcentaje de tubos germinativos formados (B) en blastoconidios exponenciales (D.O \approx 0,3) CEY.1 (CAI-4 *URA+*), incubados en YPD suplementado con suero humano (10%) a 37°C y tratados con el antibiótico 5FC. Las concentraciones empeladas del respectivo antifúngico y el tiempo de exposición al mismo vienen recogidas en la propia Figura.

Una vez estudiado el papel de la AmB sobre el proceso de transición dimórfica, también se analizó el efecto de MF en idénticas condiciones. Sin embargo, previamente se examinó su actividad en presencia de suero humano, con el fin de detectar una probable inactivación parcial de su capacidad fungicida por interacciones con las proteínas del suero, como se ha descrito en estudios previos (Chen *et al.*, 2011; Földi *et al.*, 2012; Perlin, 2011). Para ello, se siguió el mismo protocolo utilizado con AmB, tratando las células exponenciales resuspendidas en YPD más suero humano (10%) con concentraciones elevadas de la equinocandina durante 1h. De forma análoga, se añadieron dos controles sin suero, en presencia y ausencia del fármaco. Los datos obtenidos revelaron una conspicua disminución de la actividad antifúngica de MF en células tratadas con suero humano (40% de

viables) respecto a las incubadas en YPD sin suero (5% de viables) (Fig. B.16A). Esta disminución fue revertida al retirar el suero del medio ya que no se observaron diferencias estadísticas entre las células previamente filamentadas y blastoconidios sometidas de forma directa con el fármaco (Fig B.16B).

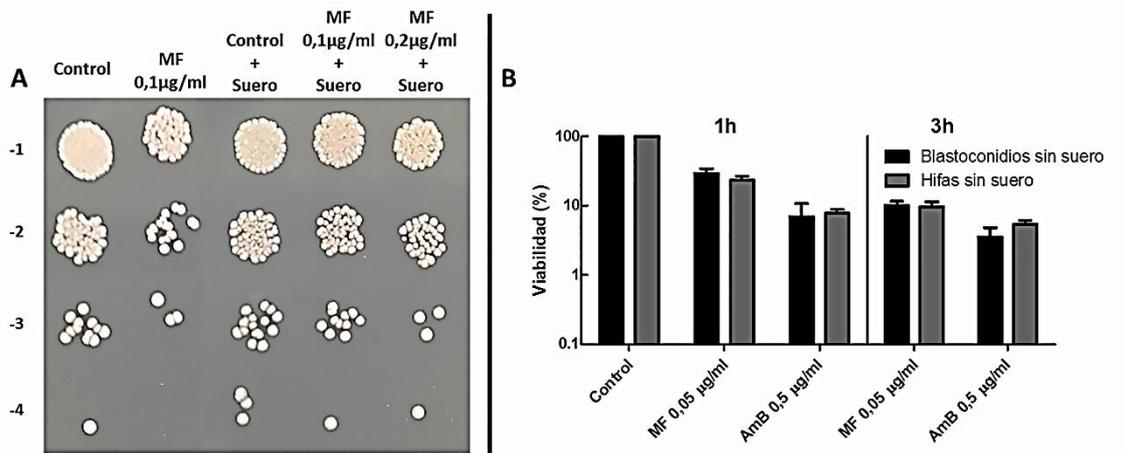


Figura B.16. Efecto del suero sobre la capacidad antifúngica de MF en células CEY.1 de *C. albicans*. Cultivos exponenciales ($D.O \approx 0,3$) crecidos en YPD se lavaron y resuspendieron en medio fresco con suero humano al 10%, momento en que: A) se añadieron las distintas concentraciones de MF dejando, paralelamente, controles sin suero en presencia y ausencia del antifúngico. Tras una hora de exposición a la droga, se practicaron diluciones seriadas de cada muestra y se dispensaron 5µl de cada dilución sobre una placa YPD. B) Ensayos de viabilidad en placa donde una alícuota sin tratar con MF y más del 90% de las células filamentadas, se le retiró el suero y resuspendió en medio YPD fresco (hifas sin suero), momento en el que se le administró el antifúngico durante 1 y 3 h. Paralelamente si dispuso otra alícuota con blastoconidios tratados directamente con los fármacos, que no estuvieron en ningún momento en contacto con suero humano (blastoconidios sin suero). En todos los casos se mantuvieron alícuotas carentes de MF.

Por el contrario, y como ya ha quedado reseñado, la AmB apenas vio alterada su actividad antifúngica en presencia de suero tras 1h de incubación. Si bien se ha descrito un descenso de la actividad letal (“killing activity”) y del efecto postantifúngico desencadenado por AmB sobre *C. albicans*, a pesar de presentar las mismas CMI en presencia y ausencia de suero. Un efecto que estaría asociado a interacciones del polieno con componentes no proteicos del suero, aún no identificados, a diferencia de lo que ocurre con MF (Zhanet *et al.*, 2001).

En este contexto, se comprobó cómo la MF paralizó de forma significativa la capacidad de transición dimórfica levadura-micelio de los blastoconidios, aunque con menor potencial fungicida (Figura B.17A). Las escasas hifas detectadas presentaron una morfología claramente alterada al microscopio óptico respecto a las células control, con múltiples ramificaciones cortas y brotes colapsados en sus paredes laterales (Fig. B.17B y C). Los extremos apicales de las hifas también aparecían dañados, como consecuencia de la intensa acción fungicida (Fig. B.17C). Esta alteración morfológica de la MF sobre el micelio de *C. albicans*, también ha sido observada en el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (Nishiyama *et al.*, 2005). En cualquier caso, se encontraron muy pocas levaduras filamentadas, pudiendo tratarse de células que ya habían completado el cambio dimórfico antes del tratamiento con el antifúngico, que perturbaría su estructura intacta.

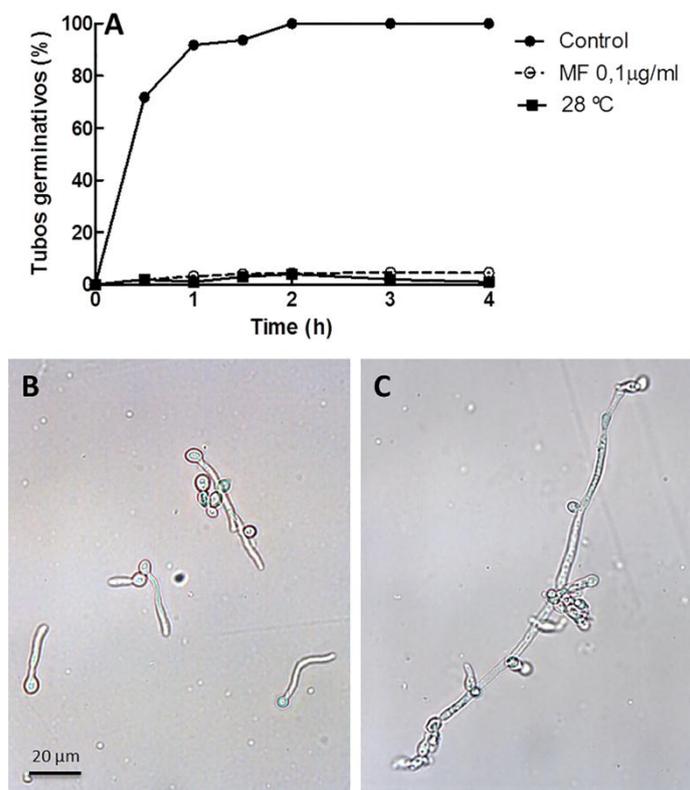


Figura B.17. Efecto de la MF sobre la transición dimórfica levadura-micelio en *C. albicans* y la morfología de los filamentos correspondientes. Las células exponenciales (D.O \approx 0,3) se lavaron, se resuspendieron en medio fresco con suero humano estéril al 10% y se incubaron a 37°C en presencia o ausencia del antifúngico. Una alícuota sin tratar se mantuvo a 28°C como control negativo de filamentación. Se tomaron muestras para el recuento de células filamentadas cada hora durante 4 horas (A) y para su visualización al microscopio óptico tras una hora de incubación en ausencia (B) o presencia de MF 0,1 µg/ml (C).

B.5. Determinación de las actividades trehalasa neutra y ácida, y del contenido de trehalosa endógena

Una vez verificada la sensibilidad y los efectos sobre la morfología celular de los dos antifúngicos en las cepas estudiadas, un apartado complementario consistió en estudiar las posibles consecuencias sobre el metabolismo de la trehalosa, un marcador de estrés oxidativo en *C. albicans* (González-Párraga *et al.*, 2003). La exposición con AmB indujo un notable incremento de la trehalosa intracelular almacenada en células exponenciales (Tabla B.2) confirmando evidencias previas (Belenky *et al.*, 2013; Collado-González *et al.*, 2012; González-Párraga *et al.*, 2011). El incremento registrado en la síntesis del disacárido fue inferior cuando las mismas células fueron tratadas con MF, aunque por encima de los valores de las células sin tratar (Tabla B.2).

Respecto de las enzimas hidrolíticas, se observó una marcada disminución de la actividad trehalasa neutra (Ntc1p) en función del antifúngico empleado y su concentración. Mientras la trehalasa ácida (Atc1p) vio aumentada su actividad (Tabla B.2). Es preciso destacar que, a pesar de la similitud en los valores de actividad catalítica en células tratadas con MF (0,05 µg/ml) y AmB (0,5 µg/ml), el contenido endógeno de trehalosa fue siempre muy superior en los cultivos expuestos a AmB (Tabla B.2).

Tabla B.2. Determinación de las actividades trehalasa neutra y ácida, así como del contenido de trehalosa intracelular en blastoconidios CAI-4. Los cultivos exponenciales fueron tratados con los antifúngicos durante una hora a 37°C. Los números entre paréntesis representan el valor normalizado en relación al control para cada parámetro, que es tomado como 1,0. [^xnmol glucosa (mg proteína)⁻¹; [†]nmoles trehalosa (mg peso húmedo)⁻¹]

1h	CAI-4		
Tratamiento	Atc1p ^x	Ntc1p ^x	Trehalosa endógena [†]
Control	2,08 (1)	22,74 (1)	4,48 (1)
MF 0,01 µg/ml	2,1 (1)	21,97 (0,97)	4,06 (0,91)
MF 0,05 µg/ml	7,46 (3,59)	15,51 (0,68)	5,52 (1,23)
MF 0,1 µg/ml	8,56 (4,12)	9,56 (0,42)	6,31 (1,41)
AmB 0,5 µg/ml	7,29 (3,5)	15,51 (0,68)	24,30 (5,49)

B.6. Implicación de la MF en la respuesta de los macrófagos frente a *C. albicans*

El antifúngico perteneciente a la familia de las equinocandinas, caspofungina, ha mostrado tener un papel inmunomodulador muy importante en la respuesta a *C. albicans*, ya que se ha descrito que esta equinocandina provoca la exposición de los β -glucanos de la levadura, favoreciendo su reconocimiento por parte de los macrófagos murinos vía Dectina-1 (Ben-Ami *et al.*, 2008; Rueda *et al.*, 2014; Wheeler y Fink, 2006). Dosis subletales de esta droga, dan lugar a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12, IL-17 e INF- γ) por parte de los macrófagos, lo que facilita la eliminación de la levadura. Por tanto, con esta premisa se procedió a analizar el papel de la MF en la respuesta a la estimulación de macrófagos humanos.

Para ello, macrófagos procedentes de la cavidad peritoneal de pacientes sanos, se estimularon con levaduras SC5314 previamente expuestas a distintas concentraciones de MF (0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,05 $\mu\text{g/ml}$) durante 4h, en una proporción 1:5 (macrófagos:levaduras). A su vez, se dispusieron paralelamente macrófagos estimulados con levaduras sin tratar y macrófagos sin levaduras, como controles. Tras la estimulación se recogió el sobrenadante que contenía las citoquinas liberadas, que se utilizó para la determinación de las mismas tal y como se indica en Materiales y Métodos.

Los datos obtenidos mostraron un aumento estadísticamente significativo del TNF- α e IL-10 en los macrófagos estimulados con *C. albicans* respecto a los niveles de producción basales (Fig. B.18). Además, las levaduras tratadas con la dosis más alta de MF (0,05 $\mu\text{g/ml}$) ensayada, indujeron un aumento significativo de la liberación de estas citoquinas respecto a lo observado en los macrófagos estimulados con las levaduras sin tratar (Fig. B.18). En el caso de IL-17A, se observó una clara tendencia a aumentar sus niveles en presencia de las levaduras tratadas con MF, que no fue estadísticamente significativa.

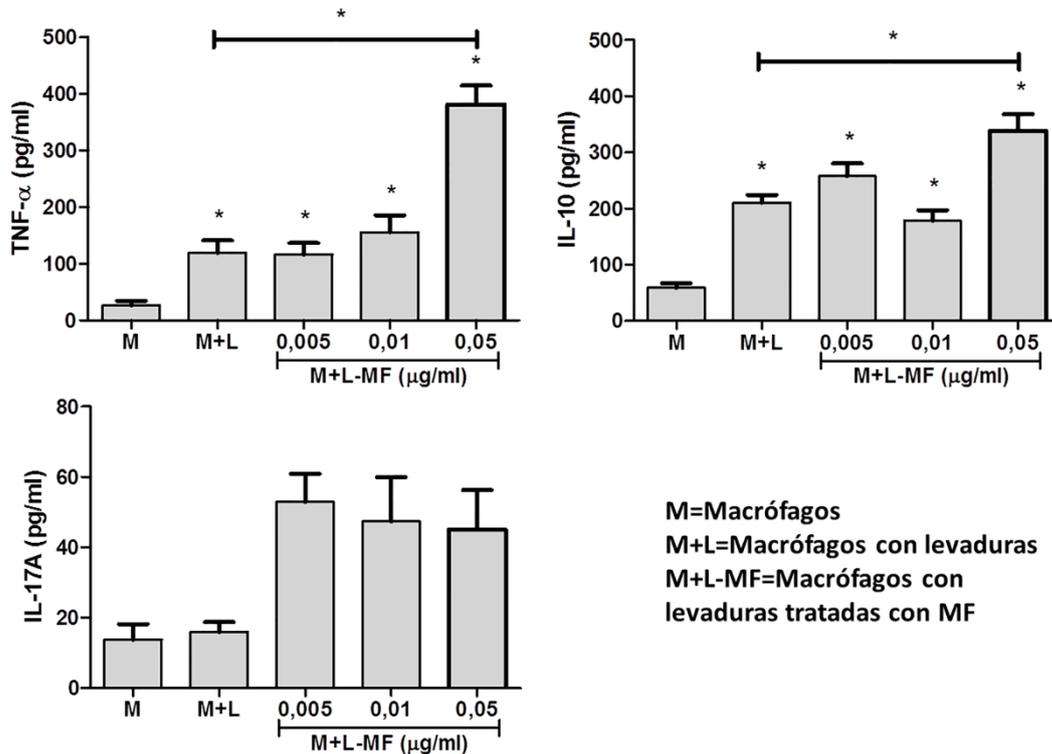


Figura B.18. Análisis de la producción de citoquinas por los macrófagos en respuesta a levaduras tratadas con MF. Células SC5314 se trataron con distintas concentraciones de MF durante 1h en YPD a 37°C. Tras el tratamiento, las células se lavaron en PBS y se cultivaron en presencia de macrófagos peritoneales en proporción 1:5. Tras 4h de estimulación a 37°C, se recogió el sobrenadante a partir del cual se procedió a la determinación de las citoquinas (TNF- α , IL-10 e IL-17A). $P < 0,05$ (*) respecto a macrófagos sin levadura o entre los histogramas conectados por los extremos del segmento correspondiente, según el test de Mann Whitney.

Estudios realizados con otros antifúngicos sobre *C. albicans*, mostraron resultados similares. Los datos presentados para TNF- α e IL-17A concuerdan con los observados por otros grupos de investigación en ensayos realizados con macrófagos murinos estimulados con *C. albicans*, previamente tratados con caspofungina (Rueda *et al.*, 2014; Wheeler y Fink, 2006). Además, IL-10 (citoquina antiinflamatoria) muestra un comportamiento similar a las citoquinas proinflamatorias analizadas en este estudio; a diferencia de lo descrito por Wheeler y Fink (2006), que no detectan diferencias significativas tras el tratamiento con caspofungina para esta citoquina. Curiosamente, el tratamiento con caspofungina para *A. fumigatus*, no indujo la producción de TNF- α en macrófagos murinos (Hohl *et al.*, 2008), a diferencia de lo descrito en *C. albicans*, por lo que el efecto del fármaco difiere según la especie fúngica.

En el mismo sentido, biopelículas de *C. albicans* en presencia de la equinocandina anidulafungina provocaron un aumento en la producción de TNF- α por monocitos de la línea celular humana THP-1, respecto a la levadura sin la droga (Katragkou *et al.*, 2010).

Por su parte, el papel de la AmB en la estimulación de citoquinas ha sido ampliamente estudiado (Ben-Ami *et al.*, 2008; Mihu *et al.*, 2014). Este polieno es considerado una droga proinflamatoria en su formulación desoxicolato o coloidal, dando lugar al aumento de TNF- α , IL-6, IL-1 β , entre otros. Sin embargo, las formulaciones liposomales parecen no tener efecto proinflamatorio sino antiinflamatorio debido, al menos en parte, a la propiedades antiinflamatorias de los liposomas.

Respecto a estudios realizados con MF, sobre otras especies fúngicas, se ha descrito que, en concordancia con nuestros resultados, monocitos y macrófagos humanos, pero no neutrófilos, aumentaban su actividad lítica contra *A. fumigatus* en presencia de MF (Choi *et al.*, 2004).

Por tanto, el tratamiento con MF no tiene sólo un efecto directo sobre la viabilidad de *C. albicans*, sino que además incrementa el reconocimiento y la activación de los macrófagos del sistema inmunitario innato, lo que facilita la eliminación de la infección fúngica.

**C. IMPLICACIÓN DE LA RUTA HOG1 EN
LA PROTECCIÓN A ESTRÉS
PRODUCIDO POR AmB y MF**

Los organismos eucariotas poseen una familia de proteínas quinasas dependientes de serina y treonina denominadas MAP quinasas (MAPKs), que actúan como mecanismos de señalización en la detección y respuesta frente a diversos tipos de estrés nutritivo y ambiental (Alonso-Monge *et al.*, 1999, 2003, 2006; Hayes *et al.*, 2014; Román *et al.*, 2007). La ruta de señalización consiste en la activación consecutiva y secuencial por fosforilación de proteínas quinasas (Fig.C.1). En síntesis, ante un estímulo externo, tras interactuar con componentes de la membrana se induce una cascada de señalización que activa una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) inicial que, a su vez, activa por fosforilación la siguiente MAP quinasa quinasa (MAPKK) y ésta activa la MAP quinasa (MAPK) final.

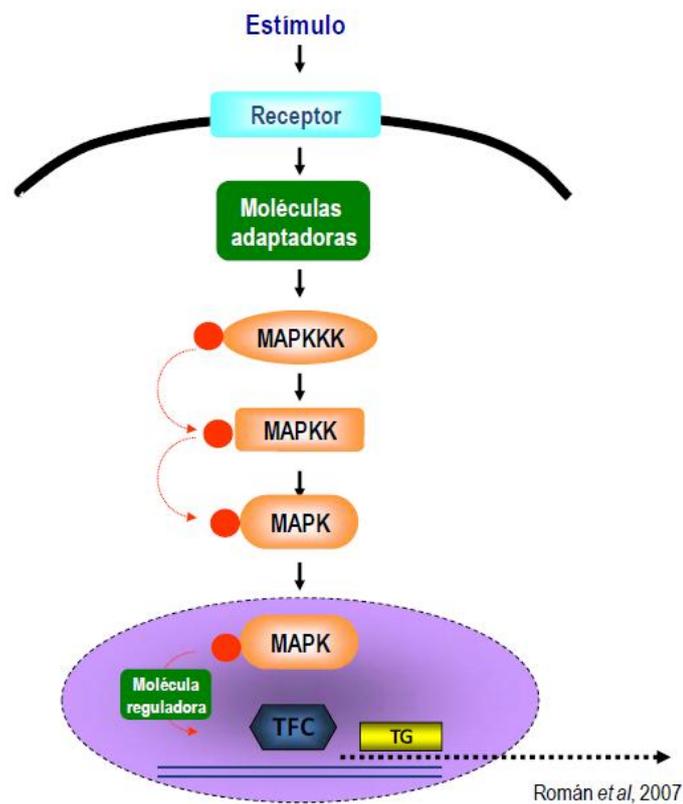


Figura C.1. Esquema general de la ruta de señalización de MAPKs.

Resultados y Discusión

Esta MAPK fosforilada puede entrar en el núcleo por translocación y provocar una respuesta adaptativa al estrés original mediante la regulación e inducción de distintos procesos que requieren la intervención de otras quinasas y factores de transcripción, todos implicados en el ciclo celular y en la resistencia a estrés. Se conocen distintas rutas MAPK, las cuales están muy conservadas entre los hongos, aunque existen diferencias y funciones adicionales entre especies (Alonso-Monge *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2014). En función del estímulo recibido se activarán rutas específicas para hacer frente al agente estresante (Fig. C.2).

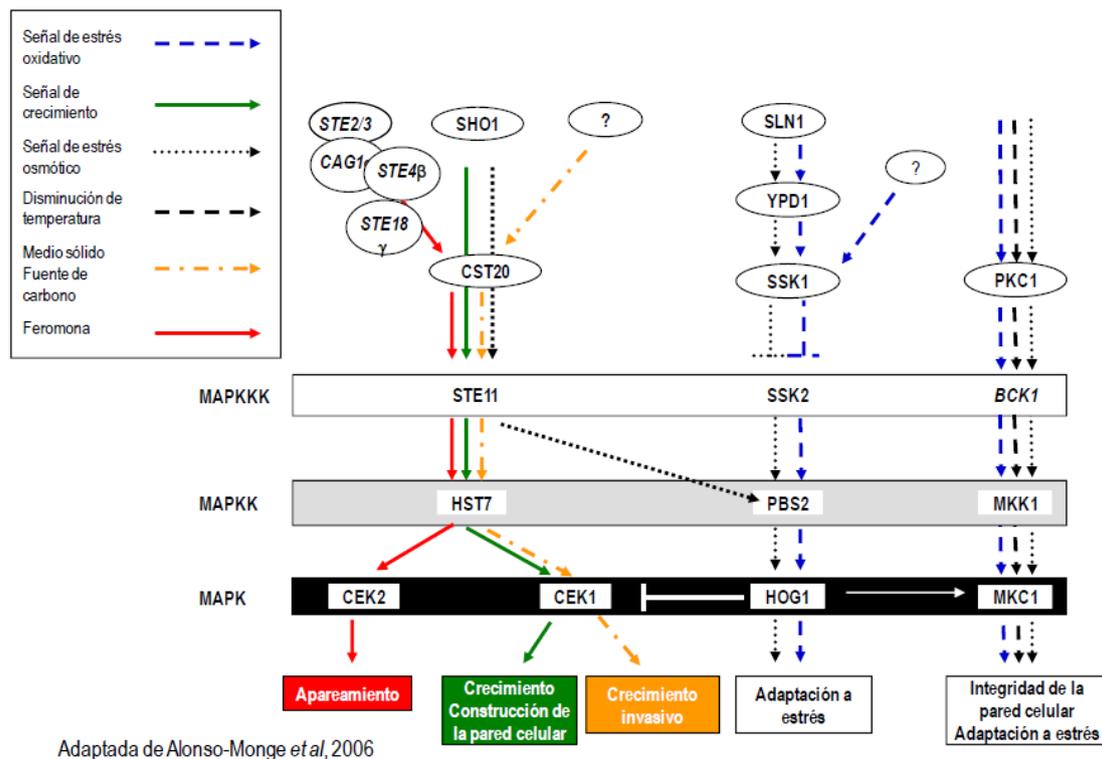


Figura C.2. Componentes implicados en la ruta de señalización de MAPKs en *C. albicans*. Los genes representados en cursiva indican que su ubicación y función en la ruta están basados en el modelo de *S. cerevisiae*, mientras que los genes representados como caracteres normales indican que la delección y/o caracterización fenotípica de los mismos ya ha sido estudiada en *C. albicans*. El símbolo “?” indica la existencia de posibles elementos adicionales implicados en la activación de la MAPK correspondiente. Los estímulos se representan con diferentes símbolos según su función: activadores (flechas) o represores (—|). Las flechas no indican si los mecanismos implicados en la interacción son directos o indirectos. Figura adaptada de Alonso-Monge *et al.* (2006).

Dentro de las cascadas mediadas por MAPK, la ruta HOG1 tiene una gran importancia en la respuesta adaptativa a estrés osmótico y oxidativo en *C. albicans*, si bien mecanismos independientes de HOG1 deben ser operativos durante los procesos de tolerancia adaptativa y tolerancia cruzada a estrés oxidativo (Alonso-

Monge *et al.*, 2003; González-Párraga *et al.*, 2010; Sánchez-Fresneda *et al.*, 2013). Además, HOG1 también está implicada en el cambio dimórfico, la formación de la pared celular, la virulencia o la colonización del tracto gastrointestinal en un modelo murino (Alonso-Monge *et al.*, 1999, 2003; Prieto *et al.*, 2014). En *C. albicans*, la ruta de señalización está regulada por las proteínas Sln1p-Ypdp1p-Ssk1p (Fig. C.2). La activación inicial de Ssk1p conduce a la fosforilación de Ssk2p (MAPKKK), ulterior responsable de la activación de Pbs2p (MAPKK) que, finalmente, fosforila a Hog1p (MAPK), la cual se transloca al núcleo donde ejerce su función, actuando sobre genes de respuesta a estrés osmótico y oxidativo.

Por tanto, el estudio de la ruta de transducción HOG1 se hace un atractivo candidato a la hora de estudiar la hipotética acción oxidativa de los fármacos antifúngicos sobre *C. albicans*, puesto que nuestros resultados previos permiten concluir que la capacidad antifúngica de los compuestos utilizados se ve potenciada mediante la producción significativa de radicales libres (Fig. B.9). Para abordar este apartado se empleó como sistema modelo la cepa parental RM-100 y el mutante homocigótico nulo, *hog1Δ/hog1Δ*, carente de la proteína Hog1p (abreviadamente se nombrará como *hog1Δ*). Como control adicional, se incluyó el revertiente Hog1⁺ conteniendo el gen nativo *HOG1* reintroducido en un fondo *hog1Δ*.

C.1. Sensibilidad del mutante *hog1Δ* a MF y AmB

En el capítulo B se determinaron las CMI de MF y AmB en distintas cepas de *C. albicans*, siguiendo el método del CLSI. Entre ellas, el mutante *hog1Δ* presentó una mayor sensibilidad frente al polieno que la cepa parental (RM-100), siendo la CMI de 0,06 y 0,12 µg/ml, respectivamente. Por su parte, las CMI determinadas para MF no mostraron diferencias apreciables entre las dos cepas (0,016 µg/ml en ambos casos). Con el fin de profundizar en el análisis del efecto fungicida, y dado que la CMI para los dos fármacos coincide en las células RM-100 y SC5314 (0,016 µg/ml en MF y 0,12 µg/ml en AmB), se realizó un conjunto de ensayos fenotípicos empleando las mismas concentraciones de antifúngico previamente analizadas.

Al someter los cultivos exponenciales con 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de MF y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de AmB durante 1h a 37°C en YPD, se obtuvo una notable reducción de la viabilidad en los dos tipos celulares, respecto a controles sin tratamiento (Fig. C.3). Sin embargo, sólo en el caso del polieno se pudo apreciar una moderada, pero significativa, diferencia en el porcentaje de supervivencia celular entre las cepas, siendo *hog1 Δ* más sensible que su parental (Fig. C.3). Este comportamiento en el ensayo de viabilidad concuerda con el observado en las CMIIs determinadas por el método de microdilución del CLSI (Tabla B.1), aunque la variación no fue tan marcada debido, probablemente, al distinto tiempo de exposición con las drogas: una hora en los ensayos de viabilidad frente a 24h en el método de microdilución del CLSI. Dada la experiencia previa de nuestro grupo con este mutante *hog1 Δ* en estudios de estrés oxidativo y tolerancia cruzada (González-Párraga *et al.*, 2008; González-Párraga *et al.*, 2010), se incluyó un ensayo de referencia con peróxido de hidrogeno (5 mM), mostrando un comportamiento similar entre cepas al registrado con AmB, siendo la toxicidad ligeramente inferior (Fig. C.3). El revertiente *Hog1⁺* mantuvo la misma pauta que la cepa parental RM-100 frente a los distintos tratamientos (Fig. C.3).

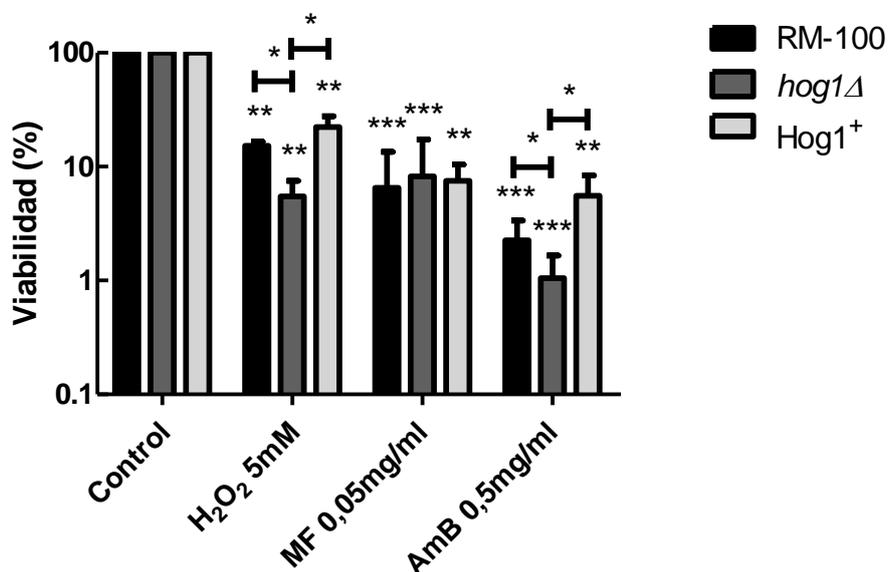


Figura C.3. Efecto de MF y AmB sobre la viabilidad de las cepas RM-100 y *hog1 Δ* de *C. albicans*. Los cultivos se trataron con MF (0,05 $\mu\text{g/L}$), AmB (0,5 $\mu\text{g/L}$) o H₂O₂ (5 mM) durante 1h a 37°C. Los valores muestran la media \pm DE de tres medidas independientes. P<0,05 (*), P<0,01 (**), P<0,001 (***), según el test de Mann Whitney.

Los ensayos simultáneos de sensibilidad en placa permitieron detectar con mayor claridad la susceptibilidad del mutante *hog1Δ* al efecto del polieno (Fig. C.4). En esta prueba, el agente estresante está presente de forma continua en el medio sólido, donde posteriormente se dispensa 5 µl de una densidad celular conocida, siendo la incubación a 37°C durante 24h. A diferencia de AmB, la equinocandina siguió sin mostrar diferencias apreciables entre el crecimiento colonial de RM-100 y *hog1Δ* (Fig. C.4). Por tanto, y de modo preliminar, podemos concluir que, la ruta HOG1 no está directamente implicada en la resistencia de *C. albicans* a MF. Como era de esperar, el mutante homocigótico presentó problemas de crecimiento en presencia de estrés osmótico y oxidativo (NaCl 1,2 M y H₂O₂ 5 mM), como ya ha sido descrito por Alonso-Monge *et al.* (2003), y el revertiente Hog1⁺ mostró un comportamiento similar a la cepa parental en todos los casos (Fig. C.4).

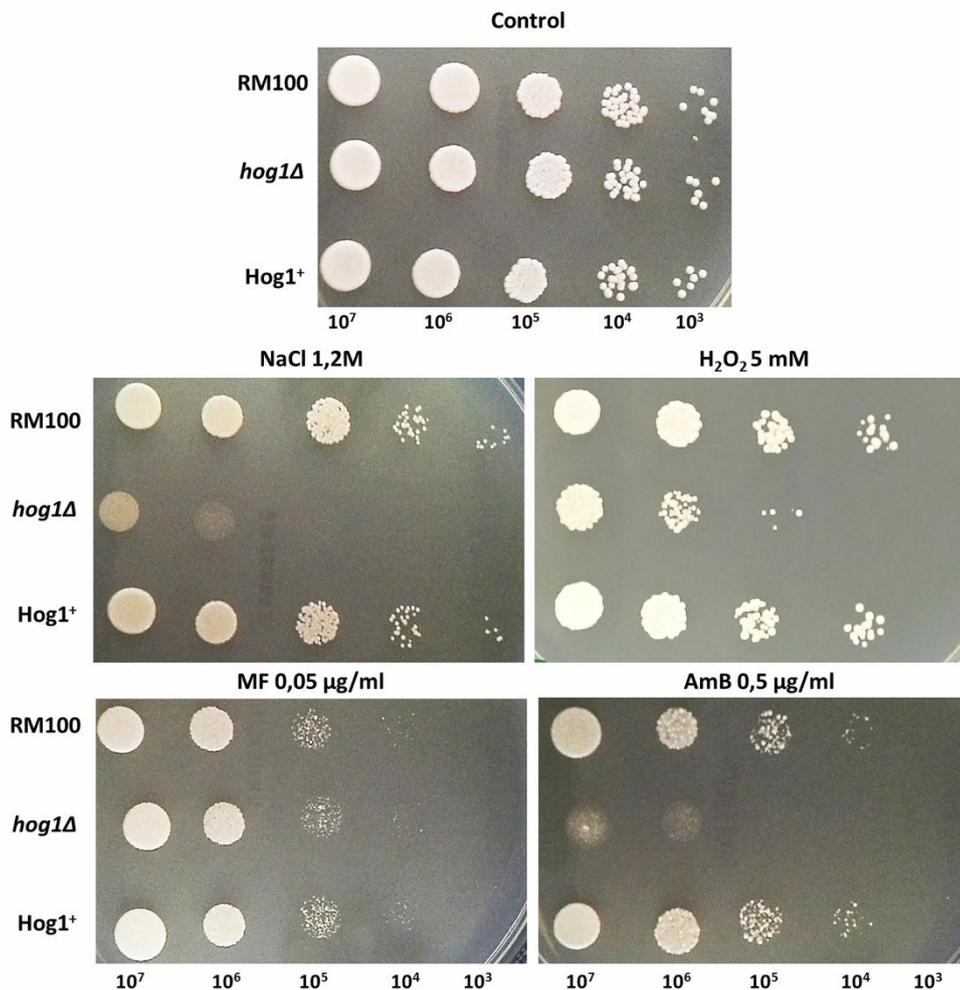


Figura C.4. Sensibilidad en placa de las cepas RM-100 y *hog1Δ* a MF y AmB. Se practicaron las diluciones seriadas que se indican en la figura, de cultivos exponenciales crecidos en YPD a 37°C y ajustados a 10⁷ cels/ml. Se dispusieron 5µl de cada dilución sobre placas YPD conteniendo el agente estresante indicado en la imagen. Una placa de YPD se dispuso paralelamente como control.

C.2. Niveles de ROS intracelular en RM100 y *hog1Δ* tras la exposición a MF y AmB

La alteración funcional de la ruta HOG1 implica una mayor sensibilidad de las levaduras a condiciones osmóticas y oxidativas adversas. Dicho incremento de la sensibilidad estaría causado, al menos en parte, por la dificultad de los mutantes afectados en contrarrestar el incremento de ROS intracelular generado por estos tratamientos (Alonso-Monge *et al.*, 2003, 2009). Además, en condiciones basales, las células *hog1Δ* presentan una tasa respiratoria mayor que el tipo parental (Alonso-Monge *et al.*, 2009), junto a un aumento en la producción de ROS mitocondrial como podemos observar en la Figura C.5. Ya que, como vimos en el capítulo anterior, MF y AmB promovieron un incremento en los niveles de ROS en la cepa CAI-4 (Fig. B.5), procedimos a determinar la formación de radicales libres en RM-100 y *hog1Δ* tras ser expuestos a estos antifúngicos.

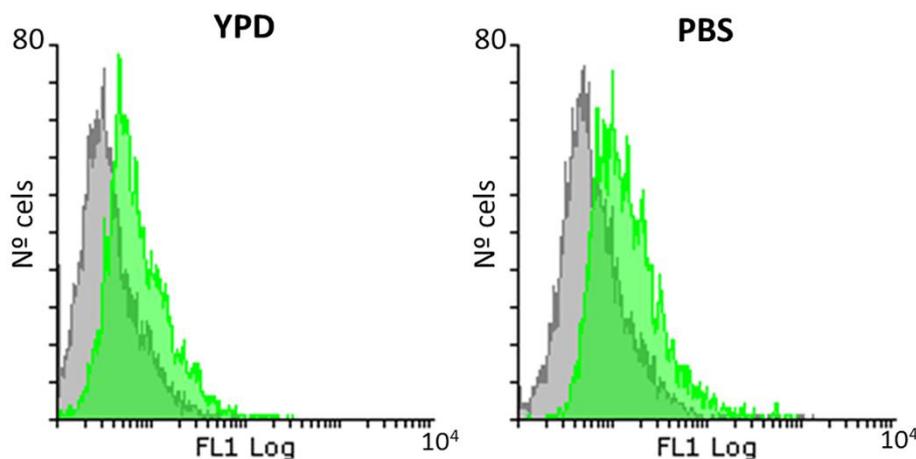


Figura C.5. Análisis comparativo de la producción de ROS en las cepas RM-100 y *hog1Δ*. Las células RM-100 (histogramas grises) y *hog1Δ* (histogramas verdes) se cultivaron en YPD (Panel izquierdo) y PBS (panel derecho) durante 1h a 37°C. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células en cada caso.

Las dos cepas incrementaron los niveles intracelulares de ROS en presencia de MF y AmB, en medio YPD (Fig. C.6). Sin embargo, dicha elevación respecto a los niveles basales fue más pronunciada en la cepa parental que en el mutante en las condiciones probadas (Fig. C.6). Además, como se ha descrito previamente, la inducción de ROS en presencia de MF fue mucho menor al cultivar las células en PBS respecto al ensayo directo en medio YPD, al contrario de lo que ocurre con AmB (Fig. C.6). Además, en el caso de MF este incremento diferencial fue

particularmente manifiesto al comparar las células RM-100 con las células *hog1Δ*, donde el incremento es inapreciable en PBS (Fig. C.6).

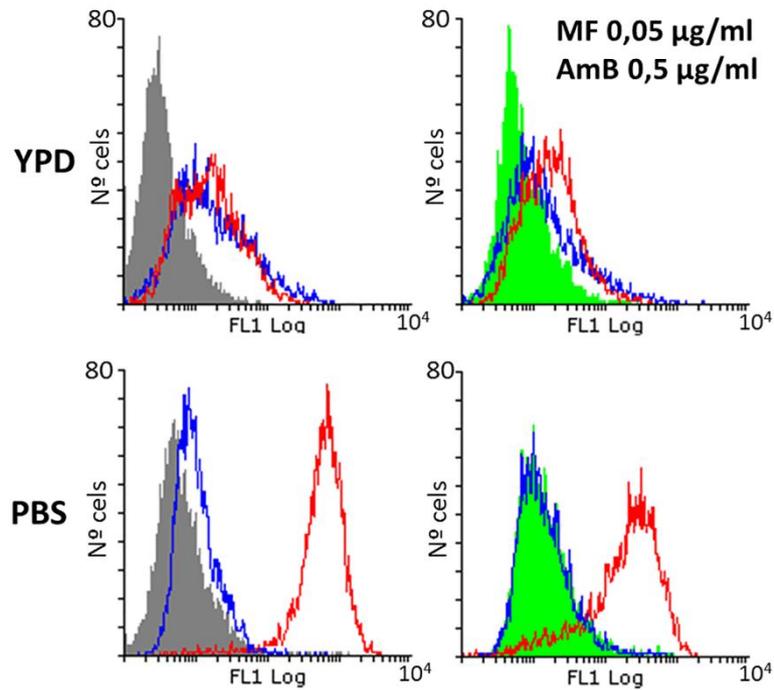


Figura C.6. Producción de ROS en células RM-100 y *hog1Δ* en respuesta a la adición de MF y AmB. Las levaduras se trataron con MF 0,05 µg/ml (histogramas azules) y AmB 0,5 µg/ml (histogramas rojos) en YPD (Paneles superiores) y PBS (paneles inferiores) durante 1h a 37°C. Los histogramas grises representan las células RM-100 control y los verdes las células *hog1Δ* control. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células para cada tratamiento.

Tras una hora de tratamiento, los cultivos *hog1Δ* presentaron un mayor número de células necróticas al tratar la población con 0,5 µg/ml de AmB respecto a las células RM-100 (Fig. C.7). Este aumento de la sensibilidad del mutante al efecto del polieno podría ser responsable de la menor generación de ROS, si lo comparamos con su parental, en presencia del antifúngico (Fig. C.7). Al disminuir la concentración de AmB 10 veces, la supervivencia celular de las levaduras *hog1Δ* y RM-100 se igualaron, y se obtuvo una mayor producción intracelular de ROS que con AmB 0,5 µg/ml (Fig. C.7). No obstante, las células *hog1Δ* seguían experimentando un incremento inferior de radicales libres (Fig. C.7). Por su parte, la equinocandina mostró el patrón de comportamiento observado hasta el momento tanto en la viabilidad celular, donde no se detectaron diferencias respecto a los controles al tratar los cultivos en PBS, como en la producción de ROS, donde el mutante no vio alterados sus niveles de ROS internos (Fig. C.7). Por tanto, parece que el diferente contenido de ROS intracelular registrado entre estas

dos cepas tras la exposición a los fármacos no está vinculado solamente al nivel de muerte celular.

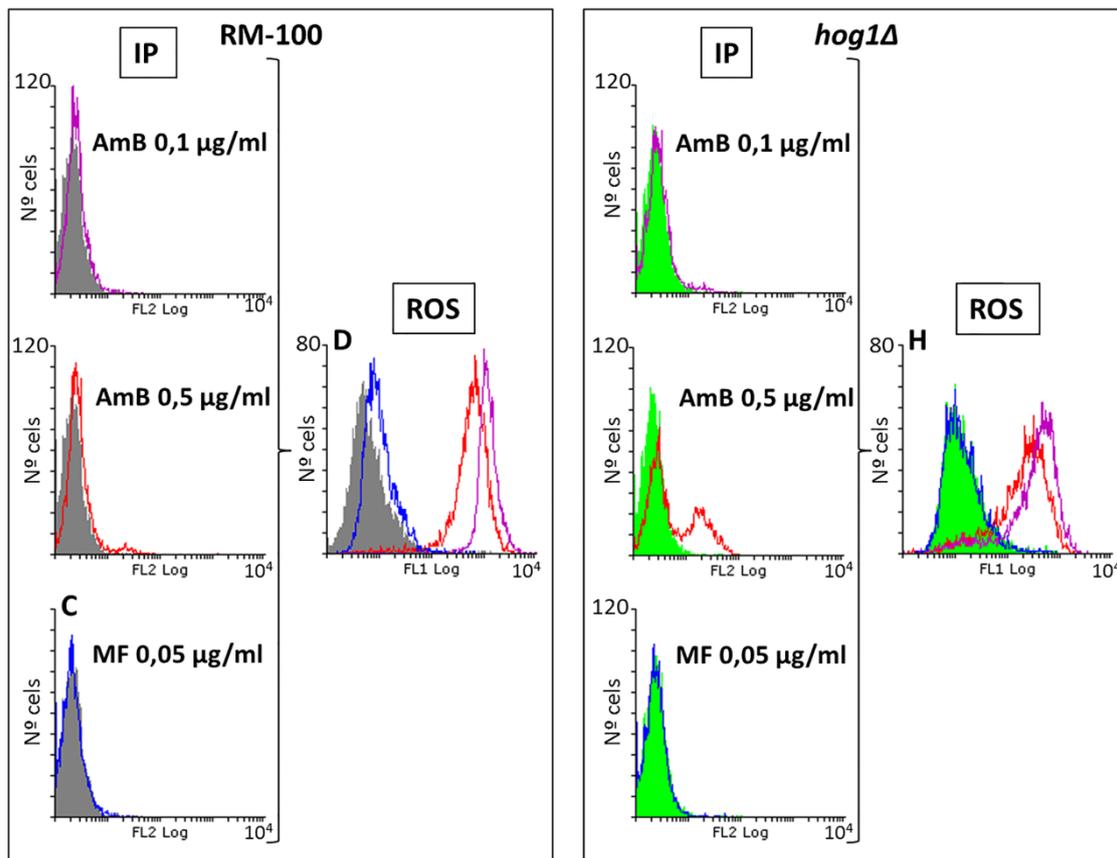


Figura C.7. Relación entre la formación interna de ROS y el grado de necrosis celular en cultivos RM-100 y *hog1Δ* en respuesta a MF y AmB. Levaduras RM-100 (histogramas grises) y *hog1Δ* (histogramas verdes) se trataron con MF 0,05 µg/ml (histogramas azules) y AmB 0,1 µg/ml (histogramas morados) o 0,5 µg/ml (histogramas rojos), en PBS durante una hora. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células para cada tratamiento.

Las diferencias en el grado de explosión oxidativa medible en función del tipo y concentración del antifúngico, así como de la cepa empleada, pueden depender del nivel de actividad catalítica de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidante. Como ya se ha descrito (González-Párraga *et al.*, 2010), al someter cultivos en crecimiento exponencial a concentraciones moderadas y altas de peróxido de hidrogeno, estas enzimas antioxidantes se activaban, presentando las células *hog1Δ* una actividad antioxidante mayor que las RM-100. Por tanto, procedimos a analizar, en presencia de MF y AmB, la respuesta de varias enzimas implicadas en la detoxificación de ROS: catalasa, glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). En la Figura C.8, se observa como los antifúngicos

indujeron una intensa activación catalítica de las enzimas analizadas, mostrando las células tratadas con MF una activación de las enzimas catalasa y SOD superior respecto a las tratadas con el polieno con un $P > 0,05$ (Fig. C.8).

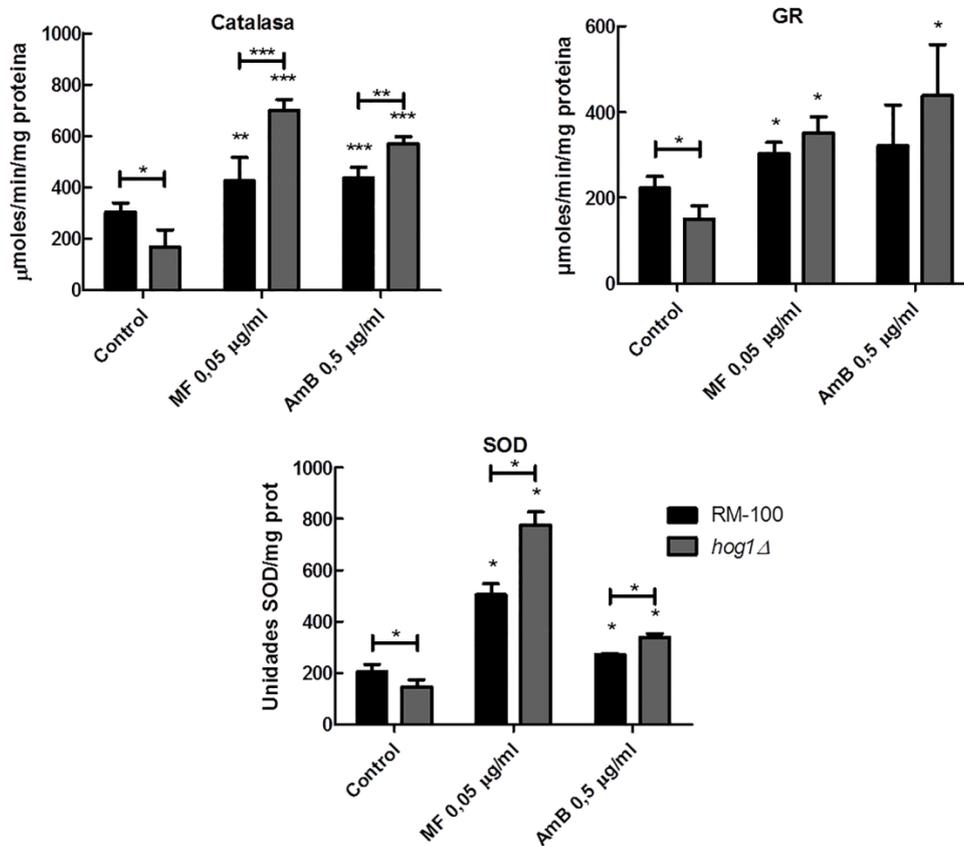


Figura C.8. Efecto de la adición de MF y la AmB sobre los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes. Las actividades catalasa, glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) se determinaron en cultivos RM-100 y *hog1Δ* tratados con MF 0,05 µg/ml y AmB 0,5 µg/ml durante 1h a 37°C. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), según el test de Mann Whitney.

Al igual que ocurre con H_2O_2 (González-Párraga *et al.*, 2010), la actividad enzimática fue más elevada en el mutante nulo *hog1Δ* en todos los casos y, especialmente, en presencia de MF (Fig. C.8). Este aumento de las actividades antioxidantes también ha sido observado en cultivos de *C. albicans* tratados con caspofungina (Kelly *et al.*, 2009). Además, se ha descrito que la MF induce la elevación de los niveles de GR en *C. albicans*, aunque el papel regulador del metabolismo del glutatión en la resistencia al antifúngico aún no está muy claro (Maras *et al.*, 2014). Por tanto, es probable que a tiempos cortos y en condiciones de estrés, la disfunción de la ruta HOG1 se compense con la activación simultánea de la respuesta enzimática antioxidante, que permita contrarrestar el incremento de ROS intracelular.

C.3. Acumulación de trehalosa en células RM100 y *hog1Δ* en presencia de MF y AmB

Según evidencias previas, las alteraciones fisiológicas producidas por la delección del gen *HOG1* elevan la tasa de respiración mitocondrial basal (Alonso-Monge *et al.*, 2009), por lo que las células necesitan una mayor demanda de ATP que, entre otras fuentes, pueden obtener a través de la degradación de trehalosa endógena. En consecuencia, se ha observado como el contenido basal de trehalosa intracelular acumulada fue siempre más alta en el mutante nulo *hog1Δ* que en la cepa RM-100 (Enjalbert *et al.*, 2006; González-Párraga *et al.*, 2010; Sánchez-Fresneda *et al.*, 2013). Además, en condiciones de estrés oxidativo inducido por la presencia de H₂O₂ 5 mM, la expresión del ARNm correspondiente a los genes implicados en la biosíntesis del disacárido (*TPS1* y *TPS2*) experimentó un notable aumento con el tiempo que, sin embargo, fue independiente de HOG1 (González-Párraga *et al.*, 2010). Debido a que HOG1 está implicado en la protección frente a estrés oxidativo en *C. albicans* y que la trehalosa se acumula especialmente en condiciones oxidativas y térmicas adversas (Alvarez-Peral *et al.*, 2002), se analizaron los niveles de almacenamiento del disacárido al someter a las cepas RM100 y *hog1Δ* a los distintos fármacos empleados.

Al ser tratados con los antifúngicos, ambos tipos celulares mostraron una tendencia similar a la observada previamente en células CAI-4, datos recogidos en el capítulo anterior (Tabla B.2 y Tabla C.1). No obstante, los niveles basales del disacárido en el mutante *hog1Δ* fueron más elevados que en la cepa parental, como ya se ha documentado en trabajos anteriores (González-Párraga *et al.*, 2010; Sánchez-Fresneda *et al.*, 2013), un resultado que se correlaciona positivamente con la superior generación basal de ROS intracelular (Fig. C.5). Adicionalmente, los cultivos *hog1Δ* también presentaron una síntesis de trehalosa endógena más elevada que los RM-100 en respuesta a MF y a estrés oxidativo suave (H₂O₂ 5 mM), introducido como control de referencia. Por su parte, la exposición con AmB promovió un prominente nivel de disacárido almacenado, que fue muy similar en ambas cepas; probablemente debido a que la fuerte acción oxidante de la AmB provocó que las células alcanzasen el contenido máximo de trehalosa que son capaces de sintetizar (Tabla C.1). Por último, señalar que las bajas concentraciones

intracelulares del disacárido medibles en presencia de MF se correlacionan positivamente con los altos niveles de actividad enzimática antioxidante mostrados en la Figura C.8. Un mecanismo explicable en términos de compensación metabólica, que asegura la protección de la integridad celular, contrarrestando mediante la activación antioxidante, la disminución del efecto protector conferido por altos niveles de trehalosa endógena (González-Párraga *et al.*, 2003)

Tabla C.1. Concentración intracelular de trehalosa en las cepas de estudio tras ser sometidas a MF, AmB o H₂O₂. Las células en crecimiento exponencial se trataron con H₂O₂ 5 mM, MF 0,05 µg/ml y AmB 0,5 µg/ml durante 1 h a 37°C.

Cepas	Trehalosa endógena [nmol trehalosa (mg p.h.) ⁻¹]			
	1h			
	Control	H ₂ O ₂ 5 mM	MF 0,05 µg/ml	AmB 0,5 µg/ml
RM-100	2,12 (1)	13,86 (6,53)	3,81 (1,79)	43,73 (20,61)
<i>hog1Δ</i>	5,76 (1)	22,80 (3,95)	27,52 (2,56)	43,28 (7,51)

C.4. Efecto de la rotenona sobre la capacidad antifúngica de AmB y MF

La respiración mitocondrial es la principal fuente de producción de ROS intracelular en organismos aerobios. En consecuencia, es previsible que cualquier perturbación en la cadena de transporte de electrones afecte a la fosforilación oxidativa y conlleve una reducción en los niveles de radicales libres. Con el fin de analizar la relación existente entre el potencial antifúngico de las drogas utilizadas y la producción de ROS resultante de la respiración celular, se utilizó rotenona, un compuesto capaz de inhibir el complejo I (NADH-ubiquinona oxidorreductasa) de la cadena de transporte de electrones.

Se realizó una serie de ensayos preliminares hasta determinar la concentración de rotenona que no causa toxicidad en las células, comparando la viabilidad de cultivos exponenciales en presencia de varias dosis de rotenona. Los ensayos se realizaron en medio YPD a 37°C. En la Figura C.9, se observa como la

concentración de rotenona escogida (0, 156 mM) no afectó la supervivencia de ninguno de los tipos celulares, RM-100 y *hog1Δ* (Fig. C.9A), pero sí alteró la producción de ROS basal del mutante (Fig. C.9B). Además, al someter los cultivos preincubados con rotenona a AmB durante 1h, apenas se indujo formación de ROS al comparar con idénticos cultivos mantenidos sin el inhibidor de la cadena respiratoria (Fig. C.9B). Por tanto, los datos obtenidos confirman que la concentración de rotenona empleada no es tóxica para las células, pero sí afecta al metabolismo oxidativo de las levaduras, alterando su tasa respiratoria.

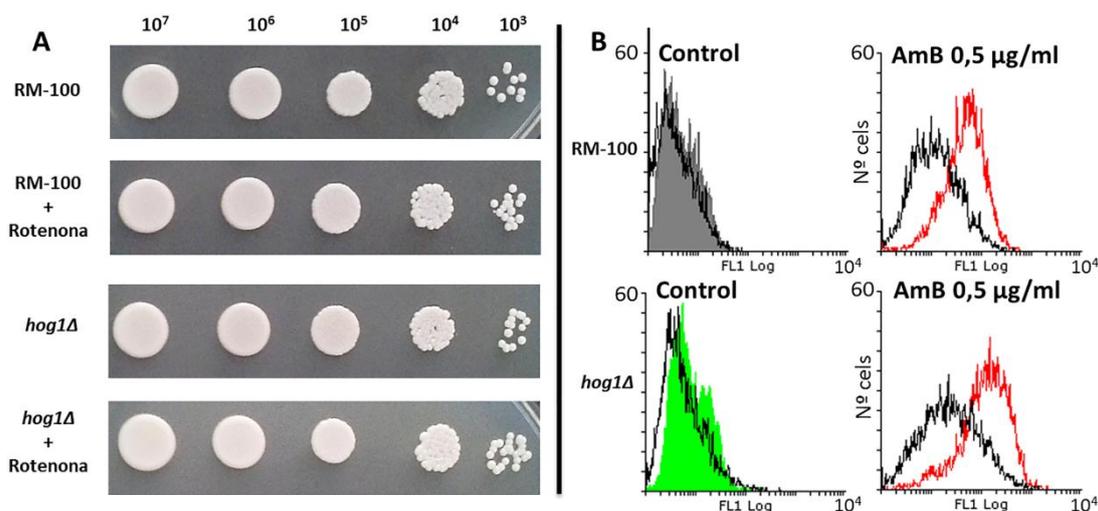


Figura C.9. Análisis del efecto de la rotenona sobre la viabilidad celular y la producción de ROS en cultivos RM-100 y *hog1Δ*. Las células se incubaron en medio YPD líquido en ausencia o presencia de rotenona 0,156 mM durante 1h a 37°C momento en el que: A) Se realizaron diluciones seriadas que se dispensaron en forma de gota en placas de YPD, y B) Los mismos cultivos (RM100 -histograma gris; *hog1Δ* -histograma verde) se incubaron con AmB 0,5 μg/ml (histograma rojo) durante una hora a 37°C. Las células pretratadas con rotenona corresponden al histograma negro. Las figuras representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Se analizaron 5000 células para cada tratamiento.

Un vez comprobado el efecto de la rotenona, se analizó si los cultivos pretratados durante 1h con dicha droga eran más resistentes al efecto de los antifúngicos ensayados. Con este fin, células exponenciales de *C. albicans* se trataron durante 1h con las drogas analizadas en presencia y ausencia de rotenona. Los datos obtenidos fueron muy reveladores, mostrando los cultivos pretratados con el inhibidor de la respiración mitocondrial una mayor resistencia a los antifúngicos (Fig. C.10) con una $P < 0,05$, según el test no paramétrico de Mann Whitney. Los cultivos sin el tratamiento mostraron la misma tendencia observada al principio del presente capítulo (Fig. C.10), siendo en todos los casos el mutante *hog1Δ* más sensible al efecto del polieno.

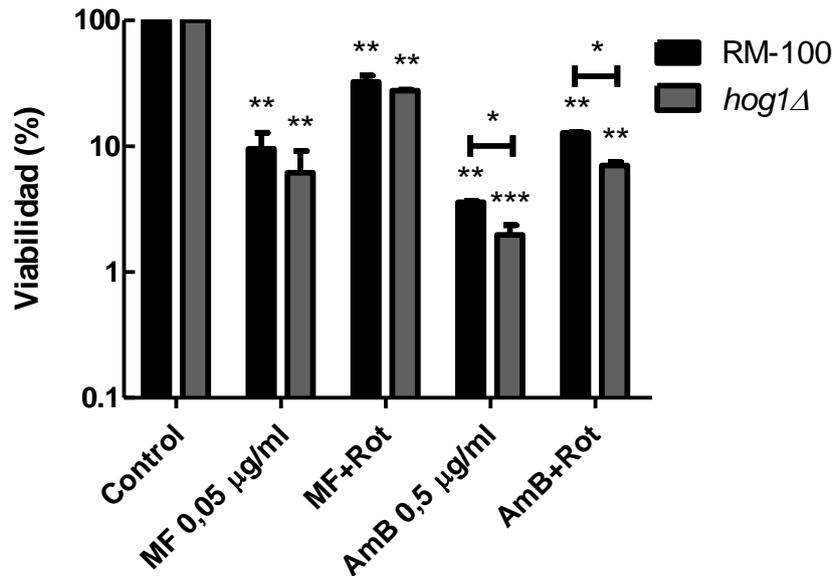


Figura C.10. Efecto de la rotenona sobre el potencial antifúngico de AmB y MF en cultivos RM-100 y *hog1Δ*. Las células se incubaron en ausencia o presencia de rotenona (Rot) 0,156 mM durante 1 h y, posteriormente, se le adicionaron los antifúngico (MF 0,05 µg/ml o AmB 0,5 µg/ml) durante 1h a 37°C, momento en el que se calculó el porcentaje de viabilidad. P<0,05 (*), P<0,01 (**), P<0,001 (***) , según el test de Mann Whitney.

Resultados similares han sido recientemente descritos por Mesa-Arango *et al.* (2014) en células de *C. tropicalis* sometidas al tratamiento con AmB tras preincubación con rotenona, aportando evidencias adicionales a la hipótesis de que la inducción de ROS por compuestos antifúngicos potencia su toxicidad sobre las levaduras. No obstante, la MF también experimentó una reducción de su acción letal en presencia de rotenona, a pesar de mostrar menores niveles de inducción de ROS que la AmB (Fig. C.6). Este fenómeno se correlaciona con los efectos de la tiourea, descritos en el capítulo anterior en células CAI-4 (Fig. B.9). Probablemente, los incrementos de ROS observados en presencia de MF se deban únicamente a su fuerte letalidad sobre las células, ya que esta equinocandina no induce sobreproducción de ROS a concentraciones subletales como sí se observa con el polieno. No obstante, la disminución de la tasa respiratoria junto con los niveles de ROS, implican igualmente una reducción en la toxicidad de MF.

5. RESUMEN GENERAL

Las micosis causadas por hongos oportunistas representan actualmente un grave problema clínico. La levadura *C. albicans* sigue siendo el patógeno responsable de la mayoría de septicemias fúngicas, con elevada prevalencia en pacientes inmunodeprimidos. El tratamiento quimioterápico de las micosis puede presentar complicaciones, debido a la baja toxicidad selectiva de algunos antifúngicos y su elevado coste; así como por los crecientes problemas de resistencia a los mismos y el aislamiento frecuente de especies previamente catalogadas como inocuas en brotes hospitalarios. En consecuencia, es necesario profundizar en el análisis minucioso de los mecanismos de actuación de las drogas disponibles, potenciar su efecto fungicida, o bien, contrarrestar sus efectos secundarios y evitar posibles casos de resistencia.

Del mismo modo, resulta esencial abordar el estudio de nuevas dianas antifúngicas para obtener futuros compuestos, dotados de una mayor eficacia antimicrobiana y alta toxicidad selectiva. Sobre estas premisas, en esta Memoria hemos llevado a cabo un análisis detallado de la respuesta de *C. albicans* frente a validamicina A (Val. A), una sustancia ya empleada en el control de plagas causadas por hongos fitopatógenos, que actúa como un inhibidor de la enzima trehalasa. Con posterioridad, se han investigado posibles mecanismos complementarios de actividad antifúngica en los compuestos de práctica clínica, micafungina (MF) y anfotericina B (AmB).

Por lo que respecta a Val A., tras comprobar su acción inhibitoria sobre la trehalasa ácida (Atc1p), localizada en la pared celular de *C. albicans*, determinamos que la concentración de 0,1 mg/ml era la más idónea a la hora de realizar futuros ensayos clínicos, por ser la mínima concentración del antibiótico que mostraba un efecto paralizante sobre el crecimiento microbiano, así como sobre la viabilidad celular (Fig. A.4 y A.6). Trabajos previos en *R. solani* (Asano *et al.*, 1987) indican que esa dosis suprime eficazmente la degradación de trehalosa intracelular. Estos datos han sido confirmados aquí, verificando incluso que dicha concentración induce una acumulación del disacárido superior a la registrada con niveles más altos de Val. A (Tabla A.2). Este aspecto ha sido observado en *Escherichia coli* (Li *et al.*, 2012), al tratar la enterobacteria con distintas concentraciones de la droga, demostrando que solamente dosis superiores a 0,1 mM muestran diferencias

significativas en el crecimiento, mientras la acumulación de trehalosa puede ser optimizada ajustando la concentración de Val. A en el medio de cultivo (0,1 mM en este caso). Datos similares se han observado en los nódulos de la raíz de *Medicago truncatula*, que acumulan tres veces más trehalosa en presencia de 30 μ M de Val. A. Asimismo, las plantas transgénicas de tabaco aumentan entre dos y cuatro veces la síntesis de trehalosa endógena cuando crecen con dicha concentración de Val. A. El mismo proceso ha sido descrito en nódulos de soja (*Glycine max* L. Merr.) (Best *et al.*, 2011; Goddijn *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1995).

En términos de viabilidad celular, el análisis comparativo de la Val. A respecto del efecto producido por AmB, permite concluir que la capacidad de Val. A para afectar el crecimiento y supervivencia de la población celular es muy débil (Fig. A.8). Además, se obtuvo una correlación positiva entre el grado de estrés producido por el inhibidor y el tamaño celular, correspondiendo los valores más bajos del volumen celular interno a células tratadas con AmB, seguidas de las expuestas a Val. A, tomando como referencia el ensayo control que presentaba el mayor tamaño celular (Tabla A.3).

En lo referente a las actividades enzimáticas, no se pudo realizar un estudio comparativo entre ambos antibióticos, debido a la intensa acción letal de la AmB (0,5 μ g/ml) a los tiempos empleados. Sin embargo, sí pudieron analizarse las diferencias entre la cepa parental CAI-4 y el mutante homocigótico *atc1 Δ* carente de trehalasa ácida (Atc1p); que mostró un mayor grado de viabilidad celular que la cepa parental, tras tratamiento con Val. A (Fig. A.9), debido probablemente a la carencia de actividad trehalasa y la subsiguiente falta de unión con validoxilamina A. Adicionalmente, la inhibición de la enzima neutra fue menor que la observada en células CAI-4, corroborando la mayor resistencia observada *in vitro* en el mutante (Tabla A.4). La trehalasa ácida de la cepa parental, también mostró una disminución de la actividad enzimática en muestras tratadas con Val. A, aunque menor respecto a la enzima neutra (Tabla A.4). No obstante, Atc1p posee bajos niveles de actividad basal en medio YPD, debido a la represión catabólica que sufre por la acción de D-glucosa (Sánchez-Fresneda *et al.*, 2009).

Por último, reseñar que Val. A mostró una toxicidad similar sobre *C albicans* y sobre células humanas, bien procedentes de la línea celular THP-1 o en cultivos primarios procedentes de la sangre de pacientes sanos (Figs. A.14 y A.15). Por tanto, el conjunto de los datos obtenidos permite concluir que actualmente Val. A no puede ser considerado un antifúngico de uso clínico. Sin embargo, posee un mecanismo de acción y una serie de propiedades antifúngicas que pueden servir de base para diseñar nuevos compuestos farmacéuticos que permitan combatir de forma más eficaz las alteraciones sistémicas provocadas por *C albicans*.

Por otra parte, la creciente descripción de dianas antifúngicas adicionales a las tradicionalmente conocidas en ciertos antimicóticos clínicos como la AmB, así como la importancia de la formación de ROS en la acción antifúngica de esta droga (Delattin *et al.*, 2014; González-Párraga *et al.*, 2011; Mesa-Arango *et al.*, 2014), ha motivado que el segundo y tercer capítulo de Resultados y Discusión de esta Memoria, se haya centrado en el análisis comparativo del comportamiento de MF y AmB.

En primer lugar, se observó un marcado efecto antifúngico de ambos compuestos sobre distintos fondos genéticos de *C. albicans*, mostrando la MF una citotoxicidad similar a la AmB, tras aplicar una concentración 10 veces menor, determinada por el método del CLSI o mediante el recuento de UFC/ml (Tabla B.1; Fig. B.2). No obstante, al medir la viabilidad celular con ioduro de propidio (IP), sólo MF mostró un potente carácter fungicida en medio rico (YPD), pero no en PBS, a concentraciones iguales o superiores a 0,05 µg/ml (Fig. B.6), probablemente debido a que la acción fungicida de la equinocandina depende de la actividad metabólica celular (Marcos-Zambrano *et al.*, 2014). Las células tratadas con AmB, sin embargo, apenas se tiñeron con IP. Estas diferencias en el grado de viabilidad registrable, según se realice por recuento de UFC/ml o por IP, tras 1h de tratamiento con AmB, han sido previamente descritas por Sangalli-Leite *et al.* (2011), constatando que el efecto letal del polieno sobre la célula tiene lugar cierto tiempo después del tratamiento.

La producción de ROS en respuesta a la adición de MF varió en función del medio empleado, siendo más acusada en YPD para concentraciones que inducen una marcada citotoxicidad (Figs. B5 y B6). Por su parte, AmB mostró siempre una elevada producción de ROS intracelular, independientemente de su toxicidad sobre las levaduras (Figs. B4, B5 y B6). Ello sugiere que el polieno actúa inicialmente en el medio intracelular mediante la inducción de ROS. A su vez, la muerte celular tiene lugar con posterioridad. Diversos grupos proponen que concentraciones intermedias de AmB provocan apoptosis inducida por los altos niveles intracelulares de radicales libres, mientras que dosis fungicidas dan lugar a necrosis celular (IP+) (Phillips *et al.*, 2003; Sangalli-Leite *et al.*, 2011).

La ruta de MAPKs HOG1 cumple un papel esencial en la fisiología de *C. albicans*, incluyendo la resistencia a estrés oxidativo y osmótico. El mutante nulo *hog1Δ*, interrumpido en dicha ruta, nos permitió estudiar su implicación en la resistencia a los antifúngicos clínicos analizados. Así, este mutante homocigótico fue mucho más sensible al efecto del polieno que la cepa parental (RM-100); una acción opuesta a la de MF, que no mostró diferencias entre las cepas (Fig. C.4). Por tanto, la ruta HOG1 parece estar directamente implicada en la resistencia de *C. albicans* a AmB pero no a MF. Además, *hog1Δ* experimentó un mayor nivel de activación de las enzimas antioxidantes (catalasa, GR y SOD) en presencia de los antifúngicos, lo que se correlaciona con los menores niveles de ROS detectados respecto al tipo parental (Fig. C.6).

No obstante, AmB continuó mostrando los niveles más altos de ROS internos, sugiriendo que este polieno es un potente inductor de radicales libres y confirmando que dicha producción es un elemento principal de su acción fungicida. Sin embargo, al tratar *C. albicans* con **rotenona** -un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones-, o con **tiourea** -un secuestrador de radicales hidroxilo-, se detectó una disminución en la toxicidad de ambos antimicóticos, AmB y MF (Figs. B.9 y C.10). Por tanto, estos datos indican que la acción fungicida de la equinocandina también se ve potenciada por ROS, aunque su papel no sería determinante.

Se ha investigado también la hipotética correlación entre dimorfismo y viabilidad celular en *C. albicans*, promovida por AmB. Con anterioridad, ha sido propuesto un posible efecto inhibitorio de la AmB sobre la transición dimórfica levadura-micelio a concentraciones subletales (Ellepola y Samaranayake, 1998; Vale-Silva *et al.*, 2007), aunque se desconoce el mecanismo causal de esta inhibición. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, se observó que el porcentaje de emisión de tubos germinativos disminuyó gradualmente en función de la toxicidad ejercida sobre las células, y sólo las dosis más tóxicas impedían la formación de estructuras miceliales, como resultado de la parada en el crecimiento celular (Fig. B.13). Además, al aplicar AmB durante tiempos cortos (30min o 1h) y retirarla inmediatamente del medio, las levaduras reanudaron su crecimiento junto con la producción de tubos germinativos (Fig. B.14). Por tanto, el efecto del polieno sobre la formación de hifas sería consecuencia de su acción fungicida sobre la viabilidad celular, y no de un bloqueo en los componentes reguladores, implicados en la transición dimórfica.

Por último, MF cumple un papel inmunomodulador muy importante en la interacción levadura:macrófago. Esto se debe a que se establece un incremento en la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α y la antiinflamatoria IL-10, en macrófagos humanos estimulados con levaduras previamente expuestas a la equinocandina, respecto a levaduras sin tratar (Fig. B.18). Este comportamiento se corresponde con lo observado en *A. fumigatus*, donde los macrófagos humanos vieron incrementada su capacidad fagocítica al interactuar con el hongo en presencia de MF (Choi *et al.*, 2004). Por tanto, MF favorece el reconocimiento y la activación de los macrófagos del sistema inmunitario innato, lo que facilita la eliminación de la infección fúngica.

6. CONCLUSIONES

El conjunto de datos experimentales expuestos en la presente Memoria permite establecer las siguientes **conclusiones**:

1. La cepa CAI-4 de *C. albicans* presenta una mayor sensibilidad al efecto inhibitorio de la validamicina A (Val. A) en medio YPD, siendo la CMI₅₀ de 0,5 mg/ml. Además, la Val. A actúa como un inhibidor competitivo de la enzima trehalasa ácida (Atc1p) de la pared celular, promoviendo la síntesis y acumulación intracelular de trehalosa endógena.
2. La Val. A tiene un débil efecto fungicida sobre *C. albicans*, muy inferior al ejercido por anfotericina B (AmB), introducida como control positivo. Ensayos con el mutante homocigótico, *atc1Δ*, deficiente en la actividad Atc1p, revelan una mayor resistencia a Val. A que la cepa parental, CAI-4. La aplicación conjunta de AmB y Val. A no induce ningún efecto tóxico sinérgico sobre la viabilidad celular de *C. albicans*. Por tanto, la inhibición de las trehalasas, causada por Val. A, no es letal para esta levadura.
3. La actividad catalasa no tiene ninguna relevancia apreciable en la protección de la integridad celular frente al tratamiento con Val. A. Del mismo modo, esta droga no ejerce ningún tipo de influencia sobre la capacidad de transición dimórfica levadura-micelio en *C. albicans*.
4. La Val. A causa un grado de toxicidad sobre las células humanas similar a la producida sobre *C. albicans*, lo que excluye su aplicación clínica. No obstante, sus propiedades y mecanismo de acción, posibilitan su utilización como sustrato para la obtención de futuros compuestos antifúngicos contra *C. albicans*.
5. La micafungina (MF) presenta una citotoxicidad dosis-dependiente similar en las cepas CAI-4 y SC5314 de *C. albicans*. La producción de ROS intracelular aumenta en respuesta a MF, pero este incremento es mucho mayor al analizar las levaduras en medio rico (YPD) que en tampón fosfato (PBS). La AmB, por el contrario, mantiene siempre una producción de ROS mayor en PBS.
6. La viabilidad celular determinada con ioduro de propidio (IP) no se ve alterada al tratar las células de *C. albicans* con MF en PBS durante 1h, pero sí es seriamente dañada en YPD, junto a un aumento en la producción de ROS. Sin

Conclusiones

embargo, a pesar de que AmB presenta una toxicidad similar o inferior a MF al emplear ambas condiciones, promueve mayores niveles de ROS intracelular que la equinocandina. Por tanto, el grado de explosión oxidativa no va asociado a un efecto antifúngico inmediato de dicha droga.

7. El pretratamiento celular con tiourea o rotenona, confiere un aumento de la resistencia al efecto antifúngico de MF y AmB, junto con la disminución simultánea del nivel de ROS endógeno. Por tanto, la producción intracelular de radicales libres potencia la efectividad los antifúngicos. El contenido de trehalosa almacenada aumenta en presencia de MF, pero este aumento es mucho más notable con AmB.
8. MF altera la morfología celular de *C. albicans*, adoptando las levaduras formas hinchadas o carentes de contenido citosólico, con malformaciones en la capa intermedia de la pared o en los septos. Por su parte, AmB inhibe la formación de tubos germinativos como consecuencia de su elevada letalidad, pero no por afectar los elementos reguladores de la transición dimórfica. Del mismo modo, MF suprime la filamentación a concentraciones letales, mostrando las escasas hifas detectadas múltiples ramificaciones cortas y brotes colapsados.
9. El mutante nulo *hog1Δ*, carente de la proteína funcional Hog1p, es sensible a AmB, mientras que en presencia de MF no muestra diferencias significativas con la cepa parental (RM-100). Por tanto, la ruta Hog1 parece estar directamente implicada en la resistencia de *C. albicans* a AmB pero no a MF.
10. Las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa aumentan su actividad en presencia de AmB y MF. Este incremento es más notable en el mutante *hog1Δ*.
11. MF incrementa el reconocimiento y la activación de los macrófagos, observado en el aumento de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α y la antiinflamatoria IL-10, lo que facilita la eliminación de la infección fúngica.

7. LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Taxonomía de *C. albicans*. 9

Figura 1.2. Porcentaje de aislamientos clínicos detectados en España de distintas especies del género *Candida* según un estudio realizado por FUNGEMYCA (2009-2010). 11

Figura 1.3. Micrografías de las distintas morfologías que presenta *C. albicans* en su ciclo biológico. 12

Figura 1.4. Fases de la adhesión y penetración celular. 15

Figura 1.5. Fases de desarrollo de las biopelículas. 16

Figura 1.6. Representación de la organización estructural que adoptan los distintos componentes de la pared celular de *C. albicans*. 18

Figura 1.7. Representación de las distintas morfologías desarrolladas por *C. albicans*. 20

Figura 1.8. Estructura química y mecanismo de acción de la AmB. 23

Figura 1.9. Mecanismo de acción antifúngica de las equinocandinas. 25

Figura 1.10. Estructura molecular de la MF. 25

Figura 1.11. Estructura de los distintos anillos azólicos. 26

Figura 1.12. Dianas celulares de los principales antifúngicos eficaces contra *C. albicans*. 28

Figura 1.13. Formación de especies reactivas de oxígeno. 31

Figura 1.14. Funciones y metabolismo del glutatión. 35

Figura 1.15: Estructura molecular del disacárido trehalosa. 36

Figura 1.16. Estructura general de las distintas validamicinas. 42

Figura 1.17. Estructura molecular de los principales inhibidores de trehalasas. 44

Figura 1.18. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa. 45

Figura 1.19. Morfología típica de un monocito y un macrófago. 47

Figura 1.20. Receptores y señalización implicada en la interacción de los fagocitos con *C. albicans*. 48

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Ejemplo de selección de población linfo-monocítica atendiendo al tamaño (SSC) y complejidad (FSC) en diagrama de puntos, obtenido mediante citómetro de flujo. 61

Figura 3.2. Morfología típica de la línea celular THP-1 tras la diferenciación con PMA. 62

Figura 3.3. Recta patrón de valoración de glucosa con el método glucosa oxidasa-peroxidasa. 72

Figura 3.4. Recta de calibrado para medida de TNF- α mediante ELISA. 79

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. ANÁLISIS DE LA VALIDAMICINA A COMO COMPUESTO ANTIFÚNGICO EN *C. albicans*

Figura A.1. Determinación del efecto de Val. A sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans*. 86

Figura A.2. Determinación del efecto de Val. A sobre la cepa CAI-4 de *C. albicans*. 87

Figura A.3. Inhibición de Val. A sobre la actividad trehalasa ácida (Atc1p) de la cepa CAI-4 de *C. albicans*. 88

Figura A.4. Efecto de Val. A sobre el crecimiento celular en cultivos de la cepa CAI-4 de *C. albicans*. 90

Figura A.5. Estudio de la sensibilidad en placa de <i>C. albicans</i> al tratamiento con Val. A.	91
Figura A.6. Porcentaje de supervivencia de células CAI-4 frente al tratamiento con Val. A.	92
Figura A.7. Efecto de Val. A y AmB sobre el crecimiento de CAI-4 y <i>atc1Δ</i>	95
Figura A.8. Porcentaje de supervivencia de la cepa CAI-4 tras la exposición a Val. A y AmB.	96
Figura A.9. Porcentaje de viables en células CAI-4 y <i>atc1Δ</i> tratadas con Val. A.	97
Figura A.10. Micrografías ópticas de la cepa CAI-4 de <i>C. albicans</i> tratadas con Val. A y AmB.	98
Figura A.11. Efecto de Val. A en la formación de tubos germinativos.	103
Figura A.12. Micrografías ópticas de células CAI-4, usando la técnica de contraste interferencial de Nomarski, que ilustran las distintas etapas en la transformación de la respectiva fase levaduriforme, hasta estructura miceliar.....	105
Figura A.13. Efecto de la combinación de Val. A y AmB sobre la viabilidad celular de la cepa CAI-4.	106
Figura A.14. Estudio de la toxicidad de Val. A sobre células THP-1.	108
Figura A.15. Efecto de distintas concentraciones Val. A sobre linfocitos y macrófagos procedentes de la sangre periférica de pacientes sanos.....	109

B. ESTUDIO DE LOS ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO MICAFUNGINA Y ANFOTERICINA B SOBRE C. albicans.

Figura B.1. Análisis del efecto de MF sobre la cepa CAI-4 de <i>C. albicans</i> y el mutante isogénico <i>atc1Δ</i>	115
Figura B.2. Efecto de MF y AmB sobre la viabilidad celular de CAI-4.....	116
Figura B.3. Efecto de MF y AmB sobre la viabilidad de SC5314.	117
Figura B.4. Acumulación intracelular de ROS tras el tratamiento de las levaduras CAI-4 con MF y AmB en PBS.	119
Figura B.5. Acumulación interna de ROS tras el tratamiento de la cepa CAI-4 con MF y AmB en YPD.	120
Figura B.6. Análisis de la viabilidad celular mediante la tinción con IP sobre células CAI-4 tras el tratamiento con MF y AmB.	121
Figura B.7. Efecto del medio de cultivo empleado en la actividad antifúngica de MF y AmB sobre células CAI-4.	122
Figura B.8. Producción intracelular de ROS y viabilidad celular en respuesta a MF y AmB en células SC5314 cultivadas en YPD o PBS.	123
Figura B.9. Efecto protector de la tiourea sobre la actividad antifúngica de AmB y MF.	124
Figura B.10. Análisis de las alteraciones morfológicas producidas por MF y AmB.....	125
Figura B.11. Análisis morfológico de levaduras CAI-4 mediante MET.....	126
Figura B.12. Micrografías al MET de células CAI-4 tratadas con MF.	127
Figura B.13. Efecto de concentraciones crecientes de AmB sobre células CAI-4 sometidas a un proceso de inducción dimórfica.	130
Figura B.14. Acción reversible de la AmB sobre la viabilidad celular y la formación de tubos germinativos inducida por suero humano en blastoconidios de la cepa CAI-4.	131
Figura B.15. Efecto de 5FC sobre levaduras sometidas a un proceso de inducción dimórfica.	132

Figura B.16. Efecto del suero sobre la capacidad antifúngica de MF en células CEY.1 de *C. albicans*..... 133

Figura B.17. Efecto de la MF sobre la transición dimórfica levadura-micelio en *C. albicans* y la morfología de los filamentos correspondientes..... 134

Figura B.18. Análisis de la producción de citoquinas por los macrófagos en respuesta a levaduras tratadas con MF..... 137

C. IMPLICACIÓN DE LA RUTA HOG1 EN LA PROTECCIÓN A ESTRÉS PRODUCIDO POR AmB y MF

Figura C.1. Esquema general de la ruta de señalización de MAPKs..... 141

Figura C.2. Componentes implicados en la ruta de señalización de MAPKs en *C. albicans*..... 142

Figura C.3. Efecto de MF y AmB sobre la viabilidad de las cepas RM-100 y *hog1Δ* de *C. albicans*..... 144

Figura C.4. Sensibilidad en placa de las cepas RM-100 y *hog1Δ* a MF, AmB, NaCl y H₂O₂..... 145

Figura C.5. Análisis comparativo de la producción de ROS en las cepas RM-100 y *hog1Δ*..... 146

Figura C.6. Producción de ROS en células RM-100 y *hog1Δ* en respuesta a la adición de MF y AmB..... 147

Figura C.7. Relación entre la formación interna de ROS y el grado de necrosis celular en cultivos RM-100 y *hog1Δ* en respuesta a MF y AmB..... 148

Figura C.8. Efecto de la adición de MF y la AmB sobre los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes..... 149

Figura C.9. Análisis del efecto de la rotenona sobre la viabilidad celular y la producción de ROS en cultivos RM-100 y *hog1Δ*..... 152

Figura C.10. Efecto de la rotenona sobre el potencial antifúngico de AmB y MF en cultivos RM-100 y *hog1Δ*..... 153

8. LISTA DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Distribución de las especies aisladas de <i>Candida</i> en estudios globales (%).	10
Tabla 1.2. Clasificación y principales factores de riesgo.	14
Tabla 1.3. Composición y posible papel funcional de los principales polisacáridos que constituyen la pared celular.	17

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Cepas de <i>C. albicans</i> empleadas en la presente Memoria: genotipo y procedencia.	57
Tabla 3.2. Medios de cultivos utilizados para el cultivo de las cepas <i>C. albicans</i> .	58
Tabla 3.3. Intervalos de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad a las 24h, obtenidas por el método de microdilución M27-S4.	76

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. ANÁLISIS DE LA VALIDAMICINA A COMO COMPUESTO ANTIFÚNGICO EN *C. albicans*

Tabla A.1. Determinación de las CMIs de Val. A en la cepa CAI-4 de <i>C. albicans</i> .	88
Tabla A.2. Contenido de trehalosa intracelular almacenado por células CAI-4 en respuesta a Val. A.	93
Tabla A.3 Efecto de Val. A y AmB sobre el tamaño celular en CAI-4.	99
Tabla A.4. Niveles de actividad trehalasa ácida, trehalasa neutra y catalasa en cultivos CAI-4 y <i>atc1Δ</i> tratados con Val. A.	100
Tabla A.5. Niveles de trehalosa endógena en cultivos CAI-4 y <i>atc1Δ</i> tratados con Val. A.	101
Tabla A.6. Concentración de trehalosa intracelular almacenada en cultivos miceliarios CAI-4 y <i>atc1Δ</i> tratados con Val. A.	104
Tabla A.7. Niveles de actividad trehalasa ácida, trehalasa neutra y catalasa en cultivos CAI-4 tratados con Val. A y AmB de forma combinada.	107

B. ESTUDIO DE LOS ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO MICA FUNGINA Y ANFOTERICINA B SOBRE *C. albicans*

Tabla B.1. Cálculo de las CMIs para MF y AmB correspondientes a las distintas cepas usadas en esta Memoria.	114
Tabla B.2. Determinación de las actividades trehalasa neutra y ácida, así como del contenido de trehalosa intracelular en blastoconidios CAI-4.	135

C. IMPLICACIÓN DE LA RUTA HOG1 EN LA PROTECCIÓN A ESTRÉS PRODUCIDO POR AmB y MF

Tabla C.1. Concentración intracelular de trehalosa en las cepas de estudio tras ser sometidas a MF, AmB o H ₂ O ₂ .	151
---	-----

2. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A., Lichtman, A. y Pillai, S. (2012). *Cellular and Molecular Immunology*, 7a ed. Elsevier Madrid.

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**, 121–126.

Akins, R. A. (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **43**, 285–318.

Allevato, M., Negroni, R. y Galimberti, R. (2007). Antifúngicos: Ayer, hoy y mañana. *Act Ter Dermatol* **30**, 8.

Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sánchez, M. y Nombela, C. (1999). Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 3058–3068.

Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Román, E., Negro, A. I., Eisman, B., Nombela, C. y Pla, J. (2003). The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**, 351–361.

Alonso-Monge, R., Román, E., Nombela, C. y Pla, J. (2006). The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**, 905–912.

Alonso-Monge, R., Carvaihlo, S., Nombela, C., Rial, E. y Pla, J. (2009). The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **155**, 413–423.

Alvarez-Peral, F. J. y Argüelles, J. C. (2000). Changes in external trehalase activity during human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*. *Res Microbiol* **151**, 837–843.

Alvarez-Peral, F. J., Zaragoza, O., Pedreno, Y. y Argüelles, J.C. (2002). Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology* **148**, 2599–2606.

Ando, O., Satake, H., Itoi, K., Sato, A., Nakajima, M., Takahashi, S., Haruyama, H., Ohkuma, Y., Kinoshita, T. y Enokita, R. (1991). Trehazolin, a new trehalase inhibitor. *J Antibiot (Tokyo)* **44**, 1165–1168.

Ando, O., Nakajima, M., Kifune, M., Fang, H. y Tanzawa, K. (1995). Trehazolin, a slow, tight-binding inhibitor of silkworm trehalase. *Biochim Biophys Acta* **1244**, 295–302.

Argüelles, J. C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* **174**, 217–224.

Argüelles, J. C., Rodriguez, T. y Alvarez-Peral, F. J. (1999). Trehalose hydrolysis is not required for human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*: evidence from a *tps1/tps1* mutant deficient in trehalose synthesis. *Res Microbiol* **150**, 521–529.

Argüelles, J.-C. (2014). Why can't vertebrates synthesize trehalose? *J Mol Evol* **79**, 111–116.

Armstrong-James, D. (2007). Invasive *Candida* species infection: the importance of adequate empirical antifungal therapy. *J Antimicrob Chemother* **60**, 459–460.

Asamizu, S., Yang, J., Almabruk, K. H. y Mahmud, T. (2011). Pseudoglycosyltransferase catalyzes nonglycosidic C-N coupling in validamycin A biosynthesis. *J Am Chem Soc* **133**, 12124–12135.

Asano, N., Yamaguchi, T., Kameda, Y. y Matsui, K. (1987). Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*. *J Antibiot (Tokyo)* **40**, 526–532.

Asano, N., Takeuchi, M., Kameda, Y., Matsui, K. y Kono, Y. (1990). Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *J Antibiot* **43**, 722–726.

Badiee, P. y Hashemizadeh, Z. (2014). Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis y clinical management. *Indian J Med Res* **139**, 195–204.

Baginski, M., Sternal, K., Czub, J. y Borowski, E. (2005). Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim Pol* **52**, 655–658.

Barraza, A. y Sánchez, F. (2013). Trehalases: a neglected carbon metabolism regulator? *Plant Signal Behav* **8**, e24778.

Belenky, P., Camacho, D. y Collins, J. J. (2013). Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Rep* **3**, 350–358.

Ben-Ami, R., Lewis, R. E. y Kontoyiannis, D. P. (2008). Immunocompromised Hosts: Immunopharmacology of Modern Antifungals. *Clin Infect Dis* **47**, 226–235.

Berlett, B. S. y Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**, 20313–20316.

Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **9**, 595–601.

Berman, J. y Sudbery, P. E. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* **3**, 918–930.

Best, M., Koenig, K., McDonald, K., Schueller, M., Rogers, A. y Ferrieri, R. A. (2011). Inhibition of trehalose breakdown increases new carbon partitioning into cellulosic biomass in *Nicotiana tabacum*. *Carbohydr Res* **346**, 595–601.

Blázquez, M. A., Lagunas, R., Gancedo, C. y Gancedo, J. M. (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett* **329**, 51–54.

Blázquez, M. A., Stucka, R., Feldmann, H. y Gancedo, C. (1994). Trehalose-6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **176**, 3895–902.

Boudreau, B. A., Larson, T. M., Brown, D. W., Busman, M., Roberts, E. S., Kendra, D. F. y McQuade, K. L. (2013). Impact of temperature stress and validamycin A on compatible solutes and fumonisin production in *F. verticillioides*: Role of trehalose-6-phosphate synthase. *Fungal Genet Biol* **57**, 1–10.

Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S. y Medoff, G. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 183–188.

Brown, G. D., Denning, D. W. y Levitz, S. M. (2012). Tackling Human Fungal Infections. *Science* **336**, 647.

Cabib, E. y Leloir, L. F. (1958). The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Biol Chem* **231**, 259–275.

Calderone, R. A. (1993). Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol* **1**, 55–58.

Catalán, M. y Montejo, J. C. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol* **23**, 39–49.

Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. y Martínez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130–180.

Chandrasekar, P. H. y Sobel, J. D. (2006). Micafungin : A New Echinocandin **48201**, 1171–1178.

Chen, S. C., Slavin, M. a y Sorrell, T. C. (2011). Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* **71**, 11–41.

Choi, J.-H., Brummer, E. y Stevens, D. A. (2004). Combined action of micafungin, a new echinocandin, and human phagocytes for antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* **6**, 383–389.

Collado-González, M., Guirao-Abad, J. P., Sánchez-Fresneda, R., Belchí-Navarro, S. y Argüelles, J. C. (2012). Resveratrol lacks antifungal activity against *Candida albicans*. *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 2441–2446.

Conti, H. R. y Gaffen, S. L. (2010). Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* **12**, 518–27.

Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N., Lindemann, M. J., Ho, A. W., Hai, J. H., Yu, J. J. y other authors. (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* **206**, 299–311.

Couper, K. N., Blount, D. G. y Riley, E. M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* **180**, 5771–5777.

Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E. y Zazueta-Sandoval, R. (2014). Differential Response of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to Oxidative and Nitrosative Stresses. *Curr Microbiol* **69**, 733–739.

Dantas, A. da S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B. y Quinn, J. (2015). Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* **5**, 142–165.

Delattin, N., Cammue, B. P. a y Thevissen, K. (2014). Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem* **6**, 77–90.

Denning, D. W. (2003). New drug classes Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**, 1142–1151.

DiDone, L., Oga, D. y Krysan, D. J. (2011). A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. *Yeast* **28**, 561–568.

Eck, R., Bergmann, C., Ziegelbauer, K., Schonfeld, W. y Kunkel, W. (1997). A neutral trehalase gene from *Candida albicans*: molecular cloning, characterization and disruption. *Microbiology* **143**, 3747–3756.

Edwards, E. A., Rawsthorne, S. y Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278–84.

Eggimann, P., Garbino, J. y Pittet, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**, 685–702.

Elbein, A. D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**, 17R–27R.

Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E. y Magalhães, R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr Genet* **61**, 263–274.

Ellepola, A. N. y Samaranayake, L. P. (1998). The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. *J Oral Pathol Med* **27**, 213–219.

Ellis, D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* **49 Suppl 1**, 7–10.

Enjalbert, B., Smith, D. A., Cornell, M. J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A. J. P. y Quinn, J. (2006). Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**, 1018–1032.

Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 469–486.

Fidel, P. L., Cutright, J. L., Tait, L. y Sobel, J. D. (1996). A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**, 425–431.

Filler, S. G. (2013). Can host receptors for fungi be targeted for treatment of fungal infections? *Trends Microbiol* **21**, 389–396.

Florez, J., Armijo, J. y Mediavilla, A. (2008). Fármacos antifúngicos. In *Farmacol Humana*, 5a ed., pp. 1301–1316. Elsevier Masson Barcelona.

Földi, R., Szilágyi, J., Kardos, G., Berényi, R., Kovács, R. y Majoros, L. (2012). Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**, 338–342.

Fonzi, W. A. y Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717–28.

França, M. B., Panek, A. D. y Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**, 621–631.

Frohner, I. E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O. y Kuchler, K. (2009). *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* **71**, 240–252.

Fuhrmann, U., Bause, E. y Ploegh, H. (1985). Inhibitors of oligosaccharide processing. *Biochim Biophys Acta* **825**, 95–110.

Fujii, J., Ito, J.-I., Zhang, X. y Kurahashi, T. (2011). Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. *J Clin Biochem Nutr* **49**, 70–78.

Gancedo, C. y Flores, C. L. (2004). The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* **4**, 351–359.

Garre, E., Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J. V y Matallana, E. (2009). Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**, 52–62.

Gauglitz, G. G., Callenberg, H., Weindl, G. y Korting, H. C. (2012). Host defence against *Candida albicans* and the role of pattern-recognition receptors. *Acta Derm Venereol* **92**, 291–298.

Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D. A., Mowat, A. M. y Randolph, G. J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **10**, 453–460.

Gil-Lamaignere, C., Salvenmoser, S., Hess, R. y Müller, F.-M. C. (2004). Micafungin Enhances Neutrophil Fungicidal Functions against *Candida* Pseudohyphae. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2730–2732.

Gillum, A. M., Tsay, E. Y. y Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**, 179–82.

Goddijn, O. J., Verwoerd, T. C., Voogd, E., Krutwagen, R. W., de Graaf, P. T., van Dun, K., Poels, J., Ponstein, A. S., Damm, B. y Pen, J. (1997). Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* **113**, 181–190.

Gómez-López, A., Zaragoza, O., Rodríguez-Tudela, J. L. y Cuenca-Estrella, M. (2008). Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother* **9**, 2801–2816.

González-Párraga, P., Hernández, J. A. y Argüelles, J. C. (2003). Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* **20**, 1161–1169.

González-Párraga, P., Marín, F. R., Argüelles, J.-C. y Hernández, J. A. (2005). Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1722**, 324–330.

González-Párraga, P., Sánchez-Fresneda, R., Martínez-Esparza, M. y Argüelles, J.-C. (2008). Stress responses in yeasts: what rules apply? *Arch Microbiol* **189**, 293–296.

González-Párraga, P., Sánchez-Fresneda, R., Zaragoza, O. y Argüelles, J.-C. (2011). Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 777–83.

González-Párraga, P., Alonso-Monge, R., Plá, J. y Argüelles, J. C. (2010). Adaptive tolerance to oxidative stress and the induction of antioxidant enzymatic activities in *Candida albicans* are independent of the Hog1 and Cap1-mediated pathways. *FEMS Yeast Res* **10**, 747–756.

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

Gralla, E. B. y Kosman, D. J. (1992). Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet* **30**, 251–319.

Grant, C. M., Maciver, F. H. y Dawes, I. W. (1996). Stationary-phase induction of *GLR1* expression is mediated by the yAP-1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **22**, 739–746.

Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C. y Burke, M. D. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci* **109**, 2234–2239.

Guirao-Abad, J. P., Sánchez-Fresneda, R., Valentín, E., Martínez-Esparza, M. y Argüelles, J.-C. (2013). Analysis of validamycin as a potential antifungal compound against *Candida albicans*. *Int Microbiol* **16**, 217–25.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141**, 312–322.

Hamilton, A. J. y Holdom, M. D. (1999). Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med Mycol* **37**, 375–89.

Hao, B., Cheng, S., Clancy, C. J. y Nguyen, M. H. (2013). Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 326–332.

Hayes, B. M. E., Anderson, M. a., Traven, A., Van Der Weerden, N. L. y Bleackley, M. R. (2014). Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cell Mol Life Sci* **71**, 2651–2666.

Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* **9**, 591–596.

Hernández-Santos, N. y Gaffen, S. L. (2012). Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **11**, 425–35.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. y Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313–1318.

Hohl, T. M., Feldmesser, M., Perlin, D. S. y Pamer, E. G. (2008). Caspofungin Modulates Inflammatory Responses to *Aspergillus fumigatus* through Stage-Specific Effects on Fungal β -Glucan Exposure. *J Infect Dis* **198**, 176–185.

Hohmann, S. y Mager, W. H. (2003). *Yeast Stress Responses*. Topics in Current Genetics. Springer Berlin Heidelberg.

Hope, W. W., Taberner, L., Denning, D. W. y Anderson, M. J. (2004). Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4377–4386.

Hui, Y. y Chang, C.-W. T. (2002). Convenient divergent synthesis of a library of trehalosamine analogues. *Org Lett* **4**, 2245–8.

Huppler, A. R., Whibley, N., Woolford, C. A., Childs, E. E., He, J., Biswas, P. S., McGeachy, M. J., Mitchell, A. P. y Gaffen, S. L. (2015). A *Candida albicans* Strain Expressing Mammalian Interleukin-17A Results in Early Control of Fungal Growth during Disseminated Infection. *Infect Immun* **83**, 3684–92.

Hwang, C.-S., Rhie, G., Oh, J.-H., Huh, W.-K., Yim, H.-S. y Kang, S.-O. (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* **148**, 3705–3713.

Hwang, C.-S., Baek, Y.-U., Yim, H.-S. y Kang, S.-O. (2003). Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* **20**, 929–941.

Hwang, I. S., Lee, J., Hwang, J. H., Kim, K. J. y Lee, D. G. (2012). Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J* **279**, 1327–1338.

Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P.-A., Poulain, D. y Jouault, T. (2003). *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 13086–13093.

Iturriaga, G., Suárez, R. y Nova-Franco, B. (2009). Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. *Int J Mol Sci* **10**, 3793–3810.

Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511–1527.

Jamieson, D. J., Stephen, D. W. y Terrière, E. C. (1996). Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 83–88.

Janeway, C. A. y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197–216.

Jouault, T., Sarazin, A., Martinez-Esparza, M., Fradin, C., Sendid, B. y Poulain, D. (2009). Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* **11**, 1007–1015.

Kaliappan, K. P., Das, P., Chavan, S. T. y Sabharwal, S. G. (2009). A versatile access to calystegine analogues as potential glycosidases inhibitors. *J Org Chem* **74**, 6266–6274.

Kartsonis, N. A., Nielsen, J. y Douglas, C. M. (2003). Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resist Updat* **6**, 197–218.

Katragkou, A., Kruhlak, M. J., Simitopoulou, M., Chatzimoschou, A., Taparkou, A., Cotten, C. J., Paliogianni, F., Diza-Mataftsi, E., Tsantali, C. y other authors. (2010). Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J Infect Dis* **201**, 1941–1949.

Kelly, J., Rowan, R., McCann, M. y Kavanagh, K. (2009). Exposure to caspofungin activates Cap and Hog pathways in *Candida albicans*. *Med Mycol* **47**, 697–706.

Klepser, M. (2011). The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. *J Crit Care* **26**, 225.e1–225.e10.

Klis, F. M., de Groot, P. y Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**, 1–8.

Kohanski, M. a., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. a. y Collins, J. J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* **130**, 797–810.

Kontoyiannis, D. P. y Lewis, R. E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* **359**, 1135–1144.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. y Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485–517.

Kreger, D. R. (1954). Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests. *Biochim Biophys Acta* **13**, 1–9.

Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Amsterdam.

Van Laere, A. (1989). Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol Lett* **63**, 201–209.

Leach, M. D. y Cowen, L. E. (2013). Surviving the heat of the moment: a fungal pathogens perspective. *PLoS Pathog* **9**, e1003163.

Li, H., Su, H., Kim, S. B., Chang, Y. K., Hong, S.-K., Seo, Y.-G. y Kim, C.-J. (2012). Enhanced production of trehalose in *Escherichia coli* by homologous expression of otsBA in the presence of the trehalase inhibitor, validamycin A, at high osmolarity. *J Biosci Bioeng* **113**, 224–232.

Liu, H., Köhler, J. y Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* **266**, 1723–6.

Lockhart, S. R. (2014). Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clin Microbiol Newsl* **36**, 131–136.

Lopez, C. M., Wallich, R., Riesbeck, K., Skerka, C. y Zipfel, P. F. (2014). *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. *PLoS One* **9**, e90796.

Low, C.-Y. y Rotstein, C. (2011). Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep* **3**, 14.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–75.

Mager, W. H. y Ferreira, P. M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem J* **290 (Pt 1)**, 1–13.

Mansour, M. K. y Levitz, S. M. (2002). Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* **5**, 359–365.

Maras, B., Angiolella, L., Mignogna, G., Vavala, E., Macone, A., Colone, M., Pitari, G., Stringaro, A., Dupré, S. y Palamara, A. T. (2014). Glutathione metabolism in *Candida albicans* resistant strains to fluconazole and micafungin. *PLoS One* **9**, e98387.

Marcos-Zambrano, L. J., Escribano, P., González Del Vecchio, M., Bouza, E. y Guinea, J. (2014). Micafungin is more active against *Candida albicans* biofilms with high metabolic activity. *J Antimicrob Chemother* 10–13.

Martchenko, M., Alarco, A.-M., Harcus, D. y Whiteway, M. (2004). Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* **15**, 456–467.

Martínez-Esparza, M., Aguinaga, A., González-Párraga, P., García-Peñarrubia, P., Jouault, T. y Argüelles, J. C. (2007). Role of trehalose in resistance to macrophage killing: study with a *tps1/tps1* trehalose-deficient mutant of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Infect* **13**, 384–394.

Martínez-Esparza, M., Martínez-Vicente, E., González-Párraga, P., Ros, J. M., García-Peñarrubia, P. y Argüelles, J.-C. (2009). Role of trehalose-6P phosphatase (TPS2) in stress tolerance and resistance to macrophage killing in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol* **299**, 453–464.

Mast, N., Zheng, W., Stout, C. D. y Pikuleva, I. a. (2013). Antifungal Azoles: Structural Insights into Undesired Tight Binding to Cholesterol-Metabolizing CYP46A1. *Mol Pharmacol* **84**, 86–94.

Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D. y Cornet, M. (2014). Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med* **40**, 1241–1255.

Mayer, F. L., Wilson, D. y Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119–128.

McCord, J. M. y Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte cytochrome c (hemocyanin). *J Biol Chem* **244**, 6049–55.

McManus, B. a. y Coleman, D. C. (2014). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol* **21**, 166–178.

Mesa-Arango, A. C., Trevijano-Contador, N., Roman, E., Sanchez-Fresneda, R., Casas, C., Herrero, E., Argüelles, J. C., Pla, J., Cuenca-Estrella, M. y Zaragoza, O. (2014). The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to the Fungicidal Effect of This Drug. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 6627–6638.

Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F. y Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet* **43**, 335–367.

Mihu, M. R., Pattabhi, R. y Nosanchuk, J. D. (2014). The impact of antifungals on toll-like receptors. *Front Microbiol* **5**, 99.

Moradas-Ferreira, P. y Costa, V. (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep* **5**, 277–285.

Morano, K. a., Grant, C. M. y Moye-Rowley, W. S. (2012). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1157–1195.

Mosser, D. M. y Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969.

Müller, J., Boller, T. y Wiemken, A. (1995). Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* **197**, 362–368.

Nguyen, K. T., Ta, P., Hoang, B. T., Cheng, S., Hao, B., Nguyen, M. H. y Clancy, C. J. (2010). Characterising the post-antifungal effects of micafungin against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* isolates. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 80–4.

Nishiyama, Y., Uchida, K. y Yamaguchi, H. (2002). Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J Electron Microsc (Tokyo)* **51**, 247–255.

Nishiyama, Y., Hasumi, Y., Ueda, K., Uchida, K. y Yamaguchi, H. (2005). Effects of micafungin on the morphology of *Aspergillus fumigatus*. *J Electron Microsc (Tokyo)* **54**, 67–77.

Nwaka, S. y Holzer, H. (1998). Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **58**, 197–237.

O'Donnell, L. E., Robertson, D. y Ramage, G. (2015). *Oral Candidosis*. Springer Berlin Heidelberg.

Odds, F. C., Brown, A. J. P. y Gow, N. A. R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**, 272–279.

Onishi, R. M. y Gaffen, S. L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* **129**, 311–321.

Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martínez, J. A., López, J., Pitart, C. y Mensa, J. (2011). *Candida* species bloodstream infection: Epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect* **77**, 157–161. Elsevier Ltd.

Palacios, D. S., Anderson, T. M. y Burke, M. D. (2007). A post-PKS oxidation of the amphotericin B skeleton predicted to be critical for channel formation is not required for potent antifungal activity. *J Am Chem Soc* **129**, 13804–13805.

Patterson, T. F. (2005). Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* **366**, 1013–1025.

Pedreño, Y., Maicas, S., Argüelles, J. C., Sentandreu, R. y Valentin, E. (2004). The ATC1 gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **279**, 40852–40860.

Pedreño, Y., González-Párraga, P., Conesa, S., Martínez-Esparza, M., Aguinaga, A., Hernández, J. A. y Argüelles, J. C. (2006). The cellular resistance against oxidative stress (H₂O₂) is independent of neutral trehalase (Ntc1p) activity in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **6**, 57–62.

Pedreño, Y., González-Párraga, P., Martínez-Esparza, M., Sentandreu, R., Valentín, E. y Argüelles, J.-C. (2007). Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiology* **153**, 1372–1381.

Perlin, D. S. (2011). Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol* **6**, 441–457.

Peters, B. M., Yano, J., Noverr, M. C. y Fidel, P. L. (2014). *Candida* Vaginitis: When Opportunism Knocks, the Host Responds. *PLoS Pathog* **10**, e1003965.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H., Alexander, B. D., Andes, D., Brown, S. D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M. A. y other authors. (2008). Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Caspofungin, Anidulafungin, and Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. *J Clin Microbiol* **46**, 2620–2629.

Pfaller, M. a y Diekema, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* **36**, 1–53.

Pfaller, M. A., Andes, D. R., Diekema, D. J., Horn, D. L., Reboli, A. C., Rotstein, C., Franks, B. y Azie, N. E. (2014). Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One* **9**, e101510.

Pfaller, M. A. y Castanheira, M. (2015). Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. *Med Mycol* **54**, 1–22.

Phillips, A. J., Sudbery, I. y Ramsdale, M. (2003). Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14327–14332.

Prieto, D., Román, E., Correia, I. y Pla, J. (2014). The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PLoS One* **9**, e87128.

Richards, A. B., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P. M., Waalkens-Berendsen, D. H., Shigoyuki, A. y Kurimoto, M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* **40**, 871–898.

Richards, T. S., Oliver, B. G. y White, T. C. (2008). Micafungin activity against *Candida albicans* with diverse azole resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* **62**, 349–355.

Robson, G. D., Kuhn, P. J. y Trinci, A. P. J. (1989). Effect of Validamycin A on the Production of Cellulase, Xylanase and Polygalacturonase by *Rhizoctonia solani*. *Microbiology* **135**, 2709–2715.

Román, E., Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R. y Pla, J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol* **15**, 181–190.

Rueda, C., Cuenca-Estrella, M. y Zaragoza, O. (2014). Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 1071–1083.

Ruiz-Camps, I. y Cuenca-Estrella, M. (2009). Antifúngicos para uso sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**, 353–362.

Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentín, E. y Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**, 14–29.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.

San José, C., Monge, R. A., Pérez-Díaz, R., Pla, J. y Nombela, C. (1996). The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**, 5850–2.

San Miguel, P. F. y Argüelles, J. C. (1994). Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1200**, 155–60.

Sánchez-Fresneda, R., González-Párraga, P., Esteban, O., Laforet, L., Valentín, E. y Argüelles, J.-C. (2009). On the biochemical classification of yeast trehalases: *Candida albicans* contains two enzymes with mixed features of neutral and acid trehalase activities. *Biochem Biophys Res Commun* **383**, 98–102.

Sánchez-Fresneda, R., Guirao-Abad, J. P., Argüelles, A., González-Párraga, P., Valentín, E. y Argüelles, J. C. (2013). Specific stress-induced storage of trehalose, glycerol and d-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 1334–1339.

Sangalli-Leite, F., Scorzoni, L., Mesa-Arango, A. C., Casas, C., Herrero, E., Gianinni, M. J. S. M., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M. y Zaragoza, O. (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect* **13**, 457–467.

Sanguinetti, M., Posteraro, B. y Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses* **58**, 2–13.

Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, a. M. y Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* **62**, 10–24.

Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C. y Lopez-Ribot, J. L. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* **2**, 1053–1060.

Seider, K., Heyken, A., Lüttich, A., Miramón, P. y Hube, B. (2010). Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol* **13**, 392–400.

Sharif, O., Bolshakov, V. N., Raines, S., Newham, P. y Perkins, N. D. (2007). Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol* **8**, 1.

Sharma, S. C. (1997). A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 11–15.

Shepherd, M. G. (1985). Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect Immun* **50**, 541–544.

Shepherd, M. G., Poulter, R. T. y Sullivan, P. A. (1985). *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol* **39**, 579–614.

Shirazi, F. y Kontoyiannis, D. (2015). Micafungin triggers caspase-dependent apoptosis in *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms, including caspofungin non-susceptible isolates. *Virulence* **6**, 385–394.

Singer, M. A. y Lindquist, S. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* **16**, 460–468.

Skinner, C. E. y Fletcher, D. W. (1960). A Review of the Genus *Candida*. *Bacteriol Rev* **24**, 397–416.

Slater, J. L., Howard, S. J., Sharp, A., Goodwin, J., Gregson, L. M., Alastruey-Izquierdo, A., Arendrup, M. C., Warn, P. A., Perlin, D. S. y Hope, W. W. (2011). Disseminated candidiasis caused by *Candida albicans* with amino acid substitutions in Fks1 at position Ser645 cannot be successfully treated with micafungin. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3075–3083.

Sokol-Anderson, M. L., Brajtburg, J. y Medoff, G. (1986). Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* **154**, 76–83.

Soll, D. R., Lockhart, S. R. y Zhao, R. (2003). Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**, 390–7.

Soll, D. R. (2008). Candida Biofilms: Is Adhesion Sexy? *Curr Biol* **18**, R717–R720.

Stadtman, E. R. y Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**, 207–218.

Sudbery, P., Gow, N. y Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**, 317–324.

Sullivan, P. A., Yin, C. Y., Molloy, C., Templeton, M. D. y Shepherd, M. G. (1983). An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *Can J Microbiol* **29**, 1514–25.

Tayal, V. y Kalra, B. S. (2008). Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol* **579**, 1–12.

Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Dénarié, J. y Rosenberg, C. (1988). A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *J Bacteriol* **170**, 1153–1161.

Thevelein, J. (1996). Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In *Biochem Mol Biol*, pp. 395–420. Springer Berlin Heidelberg.

Tlamçani, Z. y Er-rami, M. (2013). Fungal opportunist infection : common and emerging fungi in immunocompromised patients. *J Immunol Tech Infect Dis* **2**, 1–5.

Toledano, M. B., Delaunay-Moisan, A., Outten, C. E. y Igarria, A. (2013). Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1699–1711.

Tournu, H., Fiori, A. y Van Dijck, P. (2013). Relevance of trehalose in pathogenicity: some general rules, yet many exceptions. *PLoS Pathog* **9**, e1003447.

Umezawa, H. y Hooper, I. R. (1982). *Aminoglycoside Antibiotics*. Springer Berlin Heidelberg.

Valentin, E., Mormeneo, S. y Sentandreu, R. (2000). *Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts*. Karger Basel.

Vale-Silva, L. A., Buchta, V. y Valentová, E. (2007). Effect of subinhibitory concentration of some established and experimental antifungal compounds on the germ tube formation in *Candida albicans*. *Folia Microbiol* **52**, 39–43.

Vallés, J., Calbo, E., Anoro, E., Fontanals, D., Xercavins, M., Espejo, E., Serrate, G., Freixas, N., Morera, M. A. y other authors. (2008). Bloodstream infections in adults: importance of healthcare-associated infections. *J Infect* **56**, 27–34.

Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P. y Thevelein, J. M. (1995). Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol* **61**, 109–115.

Van Dijck, P., De Rop, L., Szlufcik, K., Van Ael, E. y Thevelein, J. M. (2002). Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. *Infect Immun* **70**, 1772–1782.

Van Laere, A. (1989). Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol Lett* **63**, 201–209.

Vazquez, J. A. y Sobel, J. D. (2002). Mucosal candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* **16**, 793–820.

Verduyn Lunel, F. M., Meis, J. F. G. M. y Voss, A. (1999). Nosocomial fungal infections: Candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**, 213–220.

Vincent, B. M., Lancaster, A. K., Scherz-Shouval, R., Whitesell, L. y Lindquist, S. (2013). Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol* **11**, e1001692.

De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. y Wiemken, A. (1993). Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur J Biochem* **212**, 315–323.

Wheeler, R. T. y Fink, G. R. (2006). A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* **2**, 328–339.

Whiteway, M. y Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **61**, 529–553.

Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**, 209–217.

Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* **10**, 95–105.

Zaragoza, O., Blazquez, M. a y Gancedo, C. (1998). Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. *J Bacteriol* **180**, 3809–3815.

Zaragoza, O., de Virgilio, C., Pontón, J. y Gancedo, C. (2002). Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology* **148**, 1281–1290.

Zhanel, G. G., Saunders, D. G., Hoban, D. J. y Karlowsky, J. A. (2001). Influence of Human Serum on Antifungal Pharmacodynamics with *Candida albicans* Influence of Human Serum on Antifungal Pharmacodynamics with *Candida albicans* **45**, 2018–2022.

Zheng, Y.-G., Jin, L.-Q. y Shen, Y.-C. (2004). Resin-catalyzed degradation of validamycin A for production of validoxylamine A. *Catal Commun* **5**, 519–525.

Zimmermann, H. W., Trautwein, C. y Tacke, F. (2012). Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol* **3**, 56.