

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

 I. Relación entre la Actividad Trehalasa y la Sensibilidad Antifúngica en *Candida parapsilosis*.
II. Análisis Bioinformático del metabolismo de la Trehalosa en el Género *Candida*

> M^a Luz Muñoz Megías 2022





UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética y Microbiología

Departamento de Microbiología y Ecología

Sergi Maicas i Prieto, Profesor Titular de Microbiología de la Universitat de València, Ruth Sánchez- Fresneda Pinto, Profesora Asociada de Microbiología 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: "I. Relación entre la actividad trehalasa y la sensibilidad antifúngica en Candida parapsilosis. II. Análisis bioinformático del metabolismo de la trehalosa en el género Candida", que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Murcia, Dña. Mª Luz Muñoz Megías, para optar al Título de Doctor, contiene fielmente el trabajo experimental y bioinformático realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Genética y Microbiología de 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 esta certificación en Murcia a 2 de febrero de 2022.





UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Genética y Microbiología

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología y Ecología

TESIS DOCTORAL

I. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD TREHALASA Y LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN *Candida parapsilosis*. II. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL METABOLISMO DE LA TREHALOSA EN EL GÉNERO *Candida*

Memoria que presenta

Dña. Mª Luz Muñoz Megías

para optar al Grado de Doctora en Ciencias Biológicas

Murcia, 2 de febrero de 2022

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis Doctoral, *Dr. Juan Carlos Argüelles, Dr. Sergi Maicas i Prieto* y *Dra. Ruth Sánchez-Fresneda* por darme la oportunidad de trabajar en uno de sus proyectos, por su paciencia ante algunos momentos de torpeza y por haberme animado a continuar cada vez que pensaba en abandonar.

Gracias a Inma, Isabel, Javi, Mencía y M^a José porque siempre me han animado a continuar.

Gracias a la *Dra. Matilde* Sánchez Ayuso a quien siempre he admirado por su trabajo, proximidad y cariño.

Gracias a toda mi familia política, a mis hermanos, a mi madre Dolores Megías Pujante, a mi marido José Tomás Bernal-Quirós González, a mis hijos José Tomás y Mencía y en especial a mi padre Juan Antonio Muñoz Fuster.

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

A mis padres y a mis hijos

Para ti, José Tomás

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	3
TAXONOMÍA Y GENERALIDADES DE Candida parapsilosis	3
DISTRIBUCIÓN POR ESPECIES DE AISLADOS CLÍNICOS DE Candida SEGÚN	6
ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS	
FACTORES DE RIESGO	9
FACTORES DE VIRULENCIA	10
ANTIFÚNGICOS DE APLICACIÓN EN TERAPIA CLÍNICA	10
POLIENOS	12
EQUINOCANDINAS	16
AZOLES	18
OTROS ANTIFÚNGICOS	20
POSIBLE DIANA ANTIFÚNGICA: TREHALOSA	20
BIOSÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE TREHALOSA	22
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
MATERIALES	25
MÉTODOS	27
RESULTADOS Y DISCUSION	38
SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS MICAFUNGINA (MF) Y ANFOTERICINA	38
(AmB) SOBRE Candida parapsilosis Y EL MUTANTE ISOGÉNICO atc1∆/ntc1∆ QUE	
CARECE DE LAS DOS TREHALASAS	
ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES DE LAS CEPAS AM2001/0013 (Cp) Y atc 1Δ /ntc 1Δ	45
EN RESPUESTA A LOS ANTIFÚNGICOS MF Y AmB	
SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE Candida parapsilosis Cp y atc1∆/ntc1∆ A LOS	52
ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS: FLUCONAZOL (FLZ) E ITRACONAZOL (ITR)	
ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES DE LAS CEPAS AM2001/0013 (Cp) y atc 1Δ /ntc 1Δ	56
EN RESPUESTA A LOS ANTIFÚNGICOS FLUCONZOL E ITRACONAZOL	
CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 2	73
INTRODUCCIÓN	75
OBJETIVOS	78
MATERIALES Y MÉTODOS	79
RESULTADOS Y DISCUSION	80
HIDRÓLISIS DE TREHALOSA: TREHALASAS	80
BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA	95
TREHALOSA-6-FOSFATO SINTASA (TREHALOSA SINTASA)	98
TREHALOSA-6-FOSFATO FOSFATASA (TREHALOSA FOSFATASA)	103
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	115

RESEÑAS DE ACTIVIDAD CIENTÍFICA

Parte de los resultados contenidos en la presente Memoria, están siendo preparados para ser objeto de publicación científica especializada que corresponde a las siguientes referencias:

-Sánchez-Fresneda et al.

"The lack of a functional trehalase activity in *Candida parapsilosis* increases the susceptibility to itraconazol" (Manuscrito enviado para publicación).

-Muñoz-Megías et al.

"The fungicidal action of Itraconazol in *Candida parapsilosis* depends on the mitocondrial activity" (Manuscrito en preparación.)

El trabajo experimental realizado en el laboratorio se ha beneficiado, en parte, del equipamiento disponible adquirido con cargo a los siguientes proyectos:

BFU2006-08684/BMC. Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

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

Igualmente, deseamos manifestar nuestro agradecimiento al contrato de colaboración tecnológica en vigor con la empresa CESPA, S.A, en el marco de los Trabajos de carácter científico (artículo 68.1 de la LOU).

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Nth1p/Ntc1p	Trehalasa ácida
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
Cél	Célula
DHF	Dihidrofluoresceína
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLZ	Fluconazol
GlcNAc	N-acetilglucosamina
G6PDH	Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa
GR	Glutatión reductasa
GTP	Guanosina trifosfato
МАРК	Proteín-quinasa activada por mitógeno
MCC	Medio de cultivo completo
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
Mr	Peso Molecular
NADH	Nicotiamida-adenina dinucleótido
Nth1p/Ntc1p	Trehalasa neutra
O_2^{-}	Anión superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singlete
OH	Radical hidroxilo
ORF	Pauta abierta de lectura
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
РКА	Proteína quinasa A
РКС	Proteína-quinasa C

PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo
Rod	Rodamina
RT-PCR	Transcripción reversa-PCR
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
STRE	Elementos de respuesta a estrés
TBS	Tampón tris salino
TEMED	Tetrametilendiamina
T6P	Trehalosa-6-fosfato
Tps 1	Trehalosa-6P-sintetasa
Tps 2	Trehalosa-6P-fosfatasa
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
UDPG	Uridina difosfatoglucosa
Xg	Gravedades
YNB	Extracto de levadura base
YPD	Extracto de levadura peptona y glucosa

CAPÍTULOI

RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD TREHALASA Y LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN *Candida parapsilosis*

INTRODUCCIÓN

TAXONOMÍA Y GENERALIDADES DE Candida parapsilosis

El género *Candida* pertenece al reino de los hongos o reino "Fungi". Se clasifica taxonómicamente dentro del phylum Ascomicota, orden Saccharomycetales perteneciendo a la familia Saccharomycetaceae. Comprende células vegetativas con gemación multilateral, carentes de reproducción sexual y capaces de formar pseudohifas o verdadero micelio.



Figura 1.1. Taxonomía de Candida parapsilosis

Dentro del género *Candida* están incluidas unas 200 especies cuya característica principal es la ausencia de cualquier forma reproductiva sexual. Tras errores en la ubicación taxonómica que se solucionaron con la aplicación de técnicas moleculares basadas principalmente en el análisis de fragmentos representativos de ácidos nucleicos, Barns y colaboradores propusieron en 1991 el árbol evolutivo de las especies patógenas del género *Candida* y sus parientes más cercanos.

Estos estudios permitieron concluir que *C. parapsilosis* estaba relacionada con el grupo de *C. albicans*, englobándose actualmente en el Clado de *Candida*. El hongo

patógeno *C. parapsilosis*, se aisló por primera vez en Puerto Rico, a partir de las heces de un paciente con diarrea. En 1928 fue descrita por Ashford como una especie del género *Monilia* que no fermentaba maltosa, siendo denominada *Monilia parapsilosis* para distinguirla de *M. psilosis*, aislada más frecuentemente y que hoy se conoce como *C. albicans* [1]. Se proponen tres especies distintas: *C. parapsilosis, C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* y aunque actualmente la distinción entre ellas no es totalmente precisa, en conjunto son responsables de la mayoría de las enfermedades clínicas registradas [2].

Esta levadura tiene un tamaño que oscila entre 2,5-4 × 2,5-9 μ m y presenta formas ovales, redondas o cilíndricas, siendo sus colonias macroscópicas blancas, cremosas y con aspecto brillante. La morfología externa de las colonias puede ser lisa o rugosa. Se han descrito cuatro morfotipos distintos: forma crepe, concéntrica, lisa y cráter [3] (Figura 1.2). El fenotipo de las colonias está ligado a la morfología de la levadura: el fenotipo crepe y concéntrico corresponde principalmente a pseudohifas, mientras que el fenotipo cráter y liso está formado por células levaduriformes [3, 4].



Figura 1.2. Diferentes morfologías coloniales obtenidas a partir de un aislado clínico de *C. parapsilosis*. A) Morfología en forma de crepe. B) Colonia con forma concéntrica. C) Colonia con forma lisa. D) Colonia con forma de cráter [3].

La morfología levaduriforme denominada blastoconidio o blastosporas está formada por células que se reproducen asexualmente mediante gemación multilateral correspondiendo a la fase unicelular del hongo. Cuando la yema alcanza su tamaño óptimo, se produce la división celular, permaneciendo una huella de quitina en el lugar de gemación. Las pseudohifas están formadas por células que permanecen unidas a la madre después de dividirse, dando como resultado agrupaciones de células alargadas unidas, con apariencia de falso micelio.

Hasta la fecha, no hay un registro de verdaderas hifas formadas por *C. parapsilosis* (estructura miceliar). Estímulos ambientales que inducen estrés, tales como: temperatura

elevada, presencia de suero, estados de ayuno, altos niveles de CO2 y bajos niveles de O_2 en el hospedador, influyen en la transición morfológica [4].



Figura 1.3. Micrografías correspondientes a los distintos tipos morfológicos presentes en *C. parapsilosis*. En la micrografía (1) se muestran células levaduriformes o blastoconidios (flecha negra) y células divididas asexualmente por gemación (flecha roja). En la micrografía (2) se muestran pseudohifas (flecha amarilla). La observación microscópica se realizó por contraste interferencial de Nomarski (100x).

Aunque los inductores exactos del paso de estructuras levaduriformes a pseudohifas no están claros, sí que conocemos que el cambio está relacionado con un grupo específico de aminoácidos, en concreto citrulina, que produce cambios en la morfología de la célula. Durante la transición del crecimiento de levadura a filamento (célula específica de pseudohifa), proteínas superficiales y adhesinas aparecen en la capa externa de la pared celular de la célula individual en fase de alargamiento [5]. C. *parapsilosis* se encuentra presente como organismo comensal en tejidos epiteliales y mucosas de los seres humanos, pero no es patógeno obligado del hombre. Ha sido aislado en fuentes no humanas, tales como animales domésticos, insectos, barro y ambientes marinos [6,7].

5

DISTRIBUCIÓN POR ESPECIES DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida* SEGÚN ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

DISTRIBUCIÓN A NIVEL MUNDIAL

Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie con mayor incidencia clínica dentro de su género, responsable de infecciones tanto superficiales como sistémicas en humanos, otro grupo de levaduras oportunistas dentro de este género y que se denominan especies "no-albicans" (NCA) representan hoy en día una parte muy importante de las candidiasis registradas en todo el mundo. Dentro de este grupo, las más representativas son: *C. parapsilosis, C. orthopsilosis, C. tropicalis, C. guilliermondii, C. krusei y C. glabrata* [8].

La principal fuente de infección por *Candida* sp. suele ser endógena, es decir, previa colonización en la piel o mucosas de dicha levadura, aunque también puede transmitirse a través de material quirúrgico infectado, a través de las manos y manipulación del personal sanitario o desde otros pacientes [9]. Las candidiasis se pueden dividir en tres grupos: cutánea (piel y sus apéndices), mucosa (orofaríngea, esofágica, vulvovaginal) y sistémica (infecciones del torrente sanguíneo, es decir, candidemias y otras formas de candidiasis invasiva). Actualmente representan la cuarta causa de infecciones nosocomiales (10%); la mortalidad debido a candidiasis sistémicas sigue creciendo, desde un 15% a un 35% dependiendo de las especies de *Candida*.

Según datos de programas multinacionales de vigilancia como SENTRY (Antifungal surveillance program; <u>sentry-mvp.jmilabs.com</u>) y ARTEMIS (Global antifungal surveillance program; <u>https//www.ncib.nlm.nih.gov</u>), determinadas especies "no *Candida albicans*" fueron responsables del 10-40% de todas las candidiasis sistémicas de 1970 a 1990, aumentando esta proporción del 35-65% en las dos décadas del siglo XXI. Un reciente análisis que comprende los últimos diez años de la distribución mundial de estas especies, indicó que *C. glabrata* sigue siendo la más común, mientras que *C. parapsilosis, C. tropicalis y C. krusei* son frecuentemente aisladas. Existe una variación geográfica significativa en la frecuencia de las "especies no albicans o NACs". Entre dichas especies NAC comúnmente aisladas, *C. parapsilosis* es a menudo la segunda o tercera prevalente, dependiendo del grupo de pacientes, así como de las regiones geográficas. Se recopilaron datos a partir de estudios multicéntricos-

multihospitalarios nacionales de epidemiología de *Candida* realizados durante la última década en cada continente. Estos informes se realizaron desde 2009 hasta principios de 2018. Si estos estudios no eran factibles, se reunían estudios regionales recogidos sobre datos epidemiológicos de 2000 a 2015. Aunque *C. albicans* se mantiene como la principal causa de candidiasis invasiva en todo el mundo, *C. parapsilosis* es la segunda especie comúnmente más aislada en el sur de Europa, algunas regiones de Asia y América latina.

Tabla 1.1. Conclusiones de elaboración propia a partir de datos obtenidos en un estudio multicéntrico-multihospitalario dónde se muestra la prevalencia clínica de *Candida parapsilosis* a nivel mundial [4].

AREA	PREVALENCIA DE <i>Candida parapsilosis</i>
SUR EUROPA, REGIONES ASIA, AMÉRICA LATINA	Segunda especie más aislada
EUROPA MEDITERRÁNEA: GRECIA, PORTUGAL, ITALIA y ESPAÑA	Representa un 20-25 % de los brotes
SERBIA	Responsable del 46 % de candidiasis en adulto <i>s</i> tras <i>C. albicans</i>
CENTRO EUROPA Y ESCANDINAVIA	Segunda especie más común, seguida de cerca por <i>C. glabrata</i>
AUSTRALIA	Representa el 16,5 % de infecciones en el torrente sanguíneo
ASIA	En China y Japón es la segunda especie de <i>Candida</i> más identificada. En cambio, en la India es la tercera
AMÉRICA DEL NORTE	<i>C. glabrata y C. parapsilosis</i> tienen similar incidencia de candidiasis invasiva
AMÉRICA LATINA	A veces supera a infecciones por <i>C. albicans</i> en Colombia y Venezuela.
SUDÁFRICA	Es la segunda más común. Representa el 35 % en el sector público y el 50% en el sector privado

DISTRIBUCIÓN A NIVEL DE ESPAÑA

Con respecto a España, varios estudios prospectivos multicéntricos que pertenecen al proyecto Fungemyca, fueron realizados en los años 2009-2010 para evaluar la epidemiología de los casos de fungemia detectados en 44 hospitales de todo el país, atribuibles a especies del género *Candida*. Los datos concluyeron que *C. albicans* fue la principal especie aislada (44,71%) siendo, *C. parapsilosis* (29,13%) la especie "no *Candida albicans*" (NCA) más común , a diferencia de otros países dónde es *C. glabrata* (11,5%) (Figura 1.4) [10].



Figura 1.4. Distribución de las especies de *Candida* en España según datos obtenidos de estudios multicéntricos [11].

Desde la década de 1990, se ha detectado un aumento considerable tanto de las candidiasis sistémicas invasivas observadas en ambientes hospitalarios como de las candidemias diseminadas a través del torrente circulatorio, siendo un grave problema de salud debido tanto a sus elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, como a la frecuencia con la que se han registrado en los últimos años, especialmente importante para las especies "NCA".

FACTORES DE RIESGO

Determinadas enfermedades invasivas, como las infecciones producidas en el caso de *C. albicans*, están precedidas por una etapa de colonización sobre los tejidos del hospedador. Por ello, se ha propuesto una transmisión vertical de la misma, que generalmente se realiza de madre a hijo en el momento del nacimiento [1]. Por el contrario, en el caso de *C. parapsilosis*, la enfermedad invasiva puede ocurrir sin que haya un primer paso colonizador. La transmisión tiene lugar por vía horizontal, a través de poblaciones coetáneas mediante contaminación de fuentes externas, como aparatos médicos, contagio por fluidos, manos y manipulación del personal sanitario y de los trabajadores, dispositivos clínicos como catéteres, prótesis y otros [1].

La prevalencia de *C. parapsilosis* está aumentando a un ritmo alarmante en el entorno hospitalario. La población con riesgo de infección por esta levadura incluye individuos inmunodeprimidos, caso de pacientes con cáncer, SIDA, los sometidos a alguna cirugía abdominal y, sobre todo, neonatos prematuros de bajo peso al nacer. La candidiasis neonatal causada por *C. parapsilosis* se ha difundido ampliamente en todo el mundo [4].

Los primeros informes asociaron la aparición de *C. parapsilosis* a pacientes con endocarditis dependientes de estupefacientes intravenosos. Más recientemente, esta especie ha surgido como un importante patógeno nosocomial, con manifestaciones clínicas como fungemia, endocarditis, endoftalmitis, artritis y peritonitis. Todas estas patologías suelen producirse en asociación con procedimientos o dispositivos protésicos [12]. Los brotes infecciosos por *C. parapsilosis* también han sido causados por la contaminación de soluciones de hiperalimentación, habitualmente empleadas en hospitales como alimentación parenteral, dispositivos de control de presión intravascular y solución de irrigación oftálmica. Estudios experimentales han demostrado que *C. parapsilosis* es menos virulenta que *C. albicans* o *C. tropicalis*. Sin embargo su creciente aparición en entornos nosocomiales se debe a que su presencia también se extiende a la colonización frecuente de la piel, particularmente el espacio sublingual, así como a la capacidad de proliferar en soluciones que contienen glucosa, con aumento resultante de la adherencia a los materiales sintéticos [12].

FACTORES DE VIRULENCIA

Aunque la información disponible sobre los factores de virulencia desarrollados por *C. parapsilosis* no son todavía suficientes, a continuación se describen brevemente los analizados como más importantes [1].

 Adhesión: es el primer paso para la colonización de los microorganismos a la superficie de las células hospedadoras. Los receptores moleculares fúngicos implicados en este proceso se denominan adhesinas y se expresan en la superficie del hongo.

Cuando *C. parapsilosis* se adhiere, produce una biopelícula que sirve para conformar una estructura compleja donde están sumidas levaduras y pseudohifas formando una bicapa [4].

Estas biopelículas se desarrollan tanto en superficies naturales del hospedador como en dispositivos médicos tipo implantes, catéteres, válvulas cardiacas, lentes, etc., convirtiéndose en un gran foco de diseminación [1,13].

Secreción de enzimas: las enzimas secretadas extracelularmente por los patógenos fúngicos constituyen posibles dianas de acción para ciertos inhibidores sintéticos de gran interés clínico. Dentro de estas enzimas podemos destacar: proteasas que favorecen la adhesión e invasión del hongo y debilitan el sistema inmunitario del hospedador; <u>lipasas</u> que catalizan la hidrólisis de triglicéridos y <u>fosfolipasas</u> que hidrolizan uniones éster de los fosfoglicéridos provocando inestabilidad de la membrana plasmática. Aunque en *C. parapsilosis* todavía no está muy claro su papel en cuanto a la virulencia se refiere.

ANTIFÚNGICOS DE APLICACIÓN EN TERAPIA CLÍNICA

Las candidemias y candidiasis invasivas son una importante causa de infección nosocomial, cuya incidencia no para de crecer, debido al aumento de pacientes inmunodeprimidos [14]. El aumento de cepas fúngicas altamente resistentes junto con la disponibilidad más limitada de terapias antifúngicas seguras y eficaces, si comparamos con sus equivalentes anti-bacterianas, así como sus importantes efectos secundarios en los pacientes, complica la aplicación con plenas garantías de estos tratamientos antifúngicos. Una razón fundamental se debe a que hongos y levaduras son organismos eucariotas y por tanto comparten rutas metabólicas y moléculas importantes con células de mamíferos. Esta homología retrasa el desarrollo de nuevos fármacos que nos permitan combatir estas enfermedades. En la búsqueda del antifúngico perfecto es fundamental aplicar el principio de Toxicidad Selectiva, es decir, disponer del compuesto que afecta negativamente de forma selectiva al desarrollo del hongo, causando efectos dañinos mínimos en el paciente [15]. El efecto tóxico sobre las células puede ser de dos tipos:

- Acción fungistática: el compuesto impide el crecimiento celular y la expansión del patógeno por el cuerpo, y así el sistema inmunitario se encarga de erradicar la infección.
- Acción fungicida: es el propio medicamento el que mata directamente al microorganismo patógeno, produciendo la lisis de las células y deteniendo la colonización del hospedador.

Ambos efectos no son excluyentes y se pueden dar con el mismo producto, dependiendo de la concentración utilizada o la vía de aplicación del mismo. Así, algunos fármacos serán fungistáticos a bajas concentraciones y fungicidas a altas dosis [16,17]. Actualmente, algunos de los antifúngicos que más se utilizan en clínica tienen como diana el contenido de ergosterol, el principal esterol presente en la membrana de los hongos (polienos), otros como las equinocandinas, actúan sobre la biosíntesis del β -1,3-glucano, componente principal de la pared fúngica. Mientras, los azoles se unen a enzimas que intervienen en la ruta de síntesis del ergosterol (Figura 1.5].



Figura 1.5. Dianas celulares de los principales antifúngicos eficaces contra las especies del género *Candida*, incluyendo *C. parapsilosis*. 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 ciertas enzimas implicadas en la síntesis del ergosterol. 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.* [17].

En los siguientes epígrafes, se presenta una breve descripción de los principales grupos de antifúngicos utilizados en clínica:

POLIENOS

Son moléculas naturales sintetizadas a partir de diferentes especies del género *Streptomyces.* La molécula contiene un anillo macrólido de 40 átomos de carbono cerrado por una lactona. Este anillo está organizado en dos regiones, una contiene numerosos dobles enlaces, mientras la otra mantiene un grupo hidroxilo unido a cada carbono. Esta estructura le otorga carácter de molécula anfipática, presentando una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. Posee también un aminoazúcar, la micosamina, unida en el carbono 19 y con un grupo carboxilo enlazado al carbono 16 [16].


Figura 1.6. Estructura general de los antifúngicos poliénicos. Destaca el anillo macrólido esencial que constituye la mayor parte de la estructura, la lactona que cierra el anillo, así como el aminoazúcar, micosamina, unida al carbono 19 y el extremo carboxilo unido al carbono 16.

El mecanismo de acción de los polienos reside en su unión específica al ergosterol, esterol esencial de la membrana plasmática en hongos, análogo al colesterol en células animales. Esta unión provoca alteraciones en la permeabilidad de la membrana, con formación de poros que lleva a inducir apoptosis en las células fúngicas, provocada por un estrés oxidativo, debido a la pérdida de agua y electrolitos esenciales [18,19]. Dentro de este grupo, los antifúngicos más importantes son los siguientes:

Anfotericina B

La Anfotericina B presenta una importante toxicidad en humanos: fiebre, daños renales y hepáticos, ya que su región hidrofóbica tiene gran afinidad por el colesterol presente en las membranas de mamíferos. Esto provoca una baja toxicidad selectiva con efectos secundarios en el hígado y en el riñón. Sin embargo, y a pesar de su temprana introducción en clínica, a comienzos de 1950, apenas se han descrito casos de resistencia frente a Anfotericina B [20]. Gracias a las nuevas formulaciones liposomales, sigue siendo el antifúngico más utilizado debido a la disminución de sus efectos secundarios y a la gran efectividad contra las micosis sistémicas [16,21].

Al ser administrada y después de anclarse a la membrana plasmática, los dominios hidrofílicos de las moléculas de Anfotericina B quedan rodeados por un entorno hidrofóbico, tendiendo a agruparse formando orificios o poros hidrofílicos en la membrana celular.



Figura 1.7. Estructura de la anfotericina B, donde se resalta la región hidrófila y la región hidrofóbica del anillo macrólido.

La generación de estos poros altera la permeabilidad de la membrana, favoreciendo la entrada de protones y la salida de iones, así como de macromoléculas de vital importancia para la célula como son azúcares o proteínas. Esta descompensación iónica provoca que la célula se enfrente a un elevado estrés osmótico interno que finalmente puede desencadenar la lisis celular [16,19,22,23].

Se ha indicado previamente que la afinidad parcial de la Anfotericina B para unirse al colesterol, esterol mayoritario de la membrana en células animales y humanas, es un grave factor limitante a la hora de su administración, ya que puede generar ciertos efectos secundarios de diversa seriedad sobre órganos esenciales [16,19,22]. En consecuencia, se han realizado intensas investigaciones para obtener nuevos derivados, o bien diversas formas conjugadas de Anfotericina B que, sin limitar su capacidad antifúngica, consigan amortiguar o suprimir los efectos secundarios causados a los pacientes [16,22].

Entre estas formulaciones podemos encontrar:

- Anfotericina B desoxicolato. Por ser insoluble en agua (debido a su parte hidrofóbica), resulta imposible una perfusión intravenosa de Anfotericina B, ya que el 90% del plasma es agua. Para poder emplear esta vía de administración se utiliza una nueva formulación, donde el fármaco está liofilizado y mezclado con desoxicolato. Al

hidratarse, forma una suspensión coloidal que facilita la administración intravenosa. Sin embargo, el inconveniente del método es la persistencia de los efectos adversos que ocasiona el principio activo en el paciente [16,18,22].

- Anfotericina B complejo lipídico. En este caso, se realiza una disolución de Anfotericina B con L- α -dimiristofosfatidilcolina y L- α -dimiristofosfatidilglicerol, dos lípidos de cadena larga que forman un complejo con el antifúngico, facilitando su infusión intravenosa. Esta fórmula reduce parcialmente la actividad fungicida de la Anfotericina B con respecto al complejo con desoxicolato, ya que la concentración sérica es menor. Sin embargo, la nefrotoxicidad disminuye considerablemente, permitiendo la aplicación de mayores dosis y un mejor control de los efectos secundarios [16,18,22].

Anfotericina B liposómica. En esta formulación, la Anfotericina B se intercala entre vesículas liposomales. Un liposoma consiste en una doble membrana lipídica formada por fosfolípidos de cadena larga junto al colesterol, que confiere estabilización a la doble membrana. Como los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, los liposomas presentan regiones lipófilas e hidrófilas, lo que facilita el transporte de moléculas con un fuerte carácter hidrófobo por la sangre. La región hidrófoba de la Anfotericina B se intercala en la doble membrana lipídica uniéndose al colesterol, siendo transportada por la sangre unida al liposoma. Cuando se encuentra con una célula fúngica, la Anfotericina B se disocia del colesterol liposomal y se une al ergosterol presente en la membrana, debido a que posee una mayor afinidad por este esterol que por el colesterol [16,18,22,23]. Entre todas, ésta ha sido la estrategia de más éxito, reduciendo al mínimo la nefrotoxicidad ligada a la administración de Anfotericina B. Además, permite mantener estable su actividad antifúngica, por lo que puede aumentarse la dosis administrada y realizar tratamientos más prolongados, consiguiendo un mayor control de la infección y una reducción notable los efectos secundarios [16,18,22,23]. Su estructura es muy parecida a la Anfotericina B. La diferencia básica entre ambos reside en el número de dobles enlaces en la región hidrófoba así como la disposición de los grupos hidroxilos en la región hidrófila [16]. Aunque su modo de acción es idéntico al de Anfotericina B, la nistatina no puede atravesar la piel y las mucosas, por lo que sólo se puede utilizar a nivel tópico, limitando su rango de acción a micosis superficiales.



Figura 1.8. Estructura química de la nistatina. Este antifúngico también pertenece a la familia de los polienos.

EQUINOCANDINAS

Es el grupo de antifúngicos más reciente en cuanto a implantación clínica se refiere. Su estructura molecular es muy compleja, presentando un núcleo peptídico cíclico y una cadena lateral formada por una cola hidrofóbica cuya longitud y composición varía dependiendo de la equinocandina específica. Son de naturaleza semisintética, obtenidos a partir de diferentes microorganismos y modificados de forma posterior en el laboratorio, por introducción de diversos radicales [24].

El modo de acción de las equinocandinas se basa en la inhibición de la síntesis de la pared fúngica. En concreto, inhiben la actividad enzimática (1,3)- β -D-glucano sintasa de manera no competitiva (la unión del fármaco no modifica la afinidad que presenta la enzima por el sustrato, debido a que el lugar de unión no coincide con el centro catalítico de la enzima). Esta enzima está implicada en la síntesis de los polímeros de β -(1,3)-D-glucano. Dichos polímeros mantienen la rigidez e integridad osmótica de la pared celular fúngica [24, 25]. La inhibición de la síntesis de β -(1,3)-D-glucano provoca la pérdida de dicha integridad y la célula se enfrenta a un fuerte estrés osmótico, llegando incluso a provocar lisis celular [26, 27].

El hecho de actuar sobre la (1,3)- β -D-glucano sintasa como enzima diana, implica que las equinocandinas puedan ser menos tóxicas respecto a otros antifúngicos. Esto es debido a que las células humanas carecen de pared externa y, por tanto, esta enzima no está presente en nuestros tejidos [25]. A bajas concentraciones actúan como fungistáticos, ya que las levaduras no pueden reorganizar la pared en su presencia, pero a altas concentraciones desarrollan actividad fungicida y pueden inestabilizar la estructura de la pared hasta causar lisis celular [19,24]. Las equinocandinas más importantes son:

 Caspofungina: fue la primera comercializada. Se administra por vía intravenosa y provoca trastornos hepáticos y renales mucho más elevados que el resto de las equinocandinas.



Figura 1.9. Estructura molecular de la caspofungina [24].

 Micafungina: derivado semisintético, cuya vía principal de administración es por inyección intravenosa. Presenta una nefrotoxicidad menor respecto a los tratamientos con Caspofungina. Es la que se ha utilizado en esta Memoria.



Figura 1.10. Estructura molecular de la Micafungina [24].

• Anidulafungina: es un derivado semisintético del núcleo de la equinocandina B, con una cola hidrofóbica formando una cabeza terfenilo, que contiene tres anillos bencénicos unidos en posición para y cinco átomos de carbono (Figura 1.11). Su mecanismo de acción es similar al resto de equinocandinas, con la diferencia de que la Anidulafungina es insoluble en agua, por lo que su utilización requiere la resuspensión previa con etanol y agua para facilitar su administración por vía intravenosa. Parece presentar una menor toxicidad a nivel hepático que la Caspofungina, por lo que junto con la Micafungina, están en proceso de investigación para mejorar su implantación terapéutica [24].



Figura 1.11. Estructura molecular de la Anidulafungina [24].

AZOLES

Se trata de un grupo de antifúngicos sintéticos con actividad antifúngica y con un amplio espectro de actividad. Junto con la Anfotericina B son actualmente los más usados como tratamiento contra micosis sistémicas diseminadas. Su estructura molecular está basada en anillos aromáticos derivados del imidazol, con átomos de nitrógeno formando parte de ellos. En función del número de átomos de nitrógeno, se clasifican en dos grupos:

• Azoles de primera generación: presentan dos nitrógenos en su estructura (Miconazol, Clotrimazol y Ketoconazol).

 Ketoconazol: ha sido históricamente el más utilizado, ya que presenta un amplio espectro de acción. Sin embargo, tiene efectos sobre las hormanas gonadales (testosterona) y la síntesis de andrógenos. Actualmente está siendo sustituido por Itraconazol o Fluconazol. Incorpora dos átomos de cloro en la molecular.

• Azoles de segunda generación: Incorporan tres nitrógenos en su estructura (Fluconazol, Itraconazol, Posaconazol, Ravuconazol).

Itraconazol: De estructura compleja (Figura 1.12), Tiene un amplio espectro de acción antifúngica y es muy usado. Se administra por vía oral, presenta menor afinidad por el citocromo P450 de las células de mamíferos, reduciendo sus efectos adversos. Es un claro sustituto del Ketoconazol. Se desaconseja en casos de insuficiencia cardíaca.



Figura 1.12. Estructura molecular del Itraconazol.

Fluconazol: por su rápida asimilación y baja toxicidad, es actualmente el más utilizado para tratar micosis en pacientes inmunodeprimidos (Figura 1.13).



Figura 1.13. Estructura molecular de Fluconazol.

De uso muy frecuente empieza a ocasionar la aparición de resistencias. Sus efectos adversos son escasos, pero se han descrito aumento de las transamisasas y aparición de

exantemas cutáneos. Otras moléculas azólicas en fase de investigación y aplicación clínica: Voriconazol (derivado del Fluconazol), Ravuconazol, y Posaconazol (derivado del Itraconazol). Todos los miembros de esta familia comparten un mecanismo de acción idéntico. Consiste en la inhibición de la enzima Lanosterol 14 α -desmetilasa que cataliza la conversión específica de lanosterol en ergosterol y utiliza como cofactor el citocromo P450, viéndose afectada la síntesis de ergosterol.

Esta sustancia es predominante en la membrana celular de los hongos. Como consecuencia, las células sufren una pérdida de fluidez y permeabilidad de la membrana, que se vuelve osmóticamente inestable, frenando el crecimiento celular. Así mismo, la acumulación de lanosterol, intermediario que genera elevada toxicidad, puede desencadenar la muerte celular [19].

OTROS ANTIFÚNGICOS

Podemos destacar varios compuestos con potencial uso clínico, aunque no siempre se conocen con claridad sus mecanismos de acción. Estos compuestos han pasado sus correspondientes tests de toxicidad previos y obligados, siendo eficaces para tratar infecciones micóticas. Los compuestos más importantes son, entre otros: Fluorocitosina, Griseofulvina, Terbinafinas, Ciclopirox y Sordarinas.

POSIBLE DIANA ANTIFÚNGICA: TREHALOSA

Debido a la creciente prevalencia de infecciones micóticas, a las resistencias desarrolladas por los antifúngicos y a los graves efectos secundarios que producen algunos de ellos, es necesaria la búsqueda de nuevos antifúngicos que sean más seguros y potentes. Las nuevas investigaciones están dirigidas hacia moléculas que estén presentes exclusivamente en las células fúngicas. Esta aproximación resulta difícil porque son células eucariotas al igual que las células de mamíferos y, por lo tanto, comparten gran parte de rutas metabólicas y moléculas esenciales.

Nuestro grupo ha propuesto que una de estas potenciales dianas antifúngicas podría ser la molécula de trehalosa, un disacárido con múltiples funciones dentro de los hongos y que está ausente en las células de mamíferos. Las vías metabólicas de biosíntesis e hidrólisis de trehalosa han sido previamente analizadas [28–31]. Es importante reseñar que la biosíntesis de trehalosa no es operativa en mamíferos [29], posibilitando que se

cumpla el principio reseñado de toxicidad selectiva en la búsqueda de nuevos fármacos. En esta Memoria hemos planteado investigar la ruta que implica la hidrólisis de trehalosa en *C. parapsilosis*, mediante el análisis de mutantes carentes específicamente de las dos enzimas involucradas en la hidrólisis del compuesto.

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por enlace glucosídico tipo α : 1-1 (Figura 1.14), descrita por Wiggers por primera vez en 1832, como un azúcar desconocido presente en el cornezuelo del centeno. Posteriormente a este azúcar se le denominó trehalosa por el químico Berthelot. Está presente en bacterias, arqueas, hongos, invertebrados y plantas. Además, es el principal azúcar en la hemolinfa de insectos en estado criptobionte [32, 33].



Figura 1.14. Estructura molecular del disacárido no reductor trehalosa.

Uno de sus papeles fisiológicos más relevantes es la protección celular frente a diversos tipos de estrés nutritivo y ambiental, como choques térmicos y osmóticos, exposición oxidante y otras condiciones desfavorables, como la brusca interrupción de nutrientes esenciales. En células reproductoras o de resistencia incrementa la estabilidad celular para combatir altas temperaturas o estados de congelación o desecación. En levaduras y hongos filamentosos también es utilizada como fuente de carbono y de energía [32–35].

La importancia de la trehalosa como protector de la integridad celular ante distintos tipos de estrés, llevó a plantear la hipótesis de considerar los elementos implicados en el metabolismo del disacárido como potenciales dianas antifúngicas. Las evidencias bioquímicas y genéticas obtenidas con mutantes deficientes en la biosíntesis de trehalosa en *Candida albicans* daban solidez a esta idea. Es preciso considerar que, en

cierto modo, los antibióticos actúan como agentes externos inductores de estrés, que provocan toxicidad celular [32, 36–38].

BIOSÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE TREHALOSA

La biosíntesis de la trehalosa tiene lugar en el citosol en dos etapas consecutivas: en una primera etapa (Figura 1.15) se produce la transferencia de D-glucosa desde uridina difosfoglucosa (UDP-glucosa) a glucosa-6-fosfato para producir trehalosa-6-fosfato. En la segunda etapa (Figura 1.16) se produce la desfosforilación de trehalosa-6-fosfato dando lugar a trehalosa libre, que presenta actividad biológica.

Las enzimas que participan en la movilización de trehalosa se clasifican en dos grupos, atendiendo a parámetros catalíticos, localización subcelular y mecanismos de regulación. Son las denominadas trehalasas ácidas y trehalasas neutras. La trehalasa neutra (Ntc1p o citosólica) juega un papel primordial en la degradación de la trehalosa endógena, acumulada en el citosol. Este proceso ocurre cuando células en reposo reanudan el crecimiento exponencial o después de la recuperación de un estrés ambiental, como puede ser un choque térmico u osmótico.



Figura 1.15. Primera etapa de la biosíntesis de trehalosa (trehalosa sintasa).



Figura 1.16. Segunda etapa de la biosíntesis de trehalosa (trehalosa fosforilasa).

La hidrólisis de la trehalosa (Figura 1.17) es catalizada por α -glucosidasas específicas denominadas trehalasas, que generan dos moléculas de glucosa por molécula de trehalosa [32,39].



Figura 1.17. Hidrólisis de trehalosa (trehalasa).

Tiene un óptimo de actividad a pH neutro y está controlada por fosforilación reversible mediada por proteínas quinasas dependientes de AMPc [40]. La trehalasa ácida (Atc1p o externa), se encuentra localizada en la pared celular y se encarga de hidrolizar la trehalosa exógena. Su actividad máxima ocurre a pH ácido y está sujeta a represión catabólica por glucosa [40]. En *Saccharomyces cerevisiae*, pero no en otras levaduras, la actividad ácida aumenta en fase estacionaria, cuando se está acumulando trehalosa endógena. Sin embargo, la actividad neutra aumenta en cultivos exponenciales y disminuye en fase estacionaria [32,40,41].

La trehalosa posee una serie de propiedades exclusivas muy útiles en investigación. Son moléculas con alto grado de hidrofilicidad y estabilidad química, que forman cristales no higroscópicos y que carecen de puentes de hidrógeno internos. Presentan un elevado grado de estabilidad en medio ácido y un punto de ebullición muy alto [32,42]. Estas características son responsables de que este disacárido sea uno de los principales mecanismos de defensa frente a diferentes formas de estrés [29,32].

Por otra parte, estas propiedades fisicoquímicas otorgan a la trehalosa una gran aplicación biotecnológica utilizándose como aditivo alimentario para conservar las características organolépticas de frutas y vegetales manteniendo las propiedades y la estabilidad de complejos macromoleculares. En cosmética es utilizada para eliminar malos olores emitidos por la piel humana; 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 [29,39,43].

OBJETIVOS

Debido al aumento de casos de micosis hospitalarias en los últimos años y a los problemas causados por los antifúngicos utilizados hasta ahora, tales como: los efectos secundarios en los pacientes obligado a la baja toxicidad selectiva, la interacción con otros fármacos, el gasto económico y la resistencia a antibióticos, entre otros, se buscan alternativas seguras y con alta eficacia para combatir este problema prioritario por parte de los sistemas sanitarios.

Teniendo en cuenta la experiencia previa de este grupo de investigación, el objetivo principal de esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido proseguir el análisis del metabolismo de la trehalosa como potencial diana antifúngica con aplicación clínica. La aproximación experimental consistió en utilizar la levadura patógena emergente *Candida parapsilosis*, midiendo su sensibilidad frente a antifúngicos de aplicación clínica, en paralelo con la del mutante homocigótico nulo (*atc1* Δ /*ntc1* Δ) KO (Nou^s), construido mediante manipulación genética. Dicho mutante carece de las dos actividades trehalasa funcionales.

Se han establecido varias etapas para verificar este objetivo general, que se pueden desglosar en los siguientes apartados:

- Estudiar la susceptibilidad de la cepa parental y del mutante *atc1*Δ/*ntc1*Δ frente a concentraciones definidas de estos compuestos: Anfotericina B (0,25 y 1,0 µg/ml), Micafungina (0,50 y 1,0 µg/ml), Fluconazol (1,0 µg/ml) e Itraconazol (0,3 µg/ml).
- Comprobar si la generación de un estrés oxidativo intracelular participa en el mecanismo defensivo de *C. parapsilosis* frente a los antifúngicos probados.
- Analizar la acumulación de trehalosa como indicador de respuesta antifúngica protectora en *C. parapsilosis.*

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Cepas de Candida parapsilosis y condiciones de mantenimiento

Se utilizaron las cepas de *C. parapsilosis* caracterizadas genotípicamente y conservadas en glicerol a -80° C al 50% (v/v) (Tabla 3.1). A partir de dichas cepas se realizaron subcultivos en YPD a 28°C que luego fueron mantenidos a 4°C hasta su uso en el laboratorio.

Cepa	Genotipo	Referencia
A M2001/0013	ATC/ATC1, NTC1/NTC1	[23]
atc1∆/ntc1∆ KO (Nou ^s)	Δatc1:: FRT/Δatc1::FRT Δntc1::FRT/Δntc1::FRT	[31]

Tabla 3.1. Cepas de *Candida parapsilosis* empleadas en este trabajo.

La cepa AM2001/0013 es un aislado clínico procedente de la cavidad oral y se toma como cepa silvestre de *Candida parapsilosis* [23]. *atc1* Δ es un mutante homocigótico de C. *parapsilosis* que tiene interrumpida la ruta de la hidrólisis de trehalosa exógena por la ausencia del gen *ATC1*, que codifica la trehalasa ácida [30,31]. *ntc1* Δ es un mutante de *C. parapsilosis* que carece los dos alelos que codifican la enzima trehalasa neutra [30,31].

El mutante homocigótico nulo para las dos enzimas que participan en la hidrólisis de la trehalosa a glucosa, podría ser utilizado para confirmar si la movilización o no de la trehalosa, y por tanto su nivel de acumulación en la célula y posterior movilización fisiológica en respuesta a distintos tratamientos, le confiere a *C. parapsilosis* resistencia específica ante la aplicación de los distintos antifúngicos utilizados en esta Memoria, que son representativos de las principales familias con aplicación terapéutica.

Medios de cultivo

El medio general utilizado para el crecimiento de *C. parapsilosis* Cp y su mutante fue el siguiente:

Medio YPD: medio complejo que contiene los ingredientes necesarios para el crecimiento rutinario de las levaduras [44]. Su composición en porcentaje (g/100 ml) es la siguiente:

- 2% glucosa
- 2% peptona
- 1% extracto de levadura
- 2% agar (sólo en caso de medio sólido)

Los antifúngicos que se utilizaron en estos ensayos fueron:

- Anfotericina B (AmB), obtenida de AppliChem GMBH.
- Micafungina, en formato farmacológico de Micamina® (Astellas Pharma Europe B.V.)
- Fluconazol (Sigma)
- Itraconazol (Sigma)

La alícuota madre de ambos antifúngicos se preparó a una concentración de 10 mg/ml en Dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenó a -80° C en viales de vidrio hasta su uso. Los antifúngicos fueron suministrados durante los análisis experimentales en concentraciones distintas:

- Anfotericina B: $0,25 \ \mu g/ml \ o \ 1,0 \ \mu g/ml$
- Micafungina: 0,5 μ g/ml o 1,0 μ g/ml
- Fluconazol: 1,0 μg/ml
- Itraconazol: 0,3 μg/ml

Las diluciones de los cuatro antifúngicos se realizaron en DMSO, como este disolvente resulta tóxico para las células eucariotas, se dispuso de un control adicional con DMSO al 1%.

La preparación de todos los medios se llevó a cabo en una campana de extracción CAPTAIR dotada de luz, ventilación y gas para asegurar las condiciones de esterilidad.

Los cultivos en medios líquidos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer que fueron rellenados hasta un tercio de su volumen para facilitar la aireación de éstos. Los inóculos de *C. parapsilosis* se crecieron a 28°C con agitación durante toda la noche y se refrescaron a 37°C en nuevo YPD líquido, partiendo de una D.O._{600nm} \approx 0,3 hasta alcanzar una D.O._{600nm} \approx 0,8 que equivale a una densidad celular de 10⁷ células/ml y así iniciar los ensayos con las mismas condiciones para la cepa parental y el mutante.

Para el crecimiento de los cultivos se utilizaron los incubadores Certomat MO II y Medilow-P (Selecta), con una agitación orbital de 90 rpm, para el caso de los medios en estado líquido. Para los medios sólidos se utilizaron las estufas de incubación térmica Heraeus incubator y Thermo Scientific.

MÉTODOS

Medida del crecimiento microbiano

La determinación del crecimiento de la levadura en medio líquido se realizó mediante las técnicas de turbidimetría y peso húmedo.

Turbidimetría

Para esta prueba se tomaron medidas de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda (λ) de 600nm en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1280. Se hicieron varias diluciones para garantizar que la medida de la densidad óptica estuviese en el intervalo de linealidad entre el valor medido y el número de células real del cultivo.

Peso húmedo

Para determinar el peso húmedo, se utilizaron tubos Eppendorf de 1,5 ml que previamente se pesaron vacíos (p0). Se tomaron muestras de 1 ml del cultivo en YPD que se centrifugaron a 13.000 rpm, a 4°C durante 7 minutos y posteriormente se retiró el sobrenadante con sumo cuidado, eliminando todos los restos con papel secante. Una vez extraída el agua, se pesaron de nuevo los tubos, obteniendo el peso del precipitado (pP).

La determinación de la masa celular de la levadura crecida se efectuó mediante la diferencia de las medidas obtenidas, es decir, el peso del precipitado menos la del peso vacío (pP-p0). Esta prueba se realizó por duplicado para cada uno de los casos.

Viabilidad y sensibilidad en el tratamiento con agentes estresantes

Se diseñaron varios ensayos con agentes estresantes a diferentes concentraciones según el objetivo de este trabajo. Se siguió el siguiente protocolo:

Se preparó un preinóculo de las cepas estudiadas en medio YPD líquido y se incubó toda la noche a 28°C en agitación continua. A la mañana siguiente el cultivo fue refrescado con YPD líquido fresco partiendo de una D.O._{600nm} de 0,3 y se dejó crecer en agitación continua a 37°C hasta que alcanzó la fase exponencial o una D.O._{600nm} aproximada de 0,8-1,0 correspondiente a una densidad celular de 10⁷ células/ml. A continuación, se tomaron alícuotas iguales sobre las que se aplicó el tratamiento con el agente estresante correspondiente, excepto en la alícuota control, a la que no se puso ningún tratamiento.

Ensayo de viabilidad

A partir de un cultivo de cada cepa crecida en YPD hasta fase exponencial se recogió 1 ml en condiciones estériles y se realizaron diluciones seriadas 1/10 con agua destilada estéril, en el rango de 10⁻¹ hasta 10⁻⁷.

Se dispensaron 100μ l de cada dilución extendida sobre placas de YPD sólido formado un césped que cubría toda la placa mediante agitación suave con perlas de vidrio de 3 mm de diámetro. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas y posteriormente se realizó un recuento directo en cámara para determinar las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), siendo el intervalo de recuento aproximadamente de 30-300 colonias por placa.

Debido a que en cada ensayo las placas se dispusieron por triplicado, se obtuvieron valores promedio y el porcentaje promedio de viables se ha referido a la muestra control, cuyo crecimiento sin agentes estresantes representa el 100% de viabilidad.

Obtención de extractos celulares

La determinación de actividades enzimáticas localizadas en el citosol de las células requiere disponer de extractos acelulares. Para obtenerlos, se procedió a recoger 20 ml de células en tubos Falcon, en condiciones de esterilidad y a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C, eliminado el sobrenadante a continuación mediante decantación cuidadosa. Posteriormente, se lavaron las células añadiendo 20 ml de agua destilada estéril fría y se añadieron 1,25 ml de tampón 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 100 mM a pH= 6,0 (para estabilizar las proteínas) conteniendo fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 0,1 mM y cisteína 5mM.

La rotura mecánica de las células se realizó en tubos de hemolisis de 0,5 cm diámetro, con perlas de Ballotini (0,45 mm de diámetro) durante 7 ciclos de 45 segundos cada uno, manteniendo descansos de 1 minuto de hielo para impedir que el calor de la fricción produjera la desnaturalización de las proteínas. Por último, se recogieron los extractos mediante pipetas Pasteur y se transfirieron a tubos Eppendorf en hielo, que fueron centrifugados inmediatamente durante siete minutos a 4°C y 13.000 rpm. El sobrenadante se traspasó a otro Eppendorf y se conservó a -20°C, mientras que el precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón MES antes de ser conservado igualmente a -20°C.

Determinación de la cantidad de trehalosa endógena

Para determinar el contenido de trehalosa endógena, se partió de cultivos celulares en fase exponencial (D.O._{600nm} \approx 0,8-1,0). Se tomaron 20 ml de dichos cultivos y se prepararon los extractos siguiendo el protocolo descrito por González–Párraga *et al.*, 2003 [49]. Se centrifugaron a 3500 rpm descartando después el sobrenadante y añadiendo 1 ml de agua fría, conservándolos después a -20°C hasta su análisis. En ese momento, tras su descongelación, los tubos se dispusieron en un baño a 95°C durante 30 minutos para producir lisis celular y liberar al exterior la trehalosa endógena. A continuación, se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos para posteriormente obtener el sobrenadante.

El ensayo de valoración consistió en una mezcla que contenía 90 μ l de tampón acetato sódico 25 mM pH 5,6, 100 μ l de cada sobrenadante correspondiente al extracto

obtenido anteriormente y 10 μ l de trehalasa comercial (Sigma, 2 unidades/ml). Esta enzima hidroliza las moléculas de trehalosa en 2 moléculas de glucosa a 37°C, en las condiciones que aportan los tampones y durante toda la noche de incubación. Además de las muestras, se preparó un control con trehalosa comercial (1-5 mM) para obtener una recta patrón de referencia. Los blancos fueron realizados sustituyendo la trehalosa comercial por agua destilada.

Trehalasas

(ácida/neutra)

Trehalosa \rightarrow 2 Glucosa

Este método mide la cantidad de glucosa que se genera a partir de la trehalosa presente. Dicha cantidad fue medida mediante una reacción enzimática acoplada de glucosa oxidasa-peroxidasa. La valoración analítica consiste en que la glucosa liberada en el medio es oxidada a ácido glucónico por la enzima glucosa oxidasa.

Glucosa + O_2 + $H_2O \rightarrow Ac.$ Glucónico + H_2O_2 Glucosa oxidasa

Del peróxido formado en esta reacción y junto con la peroxidasa y un cromógeno oxidable (orto-dianisidina), que es incoloro en forma reducida, pero se colorea en su forma oxidada) se obtiene un producto coloreado final.

$$H_2O_2 + O$$
-dianisidina $\rightarrow H_2O + O$ -dianisidina oxidada
Peroxidasa

Para la reacción de valoración, se añadió al tubo de ensayo y a distintos tiempos, 1 ml de reactivo formado por las siguientes soluciones mezcladas en una proporción 20:1 (v/v) inmediatamente antes de su valoración:

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

La incubación tuvo lugar a 30°C durante 30 minutos y se detuvo la reacción con 1 ml de HCl 6N. Así, se desnaturaliza la solución de glucosa-peroxidasa y el complejo de la O-dianisidina oxidada vira a color rosa. De inmediato, se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1280 a 540 nm, para evitar la alteración de color debido a la oxidación espontánea y progresiva de la acción del aire de la O-dianisidina.

Los valores procedentes de ensayos experimentales se refirieron a una recta de referencia de glucosa (Figura 3.1) y se midieron en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1280 a 540 nm (Abs₅₄₀ nm), estableciéndose un rango de linealidad entre 10 y 100μ g de glucosa/200 µl.



Figura 3.1. Gráfica patrón para la valoración de glucosa con el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa.

Determinación colorimétrica de la proteína

El contenido total de proteínas en las muestras de determinó mediante el método de Lowry [45]. Este método nos permite cuantificar las proteínas presentes gracias al color que se forma por la interacción de determinados aminoácidos con el reactivo de Folin-Ciocalteau. La intensidad del color que se obtiene en la reacción es proporcional a la concentración de proteínas, dentro del rango de linealidad de la ley de Lambert-Beer.

El procedimiento se realiza en dos etapas. En la primera de ellas se añade el reactivo de Lowry y se deja incubar mientras se prepara la solución de Folin. En medio alcalino, el Cu²⁺ se une a los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos formando complejos de color azul. Estos complejos dan lugar a que las tirosinas de la proteína queden

expuestas para la segunda reacción debido a que queda abierta la estructura tridimensional de la proteína. En la segunda etapa, se añade la solución de Folin y se deja incubar 30 minutos. Los grupos fenólicos de las tirosinas expuestas son reducidas por el ácido fosfomolibdo-túngstico del reactivo de Folin, actuando el cobre como catalizador, y pasando el ácido de color amarillo a azul intenso. Según el protocolo, se añade a cada tubo 1 ml la muestra diluida, 3 ml del reactivo de Lowry y 0,9 de agua destilada. Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 300 μ l de la solución de Folin, se deja incubar 30 minutos más e inmediatamente se lee en el espectrofotómetro a D.O._{540 nm}. La prueba se realizó por duplicado para cada muestra y se utilizó como blanco agua destilada. Como patrón de referencia, se empleó una solución de albúmina bovina (Sigma). El método es lineal en un rango de 10 a 90 μ l/ml de proteína.

Ensayos enzimáticos

Para conocer cómo se ve afectado el metabolismo de la levadura por los distintos agentes estresantes, así como por los antifúngicos probados, es necesario determinar la actividad de ciertas enzimas caracterizadas por su función antioxidante y detoxificante. Se realizaron las siguientes pruebas:

Catalasa

Los organismos eucariotas aerobios disponen de la enzima catalasa, que les permite protegerse del radical peróxido de hidrógeno mediante la descomposición del H_2O_2 en moléculas de agua y oxígeno.

$$2 H_2 O_2 \rightarrow 2 H_2 O + O_2$$

Catalasa

La actividad de esta enzima se cuantificó usando el método descrito por Aebi (1984), con las modificaciones recogidas en González-Párraga *et al.* (38]. Primero se adicionó H_2O_2 10,6M al tampón BPK+50mM a pH7. En una cubeta de cuarzo de 1,5 ml se añadieron 25 µl del sobrenadante citosólico previamente centrifugado, y 975 µl de la mezcla tampón. Una vez agitada la mezcla en la cubeta, se introdujo en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1280 (con accesorio de termostatización) utilizando como blanco tampón fosfato potásico y se registraron los valores de la pendiente. La prueba se realizó a 25°C. Cada muestra se hizo por triplicado.

Si se produce la disociación del H_2O_2 se registra una disminución de la absorbancia a 240 nm. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad de reacción y de un coeficiente de extinción molar para H_2O_2 (ϵ =39,98M⁻¹×cm⁻¹). Los resultados se expresan en µmoles×min⁻¹×ml⁻¹.

Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es una enzima que cataliza la reacción que dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Esta acción es importante ya que protege a las células de la acción oxidante de este compuesto. Existen diferentes métodos directos o indirectos para determinar la actividad de esta enzima. En nuestro caso, utilizamos un ensayo comercial (SOD assay kit, Sigma, St. Louis, USA), que usa una sal monosódica de tetrazolio altamente soluble en agua, el WST-1= (2-(4-lodofenil)-3(4-nitrofenil)-5(2,4-disulfofenil)2H-tetrazolio. El ratio de reducción está linealmente relacionado con la actividad de la xantina oxidasa, y es inhibido por la enzima SOD tal como se indica en la Figura 3.2. Por tanto, el IC₅₀ (inhibición de la actividad en 50%) puede ser determinado por un método colorimétrico.

Siguiendo las indicaciones del suministrador del kit, el procedimiento seguido fue el siguiente: primero se preparó el "working solution (WST)", para ello 1 ml de WST comercial fue diluido en 19 ml de "buffer solution". También se preparó la enzima del kit, para ello diluimos 15 μ l de "working solution "en 2,5 ml del "dilution buffer".

Una vez preparados los reactivos, se sigue el protocolo sobre una placa de 96 pocillos (agitando en cada paso). Se dispone de tres blancos. Primero se añaden 20 μ l de la muestra a los pocillos de muestra y al pocillo blanco 2. Se añaden a continuación 20 μ l de agua a los pocillos blanco 1 y 3. Después añadimos 200 μ l de WST a todos los pocillos. Los pocillos blanco 2 y 3 contienen 20 μ l de "dilution buffer" y por último se añaden 20 μ l de enzima "working solution "a cada muestra y al pocillo blanco 1. Se incuba 20 minutos a 37°C en oscuridad y se procede a la lectura de la placa que se realiza a 450 nm.



Figura 3.2. Reacción de dismutación del anión superóxido a través de la enzima SOD. Imagen adaptada a partir del kit comercial correspondiente (Sigma, St. Louis, USA).

Para calcular la actividad SOD se aplica la siguiente ecuación:

Actividad SOD (% de inhibición) = $[(A_{Blanco1}-A_{Blanco3})-(A_{muestra}-A_{Blanco2})]$ (A_{Blanco1}-A_{Blanco3}) X 100

Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el potencial de membrana mitocondrial

Estos ensayos se realizaron para conocer el efecto de los antifúngicos que se emplearon en este estudio en cuanto a la producción de especies reactivas del oxígeno interno (ROS). Se utilizaron dos métodos complementarios: el primero para la detección global de ROS, con diacetato de dihidrofluoresceína y el segundo para la determinación del potencial de membrana mitocondrial, con rodamina 123.

Determinación global de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para detectar la producción de radicales libres, se agregó diacetato de dihidrofluoresceína (DHF; 40 μ M, Sigma Aldrich) durante 30 minutos en oscuridad a 37°C. La DHF difunde a través de las membranas celulares y es hidrolizada por las esterasas a un compuesto no fluorescente, que es oxidado rápidamente por las especies reactivas de oxígeno (ROS) convirtiéndose en una molécula fluorescente. De esta forma, la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo.

Los cultivos que habían crecido en YPD hasta alcanzar fase exponencial (D.O. ≈ 0.8 -1,0) de las dos cepas fueron tratados con los antifúngicos durante 1h a 37°C, en agitación continua. Tras el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X para añadirles DHF 40 μ M durante 30 minutos a 37°C. La interacción de estos compuestos con los radicales libres del medio provoca la división de la fluoresceína, con emisión de una fluorescencia verde medible en el canal FL1 del citómetro de flujo.

Determinación del potencial de membrana

La determinación del potencial de membrana se realizó usando rodamina 123 (Rod) [46,47]. Se trata de una sonda fluorescente que normalmente se usa para determinar la funcionalidad de las mitocondrias debido a que sólo se acumula en éstas cuando las células están vivas y activas metabólicamente, con un potencial de membrana negativo, estableciendo una correlación entre fluorescencia y variación de potencial.

Junto al ensayo de DHF, se tomaron las células en fase exponencial, se trataron con antifúngicos durante una hora y se lavaron con PBS 1X. En esta ocasión se lavaron tres veces para eliminar el exceso de Rodamina, antes de tener la suspensión final con una dilución 1/10 del precipitado del último lavado. El compuesto emite una fluorescencia de color verde medible en el canal FL1 del citómetro de flujo.

Determinación de la mortalidad celular por Ioduro de propidio (IP)

Se determinó con muestras idénticas a las empleadas para la determinación de ROS pero, en este caso se trataron con ioduro de propidio (IP) a una concentración de 20 μ M. La principal característica de este compuesto es que no puede atravesar la membrana celular y por lo tanto interaccionan sólo con el ADN de las células muertas, que tienen

la pared dañada y emiten fluorescencia de color rojo al intercalarse entre las bases del ADN de las células afectadas. Tras 5 minutos de incubación con el IP, la fluorescencia emitida por las células se captó en el canal FL2 del citómetro de flujo.

En los tres casos se empleó el citómetro FC500 del Servicio de apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Se procesaron 10.000 células y los resultados fueron analizados por el software Flowing Software 2.5.1 (https://bioscience.fi > cell-imaging).

Formación de biopelículas

Los biofilms de *Candida albicans* se obtuvieron *in vitro* utilizando placas de poliestireno de 96 pocillos, en las que la levadura se adhiere al fondo de dichas placas. Se siguió el procedimiento descrito por Sánchez-Fresneda *et al.* [31]. Se partió de una suspensión de *C. albicans* (1×10^6 blastoconidios/ml) en medio RPMI 1640, 100 µl de la misma se dispusieron en cada pocillo de la placa. Se dejó que se adhirieran a la placa para formar así el biofilm durante 24h a 37°C. Transcurrido ese intervalo y comprobada la formación de biopelículas mediante inspección ocular, el medio se aspiró y las células no adherentes se eliminaron lavando tres veces con PBS [1×] estéril.

Valoración colorimétrica con XTT

Para cuantificar la capacidad vital y resistencia de biofilms se usó XTT (sodio 2,3,bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium).

Se preparó una solución de XTT 0,5 mg/ml en PBS, esterilizada mediante filtración a través de un filtro de 0,22 micras de tamaño de poro y se le añadió menadiona 25 μ M (Sigma, St. Louis, USA). A cada pocillo se le adicionaron 100 μ l de la solución de XTT-menadiona y las placas se incubaron durante 1h a 37°C. La actividad metabólica de las células sésiles de *C. albicans* se evaluó cuantitativamente midiendo la absorbancia a 540 nm, en un lector de placa de 96 pocillos. La sal de tetrazolio acumulada tras la reducción de XTT por las deshidrogenasas celulares fue proporcional al número de células viables presentes en el biofilm.

Soporte bioinformático, representación gráfica y análisis estadístico de datos

A lo largo de la presente Memoria se han empleado herramientas bioinformáticas disponibles en internet. Las más utilizadas han sido las siguientes: Pubmed. Base de datos de revistas científicas de la biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</u>. Para la correcta representación gráfica de los resultados y el análisis estadístico de los datos, se empleó el programa Graph Pad Prism versión 6.00 (La Jolla, CA, USA), <u>http://www.graphpad.com</u>.

Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron un mínimo de tres veces. En las gráficas se representa el valor medio de los datos y mediante las barras de error, se expresa el error típico de la media, de al menos dos muestras independientes. Para el tratamiento estadístico de los datos se calcularon los valores medios, así como la desviación estándar de todos los datos obtenidos. Se realizó el test no paramétrico de U de Mann-Whitney (comparación con el grupo control) para determinar si existían diferencias entre las medidas efectuadas. En todos los casos, el intervalo de confianza utilizado fue del 95% siendo los niveles de significación, los siguientes: P<0,05 (*), P<0,01(**) y P<0,001(***).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS MICAFUNGINA (MF) Y ANFOTERICINA (AmB) SOBRE *Candida parapsilosis* Y EL MUTANTE ISOGÉNICO *atc1\ddla/ntc1\ddla* QUE CARECE DE LAS DOS TREHALASAS.

Los experimentos iniciales de esta Memoria se diseñaron para aplicar determinados tratamientos antifúngicos sobre cultivos de una levadura patógen emergente: *Candida parapsilosis*. En concreto, se utilizaron muestras con la misma densidad celular de las cepas AM2001/0013 (tipo parental, abreviadamente Cp) y el mutante isogénico homocigótico *atc1/atc1/ntc1/ntc1* o (*atc1\Delta/ntc1\Delta*) KO (Nou^s) (deficiente en las dos actividades trehalasa: ácida (Atc1p) y neutra (Ntc1p) presentes en esta levadura [30,31]. Las muestras se prepararon a partir de cultivos que han alcanzado la fase exponencial, determinada mediante el cálculo de la absorbancia a 600 nm en un espectofotómetro. Como referencia estimativa, se tomó una concentración de 10⁷ células/ml equivalente a (D.O.600_{nm}~0,8-1,0). El crecimiento se llevó a cabo en medio YPD líquido a 37°C con agitación orbital (Materiales y Métodos).

En primer lugar, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (o CMIs), para todos los antifúngicos, En primer lugar, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (o CMIs), para todos los antifúngicos, que se aplicaron sobre las cepas de *C. parapsilosis* estudiadas en esta Memoria (Tabla 4.1). El cálculo se realizó utilizando el protocolo establecido por el sistema EUCAST.

Antifúngicos	Rango CMI (µg/mI)	Ср	atc1\/ntc1\
Anfotericina B	0,12-0,5	0,12	0,12
Micafungina	0,25-1,0	0,50	0,50
Fluconazol	0,5-2,0	0,50	0,50
Itraconazol	0,015-0,12	0,015	0,015

Tabla 4.1. Concentraciones mínimas inhibitorias de los antifúngicos utilizados en esta memoria correspondientes a las cepas estudiadas. Para más detalles, ver Métodos.

Viabilidad celular en medio líquido

Se realizó un conjunto de ensayos para comprobar el efecto de los antifungicos empleados: Micafungina (MF) y Anfotericina (AmB) a distintas concentraciones, que fueron escogidas en función de los valores de CMI.

Como se puede observar en la Figura 4.1, la aplicación de un tratamiento con dos dosis del antifúngico MF (0,5 μ g/ml y 1,0 μ g/ml) dio lugar a una mayor tasa de supervivencia en las levaduras procedentes del mutante *atc1\Delta/ntc1\Delta* nulo, respecto a la viabilidad registrada en la cepa parental (Cp). Tras una hora de tratamiento, dicho mutante presentó una mayor resistencia a ambas concentraciones, y cabe destacar que incluso promovieron el crecimiento de algunos aislados de *C. parapsilosis* como había quedado patente en estudios de otros autores [4]. Sin embargo, a las tres horas de exposición, sólo se vio un descenso que fue estadísticamente significativo en la viabilidad de la cepa mutante, expuesta a la mayor concentración de la equinocandina (Figura 4.1).



Figura 4.1. Determinación del grado de viabilidad celular en medio YPD líquido en respuesta al tratamiento de AmB (0,25 μ g/ml y 1,0 μ g/ml) y MF (0,5 μ g/ml y 1,0 μ g/ml) a una hora y a las 3 horas de su aplicación, de la cepa parental (Cp) de *C. parapsilosis* y del mutante isogénico (*atc1\Delta/ntc1\Delta*). Los cultivos se incubaron a 28°C en YPD durante toda la noche, se refrescaron en el mismo medio (D.O.₆₀₀ = 0,3) antes de añadir los compuestos. El tratamiento estadístico aplicado fue mediante Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0,05 (*) y P<0,01 (**).

Estos resultados sugieren que las enzimas involucradas en la hidrólisis de trehalosa podrían presentar distinta susceptibilidad a la acción fungicida de polienos (AmB) y equinocandinas (MF), dos antifúngicos que se utilizan de manera rutinaria como tratamiento clínico [19,21]. También apuntan a que la eficacia tóxica del tratamiento con AmB sobre *C. parapsilosis* incrementa con el tiempo, siendo ya muy notable a las tres horas de aplicación (Figura 4.1).

Un lote paralelo del cultivo se trató con el polieno AmB (0,25 μ g/ml y 1,0 μ g/ml). Tras una hora de tratamiento se registró un descenso en la viabilidad de la cepa parental, reflejado con más intensidad a la concentración de 1,0 μ g/ml. En cambio, después de tres horas, la bajada observada en la viabilidad de ambas cepas fue estadísticamente significativa a las dos concentraciones de AmB empleadas: 0,25 y 1,0 μ g/ml. Si bien, siendo muy notable la disminución, resultó más acentuada en el mutante deficiente en la actividad trehalasa global a la máxima concentración del polieno (Figura 4.1).

Crecimiento colonial en medio sólido

Estos ensayos sirven para complementar el recuento de viables efectuado en medio líquido, con el fin de confirmar o descartar los resultados obtenidos previamente. Los datos mostrados en la Figura 4.2 corresponden a una imagen representativa del conjunto de placas efectuado para dicho ensayo, que se realizó por duplicado.

Se puede comprobar que, como ocurre en medio YPD líquido, tras 1 hora de tratamiento con MF (0,5 μ g/ml), el mutante nulo fue el que registró una mayor intensidad en la formación macroscópica de colonias con respecto a la cepa parental, aunque la diferencia observada fue muy leve, ya que el crecimiento colonial en placa es principalmente cualitativo, y tiene un valor orientativo. A las tres horas, tanto el mutante como la cepa parental tratadas con AmB presentan una notable disminución del crecimiento colonial con respecto a ambas cepas tratadas con MF, aunque entre ellas no se aprecian diferencias importantes, por tratarse de un método cualitativo (Figura 4.2). Posteriormente, se realizaron otros ensayos confirmatorios, descartando los tratamientos que utilizaban las concentraciones más bajas de 0,25 μ g/ml (AmB) y 0,5 μ g/ml (MF), manteniendo únicamente las concentraciones superiores de 1,0 μ g/ml tanto de Anfotericina como de Micafungina, ya que parecían haber dado resultados de viabilidad más significativos y se alargó el tratamiento en el tiempo, concretamente se aplicó el antifúngico a 1, 3, 10 y 24 horas.



Figura 4.2. Representación del crecimiento colonial de *Candida parapsilosis* en medio YPD sólido. Se partió de muestras celulares idénticas para ambas cepas, que fueron sometidas a 1 hora (A) y 3 horas (B) de tratamiento a 37°C con Micafungina (MF) 0,5 y 1,0 μ g/ml y Anfotericina B (AmB) 0,25 y 1,0 μ g/ml. Se practicaron diluciones seriadas de *C. parapsilosis* y su mutante *atc1* Δ /*ntc1* Δ . Se tomaron 5 μ l de cada dilución que se dispensaron en forma de gota ("spot") sobre el medio YPD sólido. Las placas se incubaron 24 h a 37°C antes de ser fotografiadas.

La aplicación del tratamiento con AmB y MF durante una hora, apenas varía la tasa de supervivencia de la cepa parental y el mutante $atc1\Delta/ntc1\Delta$ con respecto al control (Figura 4.3]. Sin embargo, a las tres horas cuando se aplicó AmB, tanto la cepa parental como el mutante homocigótico disminuyen su viabilidad y en este último caso, esta disminución fue más acusada (Figura 4.3).

Sólo fue a las 10 horas cuando el tratamiento de AmB hizo que la tasa de supervivencia del mutante siguiera disminuyendo, recuperándose a las 24 horas, lo que supondría una pérdida de eficacia del antifúngico debido a su eliminación a lo largo de esta incubación más prolongada. A su vez, la aplicación de Micafungina apenas causó variaciones reseñables durante 24 horas (Figura 4.3), indicando una baja susceptibilidad *in vitro* a las equinocandinas por parte de *C. parapsilosis.*



Figura 4.3. Efecto de los antifúngicos clínicos Anfotericina B (AmB) y Micafungina (MF) sobre la viabilidad celular de las cepas de *C. parapsilosis*. Muestras con idéntica densidad celular de ambas cepas, fueron recogidas a partir de cultivos crecidos en YPD a 37° hasta fase exponencial (D.O. $600_{nm} \approx 0.8-1.0$) y posteriormente se sometieron durante 24 horas a las siguientes dosis: 1,0 µg/ml de AmB y MF. A) 1 hora, B) 3 h, C) 10 h y D) 24 h. El tratamiento estadístico aplicado fue mediante el método Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0.05 (*), P<0.01 (**) y P<0.001 (***).

Crecimiento colonial en medio sólido

Los ensayos sobre placa permiten complementar el recuento de viables efectuado previamente en medio líquido. Tanto la cepa parental como el mutante presentan el mismo comportamiento que en medio YPD líquido, tras 1h de tratamiento con AmB (1,0 μ g/ml) (Figura 4.4). Ambas cepas registraron una menor formación macroscópica de colonias a partir de las tres y diez horas de exposición antifúngica, recuperándose el crecimiento a partir de las 24 horas de dicho tratamiento.



Figura 4.4. Representación del crecimiento colonial en medio YPD sólido de *C. parapsilosis* y su mutante isogénico *atc1* Δ */ntc1* Δ . Partiendo de muestras celulares iguales de cada cepa, fueron sometidas a 1(A), 3(B), 10(C) y 24 horas (D) de tratamiento a 37°C con Micafungina (MF) 1,0 μ g/ml y Anfotericina B (AmB) 1,0 μ g/ml se realizaron diluciones seriadas de *C. parapsilosis* y su mutante. Se tomaron 5 μ l de cada dilución que se dispersaron en forma de gota ("spot") sobre YPD sólido. Las placas se incubaron 24 h a 37°C antes de ser fotografiadas (Página anterior).

En paralelo, se realizaron determinaciones turbidimétricas, tomando muestras a lo largo de las 24 horas del ensayo y midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, con el fin de saber de qué manera podría afectar el antifúngico aplicado al crecimiento celular de las levaduras. Se practicaron varias diluciones para que el dato obtenido de la densidad óptica fuese el correcto entre el valor medido y el número de células real del cultivo (Figura 4.5).



Figura 4.5. Representación de los valores de densidad óptica $(D.0._{600nm})$ de las muestras celulares de *C. parapsilosis* y el mutante *atc1* Δ /*ntc1* Δ . Las muestras se recogieron tras 1, 3, 10 y 24 horas de exposición con MF (1,0 µg/ml) y AmB (1,0 µg/ml).

ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES DE LAS CEPAS AM2001/0013 (Cp) Y $atc1\Delta/ntc1\Delta$ EN RESPUESTA A LOS ANTIFÚNGICOS MF Y AmB

Algunos antifúngicos poseen un modo de acción tóxica sobre las células más complejo de lo que se creía previamente. En el caso de los polienos, como la Anfotericina B, está documentado que, junto con el mecanismo clásico de la unión al ergosterol de membrana y la posterior formación de poros, existe un segundo mecanismo de acción, consistente en la generación de estrés oxidativo intracelular que potencia la acción fungicida del compuesto [38]. La validez de esta propuesta, ha sido posteriormente demostrada en varias levaduras patógenas oportunistas [48]. Debido a estos antecedentes, se procedió a determinar una serie de actividades enzimáticas con función antioxidante, que previamente han sido estudiadas en nuestro grupo de trabajo.

Catalasa

La determinación de la actividad catalasa, indicó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras sometidas a tratamiento con AmB $(0,25 \,\mu\text{g/ml})$ y MF $(1,0 \,\mu\text{g/ml})$ con respecto a las muestras sin tratar, siendo dicha actividad siempre inferior en las células mutantes en comparación con la cepa parental (Fig. 4.6). Por el contrario, la exposición con AmB $(1,0 \,\mu\text{g/ml})$ parece inducir un incremento de esta actividad catalasa en las células $atc1\Delta/ntc1\Delta$.

El hecho de que la cepa $atc 1\Delta/ntc 1\Delta$ (carente de las dos trehalasas responsables de la hidrólisis de la trehalosa) muestre un aumento de actividad catalasa en respuesta al tratamiento con AmB (1,0 µg/ml) indicaría que el antifúngico a dosis elevadas produce un estado de estrés oxidativo interno del que la levadura debe protegerse; no siendo suficiente el alto contenido de trehalosa acumulada (Tabla 4.2). Con la información actualmente disponible, no entendemos la razón por la cual el mutante que acumula mayor contenido del disacárido trehalosa, con función protectora frente a las especies reactivas de oxígeno [34,49], presenta una clara activación de la catalasa. Quizá la formación de ROS intracelular resulta tan alta al aplicar el antifúngico, que no basta la trehalosa por sí sola para garantizar el mantenimiento de la integridad celular [48,50].



Figura 4.6. Efecto de la exposición con los antifúngicos MF a 1,0 μ g/ml, AmB 0,25 μ g/ml y AmB 1,0 μ g/ml sobre la actividad catalasa de *C. parapsilosis*. Los tratamientos con dichos compuestos se aplicaron sobre muestras celulares idénticas durante una hora a 37°C sobre las cepas objeto de estudio, que previamente crecieron en medio YPD hasta fase exponencial (ver métodos). El tratamiento estadístico aplicado fue mediante el test de Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0,05 (*).

Superóxido dismutasa (SOD)

Esta actividad lleva a cabo la dismutación del anión superóxido (O₂⁻). El mutante *atc1* Δ /*ntc1* Δ vio disminuida su actividad SOD cuando se adicionó AmB (0,25 µg/ml y 1,0 µg/ml) con respecto a las muestras control sin tratar (Figura 4.7).

Esta disminución también se observó al comparar con la cepa silvestre en las muestras tratadas con AmB (0,25 μ g/ml), no siendo demasiado relevante. Por otra parte, se detectó un incremento de la actividad SOD estadísticamente significativo tras el tratamiento con MF en la cepa silvestre con respecto a las muestras sin tratar. Dicho incremento de la actividad SOD provocado por la equinocandina solo en el tipo parental, puede llevar a la conclusión de que las células silvestres son más sensibles a la acción del antifúngico ya que al acumular menores niveles de trehalosa (puesto que no disponen de las dos enzimas trehalasa funcionales que hidrolizan la molécula), necesitan



activar otros sistemas para defenderse del antifúngico, como serían las enzimas detoxificantes [50].

Figura 4.7. Acción antifúngica sobre la actividad superóxido dismutasa. La cepa AM2001/0013 y su mutante $atc 1\Delta/ntc 1\Delta$ crecieron hasta fase exponencial y posteriormente se adicionaron los antifúngicos MF: 1,0 µg/ml y AmB: 0,25 y 1,0 µg/ml. El tratamiento estadístico aplicado fue mediante Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0,05 (*). Contenido de trehalosa endógena

En paralelo con la medición de la viabilidad celular, en los mismos cultivos se valoró el contenido endógeno de trehalosa, por tener una función protectora contra el estrés oxidativo en *C. albicans* y otras levaduras patógenas [34,48,49]. Como se puede ver en la Tabla 4.2, el mutante carente de actividad trehalasa funcional presentó un mayor contenido basal de trehalosa endógena respecto a su cepa parental. Por su parte, y como ha sido previamente documentado en otras cepas de *Candida* [30,31,38], la adición de AmB indujo un notable incremento en la síntesis intracelular del disacárido (Tabla 4.2); mientras que en presencia de MF, la variación de trehalosa fue prácticamente nula. Estos datos refuerzan la hipótesis de un efecto diferencial de los antifúngicos sobre el contenido de trehalosa: sólo los polienos causan una clara estimulación de su síntesis, mientras las equinocandinas no utilizan esta vía de sensibilización celular en *C. albicans*.

Tabla 4.2. Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a los tratamientos de los antifúngicos MF (1,0 μ g/ml) y AmB (0,25 y 1,0 μ g/ml) en las cepas parental (Cp) y mutante **atc1** Δ /**ntc1** Δ **de** *C. parapsilosis*. Los cultivos crecieron hasta fase exponencial y posteriormente se le aplicaron los tratamientos durante una hora. Los valores de trehalosa endógena se expresan como nmoles/mg peso húmedo y se indica la desviación estándar de las medidas.

TRATAMIENTO	Ср	atc1 Δ /ntc1 Δ
Control	4,0±0,1 (1,0)	5,3±0,3(1,0)
AmB 0,25 μg/ml	5,4±0,1(1,1)	8,2±0,6 (1,0)
AmB 1,0 μ g/ml	7,1±0,2 (1,5)	8,9±0,4 (1,0)
MF 1,0 μ g/ml	4,2±0,1 (1,0)	4,3±0,3 (0,6)

Formación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La generación de diversos radicales libres del oxígeno tiene lugar en los organismos aerobios durante el metabolismo oxidativo y su acción sobre la fisiología celular. En consecuencia, se diseñó un ensayo para comprobar si la formación o no de estrés oxidativo, inducida por los antifúngicos analizados estaba relacionada con la producción de ROS intracelular. Los resultados obtenidos proceden de analizar el paso de 10.000 células a través del citómetro de flujo (Métodos) y se representan en la Figura 4.8.

Los valores endógenos de ROS medidos, utilizando como agente oxidante de referencia peróxido de hidrógeno (50 mM) y con respecto al control sin tratar (zona gris en el caso de la cepa parental y marrón en el caso del mutante), mostraron un grado de variación significativa, aunque la comparación entre ellas no reveló diferencias claras. La aplicación de AmB (1,0 μ g/ml) produjo un nivel elevado de especies ROS intracelular. En el mutante el desplazamiento es mayor, lo que indica una mayor producción de ROS (histograma de la Figura 4.8, color rojo).


Figura 4.8. Producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las cepas de *C. parapsilosis* analizadas tras ser sometidas a tratamiento antifúngico. Los histogramas muestran los resultados recogidos al analizar el paso de 10.000 células por el citómetro de flujo, tras la aplicación de los siguientes tratamientos: MF (1,0 μ g/ml) y AmB (1,0 μ g/ml), junto con el control positivo (H₂O₂) para determinar la producción de ROS. El área representada en gris (cepa parental) y marrón (mutante) corresponden al control negativo del ensayo (muestra sin tratar) y las regiones coloreadas en verde, rojo y azul, a la exposición con H₂O₂, MF y AmB, respectivamente.

El tratamiento con MF indujo un pequeño desplazamiento en la cepa silvestre indicando una detectable producción de ROS, al contrario de lo que ocurre en el mutante $atc l\Delta/ntc l\Delta$, donde no se detectó ningún cambio relevante sobre los niveles basales. Por tanto, se puede concluir preliminarmente que las equinocandinas no promueven una generación cuantificable de ROS, ya que la dihidrofluoresceína no experimentó una oxidación reseñable más que en la muestra control (Figura 4.8).

Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial analizado con rodamina.

El análisis de las levaduras con rodamina se realizó para detectar posibles cambios en el potencial de membrana mitocondrial, puesto que la gran mayoría de ROS endógeno son producidos en la mitocondria. Se llevó a cabo empleando la misma técnica de citometría de flujo con rodamina 123 como fluorocromo (Figura 4.9). El tratamiento con rodamina en el caso del control oxidante positivo (H₂O₂), determina que existe una actividad respiratoria basal en las mitocondrias, porque hay un aumento, aunque sea

leve en la actividad antioxidante de las enzimas que degradan tanto el peróxido como otros radicales en las levaduras de la cepa parental. Este proceso también ocurre, aunque en menor medida, en la cepa mutante (Figura 4.9).



Figura 4.9. Efecto de los antifúngicos sobre el potencial de membrana mitocondrial medido con rodamina. Los histogramas mostrados analizan el paso de 10.000 células por el citómetro de flujo tras la aplicación de los diferentes tratamientos con AmB y MF, junto con un control positivo de oxidación (H_2O_2). El área gris se corresponde con el control negativo o muestras sin tratar de la cepa parental, mientras la marrón corresponde al mutante.

Cuando se añadió Anfotericina B, el potencial de membrana disminuyó en las dos cepas, lo que ndicaría algún tipo de alteración en el mecanismo de acción de la cadena respiratoria mitocondrial, que vería afectada su función por el efecto tóxico que desencadena la AmB sobre *C. parapsilosis.* Los histogramas registrados para la valoración con rodamina tras adicionar Micafungina (Figura 4.9) en el caso del mutante *atc1* Δ /*ntc1* Δ nulo presentaron el mismo tipo de diagrama y resultados previamente obtenidos con dihidrofluoresceína (DHF; Figura 4.8), lo que permite establecer inicialmente que, con este antifúngico, la producción de ROS endógeno es prácticamente nula, dato que ocurre de manera paralela con la falta de detección de alteraciones en el potencial de membrana. Un patrón similar de resultados ha sido previamente demostrado en el mutante homocigótico *atc1* Δ /*atc1* Δ de *C. parapsilosis* [30], así como en cepas de *C. albicans* deficientes en la ruta de biosíntesis de trehalosa [38,51].

Efectos sobre la viabilidad celular analizada con ioduro de propidio

De la misma forma que se han realizado ensayos para observar la producción de ROS y el potencial de membrana, se diseñó una prueba para determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo, utilizando como marcador fluorescente en este caso ioduro de propidio (IP). Igualmente, se añadió un control positivo de mortalidad celular, que consistió en un choque térmico de 100°C aplicado a las células durante cinco minutos. A continuación, se procesaron todas las muestras en el citómetro de flujo. Los resultados consiguientes se pueden observar en la Figura 4.10. Como se puede comprobar, la viabilidad celular en el caso de la exposición con peróxido de hidrógeno (50 mM) verificó una pequeña población de muerte celular, aunque apenas fue destacable; mientras las pruebas efectuadas con AmB y MF manifestaron niveles similares a la población inicial (Figura 4.10). En el control positivo, sin embargo, sí pudo registrarse una evidente situación de muerte celular originada por la aplicación de calor. A falta de nuevos estudios, suponemos que una hora de tratamiento con los antifúngicos analizados no es tiempo suficiente para poder detectar un grado importante de muerte celular mediante la tinción con ioduro de propidio.



Figura 4.10. Determinación del grado de mortalidad celular mediante citometría de flujo con ioduro de propidio en respuesta a la adición de los antifúngicos. Los histogramas representan la viabilidad celular del experimento simultáneo llevado a cabo con los dos antifúngicos probados, AmB y MF. Como control positivo de muerte celular se utilizó el tratamiento por calor de 100°C aplicado durante 5 minutos.

SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *Candida parapsilosis Cp* y *atc1∆/ntc1*∆ A LOS ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS: FLUCONAZOL (FLZ) E ITRACONAZOL (ITR)

Junto con polienos y equinocandinas, los azoles constituyen la tercera gran familia de antifúngicos con aplicación clínica. Por consiguiente, una vez analizados los resultados del tratamiento con Micafungina y Anfotericina, se procedió a realizar ensayos con dos compuestos azólicos utilizados en clínica, concretamente Fluconazol (FLZ) e Itraconazol (ITR) [14,25,52]. El protocolo experimental seguido fue idéntico, aplicando ambos azoles sobre muestras con la misma densidad celular en las dos cepas a estudiar de *Candida parapsilosis*: AM2001/0013 (Cp) y ($atc1\Delta/ntc1\Delta$) KO (Nou^s) (mutante deficiente de actividad trehalasa ácida y trehalasa neutra).

Las muestras celulares se prepararon a partir de cultivos que habían alcanzado la fase exponencial, determinada mediante el cálculo de la absorbancia en el espectofotómetro $(D.O_{600nm} \approx 0.8-1.0)$ que equivale a una concentración de 10^7 células/ml. El crecimiento celular tuvo lugar en medio YPD líquido a 37°C y con agitación orbital (ver métodos).

Viabilidad celular en medio líquido

En estos ensayos se monitorizó el efecto de los antifúngicos Fluconazol (FLZ) e Itraconazol (ITR) a concentraciones de 1,0 µg/ml y 0,3 µg/ml, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 4.11, tras una hora de la aplicación del tratamiento no se apreció gran variación en la viabilidad en las dos estirpes tratadas con FLZ (1,0 µg/ml) e ITR (0,3 µg/ml), si bien, se pudo observar un leve aumento en el mutante nulo. Sin embargo, si seguimos analizando la tasa de supervivencia de las levaduras a lo largo del tiempo, a las 3 horas sí parece haber una disminución estadísticamente significativa del mutante $atc l\Delta/ntc l\Delta$ tratado con ITR (0,3 µg/ml) respecto a la viabilidad registrada en la muestra sin tratar. A las 10 horas de la aplicación, fue claramente verificable la eficacia del antifúngico Itraconazol sobre *C. parapsilosis*, puesto que disminuyó notablemente la tasa de supervivencia de las levaduras y con gran diferencia en el mutante nulo. Esta tendencia se mantuvo a las 24 horas de incubación, resultado que certificaría la estabilidad del antifúngico Itraconazol en el tiempo. La cepa parental pareció recuperar su tasa de crecimiento transcurridas 10 horas de la aplicación inicial. El tratamiento con FLZ (1,0 µg/ml) provocó una leve disminución en la viabilidad a partir de las 3 horas de ensayo hasta las 10 horas, siendo la pérdida más patente en el mutante y manteniéndose hasta las 24 horas.

Estos resultados sugieren preliminarmente que *C. parapsilosis* presenta distinta susceptibilidad a Fluconazol e Itraconazol, a pesar de ser ambos, sustancias azólicas de segunda generación con idéntico mecanismo de acción antifúngica (incorporan tres nitrógenos en su molécula). Estos resultados también sugieren que la doble interrupción de las trehalasas podría potenciar la acción tóxica de los azoles en *C. parapsilosis*, ya que al haber una tasa de supervivencia menor en el mutante *atc1* $\Delta/ntc1\Delta$ (carente de las enzimas trehalasa ácida y trehalasa neutra) parecen presentar una mayor susceptibilidad a la acción fungicida del Itraconazol, siendo menor con Fluconazol (Figura 4.11).



Figura 4.11. Efecto de los antifúngicos azólicos clínicos Fluconazol (FLZ) e Itraconazol (ITR) sobre la viabilidad celular de *C. parapsilosis*. Muestras idénticas de las cepas AM2001/0013 y su mutante nulo *atc1* Δ /*ntc1* Δ fueron recogidas de cultivos crecidos en YPD a 37° hasta fase exponencial (D.O._{600nm} \approx 0,8-1,0) y posteriormente tratadas durante 24 horas con las siguientes dosis: FLZ (1,0 µg/ml) e ITR (0,3 µg/ml). Se aplicó validación estadística mediante Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0,05 (*) y P<0,01 (**).

Crecimiento colonial en medio sólido

El propósito de este ensayo fue complementar los resultados de recuento de células viables en medio líquido con el crecimiento colonial equivalente en medio sólido. Estos resultados nos permitirán confirmar o descartar las evidencias previas. El experimento se realizó por duplicado, de manera que los datos mostrados en la Figura 4.12 corresponden a una imagen representativa del conjunto de placas contado en dicho ensayo. Se puede observar que, al igual que ocurre en medio líquido, a partir de las 10 horas de tratamiento tanto la cepa silvestre como el mutante $atc1\Delta/ntc1\Delta$ registraron una disminución en el número de colonias con el tratamiento con Fluconazol pero, sobre todo, tras la aplicación de Itraconazol, siendo en el último caso la cantidad total de colonias del mutante inferior a la cepa parental. En cambio, a las 24 horas se puede percibir una cierta recuperación de la viabilidad en la cepa parental tratada con Itraconazol (Figura 4.12).

Simultáneamente, para corroborar la validez de nuestra aproximación, el crecimiento celular también fue determinado por turbidimetría, tomando muestras del cultivo a lo largo de las 24 horas del ensayo y midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, para saber de qué manera podría afectar el antifúngico aplicado sobre el ciclo de crecimiento de las levaduras. Se hicieron varias diluciones para asegurar que la medición de la densidad óptica fuese la correcta entre el valor medido y el número de células real del cultivo (Figura 4.13).

Figura 4.12. Representación del crecimiento colonial en medio YPD sólido de *C. parapsilosis.* Se partió de muestras celulares iguales en crecimiento exponencial de las cepas, que fueron sometidas a 1(A), 3(B), 10(C) y 24 horas (D) de tratamiento a 37°C con Fluconazol (FLZ) 1,0 μ g/ml e Itraconazol (ITR) 0,3 μ g/ml. Se realizaron diluciones seriadas de *C. parapsilosis* y su mutante *atc1* Δ /*ntc1* Δ , y 5 μ l de cada dilución se dispensaron en forma de gota ("spot") sobre el medio YPD sólido. Las placas se incubaron 24 h a 37°C antes de ser fotografiadas (Página siguiente).





Figura 4.13. Representación de la cinética de crecimiento, como densidad óptica medida a partir de las muestras celulares de *C. parapsilosis* Cp y el mutante *atc1\Delta/ntc1\Delta*, tras la exposición a los azoles. La curva de crecimiento se monitorizó en medio YPD. Las muestras se recogieron tras 1, 3, 6, 10, 22, 24 y 48 horas de tratamiento con FLZ (1,0 μ g/ml) e ITR (0,3 μ g/ml). Para otros detalles, ver Métodos.

ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES DE LAS CEPAS AM2001/0013 (Cp) y $atc1\Delta/ntc1\Delta$ EN RESPUESTA A LOS ANTIFÚNGICOS FLUCONZOL E ITRACONAZOL

Evidencias recientes sugieren que ciertos antifúngicos poseen un modo de acción más complejo de lo que se creía previamente, donde la actividad oxidante interna contribuye a la patogenicidad [16,19]. Este mecanismo se ha demostrado en los polienos (Anfotericina B), pero no es tan evidente en equinocandinas (Micafungina) [48,49,51]. En consecuencia, se procedió a determinar sí también tenía lugar la generación de estrés oxidativo como segunda diana en el caso de azoles de segunda generación, como Fluconazol e Itraconazol. Ambos actúan uniéndose a una enzima clave que intervienen en la ruta de biosíntesis del ergosterol: la 14 α demetilasa. Por tanto, la membrana de las levaduras pierde fluidez y permeabilidad [16,19,22]. Debido a esto, se procedió a determinar las mismas actividades enzimáticas con función antioxidante, que previamente han sido estudiadas en esta memoria.

Catalasa

La determinación de actividad catalasa basal reveló en primer lugar que no parecen existir diferencias relevantes entre la cepa parental y el mutante homocigótico *atc1* Δ /*ntc1* Δ , por lo que la superior acumulación de trehalosa del mutante no implicaría aumentos o disminuciones de importancia en esta actividad antioxidante. La inclusión de un agente oxidante (50 mM H₂O₂) provocó una drástica reducción de la actividad catalasa en ambos tipos celulares, que podría ser debida, en parte, a su efecto tóxico sobre la viabilidad celular. Respecto al efecto de la exposición con antifúngicos sobre los niveles de catalasa en extractos libres de célula, se observó una respuesta distinta en la cepa parental y en el mutante. El tratamiento con FLZ (1,0 μ g/ml) indujo una ligera disminución en las células Cp, sin que se apreciara ninguna variación significativa en las *atc1* Δ /*ntc1* Δ con respecto a los controles sin tratar. La adición de ITR (0,3 μ g/ml) produjo el resultado opuesto (Figura 4.14). Las medidas se repitieron por triplicado.



Figura 4.14. Efecto de los antifúngicos FLZ a 1,0 μ g/ml e ITR 0,3 μ g/ml sobre la actividad catalasa de *C. parapsilosis*. Los tratamientos con dichos antifúngicos se aplicaron sobre muestras celulares idénticas durante una hora a 37° sobre cultivos de las cepas AM2001/0013 (parental) y su mutante isogénico $atc1\Delta/ntc1\Delta$, que previamente se crecieron en medio YPD hasta fase exponencial (ver métodos). El tratamiento estadístico aplicado a los datos fue mediante el test de Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0,05 (*) y P<0,001 (***).

Descartando las dosis utilizadas, no disponemos por el momento de una explicación satisfactoria que permitan correlacionar el contenido intracelular de trehalosa

sintetizado (Tabla 4.3) con la respuesta antioxidante. Quizá el largo periodo de tiempo transcurrido desde la aplicación clínica del Fluconazol, haya favorecido la aparición de resistencias y de especies fúngicas que requieren mayores dosis terapéuticas. Por otra parte, el hecho de que la cepa *atc1* $\Delta/ntc1\Delta$ (carente de las dos trehalasas responsables de la hidrólisis de la trehalosa) muestre un descenso estadísticamente significativo de su actividad catalasa en respuesta al ITR (0,3 µg/ml), siendo prácticamente insensible al FLZ (1,0 µg/ml), podría indicar que ambos antifúngicos producen un nivel diferente de estrés oxidativo en esta levadura, siendo más alto en el mutante (Figura 4.14). Adicionalmente, la caída parcial de actividad catalasa podría responder a la pérdida de integridad celular causa por el Itraconazol, mientras en condiciones normales la célula 4.3), sin que la presencia de los antifúngicos produzea un incremento suplementario en la síntesis de de este disacárido (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a los tratamientos con los antifúngicos FLZ (1,0 μ g/ml) e ITR (0,25 y 1,0 μ g/ml) en las cepas parental (Cp) y mutante *atc1\Delta/ntc1\Delta* de *C. parapsilosis.* Los cultivos crecieron hasta fase exponencial y posteriormente se aplicaron los tratamientos durante una hora. Los valores de trehalosa endógena se expresan como nmoles/mg peso húmedo y se indica la desviación estándar de las medidas.

TRATAMIENTO	Ср	atc1\/ntc1\
Control	3,0±0,1 (1,0)	4,5±0,7 (1,0)
FLZ 1,0 µg/ml	2,7±0,2 (0,9)	5,0±0,2 (1,1)
ITR 0,3 μg/ml	2,8±0,2 (0,9)	4,3±0,3 (0,9)

Superóxido dismutasa (SOD)

El mutante $atc1\Delta/ntc1\Delta$ aumentó su actividad SOD sólo cuando se aplicó la una concentración de FLZ 1,0 µg/ml, mientras con ITR 0,3 µg/ml se observó la respuesta contraria (Figura 4.15). Por el contrario, en la cepa silvestre las muestras tratadas con los dos azoles experimentaron un ligero incremento de su actividad SOD respecto al control (Figura 4.15). Esta reducción provocada por el ITR en la cepa mutante es similar a la registrada en la actividad catalasa, y podría llevar a la conclusión de que las células serían más sensibles a la acción de este antifúngico por no incrementar su contenido basal de trehalosa durante la fase exponencial (carecen de las dos enzimas trehalasas

que hidrolizan la molécula). En este caso no sería operativo un mecanismo de compensación entre la síntesis de trehalosa y la activación de sistemas enzimáticos antioxidantes para defenderse de la toxicidad causada por azoles [49]. No obstante, esta idea necesita de mayor apoyo experimental para ser confirmada. Es ¡reseñable que la adición de un oxidante fuerte (50 mM H_2O_2) tenga un efecto menos pronunciado sobre la actividad SOD en comparación con la catalasa (Figuras 4.14 y 4.15).



Figura 4.15. Efecto de los dos azoles estudiados sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD). Las cepas AM2001/0013 y $atc1\Delta/ntc1\Delta$ se crecieron hasta fase exponencial y posteriormente se aplicaron los antifúngicos FLZ a 1,0 μ g/ml e ITR 0,3 μ g/ml. El tratamiento estadístico fue también mediante Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0,05 (*).

Contenido de trehalosa endógena

La existencia de una respuesta general coordinada en levaduras frente a estrés oxidativo, ha recibido un considerable apoyo experimental [49,53]. La síntesis de trehalosa y la activación de enzimas antioxidantes forman parte de esa defensa común [30,31]. Por tanto, en los mismos cultivos donde se han determinado las actividades catalasa y SOD, se valoró el contenido endógeno de trehalosa. Como se aprecia en la Tabla 4.3, aunque el mutante presentó un mayor contenido basal de trehalosa endógena, como se ha mostrado previamente (Tabla 4.2), ya que carece de trehalasa neutra, la presencia de los azoles no indujo modificaciones relevantes en la síntesis del disacárido

en cualquiera de los dos tipos celulares. Las ligeras fluctuaciones registradas son probablemente debidas al error experimental del método seguido. En consecuencia, podemos concluir que los azoles a diferencia de la AmB no ejercen su efecto tóxico a través de cambios en el nivel intracelular de trehalosa (Tabla 4.3).

Formación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Si bien, las evidencias mostradas hasta ahora apuntan a una acción anti-candida de los azoles independiente del establecimiento de un estrés oxidativo interno, consideramos conveniente verificar este extremo, al igual que se hizo anteriormente con AmB y MF. Se siguió idéntico protocolo utilizando el fluorocromo DHF, en este caso tras la adición de Fluconazol e Itraconazol, determinando la formación de ROS intracelular mediante citometría de flujo. Para comprobar la validez del ensayo, se analizó el paso de 10.000 células en promedio por el citómetro y los datos obtenidos se representan en la Figura 4.16.

Como indica la gráfica, los valores de ROS endógeno medidos utilizando como agente oxidante de referencia el peróxido de hidrógeno (50 mM) con respecto al control sin tratar (zona gris), variaron significativamente tanto en la cepa parental como en el mutante, y entre ellas se registró una población de tamaño considerable en las células parentales y una población un poco más pequeña en la cepa $atc 1\Delta/ntc 1\Delta$ que producían niveles elevados de ROS. Por el contrario, tras el tratamiento de FLZ no se detectó ningún cambio relevante en los niveles de ROS en ninguna de las dos cepas estudiadas (Figura 4.16). Con estos datos, queremos resaltar que no hubo generación cuantificable de ROS, ya que la dihidrofluoresceína no se oxidó más que en la muestra control. A su vez, la aplicación de ITR (0,3 µg/ml) sí produjo ROS endógeno en cantidades significativas, como se puede apreciar en el histograma de la gráfica (histogramas de color naranja), sin que existan diferencias relevantes entre ambas estirpes celulares.



Figura 4.16. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las cepas de *C. parapsilosis* analizadas tras ser sometidas a exposición antifúngica. Los histogramas muestran los resultados recogidos al analizar el paso de 10.000 células por el citómetro de flujo, tras la aplicación de los siguientes tratamientos: FLZ (1,0 μ g/ml) e ITR (0,3 μ g/ml) junto con el control positivo (H₂O₂) para determinar la producción de ROS. El área representada en gris corresponde al control negativo del ensayo (muestras sin tratar) y las regiones coloreadas en verde, fucsia y naranja a la exposición con H₂O₂, FLZ e ITR, respectivamente.

Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial analizado mediante rodamina.

El análisis de las levaduras mediante tratamiento con rodamina, se realizó para detectar posibles cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Se llevó a cabo empleando la misma técnica de citometría de flujo antes explicada y los resultados se pueden observar en la Figura 4.17.

Tomando como referencia los ensayos con las cepas parental y mutante analizadas con DHF para averiguar la producción de ROS, el tratamiento con rodamina en el caso del control positivo (H₂O₂), manifestó una cierta actividad respiratoria mitocondrial porque hay un aumento -aunque sea leve- en la actividad oxidativa de las enzimas que están degradando el peróxido, así como otros radicales libres en los dos tipos celulares (Figura 4.17). Cuando se adicionó Itraconazol, se pudo ver que en la cepa parental no existen alteraciones del potencial de membrana, mientras que en la cepa $atc1\Delta/ntc1\Delta$ sí se produjo un claro aumento de dicho potencial. En consecuencia, las actividades de las

enzimas mitocondriales estarían produciendo radicales libres que no serían degradados por la actividad antioxidante (catalasa y SOD), proporcionando así una explicación plausible sobre la pérdida de viabilidad celular que ocurre en presencia de Itraconazol.



Figura 4.17. Efecto de los antifúngicos azólicos sobre el potencial de membrana medido con rodamina. Los histogramas mostrados analizan el paso de 10.000 células por el citómetro de flujo tras la aplicación de los diferentes tratamientos con FLZ e ITR más un control positivo (H_2O_2). La parte en gris se corresponde con el control negativo o muestras sin tratar y las regiones coloreadas en verde, fucsia y naranja a la exposición con H_2O_2 , FLZ e ITR respectivamente.

Los histogramas registrados para la valoración con rodamina tras la adición de Fluconazol presentaron el mismo tipo de diagrama y resultados previamente obtenidos para la dihidrofluoresceína (DHF; Figura 4.16.), lo que permite concluir de forma inicial que, con este antifúngico la producción de ROS en la mitocondria fue prácticamente nula, proceso que tiene lugar de manera paralela con la falta de detección de alteraciones en el potencial de membrana (Figura 4.17).

La inhibición de la cadena respiratoria neutraliza la acción tóxica del Itraconazol.

Los datos relativos a la producción endógena de ROS mostrados previamente (Figura 4.16) parecen sugerir la participación de un estrés oxidativo interno asociado a la capacidad antifúngica del Itraconazol. Puesto que las ROS son generadas principalmente en las mitocondrias, como productos intermedios de la cadena de transporte de electrones, quisimos evaluar la hipotética función de esta cadena respiratoria en la formación de ROS, tras un tratamiento con Itraconazol. A tal fin, se utilizó rotenona, un inhibidor específico del complejo I (NADH deshidrogenasa: ubiquinona oxidoreductasa). La concentración de rotenona fue 0.156 mM, escogida a partir de estudios similares con AmB y MF [48,50,54]. Esta dosis causa una disminución del crecimiento celular (medida como absorbancia), pero las células permanecen viables [48,50,54].

La adición de rotenona a un cultivo exponencial (YPD -37°C) conteniendo Itraconazol (0,3 μ g/ml), neutralizó la acción inhibitoria del antifúngico, tanto en las células del tipo parental como del mutante $atc1\Delta/ntc1\Delta$ nulo, siendo la cinética de crecimiento con rotenona muy similar a la del ensayo control, sin tratar (Figura 4.18). De nuevo, el efecto inhibitorio del azol fue más acusado en la cepa mutante que en la estirpe silvestre isogénica.

La inclusión de rotenona 0,156 mM revertió la acción tóxica del Itraconazol, restaurando la viabilidad de *C. parapsilosis* a niveles similares a los del ensayo control sin tratar (Figura 4.19). Resultados similares se registraron mediante el recuento de UFC/ml en placas de YPD sólido, inoculadas e incubadas durante 24-48 h a 37°C (Figura 4.20). Es particularmente reseñable la acción protectora de la rotenona sobre la integridad celular en ambas condiciones, reflejada en el notable incremento de las colonias, que se pudo detectar a las 10 h de tratamiento (Figuras. 4.19 y 4.20).



Figura 4.18. Acción de la rotenona sobre la capacidad antifúngica del ITR determinada a lo largo de las curvas de *C. parapsilosis*: cepa parental (Cp) y el mutante *atc1\Delta/ntc1* Δ . Alícuotas idénticas conteniendo Itraconzaol, se incubaron en ausencia o presencia de rotenona (Rot) 0,156 mM y se monitorizaron tras 1, 2, 5, 10 y 24h frente a una muestra sin tratar.

Ya que la acumulación significativa de ROS causa daños notables sobre macromoléculas esenciales de la célula, como proteínas, lípidos de membrana o el ADN, evaluamos a continuación si la rotenona actuaba inhibiendo la formación intracelular de ROS tras la posterior adición de Itraconazol. Para ello, una alícuota de células exponenciales fue pretratada durante 1 h a 37°C con 0,156 mM Rotenona, e inmediatamente expuesta con 0,3 μ g/ml Itraconazol durante otra hora; siendo la producción de ROS cuantificada mediante citometría de flujo [48,54]. La presencia de rotenona dio lugar a un menor nivel de acumulación intracelular de ROS en los dos tipos celulares, en comparación con idénticas células incubadas en ausencia del

inhibidor de la cadena respiratoria (Figura 4.21). En consecuencia, nuestros resultados permiten colectivamente concluir que la acción deletérea del Itraconazol sobre *C. parapsilosis* requiere la participación, al menos en parte, de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.



Figura 4.19. Análisis del efecto de la rotenona sobre la viabilidad celular en medio YPD líquido de cultivos de C. parapsilosis parental (Cp) y el mutante nulo atc1 Δ /ntc1 Δ . Las células se incubaron en YPD líquido medio en ausencia o presencia de rotenona 0,156 mM durante 1h y 10h a 37°C, momento en el que se realizaron diluciones seriadas que se dispensaron en placas de YPD, posteriormente incubadas durante 24 o 48 h. El recuento del número viables se realizó en un contador manual, estimando entre 30 y 300 colonias por placa. Se aplicó validación estadística mediante Mann-Whitney-Wilcoxon, siendo las diferencias de las medias significativas a P<0,01 (**).



Figura 4.20. Representación del crecimiento colonial en medio YPD sólido de las cepas de *C. parapsilosis* examinadas en esta Memoria. Se partió de muestras celulares iguales recogidas en crecimiento exponencial de ambas cepas. A continuación, fueron sometidas durante 1h(A) y 10 horas (B) de tratamiento a 37°C con Itraconazol (ITR) 0,3 μ g/ml e ITR 0,3 μ g/ml + rotenona 0,156 mM. Se realizaron diluciones seriadas y 5 μ l de cada dilución se dispensaron en forma de gota ("spot") sobre el medio YPD sólido. Las placas se incubaron 24 h o 48 h a 37°C antes de ser fotografiadas.

Efecto de los azoles sobre la morfología celular de Candida parapsilosis

Los análisis de viabilidad se completaron con un estudio de la morfología levaduriforme mediante microscopía óptica, con el fin de observar las posibles alteraciones producidas sobre las células de C. *parapsilosis* por la acción de los antifúngicos Fluconazol e Itraconazol.



Figura 4.21. Análisis de la inclusión de rotenona sobre la producción de ROS en cultivos de *C. parapsilosis* parental y *atc1* Δ /*ntc1* Δ tratados con el antifúngico ltraconazol. Los histogramas muestran los resultados recogidos al analizar el paso de 10.000 células por el citómetro de flujo, tras la aplicación de los siguientes tratamientos: ITR (0,3 µg/ml) e ITR (0,3 µg/ml) + rotenona 0,156 mM, junto con el control positivo (H₂O₂) para determinar la producción de ROS. El área representada en gris corresponde al control negativo del ensayo (muestras sin tratar) y las regiones coloreadas en verde, naranja y azul a la exposición con H₂O₂, ITR e ITR+ Rot 0,156mM respectivamente.

Cultivos en fase exponencial fueron analizados mediante la técnica de microscopía interferencial de Nomarski. Se realizaron fotografías de las muestras celulares a 1, 3, 10 y 24 horas del tratamiento, pero centramos el estudio en las micrografías de muestras tomadas las 24 horas, cuando fueron apreciadas más evidencias de cambios morfológicos debido a la aplicación de los antifúngicos.

En las micrografías tomadas del ensayo control (sin tratar), se advirtió que ambas cepas presentan una morfología levaduriforme típica denominada blastoconidio o blastospora (Figura 4.22), correspondiente a células que se reproducen asexualmente por gemación polar (Figura 4.22). Por otro lado, con el tratamiento de ambos azoles, tuvo lugar una disminución aparente del volumen celular, así como del número de

células por campo, coincidente con los resultados de viabilidad en el mutante, siendo más evidente en el mutante nulo.

Igualmente, las células tendieron a la formación de agregados que se intercalaron con estructuras tipo pseudohifa (células que permanecen unidas a la madre después de dividirse), claramente apreciables en las células silvestres (Figura 4.22). La aplicación del tratamiento con Fluconazol (1,0 μ g/ml) provocó la aparición del mismo tipo de agregados celulares, aunque de manera menos evidente, y apenas presentó agrupaciones con apariencia de pseudohifas.



Figura 4.22. Fotografías correspondientes a la observación microscópica por contraste interferencial de Nomarski (100x) del efecto sobre la morfología de las dos cepas de C. *parapsilosis* con los tratamientos de los antifúngicos FLZ e ITR después de 24 horas de tratamiento a 37°C. Muestra células levaduriformes o blastoconidios (flecha negra), células reproducidas por gemación (flecha roja) y pseudohifas (flecha amarilla).

Capacidad de *C. parapsilosis* para desarrollar biofilms en presencia de Itraconazol

Las infecciones por especies del género *Candida* que cursan con la formación de películas sobre superficies o sustratos sólidos (biofilms) representan una grave amenaza para la salud de pacientes sujetos a una hospitalización prolongada, especialmente los que padecen un status inmunocomprometido [50,51]. Una complicación importante surge por las escasas terapias disponibles para combatir los biofilms resistentes a antibióticos [55]. La posible eficacia del Itraconazol contra el desarrollo de biofilms preformados en placas de estireno (ver Métodos) ha sido evaluada en las dos cepas de *C. parapsilosis* objeto de estudio.

La viabilidad de las células "sésiles" formadoras de biofilms activos se ha evaluado mediante el ensayo de reducción del XTT (ver Métodos). la incubación de biofilms preformados de las dos cepas con los antifúngicos ensayados durante 24 horas, produjo un notable descenso en todos los casos en la actividad metabólica de las células sésiles fijadas (Figura 4.23).



Figura 4.23. Actividad mitocondrial de las células formadoras de biofilms en *C. parapsilosis* y su mutante expuestas a los diferentes tratamientos. La actividad metabólica de las biopelículas formadas durante 24h en placas de 96 pocillos de fondo plano, se cuantificó mediante el ensayo de reducción de XTT (ver Métodos). Se registraron diferencias estadísticamente significativas (* = P <0.05) y (*** = P <0.001) con respecto a un control no tratado según el test U de Mann-Whitney.

De nuevo, el mutante mostró una mayor susceptibilidad y la acción inhibitoria del Itraconazol sobre el biofilm fue mayor que la del Fluconazol (Figura 4.23). Es destacable que la presencia de peróxido de hidrógeno produjo una menor tasa de biofilms funcionales en el mutante, siendo similar a la registrada con el Fluconazol (Figura 4.23). El conjunto de estos datos refuerza la estrategia de utilizar el metabolismo de la trehalosa como una prometedora diana antifúngica en levaduras patógenas.

CONCLUSIONES

De forma general, las conclusiones de este epígrafe experimental recogido en la presente Memoria apoyan la participación de un estrés oxidativo intracelular como un mecanismo que contribuye a la acción tóxica de los antifúngicos azólicos. En algún caso, deben considerarse como preliminares y no definitivas, siendo necesario realizar un trabajo experimental adicional para ratificar los resultados. No obstante, permiten encauzar investigaciones posteriores sobre la susceptibilidad de *Candida parapsilosis* a los antifúngicos de uso clínico aquí analizados, tomando como modelo la carencia de las enzimas que participan en la hidrólisis de trehalosa. Ello supone una mayor concentración endógena de este disacárido de gran importancia en la fisiología de las levaduras. A partir de estas premisas, los datos experimentales obtenidos sirven para formular las siguientes conclusiones:

- I. El contenido intracelular de trehalosa aumenta en respuesta al tratamiento antifúngico aplicado, siendo más evidente en el caso de Anfotericina B y menos relevante con los dos azoles utilizados: Fluconazol e Itraconazol.
- II. La carencia de los genes ATC1 (codifica la actividad trehalasa ácida) y NTC1 (codifica la actividad trehalasa neutra), provoca un aumento en la sensibilidad de *C. parapsilosis* frente a Anfotericina B e Itraconazol, afectando significativamente la viabilidad celular en respuesta a ambos antifúngicos.
- III. La eficacia tóxica del tratamiento con Anfotericina B e Itraconazol sobre C. parapsilosis se incrementa con el tiempo de incubación, lo que implica una elevada estabilidad de los antifúngicos.
- IV. La exposición a Micafungina, aunque inicialmente dio lugar a un aumento en el porcentaje de viabilidad, cuando los cultivos se someten a un tratamiento a largo plazo, apenas causa variaciones reseñables durante 24 horas, indicando baja susceptibilidad in vitro a las equinocandinas por parte de *C. parapsilosis*.
- V. La doble ausencia funcional de las dos trehalasas puede potenciar la acción tóxica de los azoles en C. parapsilosis, lo que se traduce en una menor tasa de supervivencia en el mutante atc1Δ/ntc1Δ. La mayor susceptibilidad corresponde a la acción fungicida de Itraconazol, siendo menor con Fluconazol.
- VI. Los niveles de las actividades enzimáticas medidas: Catalasa y Superóxido dismutasa (SOD) mostraron variaciones tanto en función del antifúngico

aplicado (Anfotericina B, Micafungina, Fluconazol e Itraconazol), como de cada cepa específica de C. parapsilosis: especie parental y mutante deficiente en la hidrólisis de la trehalosa (atc 1Δ / ntc 1Δ).

- VII. Las determinaciones concurrentes de la producción endógena de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del potencial de membrana mitocondrial, confirman que en C. parapsilosis la generación de un estrés oxidativo intracelular, constituye un importante mecanismo de toxicidad inducido por Anfotericina e Itraconazol, siendo casi inapreciable en el caso de Micafungina y del otro azol utilizado: Fluconazol.
- VIII. Las dos cepas investigadas en esta Memoria son capaces de formar biofilms funcionales. La adición de los azoles produjo una reducción notable en la actividad metabólica de las células sésiles constitutivas de dichos biofilms preformados durante 24 horas. dicha reducción fue mayor en el mutante nulo y en presencia de Itraconazol respecto al Fluconazol. A su vez, el peróxido de hidrógeno también fue capaz de afectar la viabilidad de las células sésiles.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL METABOLISMO DE LA TREHALOSA EN LEVADURAS

INTRODUCCIÓN

En el Capítulo I de esta Tesis Doctoral se han descrito en detalle las principales propiedades físico-químicas, los distintos aspectos biológicos, así como el interés en ciencia básica y las potenciales aplicaciones de la trehalosa. A partir de estas consideraciones y, motivados en parte por los drásticos cambios en el trabajo de investigación derivados de la dramática aparición de la pandemia de COVID-19 a comienzos de 2020, se ha planteado un segundo bloque independiente del anterior con el fin de completar la Memoria. Este capítulo se ha centrado en el estudio bioinformático detallado de los genes involucrados en las rutas metabólicas de la trehalosa, tanto la biosíntesis como la hidrólisis. A continuación, se presenta una breve introducción que resume las principales propiedades de las mismas. Para disponer de una información más extensa, se debe consultar la primera parte de esta Tesis Doctoral.

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glucosídico tipo α : 1-1 (α -D- glucopiranosil, α -D glucopiranósido). Este disacárido está ampliamente conservado a lo largo de la evolución en una variedad de organismos procariotas y eucariotas, donde cumple un importante número de funciones fisiológicas tales como servir de fuente de carbono, reserva de carbohidratos, protector frente al estrés nutricional y medioambiental, regulador del metabolismo, e incluso transductor de señales o como factor de virulencia [32-40]. Estas funciones de la trehalosa en la biosfera se deben tanto a su estructura química singular como a sus propiedades físicas [33-40]. La ausencia de trehalosa en vertebrados representa una excepción que podría explicarse por la evolución divergente en el linaje seguido por los invertebrados y vertebrados [29-33].

La biosíntesis de la trehalosa se realiza a través de varias vías dependiendo del sistema biológico específico estudiado. En todas ellas se genera trehalosa libre como producto final, pero difieren en los sustratos, así como en las enzimas implicadas [57]. Una descripción más pormenorizada de las mismas, incluyendo la naturaleza bioquímica de las reacciones y los organismos concretos, se recogerá en los apartados correspondientes a las actividades trehalosa sintasa y trehalosa fosfatasa. Por el contrario, la hidrólisis del disacárido se limita esencialmente a la acción catalítica de la enzima trehalasa, una α -glucosidasa que tiene a la trehalosa como único sustrato. La

trehalasa rompe el enlace glucosídico $\alpha,\alpha-1,1$ del disacárido para producir dos moléculas de glucosa [29,40,42].

A continuación, se recupera un esquema global de las reacciones metabólicas implicadas en la biosíntesis e hidrólisis de trehalosa, ya incluido en el capítulo I.



Figura 4.1. Enzimas implicadas en el metabolismo de trehalosa: A) Primera etapa de la biosíntesis (sintasa); B) Segunda etapa de la biosíntesis (fosfatasa) y C) Hidrólisis (trehalasas).

Posibles relaciones filogenéticas en el metabolismo de la trehalosa entre procariotas y eucariotas.

La presencia de trehalosa ha sido ampliamente documentada en la biosfera, estando presente tanto en organismos procariotas (arqueas y bacterias) como eucariotas (hongos, insectos, crustáceos, invertebrados y plantas), pero no en vertebrados [29,56-58]. Los análisis filogenéticos realizados revelan una notable divergencia, consistente con las distintas funciones realizadas por el disacárido, siendo utilizado como fuente de carbono exógeno y soluto compatible en numerosas bacterias, mientras en hongos y plantas

actúa como protector de la integridad celular en respuesta a estrés y compuesto de reserva. A su vez, en los insectos la trehalosa es el principal azúcar presente en la hemolinfa y otros tejidos, siendo movilizado como fuente de energía durante el vuelo [29,32,33,42]. Sin embargo, resulta sorprendente que las bacterias hayan desarrollado un sistema genético muy elaborado que incluye hasta cinco rutas metabólicas diferentes involucradas en la biosíntesis de trehalosa, mientras los eucariotas sólo disponen de una sola vía [57]. Además, los dos genes, *TPS1* (trehalosa sintasa) y *TPS2* (trehalosa fosfatasa), están presentes en "clusters" génicos que codifican proteínas independientes en bacterias [33,57,59,60]. Por el contrario, en muchos hongos y plantas ambos dominios aparecen fusionados en una sola proteína [57,60].

Por su parte, las trehalasas, enzimas responsables de la hidrólisis de trehalosa, han sido descritas en los mismos grupos de organismos, con la diferencia de estar presentes también en vertebrados. Todas las trehalasas se han clasificado dentro de las familias glicósido hidrolasas 37 (GH37), GH65 y GH15, de acuerdo con la base datos Carbohydrate-Active enZyme (CAZy) database [61]. La familia GH37 contiene esencialmente trehalasas de tipo neutro, mientras la GH65 incluye a las enzimas denominadas "ácidas" junto con algunas actividades trehalosa fosforilasa. A su vez, las trehalasas descritas en varias especies de arqueas termoacidófilas, han sido incluidas en la nueva familia GH15 [57,61]. Los dominios catalíticos (CDs) de estas enzimas habitualmente contienen una estructura tipo barril (α/α)₆ con dos aminoácidos altamente conservados, aspártico (Asp) y glutámico (Glu), que funcionan como residuos catalíticos esenciales en un mecanismo invertido [40,58,62].

OBJETIVOS

El objetivo primordial planteado en este capítulo, ha consistido en realizar un análisis bioinformática individual y detallado, de los cuatro sistemas enzimáticos principales implicados en el metabolismo de la trehalosa: (i) trehalasa neutra, (ii) trehalasa ácida, (iii) trehalosa sintasa y (iv) trehalosa fosfatasa, a partir de las secuencias de genes y las correspondientes proteínas depositadas en bases de datos con acceso directo. El estudio se ha centrado en un grupo de levaduras patógenas oportunistas clasificadas dentro del género *Candida*.

El plan de trabajo seguido ha sido el siguiente:

1. Búsqueda y alineamiento de las secuencias genómicas y proteicas.

2. Estudio comparativo de las características esenciales que presentan las enzimas en un conjunto de especies con alta incidencia clínica (*C. albicans, C. orthopsilosis, C. tropicalis, C. maltosa, C. dubliniensis, C. parapsilosis y C. auris*). Con fines comparativos, se ha incluido *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Análisis filogenético comparando árboles filogenéticos derivados de la comparación de secuencias.

4. Análisis de la conformación de los centros catalíticos activos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se escogieron las secuencias de las cuatro enzimas clave en el metabolismo de la trehalosa en la levadura modelo S. cerevisiae: trehalasa neutra (Nth1p/ Ntc1p) [N° acceso en NCBI=GFP64010], trehalasa ácida (Ath1p/Atc1p) [N° acceso en ſN NCBI=NP 015351], trehalosa-6-fosfato sintasa Tps1p acceso en NCBI=AEP68509] y trehalosa-6-fosfato fosforilasa Tps2p [N° acceso en NCBI=AJV11777]. Se examinaron dos bases de datos, una más generalista: Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) [63] y otra más específica: Candida Genome Database (http://www.candidagenome.org/) [64], que contienen las secuencias genómicas de varias especies de Candida, centrándonos en las descritas como patógenos humanos. La muestra prioriza dos especies de Candida, que son objeto de estudio preferente por nuestro grupo: la altamente prevalente *C. albicans* y el patógeno con elevada incidencia en neonatos, C. parapsilosis. El estudio también ha incluido el hongo oportunista emergente C. auris, junto con otras levaduras clasificadas como "noalbicans", tales como C. dubliniensis, C. tropicalis, C. orthopsilosis y C. maltosa.

Posteriormente, se realizaron apilamientos de las secuencias, para identificar aquellas regiones de las proteínas que coincidan con el dominio catalítico de las glicosidasas usando el programa Clustal Omega [65]. Los sitios potenciales de N-glicosilación de determinaron en el servidor PROSITE <u>https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/scanprosite_form.cgi?PS00001</u> enfrentando las secuencias al patrón PS00001 N-{P}-[ST]-{P} [66]. En paralelo, la secuencia de aminoácidos determinada en el conjunto de los microorganismos en estudio se envió a modelar al servidor de reconocimiento y homología de proteínas Phyre2; Imperial College de Londres (Proyecto Elixir) (<u>http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index</u>) [67], que permite generar un modelo de homología más preciso.

La filogenia de las secuencias de aminoácidos de las diversas proteínas se realizó utilizando el programa ClustalW2-Phylogeny disponible en el servidor del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL-EBI) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2_phylogeny&seq uence=clustalw2-I20141008-205527-0685-78599923-es) [68].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis bioinformático de cada uno de los sistemas enzimáticos propuestos se ha realizado de forma independiente. En primer lugar, se examinó el tamaño promedio de pautas de lectura abierta (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) recopiladas para las distintas enzimas en todas las especies de *Candida* nombradas anteriormente. A continuación, se resume en la Tabla 4.1 el número de aminoácidos de cada una de ellas. Las distintas secuencias que conforman junto con sus plegamientos tridimensionales, se irán analizando en profundidad con posterioridad.

Tabla 5.1. Número de aminoácidos que constituyen la secuencia primaria de la correspondiente proteína en las especies de *Candida* y *Saccharomyces* estudiadas en la presente tesis. Se presentan los datos de las cuatro actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de la trehalosa

	Número de aminoácidos			
ESPECIES	Trehalasa	Trehalasa	Trehalosa-6-	Trehalosa
	neutra	ácida	fosfato sintasa	fosfatasa
S. cerevisiae	751	1211	495	896
C. auris	819	1082	483	878
C. orthopsilosis	893	1070	480	881
C. parapsilosis	903	1039	487	882
C. albicans	907	1078	478	888
C. dubliniensis	902	1078	478	888
C. tropicalis	884	1083	478	889
C. maltosa	895	1044	478	881

HIDRÓLISIS DE TREHALOSA: TREHALASAS

De forma inicial, esta Memoria ha abordado el estudio de los sistemas con actividad α-glicosidasa sobre trehalosa, conocidas como trehalasas (E.C. 3.2.18). En levaduras y hongos filamentosos normalmente coexisten dos patrones generales de actividad trehalasa, que se diferencian por su ubicación celular, secuencia de aminoácidos, configuración tridimensional, parámetros catalíticos, papel fisiológico y mecanismos de regulación. Son las denominadas trehalasas neutras (Nth1p/ Ntc1p) y trehalasas ácidas

(Ath1p/Atc1p). Un resumen de sus características bioquímicas y fisiológicas más relevantes se muestra en la Tabla 5.2.

Las trehalasas neutras son enzimas citosólicas que desarrollan su máxima actividad catalítica a pH neutro (7,0) siendo activadas por cationes divalentes (Mn^{2+} y Ca^{2+}) y reguladas por proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) (Tabla 5.2). La trehalasa neutra (Ntc1p o citosólica) juega un papel primordial en la degradación de la trehalosa endógena, acumulada en el citosol [40].

Tabla 5.2. Parámetros bioquímicos y propiedades fisiológicas más relevantes de las trehalasas fúngicas. Los datos se han recopilado esencialmente a partir de los modelos arquetipo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Modificada a partir de Maicas *et al.* [40].

Trehalasa neutra	Trehalasa ácida
$T_{optima} = 30 \ ^{\circ}C$	T _{óptima} = 30 °C
Mr= 180-320 kD	Mr= 400-550 kD
pH _{6ptimo} =6,5-7,5	$pH_{optimo} = 4,5-5,0$
Km (mM) = 4,8-40	Km (mM)= 1,5-4,7
Activación por Ca ²⁺ y Mn ²⁺	Activación independiente de cationes
	divalentes
Enzima citosólica soluble	Localizada en vacuolas o asociada a la
	pared celular
Hidrólisis de trehalosa intracelular en	Hidrólisis de trehalosa exógena
respuesta a estímulos fisiológicos	

A su vez, las trehalasas ácidas tienen acción catalítica a un pH óptimo de 4,5. Esta enzima ácida (Atc1p o externa), se encuentra localizada dentro de las vacuolas o está asociada a la pared celular externa y se encarga de hidrolizar la trehalosa exógena del medio. Su actividad catalítica no depende de cationes divalentes ni de fosforilación mediada por proteínas quinasas. En numerosos hongos está sometida a represión catabólica por glucosa [37,40,56,62].

Trehalasas neutras (Nth1p/ Ntc1p)

En el primer epígrafe de este capítulo, se estudian las trehalasas neutras, enzimas citosólicas que actúan a pH neutro (7.0), son activadas por cationes divalentes (Ca^{2+} y Mn^{2+}) y reguladas por fosforilación reversible mediada por proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) (Tabla 5.2). Estas enzimas presentan valores elevados de actividad específica en presencia de azúcares fermentables y son inhibidas por Mg²⁺. La trehalasa neutra (Ntc1p o citosólica) juega un papel fisiológico primordial en la degradación de la trehalosa endógena, acumulada en el citosol, en respuesta a cambios en las condiciones ambientales o nutricionales del medio [32,33,42,56].

Búsqueda *in silico* de potenciales actividades trehalasa neutra en especies del género *Candida*

El gen *NTC1* se localiza en el cromosoma 1 de *C. albicans*. La pauta abierta de lectura (ORF) corresponde a 2.724 pares de bases, que codifican una proteína de 907 aminoácidos con un Mr estimado de 104 kDa y dos sitios putativos para la fosforilación por cAMP-PKA, aunque no se han encontrado motivos de activación por cationes divalentes. Comparte un 57% de identidad con el gen *NTH1* de *S. cerevisiae*. La proteína Ntc1p también interviene en la movilización fisiológica de trehalosa endógena, aunque aparentemente no está involucrada como factor de patogenicidad en *C. albicans*, ni tampoco en la conversión dimórfica de levadura a hifa para formar una estructura miceliar [69].

A su vez, la comparación de las respectivas secuencias de aminoácidos utilizando el programa GAP del paquete de software GCG [69] confirmó una identidad similar del 57% entre las trehalasas neutras Nth1p de *S. cerevisiae* y Ntc1p de *C. albicans*. Sin embargo, la trehalasa neutra de *C. albicans* es 156 aminoácidos más larga que su análoga de *S. cerevisiae*, localizándose este segmento adicional en el extremo N-terminal de la molécula (20]. Igualmente, la secuencia de aminoácidos deducida mostró dos sitios potenciales de fosforilación dependientes de AMPc-PKA: Arg/ Arg/ Met/ Ser en la posición 7 y Arg/ Arg/ Leu/ Ser en la posición 210 [40,58,69]. En la Figura 5.2 se muestra el apilamiento de secuencias de la trehalasa neutra de *S. cerevisiae* y las especies de *Candida* seleccionadas en esta Tesis Doctoral.

	ð 1 (,	
5 cerevisiae	FDNVSPFKKTGFGKLQQTRRGSEDDTYSSSQGNRRFFIEDVDKTLNELLA	111
Cauris	YHDVTSTDSLGGTTKPVEIQAPRP-ISQRRASLDSSILAPKKFYINDIDMTLKELLQ	166
C orthopsilosis	YOHEDNSQSLAPP PONT - LHFRRASLDDS ILRPKKYYISDVQETLKELLE	238
C parapsilosis	YOHEDNSOSLAPP PONT - LHFRRASLDDS ILRPKKYYISDVOETLKELLE	248
C albicans	YHDNISOESVIRNANTPTTYNREK-FHLRRGSLDESTFIRPKKYYINDVOGTLRELLA	239
C dubliniensis	YHDNISRDSVIRNANTPTTYNREK-FHLRRGSLDESTYVRPKKYYINDVOGTLKELLA	239
C tropicalis	YNDEIPODSVASLNSSREK-FHLRROSLDENDLRPKKFYINDVOGTLDELLA	243
C maltosa	YHDNTSÖESFASLSREK-FHLRRGSVDEAYLRPKKFYINDVOGTLDELLA	239
	···· ** * * · · ····* ** ***	
S cerevisiae	AEDTDKNYQITIEDTGPKVLKVGTANSYGYKHINIRGTYMLSNLLQELTIAKSFGRHQIF	171
Cauris	NEDTDHNFQITIEDSGPKVLNLGTANSNGYNQFAVRGTYQLSNLLQELTIAKRFGRNQMI	226
C orthopsilosis	NEDTDNNCQITIEDTGPKVLRLGTANSNGFKSSSVRGTYMLSNLLQELTIASRFGRHQII	298
C parapsilosis	NEDTDNNCOITIEDTGPKVLRLGTANSNGFKSSSVRGTYMLSNLLQELTIASRFGRHQIV	308
C albicans	NEDTDNNCOITIEDTGPKVLRLGTANSLGINOSSIRGTYRLSNLLOELTIASRFGRHOIV	299
C dubliniensis	NEDTDNNCOITIEDTGPKVLRLGTANSLGINOSTIRGTYRLSNLLOELTIASRFGRHOIV	299
C tropicalis	NEDTDNNCOITIEDTGPKVLRLGTANSLGFYOTSVRGTYMLSNLLOELTIASRFGRHOII	303
C maltosa	NEDTDNNCOITIEDTGPKVLRLGTANSGGFYOSTIRGTYMLSNLLOELTIASRFGRSOII	299
-	**** * ****** ***** **	

Trehalase Ca binding domain pfam (07492)

Alfa, alfa-trehalase pattern (PLN02567)

	PS00927		
S conquising		303	
Counic		380	
C onthonsilosis		161	
C_orthopsilosis		404	
C_parapsilosis		474	
C_albicans	TATRPDPQA-PDSGSLTSWPYVVPGGRENELYGWDSYMETLGLLTDVKTDPSGNPRNLRH	472	
C_dubliniensis	TATKPDPET-PGNLISWPYVVPGGRENELYGWDSYMETLGLLTDVKIDPSGNPCNIKH	470	
C_tropicalis	IATKPDPNDSKNLISWPYVVPGGRENELYGWDSYMETLGLLTDVLPGKNLRH	469	
C_maltosa	TATKPDPHDPKNLTSWPYVVPGGRFNELYGWDSYMETLGLLTDVNGNKNLRH	4/1	
	* . ** ********************************		
S conovicion		380	
Counic	LOL SPONTENETVETVHYNKTI NANRSYYL GROODDEL TOMAL RVEEKTLEL NDNSODDA	110	
C authorsilasis		E24	
C_OPEROPSILOSIS	LELARGHVENFITEIETTGKILNANRSTTLGRSQPPFLTDMALRVFNKTVETNPGDVNEA	524	
C_parapsilosis	LELARGMVENFIFEIEYYGKILNANRSYYLGRSQPPFLIDMALRVFNKIVEIDPGDVNEA	534	
C_albicans	LELARGMAENFIYEIHHYGKILNANRSYYLGRSQPPFLIDMALRIFNKIIEVIPELMDEA	532	
C_dubliniensis	LELARGMAENFIYEIHHYGKILNANRSYYLGRSQPPFLTDMALRIFNKTIEVAPESMDDA	530	
C_tropicalis	LELARGMAENFIYEIHHYGKILNANRSYYLGRSQPPFLTDMALRIFNKSKEVLPDESKDR	529	
C_maltosa	LELARGMAENFIYEIHHYGKILNANRSYYLGRSQPPFLTDMALRIFNKTIEVSPELMDDA	531	
	···****.******************************		
c		110	
S_cerevisiae	VDLLKRAFQASIKEYKTVWTASPRFDPETGLSRYHPWGLGIPPETESDHFDTVLLPYASK	440	
C_auris	LDFLKRSTLAAIKEYDTVWVCKPKLDERTGLSCYHPDGEGIPPETEASHFNAILAPYLKK	509	
C_orthopsilosis	VDFLRRSTLAAIKEYETVWCCPPRLDKRTGLSCYHPEGKGIPPETEASHFNAILKKYVEK	584	
C_parapsilosis	VDFLRRSALAAIKEYETVWCCSPRLDERTGLSCYHPEGKGIPPETEASHFNAILKDYVEK	594	
C_albicans	IDFLKRATLAAIKEYETIWCAHPRLDDKTGLSCYHPEGKGIPPETEPTHFNALLKPYLAK	592	
C_dubliniensis	IDFLKRATLAAIKEYETIWCAHPRLDDKTGLSCYHPEGKGVPPETEPTHFNAVLKPYLAK	590	
C_tropicalis	LDFLQRATLAAIKEYETIWCAKPRLDEKTGLSCYHPEGKGVPPETEATHFDAVLKEYLEK	589	
C maltosa	IDFLKRATLAAIKEYETIWCAKPRLDERTGLSCYHPEGKSVPPETEATHFDAVLKEYVDK	591	
	:*:*:*: *:****.*:* . **:* .**** ***:* .:***** **:::* * *		
	THE REPORT OF A DESCRIPTION OF A		
S_cerevisiae	H-GVTLDEFKQLYNDGKIKEPKLDEFFLHDRGVRESGHDTTYRFEGVCAYLATIDLNSLL	499	
Cauris	H-NVTQPEFIEMYNAKQVHEPDLDEYFLHDRAVRESGHDTSYRLEGKAAYLATVDLNSLI	568	
C orthopsilosis	Y-GISOEEFIEKYNNEEIKEPKLDEYFLHDRAVRESGHDTSYRLEGKCAYLATVDLNSLL	643	
C parapsilosis	Y-GISŐAEFIEKYNNEEIKEPKLDEYFLHDRAVRESGHDTSYRLEGKCAYLATVDLNSLL	653	
Calhicans	VNDTDOL DETEK VNSGETKEPEL DEVEL HDRAVRESGHDTSVRLEGKCAVLATVDLNSLL	652	
C dubliniensis	VGGTDOL DETEKYNSGETOEPEL DEVEL HDRAVRESGHDTSYRLEGKCAVLATVDLNSLL	650	
C tropicalis		649	
C_maltora		650	
C_marcosa	* . **** ***.***** ***********	000	
	PS00928		
S_cerevisiae	SISRPIRQWDYPFGWAPHQILAWEGLRSYGYLTVTNRLAYRWLFMMTKAFVDYNGIVVEK	675	
C_auris	SISRPSRQWDYPYGWAPQQMLAWIGLTNYNYNGAARRLAYRWLYMMTRAFVDYNGVVVEK	744	
C_orthopsilosis	GLSRPSRQWDYPFGWAPQQILAWIGLVNYGYDGIARRLAYRWLYMMTKSFVDYNGVVVEK	818	
C parapsilosis	GLSRPSROWDYPFGWAPOOILAWIGLVNYGFDGIARRLAYRWLYMMTKSFVDYNGVVVEK	828	
C albicans	GLTRPSROWDYPFGWAPOOILAWIGLVNYGYDGIARRLAYRWLFMMTKSFVDYNGVIVEK	832	
C dubliniensis	GLTRPSROWDYPEGWAPOOILAWIGLVNYGYDGIARRLAYRWLEMMTKSEVDYNGVTVEK	827	
Ctropicalis	GLTRPSROWDYPEGWAPOOTLAWTGLVNYGYDKTAORLAYRWLYMMTKSEVDYNGVAV/EK	819	
C maltosa	GLTRPSROWDYPEGWAPOOTLAWTGLVNYGYDGTARRLAYRWLEMMTKSEVDYNGAA/EK	820	
C_11011036	· · ** ****** · **** · * · ** * * · · ******	020	
		(

Figura 5.2. Apilamiento ordenado de las trehalasas neutras correspondiente a las siete especies de *Candida* seleccionadas, así como la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. El protocolo de análisis informático seguido se describe en Materiales y Métodos. Para otros detalles, ver el texto.

Una búsqueda de motivos de proteínas en Ntc1p reveló dos coincidencias significativas con las trehalasas. Se localizó un dominio de unión a calcio de trehalasa neutra similar al dominio de Zinc EF. En la región N-terminal de la proteína (secuencia consenso DTDNNCQITIED). Todos los residuos cruciales coincidieron con la secuencia de consenso descrita en todas las trehalasas fúngicas neutras putativas y completamente caracterizadas (Figura 5.2). Las regiones central y C-terminal de la proteína se correlacionan con el dominio catalítico de la familia de la glicosil hidrosilasa 37 (aminoácidos 300-874) [58]. A partir del alineamiento de secuencias, se determinó el grado de homología entre pares de bases entre las levaduras patógenas de análisis preferente C albicans y C. parapsilosis, con respecto al gen NTC1. Se encontró una correspondencia del 68% en aminoácidos idénticos y un 77% de aminoácidos similares (Figura 5.2). El tamaño promedio de los ORF recopilados para el resto de especies estudiadas es de 2.637 nucleótidos, equivalentes a 879 aminoácidos (Figura 5.2). Destacamos por su interés como patógeno emergente C. auris, que presenta resistencia múltiple a los antifúngicos. Su ORF está constituido por 2.457 pares de nucleótidos que equivalen a 819 aminoácidos de la proteína Ntc1p (Figura 5.2). Tras el análisis mediante el algoritmo NCBI-Blast comparativo entre C. parapsilosis y C. auris, se encontró un 66% de identidad completa en aminoácidos y un 80% de aminoácidos similares en la trehalasa neutra. Utilizando el programa de búsqueda NCBI-Blast, así como Clustal.omega se realizaron alineamientos entre las dos principales especies de *Candida* estudiadas por nuestro grupo y el resto de especies "no-albicans", entre las que cabe destacar de nuevo a *C. auris* (Figura 5.2).

Tomando como ejemplo la secuencia de *C. parapapsilopsis* (ORF CPAR2_803760), y realizando un análisis *in silico*, se puede comprobar que codifica un polipéptido putativo de 903 aminoácidos, con un peso molecular de 103,2 kDa y un pI de 5,72. Además, se pueden identificar hasta seis sitios de N-glicosilación localizados en las posiciones de los aminoácidos 333, 390, 434, 499, 830 y 863. El análisis completo de sitios de N-glicosilación muestra una elevada variabilidad por lo que respecta a la cantidad de lugares potenciales susceptibles entre diferentes secuencias [29,40,56-60], pero con dos de ellos altamente repetidos (NLTR y NVTK) y otros dos presentes en todas las levaduras examinadas (NRSY y NASY) (Tabla 5.3).
Especies	Sitios de N-	Posición sitios más comunes			
	glicosilación	NLTR	NRSY	NVTK	NASY
S. cerevisiae	5		348		710
C. auris	4		414		779
C. orthopsilosis	4		489	820	853
C. parapsilosis	6	333	499	830	863
C. albicans	9	324	497	834	867
C. dubliniensis	10	324	495	829	862
C. tropicalis	10		494	821	854
C. maltosa	6		496	822	855

Tabla 5.3. Sitios potenciales de N-glicosilación en las trehalasas neutras.

En paralelo, se enviaron las secuencias de la trehalasa neutra de *S. cerevisiae* y de las candidas al servidor Phyre que generó estructuras compatibles con el modelo más cercano (*S. cerevisiae*) (Figura 5.3). Detalle molecular de esta molécula, resaltando la posición del centro catalítico, en Figura 5.4A. La superposición de estructuras moleculares de la trehalasa neutra en *C. albicans* y *S. cerevisiae* muestra la presencia de los residuos catalíticos conservados Asp y Glu, en posiciones equivalentes (Fig. 5.4B).

El servidor Phyre2 generó un modelo de homología para la proteína Ntc1p de *C. parapsilosis* que comprende el centro catalítico activo de la enzima (aminoácidos 282-890) [30,31]. A partir de estos alineamientos y analizando la secuencia proteica completa, se determinó que tal y como ocurre con la trehalasa ácida (ver después), en los cuatro primeros bloques de la secuencia y comenzando por el extremo N-terminal, aparece un tramo vacío carente de aminoácidos tanto en *S. cerevisiae* como en *C. auris* y en menor medida en *C. maltosa* (Figuras 5.2 y 5.3). No tenemos una explicación plausible para esta observación tan sorprendente. Así mismo, consideramos que el grado de alineamiento máximo ocurre entre las especies *C. albicans y C. dubliniensis*, con un 92% de aminoácidos idénticos (Figura 5.2). Existe un alto grado de similitud entre *C. albicans y C. parapsilosis* como se expuso anteriormente (68%) y aunque *C. auris* parece ser la levadura con menor homología en esta enzima respecto al resto de especies consideradas, sí mantiene un alto grado de identidad con *C. parapsilosis*, que se manifiesta en un 67% de equivalencia de aminoácidos conservados (Figura 5.2).



Figura 5.3. Modelos tridimensionales (3D) de la trehalasa neutra obtenido para las siguientes especies de levaduras: a) *Saccharomyces cerevisiae* (modelo cristalizado, n6nC_) b) *Candida maltosa* (60%), c) *C. albicans* (59%), d) *C. tropicalis* (59%), e) *C. parapsilopsis* (58%), f) *C. orthopsilopsis* (58%), g) *C. dubliniensis* (58%) y h) *C. auris* (57%). Identidad en % respecto al modelo cristalizado (maltosa fosforilasa de *Lactobacillus brevis*, c1h54B).



Figura 5.4. (A) Detalle molecular de la estructura secundaria de trehalasa neutra en *C. albicans.* El área catalítica aparece marcada con un círculo azul. (B) Superposición de las moléculas Ntcp/Nth1p de *C. albicans* y *S. cerevisiae* resaltando las posiciones críticas de los aminoácidos Asp y Glu, esenciales para la actividad catalítica. La imagen ha sido modificada a partir de Maicas *et al.* [40].

Establecimiento de árboles filogéneticos a partir de la comparación de secuencias

Se rastrearon las bases de datos para realitzar comparaciones a niveles intra e interespecífico de las secuencias, pudiéndose esbozar posibles relaciones filogenéticas y establecer dendrogramas específicos y relacionar las especies de *Candida* (Figura 5.5).





Podemos colegir que la molécula tipo de todas las levaduras secuenciadas proviene de un ancestro común, que sufrió una división independiente quedando separadas de *S. cerevisiae.* Las especies situadas más próximas entre sí son *C. maltosa y C. tropicalis* por un lado y *C. albicans y C. dubliniensis* por otro. Ambas comparten un ancestro común que debe haber sufrido dos divisiones, a diferencia de *C. parapsilosis* que habría experimentado una sola división, lo que permite diferenciarla de *C. auris*, pero también explicaría por qué el grado de homología entre ambas es mayor (Figura 5.5).

Trehalasas ácidas (Atc1p/ Atc1p)

El segundo epígrafe de este Capítulo II, abordará la caracterización filogenética de las trehalasas ácidas, enzimas con una localización en el interior de las vacuolas o en la superficie celular externa (Tabla 5.2), dependiendo de la levadura. Se continuó con el mismo protocolo bioinformática sobre el estudio comparativo intra e interespecífico de las secuencias genómicas en el grupo de levaduras seleccionadas, examinadas en las bases de datos Genebank y *Candida* Genome Database. Entre todas ellas, el estudio ha priorizado, como en el epígrafe anterior, las especies altamente prevalentes en patología humana, *C. albicans, C. parapsilosis* y la oportunista emergente *C. auris.*

Búsqueda *in silico* de potenciales actividades trehalasa ácida en especies de *Candida*

Utilizando como modelo la secuencia de trehalasa ácida de *S. cerevisiae* [40,58,78], localizamos las secuencias propias en las diferentes especies de *Candida* incluidas en esta Tesis. En la Figura 5.6 se muestra un apilamiento con las zonas más interesantes de estas secuencias. Se resaltan los dos dominios característicos de cada secuencia individual, el dominio catalítico central glicosil hidrolasa (familia 65) pfam 03636 y el pfam 03632. Si tomamos como referencia la trehalasa ácida de *C. albicans*, cuya ORF codifica un polipéptido de 1.040 aminoácidos, con un peso molecular estimado (Mr) de 116,26 kDa y un pI de 4,81 [37,62]. Igualmente, se constata que esta secuencia peptídica muestra la presencia de un péptido señal en la región amino terminal y un sitio de corte o escisión entre las posiciones 22 y 23 (Figura 5.6). La proteína resultante tiene 1.019 aminoácidos con un peso molecular (Mr) de 113,7 kDa. Asimismo, se identifican los sitios potenciales de N-glicosilación. Adicionalmente, estos sitios consenso de glicosilación se han localizado en todas las proteínas estudiadas, siendo su número variable, entre 15 y 27 (Tabla 5.4).

Dominio catalítico central glicosil hidrolasa, família 65, pfam (03636)

		4.775
5_cerevisiae	SDENTAYYDDENMILGSNLES-KNTYSRQPYVANGYIGSRIPNIGEGYALDTLNEYTD	1/5
Cauris	LEADNAYYDKSTHTI GTI DWVPHHOYOROPYVANGYI GSRTPNI GOGEAYDTI SNGTEVG	123
C_uuris		4.40
C_orthopsilosis	QESEMAE ADKELWAAGTTEESKAWAAAGATASKTENFAGAGELADAFLADAFLADAFLADAFLADAFLADAFLADAFLADA	149
C parapsilosis	OESEHAFYDRKMNVVGTTEYSKYNOFOKOPYVANGYTGSRTPNLGHGETYDOLTESPD	150
Calbianna	KESPOAEVDPHDWA/CTTEEDWENOVORODWAN/CYTCEPTDNI COCETYDOL TNEET	152
C_albicans	KESDOAFTDENDAVAGTTEFFYFAQTQAQFTYANGTTGSATFALQQFTTDQLTASST	100
C dubliniensis	KFSDOAFYDPHNNVVGTIEFPLFNOYOROPYVTNGYIGSRIPNLGOGFTYDOLTNSST	153
Ctropicalic	KESDOAEVDTTDNA/CTTEETEENOVOROPYVANCYTCSPTPNTCOCEAVDOL SNSSE	158
C_CHOPICALIS	KESDOAF ID I DI VVGTTEFTEFNOTOKOFTVANGTIGSKI FNITGOGFATDQLSNSSE	100
C maltosa	KFSDHAFYDTTANTVGTIEFPVFNOYOROPYVANGYIGSRIPNLGHGFTYDOLTNSSD	117
-	: *:** :*: : :::****:*****************	
C		220
S_cerevisiae	APGALNNGWPLRNHRFAGAFVSDFYCLQPKLNSTNFPELDDVGYSTVISSIPQ	228
Cauris	VDTPDAELPSDLSNGWPLENRRYAGAEVAGEYDLOKNTTMTNEPWLLODGYESVVAAVPO	183
C		202
C_orthopsilosis	SKKDDLYNGWPLFDKKFSGAFIAGFYDLQENTIGNNFPELLKNGYESVISAVPQ	203
C parapsilosis	SKKDDLYNGWPLFDKRFSGAFIAGFYDLQENTTGNNFPELLKNGYESVISAIPQ	204
Calbicanc	ANDROLLINGURLENKRYSCAEVACEVDLOKNTTCTNEAELLENCYESVTAAVRO	207
C_albicans	ANDDDLLNGWFLFNKKTSGAFVAGFTDLQKNTTGTNFAELLENGTESVIAAVFQ	207
C dubliniensis	ANDDDLLNGWPLFNKRYSGAFVAGFYDLQKNTTGTNFAELLENGYESVIAAVPQ	207
Ctropicalis	ANEDDI SNGURI ENKRYAGAETAGEVDTOKNTTGTNEREL I ENGVESVITAAVRO	212
c_cropicalis	ANEODESINGWELEFINKITÄGAFTÄGETDIOKNITIGTINFELLEINGTESVITÄÄVEO	ZIZ
C_maltosa	ANDDDLVNGWPLFNKRYAGAFIAGFFDIQKNTTGTNFPELLENGYESVIAAVPQ	171
	Dominio catalítico central glicosil hidrolasa, família 65, pfam (03632)	
C	AFTETROPOLI ENTARCOLEULI ANTROVANCORROL DUCUCCI CORCUCCITURI DI DI	C 4 7
5_cerevisiae	-AFTETEDDSFFEHTAV22FHFFFHTVAV22DK0FAGA20202020200000000000000000000000000	51/
C auris	GLKVEFPDNPLLTLAARASIYHLNANTRSDATGL TAAMSVTGLSSDSYGGMVFWDTDL	472
C anthony () and a		474
C_orthopsilosis	AFSLSFFINDFLLDLGSKASVTHLLANTKADAUGLIGALGVAGLSSDSYGGMVFWDTDF	4/4
C parapsilosis	QSTITEPNDPLLDLGSKASVYHLLANTRPDAOGL TGALGVAGLSSDSYGGMVEWDTDF	475
Calbinar		100
C_albicans	AFLVIFFSUSLLINLGARASTFELLAWIRFWAEGVIGALGVSGLSSUSYGGMVFWDIDL	482
C dubliniensis	TPLITEPSDPLLNLGARASIEHLLANTRPNAEGVTGALGVSGLSSDSYGGMVEWDTDL	482
Ctropicalic	CREWERSDRICH CARASVEHILLANTRODACCY TCALCUCCUSEDSYACHWENDADI	100
c_cropicalis	GELVIEFSDELENLGANASVEILELANINEDAQUVTGALGVGGESSDSTAGHVENDADE	400
C maltosa	SPLITFPSDPLLNLGARASIFHLLANTRPDAQGVTGALGVGGLSSDSYAGMVFWDADL	445
	: :*.: ** : :::*: ***** . :.* *****.*****	
	the second s	
5 corovision	WEEPALL PEEPNVAONMNNYRNATHSOAKLNAEKYGYPGATYPWTSGKYANCTS	571
5_cereviside	MELALCH HIMAGINA HISQACENALKION CATTONIS GRANCIS	571
C_auris	WMMNGLLPFSPSHARSFVNYRLHTHEQARKNLE-SDYAPKKDMNGAAYPWTSGRFGNCTS	531
Corthonsilosis	WMEKATI ALNPSHAKSTVNYRVHTHEOALKNTP-SGHEGAAYPWTSGREGNCTA	527
		500
C_parapsilosis	WMFRAILALDPTHAKSIVNYRMHTHQQALKNTP-QGYEGAAYPWTSGREGNCTA	528
Calbicans	WMI NGTI PEAPDHTKSETNYRVHI HOOATDNVP-RGYOGAVYPWTSGREGNCTG	535
C_dibitedits		555
C_dubliniensis	WMLNGILPFAPDHIKSFINYRVHLHQQAIDNVP-SGYQGAVYPWISGRFGNCIG	535
C tropicalis	WMINGTI PEAPSHAKSI TNYRI HTROOATENVP-EGYOGAVYPWTSGREGNCTA	539
Caraltana		100
C_marcosa	WHENGILPFAPAHAKSEVNTKEHTHNQAIENVP-EGTNGAVTPWTSGKFGNCTA	490
	** ** * * *** *** * ** ****************	
C conquision	TCPC//DVEVHTN//DVAMASESTVI NCHECTODEVI PVTTHPTT//NAAOEETAX// //VNSS	630
2_cerevisiae	IGPCVDTETHINVDVAHASPSITENGHEGIDDETERTTWPIIRNAAQPFTATV-RTN35	020
C auris	TGPCFDYEYHINMAVAIAAWELYKSGAVDDHFLEHSAYPLIDDAAAFFADYV-QYNET	588
Conthonsilosis	TOPOLINVEYHTNISATAMAAWELYLSGA VDDOYLESTI/VPLTNDAAVEYADY/TSYNDT	585
C_OFCHOPSILOSIS	IGPCENTE ITITISATA AWELTESGA - VODUTEESTVITETINDAAKTADIVISINDI	505
C_parapsilosis	IGPCLNYEYHINSAIAMAAWELYISGAVDDQYLESIVYPLISDAAKFYADYVISYNEI	586
C albicans	TGPCLDYEYHINMAVAMASWOLYISGAADDTELESVAYPTINDAASELAEYVVHYNDT	593
C 1 1 1 1 1		503
C_dubliniensis	IGPCLDYEYHINMAVAMASWQLYVSGAADDIFLESVAYPIINDAASFLAEYVVHYNDI	593
C tropicalis	TGPCLDYEYHINMAVAMAAWOLYISGAADDLYLETIAYPIIYDAANFFSDYVVNFNDS	597
Caralteres	TOPOL DVENHTNIMAVEMA AUOL VISCA ADDDEL ADVAVDI TNDAATEESENA/THENNIT	EEC
C_marcosa	IGFCEDTETTIMA VSMAAWQETISGA - ADDDFEADVATFEINDAATFFSETVTHFNNT	550
	**** ********* * ** ** ** ** ** **	
5 annual adver	CRAMTYRIVENAAAACI I NHCCCCCOCYL VICUU RVI RAREAOCCCOCRDUEL THEI TORAE	000
5_cerevisiae	GRAFITEVEVAAAAGLLNHGSSSQSTLTKSVLPYLKAPFAQFSEQSDDNFLTNGLTQPAF	808
C auris	GPAMTFPIFSIVSSALSEKGCSSDTYLVKAIOPFLRGPFAOFSEONNDDYSTNGGTHPAF	766
Conthongilagia	CDAMTESTESTVAANI ASSCCASOSVI HVAMODVI DCDEAOESONNDDVVCNCSTUDAE	763
C_OPTHOPSILOSIS	GLALILL STL STAAM TO SOCA SAST LUVAN ALL ROLL AND SEGMMONT V 2000 LHAL	705
C parapsilosis	GPAMTFSIFSIVAANLATSGCASQSYLHKAMOPYLRGPFAOFSEONNDNFKTNGGTHPAY	764
Calhicans	GPAMTERTESTVASNI AFTGCASOSYLHKATOREL ROPEAGEAFONNODYLTNCCTHRAE	771
C_atorcans	GLANTEL TE STANSWEAR LOCAS OSTELIKAT ÓR ELINGERA ÓR AR ÓMMODTE UNG LINAG LINAG	//1
C_dubliniensis	GPAMTFPIFSIVAANLAFTGCASQSYLHKA1QPFLRGPFAQFAEQNNDNYLTNGGTHPAF	771
C tropicalis	GPAMTEPTESWAANLAPTGCASOSYLOKATOPEL RGPEAGESEONNDNYLTNGGTHPAE	775
c_cropicails		775
C_maltosa	GPAMIFPIFSIVAANLAPIGCASQSYLQKAIQPFLRGPFAQFSEQNNDNFLTNGGTHPAF	734
	*****: :* .:: * *.:*: *:: *:*: *:*: **: *	
S cerevisiae	PELTANGGELOSTLEGLTGTRYSYEVDPDTKKTNRLLRENPTELPLLPGGTATRNEKYMN	868
C aunda		000
C_auris	PEMTAHOGELQAILQGILGLKEAHKMUNGKIVRYLKLDPIKLKTEPQGVHEDGVHYLN	824
C orthopsilosis	PELTAHGGEVOAVIHGLAGLRHSYAIDDGKISRSLELDPIALPCLGNGVOYSGTHYDN	821
(papapeilasis	DELITANCCETOMA/NCLTCL RHSVTTON CVTRRCLTL DOTAL DCL CDCVOVCCTINON	000
C_banabarrosis	FELTANGGETQAVVNGLIGERNDTTIDNGKIRKSLELDPIALPCLGDGVQYSGIHYDN	022
C_albicans	PFLTAHGGFLQAILQGLTGMRFDYTFENNKLQRLLKLDPIALPCLGEGVRFDSIKYDN	829
(dublinionsis	PELTAHOGEL OATLOGTTOMREDYTEEDNRLORTLTLDDTALDCLCCCVPEDCTVEDN	820
C_undititiensis	THE FAILOUT CATEGORY AND THE PARTY OF THE PA	029
C_tropicalis	PFLTAHGGFLQATLQGLTGLRYDYDIDEN-GKLVRILRLDPIGLPCLEEGVSFNGIQYDN	834
C maltosa	PELTAHGGELOATLOGLTGMRYGETVDEOASKI VRVI NI DPTALPCI GDGVOEDGTKYDN	794
	server aver a server a server a server a server of both ton	
	PRINDIPERION 1 PL PLP1 11 P P 11PP P 1 PL11 P	

Figura 5.6. Apilamiento ordenado de las secuencias de proteínas correspondientes a las trehalasas ácidas, obtenido *in silico* para las siete especies de *Candida* escogidas, así como de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. El protocolo de análisis informático se describe en Materiales y Métodos. Para otros detalles, ver el texto.

Especies	Sitios de N-	Posición sitios más comunes		
	glicosilación	NCT(A/G/S)	NLTD	N(I/V)TE
S. cerevisiae	27		638	
C. auris	15	528	596	899
C. orthopsilosis	18	524	593	827
C. parapsilosis	19	525	594	897
C. albicans	21	532	601	904
C. dubliniensis	20	532	601	904
C. tropicalis	19	536	605	909
C. maltosa	19	495	564	870

Tabla 5.4. Sitios de N-glicosilación potenciales en las secuencias de trehalasas ácidas.

A partir de estos resultados, podemos concluir de forma preliminar que el mayor grado de homología en la composición de aminoácidos ocurre entre las presumibles trehalasas ácidas de *C. albicans* y de *C. parapsilosis*, si bien, también existe un grado notable de coincidencia entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Analizando la secuencia completa de nucleótidos, se puede comprobar cómo *C. auris* es la levadura patógena que más se diferencia del resto de las analizadas, sobre todo cuando se compara con las otras especies de *Candida* potencialmente patógenas descritas anteriormente (Figura 5.6). Comenzando por el extremo N-terminal se puede observar como en la zona del dominio del centro catalítico N-terminal de la glicosil hidrolasa 65 hay una alta conservación de las secuencias (Figura 5.6), diferenciándose una vez más *C. parapsilosis* de *C. albicans* en ciertos aminoácidos entre las posiciones 93 y 202.

Cabe destacar tanto en un dominio como en otro de los anteriormente considerados (Figura 5.6), como todas las levaduras estudiadas presentan zonas vacías, carentes de aminoácidos en ciertas posiciones. Es el caso de las zonas anteriores a los residuos 151 y 512, tomando como referencia *C. parapsilosis* (Figura 5.6). El contraste es notable, si la comparación se efectúa con *Candida auris* que sí posee esta región completa. En el mismo sentido, comenzando con el extremo N- terminal, se observó en el primer tramo de secuencias en apilamiento (dominio pfam03636), como *C. maltosa* y *C. auris* carecen de la mayoría de aminoácidos que conforman la misma región de la proteína en el resto de levaduras analizadas (Figura 5.6). Observaciones similares se pueden hacer en el otro dominio de la proteína (pfam03632).

Como secuencia ejemplo se escogió la previamente caracterizada por nuestro grupo en *C. albicans* [37,67]. Se determinó la presencia de una secuencia conservada coincidente con el dominio N-terminal en la familia glicosil hidrolasa 65 (aminoácidos 89-350), así como otro coincidente con el dominio del centro catalítico de la misma (residuos 351-753). Ambos dominios se encuentran en todas las secuencias estudiadas (Figura 5.6). Es una constante en la familia 65 de glicosil hidrolasas que incluye además de las trehalasas ácidas, a la maltosa fosforilasa de la bacteria *Lactobacillius brevis*. Esta última enzima cataliza la conversión de maltosa y un fosfato inorgánico a β -D-Glucosa-1-fosfato + Glucosa. Se cree que la presencia del dominio resulta esencial para la actividad catalítica, aunque se desconoce su función exacta [33,63].

A su vez, el gen *ATC1* de *C. parapsilosis* (*Cp*) comparte un 67% de homología en la secuencia de nucleótidos con su ortólogo presente en *C. albicans* y un 62% de homología a nivel de proteína [30, 31, 40]. Tras comparar la secuencia de nucleótidos predicha, encontrada en el ORF denominado CPAR2-208980 sito en el contig 005809, con las secuencias encontradas en bases de datos de proteínas utilizando el algoritmo de búsqueda NCBI-Blast y Clustal.omega [65,66-68] para *C. albicans* Atc1p y *S. cerevisiae* Ath1p, se observó que la trehalasa ácida de *C. parapsilosis* compartía un 62% de aminoácidos idénticos y un 77% de aminoácidos similares con Atc1p, y 41% de aminoácidos idénticos y un 58% de aminoácidos similares con Ath1p [30]. El ORF CPAR2-208980 en el contig 005809 codifica un polipéptido de 1039 aminoácidos con un peso molecular de 116587,90 D (116,6 kD) y un pI de 5,45 (S-F, 2014). El análisis de la secuencia de aminoácidos determinó una región N- terminal con características de péptido señal y un sitio de escisión entre las posiciones 23 y 24 [30,31,62].

Posteriormente, procedimos a modelizar todas las secuencias de actividad ácida en estudio, pudiéndose observar que todas ellas soportan un plegamiento tridimensional compatible con la actividad enzimática que desarrollan (Figura 5.7).



Figura 5.7. Modelos 3D de la molécula trehalasa ácida correspondientes a las siguientes levaduras: a) *Saccharomyces cerevisiae* (18%); b) *Candida maltosa* (20%), c) *C. albicans* (14%), d) *C. tropicalis* (20%), e) *C. parapsilopsis* (21%), f) *C. orthopsilopsis* (20%), g) *C. dubliniensis* (20%) y h) *C. auris* (19%). Identidad en % respecto al modelo cristalizado (maltosa fosforilasa de *Lactobacillus brevis*, c1h54B_).

De nuevo, y como sucede con las actividades de tipo neutro, la superposición comparativa de las estructuras tridimensionales obtenidas para la trehalasa ácida en *C. albicans* y *S. cerevisiae*, permite corroborar el hecho de que las posiciones equivalentes de los residuos conservados Asp y Glu, desempeñan un papel esencial en la actividad catalítica de la enzima (Figura 5.8).



Figura 5.8. (A) Detalle molecular de la estructura secundaria de trehalasa ácida presente en *C. albicans*. El área catalítica aparece marcada con un círculo azul. (B) Superimposición de las moléculas Ntcp/Nth1p de *C. albicans* y *S. cerevisiae* resaltando las posiciones críticas de los aminoácidos Asp y Glu, esenciales para la actividad catalítica. La imagen ha sido modificada a partir de Maicas *et al.* [40].

La búsqueda de motivos proteicos en *Cp*Atc1p reveló dos coincidencias de importancia con la familia de las trehalasas fúngicas. Así, en la posición N-terminal de la proteína de 1.039 aminoácidos de longitud, hay un motivo presente en la familia glicosil hidrolasa 65, en el que están involucrados los aminoácidos 77 a 344. Igualmente, el segmento central también está correlacionado con el dominio catalítico de la familia glicosil hidrolasa 65 (aminoácidos 402-763) [61]. La enzima cristalizada maltosa fosforilasa de *L. brevis* (MPLb) cataliza la conversión de maltosa y fosfato inorgánico en β -D-glucosa-1-fosfato y glucosa. La región central corresponde al dominio catalítico, que se une a un ion fosfato, situado en la proximidad de un residuo

Glu altamente conservado [31,40,58]. Por otra parte, el tamaño promedio de los ORF aquí recopilados para el resto de especies de *Candida* es aproximadamente de 3.270 nucleótidos, equivalentes a 1.090 aminoácidos (Tabla 5.2).

Por su interés como patógeno emergente destacamos a *C. auri*s, con un ORF constituido por 3.246 nucleótidos (1.082 aminoácidos). *C. parapsilosis Cp*Atc1 y *C. auris* presentaban un 50% de aminoácidos idénticos y un 67% de aminoácidos similares con la proteína Atc1 (Figura 5.6).

Establecimiento de árboles filogéneticos a partir de la comparación de secuencias

Si establecemos paralelismos filogenéticos a partir del análisis de secuencias, la pérdida de nucleótidos al comienzo de la región N-terminal de la trehalasa ácida de *S. cerevisiae* y *C. auris*, sugiere una importante relación de divergencia, visible en el filograma con todas las secuencias (Figura 5.9).



Figura 5.9. Árbol filogenético representando la agrupación de secuencias de trehalasas ácidas presentes en *S. cerevisiae* y diferentes especies del género *Candida*.

Desde esa primera división en el tiempo y hasta el momento actual, la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen que codifica la trehalasa ácida no ha cambiado en *C. auris*. No parece ocurrir lo mismo con *C. maltosa* que también carece de la mayoría de esos nucleótidos en la parte inicial de la secuencia (Figura 5.9).

Un aspecto muy relevante de nuestros resultados sobre la hidrólisis de trehalosa en hongos filamentosos y levaduras, reside en la especificidad de sustrato e identidad del centro catalítico de las hidrolasas con actividad trehalasa. Se han descrito dos patrones enzimáticos básicos: enzimas ácidas y neutras, con importantes variaciones relativas a su localización subcelular, parámetros bioquímicos o elementos regulatorios [33,57,58]. La comparación de las distintas composiciones génicas y aminoacídicas sugiere una

divergencia evolutiva relativamente temprana y una relación filogénetica distante. Parece sorprendente que, en todos los casos, ambas actividades comparten una estricta especificidad por trehalosa como único sustrato hidrolizable, así como un idéntico mecanismo de actividad catalítica mediante inversión anomérica [33,40,57,58].

BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA

En todos los sistemas biológicos investigados hay un solo mecanismo universal responsable de la hidrólisis del disacárido trehalosa. Se trata de la rotura específica del enlace $\alpha,\alpha-1$ de la molécula, produciendo dos unidades de glucosa mediante una α -glucosidasa denominada trehalasa, que ha sido ampliamente estudiada en epígrafes anteriores [33,40,58,78]. Por el contrario, la ruta biosintética de trehalosa presenta una complejidad notablemente mayor, con importantes diferencias en el número y disposición de genes, dependiendo del organismo de que se trate. En la síntesis de trehalosa son necesarias dos etapas enzimáticas consecutivas (Figuras 5.1A y B). Otras informaciones complementarias sobre este proceso se documentan en el Capítulo I de esta Memoria. A su vez, hasta tres rutas metabólicas independientes involucradas en la biosíntesis de trehalosa han sido caracterizadas en procariotas y eucariotas, denominadas OtsA/B, TreS y TreYZ [57,59,60,70] (Figura 5.10). Sorprendentemente, mientras los vertebrados son incapaces de sintetizar trehalosa, las bacterias contienen un sistema genético muy elaborado que incluye las tres vías en numerosas especies, ampliando así sus actividades fisiológicas. Ello les permite utilizar la trehalosa como fuente de carbono, componente estructural, factor de virulencia o soluto compatible [29,33,42,56]. Por el contrario, en eucariotas sólo ha sido exclusivamente conservado el sistema ortólogo a la ruta bacteriana Ots/B (denominado vía TPS/TPP) [32,33,42,58,70]. Los parámetros más relevantes de las dos enzimas que intervienen en la biosíntesis de trehalosa en hongos y levaduras se recogen en la Tabla 5.5. Los genes implicados en la biosíntesis (TPS1 y TPS2) han sido clonados, secuenciados y caracterizados [29,32,33,70,75,79].



Figura 5.10. Rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de trehalosa en la biosfera. Los organismos correspondientes están recogidos dentro de cuadrados. Hasta ahora, todos los genomas anotados de los vertebrados carecen de cualquier gen funcional que codifique para alguna actividad trehalosa sintasa/fosfatasa. Asimismo, tampoco se han descrito mecanismos alternativos para la isomerización o la interconversión de trehalosa.

Tabla 5.5. Párametros bioquímicos y fisiologicos mas relevantes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de trehalosa en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* [75,76,78,80].

Trehalosa-6-Fosfato Sintasa (Tps1)	Trehalosa-6-Fosfato Fosfatasa (Tps2)	
Síntesis: UDP-glucosa + Glucosa-6P	Desfosorilación de trehalosa-6-P (T-6P) y	
Sintesis. ODI glacosa - Glacosa of	obtención ade trehalosa libre	
Localización citosólica	Localización citosólica	
Localización enosonea	(Complejo conjunto Tps1p-Tps2p)	
Mr = 56 kDa	Mr = 102 kDa	
Activación por Mg ²⁺ /Inhibición por Pi	Dependiente de Mg ²⁺	
pH 6.6	рН 6.6	
Temperatura óptima: 30-37°C	Temperatura óptima: 30-37°C	
Implicada en virulencia en <i>C. albicans</i>	T-6P es un regulador de la glicolisis	

La trehalosa como potencial diana antifúngica

Por su interés, haremos una mención especial a la propuesta realizada de forma independiente por varios grupos, de investigar la trehalosa como una prometedora diana para la obtención de nuevos compuestos antifúngicos [36,42,60,62,71]. Dicha propuesta responde a la necesidad de ampliar el limitado arsenal de antifúngicos eficaces contra hongos patógenos actualmente disponibles, y se fundamenta en la incapacidad de los vertebrados para sintetizar trehalosa, mientras este disacárido se halla presente en un gran número de hongos. Entre ellos, resultan especialmente preocupantes los brotes fúngicos infecciosos identificados con frecuencia creciente entre la población inmunocomprometida (receptores de transplantes, pacientes tumorales o afectados por SIDA, y los sometidos a cirugía invasiva o a tratamientos prolongados de antibioticoterapia). La tasa de mortalidad registrada en estos casos por infecciones fúngicas complicadas llega a ser del 30-40% [71]. Los principales hongos responsables están representados por los géneros *Aspergillus, Candida, Cryptococcus* y varias especies de hongos dimórficos (*Histoplasma* o *Blastomyces*) [72,73].

Un resumen de las principales evidencias que apoyarían la investigación sobre trehalosa como una diana antifúngica prioritaria, serían las siguientes: (i) La amplia presencia del disacárido en numerosas especies de hongos, abarcando ascomicetos y basiodiomicetos; (ii) La reserva de trehalosa es una respuesta protectora de los hongos patógenos durante la infección in vivo del hospedador; (iii) Los genes que codifican la actividad trehalosa sintasa (*TPS1*) y trehalosa fosfatasa (*TPS2*) son determinantes de virulencia y los correspondientes mutantes homocigóticos nulos *tps1* y *tps2* son muy sensibles a estrés oxidativo severo; (ii) El intermediarios trehalosa-6P ejerce un control estricto sobre la glucólisis mediante la inhibición específica de la hexoquinasa II y su acumulación es muy tóxica para la viabilidad celular en determinados hongos patógenos [74-78]. Por lo tanto, resulta teóricamente factible que la obtención de inhibidores muy específicos de las enzimas implicadas en la biosíntesis de trehalosa, deberían ser nocivas para las especies de hongos patógenos, mientras serían relativamente inocuos para las células de mamíferos. Las propiedades más significativas de la ruta biosintética de trehalosa se resumen en la Tabla 5.5.

TREHALOSA-6-FOSFATO SINTASA (TREHALOSA SINTASA)

Esta actividad ha sido ampliamente caracterizada en distintos grupos de hongos. Dada su importancia clínica, esta Memoria abordará con prioridad las enzimas de *C. albicans* en comparación con *S. cerevisiae*. La organización génica en *S. cerevisiae* es relativamente compleja, consta de dos polipéptidos con una masa molecular de 56 y 102 kDa correspondientes a las proteínas Tps1p y Tps2p que usualmente se encuentran agrupados, más un tercer polipéptido de 123 kDa que actuaría como un elemento regulatorio de los anteriores (Tsl1) [79,80].

El grupo del Dr. Gancedo, llevó a cabo la clonación del gen *TPS1* en *C. albicans* mediante la complementación funcional del mutante *tps1* de *S. cerevisiae* [29]. La secuencia del gen *CaTPS1* codifica un solo polipéptido de 478 aminoácidos con un Mr estimado de 54 kDa. La región 5' no codificante presenta algunas peculiaridades notables, como la presencia de varias secuencias STRE (C₄T), denominadas "secuencias de respuesta a estrés", que están implicadas en la transcripción dependiente de varios tipos de estrés ambiental, junto con cuatro copias de la repetición hexamérica HR [74-78]. La trehalosa sintasa participa en el metabolismo glucídico de *C. albicans* y otras levaduras. El mutante *tps1/tps1* es incapaz de crecer sobre glucosa por encima de 37°C debido a una reducción de su contenido intracelular de ATP [75]. Igualmente, el gen *TPS1* interviene en la adquisición de termotolerancia y la protección frente a estés oxidativo, favorece la transición dimórfica levadura-micelio, la arquitectura de la pared celular y el desarrollo de biopelículas activas, lo que revela un papel activo como factor de virulencia durante el proceso de infección y colonización del hospedador por *C. albicans* [28,75,78,81].

Tomando como modelo la secuencia de la trehalosa sintasa (tps1p) en *S. cerevisiae* (AEP68509.1), indagamos en las bases de datos [65,67] para localizar las correspondientes a las proteínas ortólogas presentes en las especies de *Candida* seleccionadas (Figura 5.11).

En el apilamiento de secuencias observamos que una gran parte de la proteína forma parte del dominio glicosil transferasa 20 (pfam00982). Analizados los alineamientos de secuencia, obtenidos a partir de todas las proteínas trehalosa sintasa, se puede concluir de forma preliminar que el mayor grado de homología tiene lugar entre *C. albicans y C.*

dubliniensis con un 99%, con un grado ligeramente inferior a *C. tropicalis y C. maltosa* (95%). A su vez, *C. parapsilosis* comparte un 87% de aminoácidos idénticos con *C. albicans*, mientras los aminoácidos iguales de ambas con *C. auris* coincide en un 83 % (Figura 5.11). La pérdida de nucleótidos al inicio del extremo N-terminal por parte de *C. auris* con respecto a *S. cerevisiae* (Figura 5.11), indica una proximidad filogenética mayor con el resto de las estirpes de *Candida* estudiadas, como se puede observar en la comparación directa de las secuencias. Merece ser destacado, que una observación equivalente tiene lugar en las trehalasas anteriormente descritas (Figuras 5.5 y 5.11). En la figura se han marcado asimismo los sitios de unión entre G6P y UDPG, que se conservan de manera canónica en todas las secuencias.

Igualmente, han sido identificados los sitios potenciales de N-glicosilación en la molécula. Aparecen en número variable (2-4) en *S. cerevisiae* y *Candida*, con la notable excepción de C. *auris*. En la mayoría de especies de *Candida* se observa una secuencia consenso N(I/V)SD en la posición 367, lo que sugiere una importante función de esta glicosilación (Tabla 5.6).

Especies	Sitios de N-glicosilación	Posición sitio más frecuente
	-	N(I/V)SD
S. cerevisiae	2	nd
C. auris	0	nd
C. orthopsilosis	3	367
C. parapsilosis	4	367
C. albicans	4	367
C. dubliniensis	4	367
C. tropicalis	3	367
C. maltosa	3	367

Tabla 5.6. Sitios potenciales de N-glicosilación en las secuencias de trehalosa sintasa

Dominio glicosil tra	nsferasa 20,	pfam	(00982))
----------------------	--------------	------	---------	---

S cerevisiae	MTTDNAKAOLTSSSGGNIIVVSNRLPVTITKNSSTGOYEYAMSSGGLVTALEGLKKTYTF	60
Cauris	MHKGKVLVVSNRL PVTTKR-KDDGSYEYSMSSGGLVTALOGLKKSTEF	47
Conthonsilosis	MUOGUVEWVSNR DVTTKR-KEDGSVDVSMSSGGLVTALOGLKKTTEF	47
C_orenopiliosis		47
C_parapsilosis		47
C_albicans		4/
C_dubliniensis	MVQGKVLVVSNREPVTIKR-LDNGSYDYSMSSGGLVTALQGLKKTTEF	47
C_tropicalis	MVQGKVLVVSNR_PVTIKR-SEDGSYDYSMSSGGLVTALQGLKKTTEF	47
C maltosa	MVQGKVLVVSNRLPVTIKR-SDDGSYDYSMSSGGLVTALQGLKKTTEF	47
	*:::****	
S_cerevisiae	KWFGWPGLEIPDDEKDQVRKDLLEKFNAVPIFLSDEIADLHYNGFSNSILWPLFHYHPGE	120
C auris	OWYGWPGLELPEDEOERVNEDLMDOFKCCAIFLSDTIADLHYNGFSNSILWPLFHYHPGE	107
Corthopsilosis	OWLGWPGLEIPEDEOAKVNADLMHKEKCTAIFLSDTIADLHYNGESNSILWPLEHYHPGE	107
Cnaransilosis	OWLIGWPGLETPEDEOAKVNKDLMNKEKCTATELSDTTADLHYNGESNSTLWPLEHYHPGE	107
Calbicans	OWYGUPGLETPEDEOT/WNDEL/SKENCTATELSDTTADLHVNGESNSTLWPLEHVHPGE	107
C_dublinionsis	OUNGUING ETDODEOAVVINEEL VEVENCTATEL COTTADILITYUGESNETI LIDI EHVINGE	107
C_dubiiniensis	QWYGWPGLEIPDDEQAKVWEELKSKPWCTAIPLSDTIADLHTWGPSNSILWPLFHTHPGE	107
C_tropicalis	QWYGWPGLEIPDDEQKRVNNDLKTKENCTAIYLTDTIADLHYNGESNSILWPLEHYHPGE	107
C_maltosa	QWYGWPGLEIPEDEQERVNSDLKTKFNCTAVYLSDVIADLHYNGFSNSILWPLFHYHPGE	107
	;* ***********************************	
5_cerevisiae	INFDENAWLAYNEANQIFINEIAKIMNHNDLIWVHDYHLMLVPEMLRVKIHDKQLQNV	178
C_auris	MNFDETAWAAYIEANRQFASKIVEQVDDDDMIWVHDYHLMLLPQMLREELAKSSKHPKNV	167
C_orthopsilosis	MNFDENAWAAYIEANKKFAVEISKQVEDNDMVWVHDYHLMLLPEMLRQEIGKSKKNI	164
C parapsilosis	MNEDENAWAAYIEANKKEAVEISKOVEDNDMW/VHDVHLMLLPEMLROEIGSSKKNT	164
Calhicans	MNEDENAMAAYTEANKKEALETVKOVNDDOMTMAHDVHLMLLPEMLROETGNVVVNT	164
C_dublicionaia		104
C_dubliniensis		104
C_tropicalis	MNFDENAWAAYIEANKKFAVEIAKQVDDDDMIWVHDYHLMLLPEMLRQEIGNRKKNI	164
C_maltosa	MNFDENAWAAYIEANRKFAIEIAKQVNDNDMIWVHDYHLMLLPEMLRNEIGNRKKNI	164
	:****.** ** ***: *: :* : ::.:*:******:*:*:*** :: . :*:	
5 cerevisiae	KVGWELHTPEPSSETVRTLPVROETLKGVLSCDLVGEHTVDVARHELSSVORV-LNVNTL	237
Counic	DTGEEL HTDEDSSETVETL DVDDETVTGVL SCOL TGEHTVDVADHEL SSVGAV ENVITE	227
C_auris		221
C_orthopsilosis	RIGFFLHIPFPSSEIYRILPVRKEILVGVLSCDLIGFHIYDYARHFLSSVSKIVPNVKIL	224
C_parapsilosis	RIGFFLHTPFPSSEIYRILPVRKEILVGVLSCDLIGFHTYDYARHFLSSVSRIVPNVKTL	224
C_albicans	KIGFFLHTPFPSSEIYRILPVRKEILEGVLSCDLIGFHTYDYARHFISSVSRIVPNVSTL	224
C_dubliniensis	KIGFFLHTPFPSSEIYRILPVRKEILEGVLSCDLIGFHTYDYARHFISSVSRIVPNVSTL	224
C tropicalis	KIGFFLHTPFPSSEIYRILPVRKEILEGVLSCDLIGFHTYDYARHFISSVSRIVPNVSTL	224
Cmaltosa	KI GEFLHTPEPSSETYRTI PVRKETI EGVI SCOLTGEHTYDYARHETSSVSRTVPN/STL	224
C	***************************************	22.1
S_cerevisiae	PNGVEYQGRFVNVGAFPIGIDVDKFTDGLKKESVQKRIQQLKETFKGCKIIVGVDRLDYI	297
C auris	PNGVEFEGRSIQIGAFPIGIDVDKFTEGVKKPDVVSRIEQLKOKFNDVKVIVGVDRLDYI	287
Corthopsilosis	PNGTLYENRSTSTGAEPTGTDVDNETEGLKKPEVOORTAOLESKEDGTKVTVGVDR. DYT	284
Cnacansilosis	PNGTI VENRSTSTGAEPTGTDVDNETEGI KNPEVOORTTOL EKKEDGW/VTVGVDR DVT	284
C plbicans	DIGTEVOGDETETGAEDTGTDVDNETDGLEVEDGVA/EDTVOLVEVEVDVVVTVGVDD DVT	204
C_albicans		204
C_dubliniensis	PNGIKTQGKSISIGAPPIGIDVDWFIDGLKKDSVVEKIKQLKSKFKDVKVIVGVUKLDTI	204
C_tropicalis	PNGIKYQGRSISIGAFPIGIDVDNFIEGLQKDSVVERIKQLKSKFKDVKVIVGVDRLDYI	284
C_maltosa	PNGIKYQGRSISIGAFPIGIDVDNFIEGLQKDSVVERIKQLKSKFKDVKVIVGVDRLDYI	284
	***! · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
5 canavisina		257
S_cereviside		201
C_auris	KDVPQKLMAFEVFLTENPEWIGKVVLVQVAVP9KDDVEEYQSLKANVNELVGRINGRFGT	347
C_orthopsilosis	KEVPQKLHAFEIFLQQNPEWIGKVVLVQVAVPSRGDVEEYQSLRATVNELVGRINGQFGT	344
C_parapsilosis	KGVPQKLHAFEIFLQQNPEWIGKVVLVQVAVPSRGDVEEYQSLRATVNELVGRINGQFGT	344
C_albicans	KGVPQKLHAFEVFLNENPEWIGKVVLVQVAVPSRGDVEEYQSLRSTVSELVGRINGEFGT	344
C dubliniensis	KGVPOKLHAFEVFLNENPEWIGKVVLVQVAVPSRGDVEEYOSLRSTVSELVGRINGEFGT	344
C tropicalis	KGVPOKLHAFEVELNENPEWIGKWI VOVAVPSRGDVEEVOSI RSTVNELVGRTNGOEGT	344
Cmaltosa	KOVPOKI HAFEVELNENPEWIGKWI VOVAVPSDBDVEEVOSI DSTVIJELVORTINGOEGT	344
U	***************************************	244
5 cerevisiae	HEIVSTSSSSTSSSATKN 495	
Cauris	KOLAKCNAEKKPGPUN 483	
Conthonailaria		
C_OPEROPSILOSIS	400	
C_parapsilosis	KELYKCNADVKPVDAKEERKRGD 487	
C_albicans	KELYKCNPQKSLRD 478	
C_dubliniensis	KELYKCNPQKSLRD 478	
C_tropicalis	KELYKCNPQKNLRS 478	
C maltosa	KELYKCNPOKSLNS 478	IDBG
	Sitios de union GOP y l	

Figura 5.11. Alineamiento ordenado de las secuencias de proteínas correspondientes a la enzima trehalosa sintasa, determinado para las siete especies de *Candida* objeto de estudio, así como de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. El protocolo de análisis informático se describe en Materiales y Métodos. Para otros detalles, consultar el texto.

Los modelos de estructurales de actividades trehalosa sintasa se muestran en la Figura 5.12. La comparación de secuencias del gen TPS1 entre las especies de Candida (Figura 5.11) confirma la presencia en *C. albicans* de una sola trehalosa sintasa, cuyo ORF codifica un polipéptido de 478 aminoácidos; *C. parapsilosis* tiene 487 [75]. El tamaño promedio de ORF en el resto de especies es de 1.438 nucleótidos (479 aminoácidos (Tabla 5.1; Figuras 5.11 y 5.12). Se ha realizado un análisis estructural de la proteína, incluyendo identificación de los dominios de unión a los distintos sustratos y del centro catalítico común al de otras glicosiltransferasas (Figura 5.12) [81,82]. En *C. albicans* Tps1p adopta un plegamiento tipo GT-B, caracterizado por dos dominios plegados de Rossmann. El dominio próximo a la región N-terminal contiene un núcleo de seis hojas β paralelas flanqueadas por ocho hélices α . El dominio C-terminal adopta una disposición tridimensional $\beta/\alpha/\beta$ con un agrupamiento de seis hojas β paralelas flanqueadas por ocho hélices a. Una hélice a situada en el extremo del dominio Cterminal se extiende hacia el N-terminal, permitiendo así la interacción directa entre elementos estructurales [81]. El centro de unión a los sustratos es característico de las glicosiltransferasas en eucariotas y procariotas [40,58,61]. Los residuos clave de unión a sustratos en *C. albicans* se encuentran en las posiciones 103,143,171,280,285,318,357, 378,380,381,382 y 387. En el resto de proteínas coincide el mismo aminoácido en las esas posiciones, salvo en la 357 donde *C. auris* y *C. maltosa* contienen valina en vez de isoleucina. A pesar de compartir la diferencia de ese único aminoácido con el resto de las proteínas ortólogas, el grado de homología comprobado está en torno al 84%, una diferencia insignificante entre ambas (Figuras 5.11 y 5.12).



Figura 5.12. Modelos 3D para la trehalosa-6-fosfato sintasa de: a) *Saccharomyces cerevisiae* (67%); b) *Candida maltosa* (67%), c) *C. albicans* (68%), d) *C. tropicalis* (67%), e) *C. parapsilopsis* (67%), f) *C. orthopsilopsis* (66%), g) *C. dubliniensis* (68%) y h) *C. auris* (66%). Identidad en % respecto al modelo cristalizado (trehalose-6-fosfato sintasa B de *Aspergillus fumigatus*, c5hvoD_).

Establecimiento de árboles filogenéticos a partir de la comparación de secuencias

Siguiendo con el mismo protocolo para establecer paralelismos filogenéticos a partir del análisis de secuencias, la pérdida notable de nucleótidos al comienzo de la región N-terminal de las trehalasas ácida de *S. cerevisiae* y *C. auris*, sugiere una importante relación de divergencia que se manifiesta en el filograma construido a partir de sus secuencias (Figura 5.13). Desde esa primera división en el tiempo y hasta el momento actual, la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen que codifica la trehalosa sintasa no ha cambiado en *C. auris*. No ocurre lo mismo con *C. maltosa* que también carece de la mayoría de esos nucleótidos en la parte inicial de la secuencia (Figura 5.13).



Figura 5.13. Árbol filogenético representando la agrupación de secuencias de trehalosa-6-fosfato sintasas (trahalosa sintasa) presentes en *S. cerevisiae* y en diferentes especies del género *Candida*.

TREHALOSA-6-FOSFATO FOSFATASA (TREHALOSA FOSFATASA)

La segunda etapa en la biosíntesis de trehalosa, consiste en defosforilación del compuesto intermediario trehalosa-6P, llevada a cabo por una fosfatasa específica, denominada Tps2p o TPPp según el organismo examinado (Figura 5.1) [29,42,70]. El producto final, trehalosa libre, es la forma común de la molécula presente en la biosfera.

Caracterización del gen TPS2

Siguiendo el mismo patrón, se ha priorizado el análisis de este gen en las levaduras *S. cerevisiae* y *C. albicans.* El gen *TPS2* se localiza en el cromosoma IV de *S. cerevisiae* y su ORF predice una secuencia de 2.685 nucleótidos que codifica una proteína de 102,8 kDa [83]. La doble interrupción del gen *TPS2* provoca incapacidad para sintetizar trehalosa con una gran acumulación en paralelo de trehalosa-6P (T6P). El mutante *tps2* de *S. cerevisiae* se comporta como sensible a la temperatura y presenta alteraciones en la superficie externa de la pared celular que da lugar a fenotipos de agregación e incremento de la permeabilidad, principalmente en cultivos estacionarios [76,78,84]. La acumulación excesiva de T6P induce alteraciones en el metabolismo de la glucosa debido a la inhibición específica de la hexoquinasa (HxK II) [74].

En *C. albicans*, la clonación y disrupción homocigótica del gen *CaTPS2* se realizó por los grupos del Dr. C. Gancedo (CSIC, Madrid) y el Dr. J.M. Thevelein (KU Leuven, Bélgica), mediante la complementación funcional del mutante termosensible *tps2* de *S. cerevisiae* [76-78]. Hay un único gen *TPS2* que tiene un tamaño de 2.664 nucleótidos correspondientes a 888 aminoácidos. El análisis de la ORF ha determinado una secuencia proteica homóloga al 67% con la proteína tps2p de la levadura de gemación. El análisis de la región promotora revela la existencia de motivos CCCCT implicados en la regulación transcripcional mediada por estrés ambiental [76-78].

Se han descrito importantes alteraciones fisiológicas asociadas a la interrupción génica del gen *TPS2* en *C. albicans*. Así el mutante nulo *tps2/tps2* es incapaz de sintetizar trehalosa, pero presenta una hiperacumulación del intermediario trehalosa-6P, que es muy tóxica para la célula [30-32], produciendo un fenotipo de termosensibilidad con reducción del crecimiento a 42°C y una intensa agregación celular en fase estacionaria, mientras la capacidad de formar hifas en medios conteniendo glucosa permanece inalterable, aunque el ensamblaje de la pared celular puede verse afectada [76]. Con todo, el efecto deletéreo más notable para *C. albicans* es la pérdida de virulencia de los mutantes *tps2/tps2*, que convierte a esta ruta en un interesante objetivo para el desarrollo de nuevos antifúngicos [36,71,76-78].

De manera similar a como se ha realizado con las tres enzimas precedentes, partiendo de la secuencia de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (trehalosa fosfatasa) de *S. cerevisiae*, se preparó un apilamiento que incluía esta misma y las secuencias de *Candida* seleccionadas para esta Tesis Doctoral (Figura 5.14). A partir del establecimiento de la secuencia, la proteína Tps2p de *C. albicans* se puede dividir en dos dominios estructurales: el dominio N-terminal (Tps2NTD) pfam00982 que incluye

534 residuos compartiendo una amplia región con tps1p de *C. albicans*, pero sin la presencia de residuos catalíticos clave, ello hace que ésta sea una zona con una estructura y sobre todo con función todavía desconocida [76,77,81].

El dominio C-terminal de *C. albicans* (Tps2PD) pfam02358 abarca el intervalo desde los aminoácidos 535 a 888, y contiene el dominio de actividad fosfatasa (Figura 5.14). Pertenece a la superfamilia de "haloácidos deshidrogenasas fosfatasas (HADSF) [81]. Actualmente, se desconoce el mecanismo que regula la especificidad de unión de la trehalosa-6P al centro activo y su posterior catálisis por las enzimas tipo fosfatasa (Tps2p o Tpp) [81]. De manera similar a lo efectuado con las enzimas precedentes, se buscaron posibles sitios de N-glicosilación (Tabla 5.7), encontrándose dos ampliamente distribuidos en casi todas las levaduras (NTT(A/S) y NW((T/S)(S/I), excepto en *S. cerevisiae* y en *C. auris*.

Especies	Sitios de N-	Posición sitios más comunes	
	glicosilación	NTT(A/S)	NW(T/S)(S/I)
S. cerevisiae	6	450	nd
C. auris	5	437	nd
C. orthopsilosis	6	439	515
C. parapsilosis	8	439	515
C. albicans	5	438	514
C. dubliniensis	4	438	514
C. tropicalis	6	439	515
C. maltosa	7	433	509

Tabla 5.7. Sitios potenciales de N-glicosilación en las trehalosa fosfatasas.

En el alineamiento de las secuencias genómicas correspondiente al gen *TPS2* (o *TPP*) se muestran enmarcados los residuos idénticos y los altamente conservados, tanto el dominio N-terminal (Tps2NTD) como en el C-terminal (Tps2PD) (Figura 5.14).

Dominio glicosil transferasa 20, pfam (00982)

S_cerevisiae C_auris		37 59
C_orthopsilosis C_parapsilosis C_albicans	-MPELSQLKVSPANTHAVSPKDFANNDKVKLSGRILNVSTTLPTQIVSNYDSKTNSYYWD -MPELSQLKVSPANIHAVSPKDFANNDKVKLSGRILNVSTTLPTQIVSNYDSETNRYYWD - MAPOOVNAFSANGSTPSPKEFEGKGKLKLSGRILNVMTSLPLOTTSDYDNKTGOYYWD	59 59 58
C_dubliniensis C_tropicalis	MAPQQAKVFSANGSIPSPKEFEGKGKLKLSGRILNVMTSLPLQIISDYDNKNGEYYWD MAPQKLRAFPTTTPIVSPKEYEGNNKVKLSGRILNVMTSLPTQIISDYNKETKQYFWD	58 58
C_maltosa	MSPQQLNGTEFSPKQFKGNDKLKLSGRILNVMTSLPSKIISDFDKNTGQYYWD *::::**:*	53
S_cerevisiae	ISATTGNSALYSSLEYLQFDSTEYEQHVVGWTGEITRTERNLFTREAKEKPQDLDDDPLY VDPTRGOSAMYSSVEEL0H-0TDWESHLTGWTGELSNKTN-ATDVNSDNTKDDPMY	97 113
C_orthopsilosis	VDIVHGSSALFSSQSFLQQ-HTDWETHVIAWTGELKNKVKNTVNVTADNLEDDPLY	114
C_parapsilosis	VDIVHGTSALFSSQSFLQQ-HTDWETHVIAWTGELKNKVKNTVNVTADNLEDDPLY	114
C_albicans	VETVRGNSALYSSQHFLAE-NKEWETHLIAWTGELINKKKDTSSLTADTLQDDPLY	113
C tropicalis	VEAVRGISALYSSOFFLVE-HSDWETHVIAWTGELINKNKNTSSLTAENLODDPLY	113
C_maltosa	VESVRGNSASYASQOFLVE-DTEWETHIIAWTGELINKKKNTSSLTAENLQDDPLY	108
S_cerevisiae	LTKEQINGLTTTLQDHMKSDKEAKTDTTQTAPVTNNVHPVWLLRKNQSRWRNYAEKVIWP	157
C_auris		158
C parapsilosis	LDDEDKDEIEKKLOKAIGSKNIHPIWLLRRDOERWRKYAESVIWP	159
C_albicans	LDEEDKSKIEKKLCDASGTPNIHPVWLLRRDQGRWRKYAENVLWP	158
C_dubliniensis	LDEEDKSKIEKKLCDASGTPNIHPVWLLRRDQGRWRKYAENVLWP	158
C_tropicalis C_maltosa	LDEDDKKDIEKKLCEANGIPNIHPVWLLRRDQSKWKKYAENVLWP LDEEDKNDIEKKLRAANGTPNIHPVWLLRRDQSRWKKYAENYLWP	158
	* . : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
S_cerevisiae	TFHYILN-PSNEGEQEKNWWYDYVKFNEAYAQKIGEVYRKGDIIWIHDYYLLLLPQLLRM	216
C_auris	VFHYIQGQPND-GAQEGQEWYDYVRFNEAYFQKIKAIYKPGDVIWIHDYYLMLLPQLLRM	217
C_orthopsilosis	VFHYFSGTPSD-GKEEIQAWHDYVKFNEAYANKIKQIYKPGDVIWIHDYYLLLLPQLLRM	218
C_parapsilosis		218
C_dubliniensis	VFHYIQGQPSD-GKAETDAWYDYVKFNEAYLNKIKSVYKPGDIIWIHDYYLLLLPQLLRM	217
C_tropicalis C_maltosa	VFHYIQGQPSDDGTAEINAWHDYVKFNEAYLNKIKAVYKPGDIIWIHDYYLLLLPQLLRM VFHYIQGQYSDDGNGEIDAWHDYVKFNEAYLNRIKAVYKPGDIIWIHDYYL-LLPQLLRM .***:: * * : *:********* ::* :*: **:********	218 212
S_cerevisiae	LEQQVNELVNSINSEYGNLNFSPVQHYYMRIPKDVYLSLLRVADLCLITSVRDGMNTTAL	454
C_auris	VEKKVSDLVTSINSRYGNLNHTPVLHYQIRINKDEYLALLRVADLCLITSIRDGMNTTSL	441
C parapsilosis	VEQKATELINQINSQTGTENHTPVEHTQHKVPKEEYLALLRVADECETTSVRDGMNTTAF	443
C_albicans	VETRVTEIISRINSKYGNLNHTPVLHYQMRVAKEEYLALLRVADLALITSVRDGMNTTSL	442
C_dubliniensis	VETRVTEIISRINSKYGNLNHTPVLHYQMRVAKEEYLALLRVADLALITSVRDGMNTTSL	442
C_tropicalis	VESKVTELISRINSKYGDENHTPVLHYQMRIGKDEYLALLRVADLALITSVRDGMNTTSL	443
C_marcosa	:* :::: *** ** :*:** ** :*: *: *: **:*******	457
S_cerevisiae	EYVTVKSHMSNFLCYGNPLILSEFSGSSNVLKDAIVVNPWDSVAVAKSINMALKLDKEEK	514
C_auris	EFVICQKENHSPLILSEFTGTASVLSDAILVNPWDSVSIAKTMYSCLNMSPEAK	495
C parapsilosis	EFVICQKTNNSPLILSEFIGTASVLNSATLVNPWDSVGVSKTINDALSESDNEK	497
C_albicans	EFVICQKYNNSPLILSEFTGTATVLKDAIMVNPWDSVGVAKTINDALMLSTKEK	496
C_dubliniensis	EFVICQKYNNSPLILSEFTGTATVLKDAIMVNPWDSVGVAKTINDALMLSMKEK	496
C_tropicalis		497
C_INGITO29	*:* : : : : : : : : : : : : : : : : : :	471
S_cerevisiae	SNLESKLWKEVPTIQDWTNMFLSSLKEQASSDDDVERKMTPALNRPVLLENYKQSKRR	572
C_auris	YHLESKLYERVTSNTIQSWTSNFIEHLLPHVQKTHKTHNTPTLNRPMLFKNYQLSERR	553
C_orthopsilosis	EALESTLIKKVASNTLUWWISTFIKULLUHSVVIHSSHYTPALNKPLLLKNYNHSKKK EVI ESTLYKKVASNTLONWISTFIKULLUHSVVIHSSHYTPALNKPLLLKNYNHSKKR	555
C_albicans	VSLESKLYEKVLSNTVQNWTSTFICDILSHSIVTHSNSYTPALNRPLLLNNYKESORR	554
C_dubliniensis	VSLESKLYEKVISNTVQNWTSTFICDILAHSIVTHTNSYTPALNRPLLLNNYDESERR	554
C_tropicalis	MHLESKLYTKVTSNTIQNWTSRFIRDIIDHSIVTHTNSFTPALNRPTLLQNYKSSKRR	555
C_maitosa	SELESKLTAKVISNIVUWSIKFIKUIIAMSIVIMSSCYIPALNKPULLKSYKNSKRR	549

S cerevisiae	LFLFDYDGTLTPIVKDPAAAIPSARLYTILOKLCADPHNOIWIISGRDOKFLNKWLGGKL	632
Cauris	LFLFDYDGTLTPIVKDPVAAIPSSRLHKIVDKLAEDPKNQIWIISGRDQAFLDKWWGSK-	612
C orthopsilosis	LFLFDYDGTLTPIVKDPAAAIPSDKLNRVLDILASDPKNOIWIISGRDOAFLEKWMGOK-	614
C parapsilosis	LFLFDYDGTLTPIVKDPAAAIPSDKLNRVLDILASDPKNQIWIISGRDQAFLEKWMGRK-	614
C albicans	LFLFDYDGTLTPIVQDPAAAIPSDKLNRILDVLSSDPKNQIWIISGRDQAFLEKWMGNK-	613
C dubliniensis	LFLFDYDGTLTPIVODPAAAIPSDKLNRILDVLSSDPKNOIWIISGRDOAFLEKWMGNK-	613
Ctropicalis	LFLFDYDGTLTPIVKDPAAAIPSDKLNRILDTLSADPKNOIWIISGRDOAFLEKWLGSK-	614
C maltosa	LELEDYDGTLTPIVKDPAAAIPSDKLNRILDTLSADPKNOIWIISGRDOAELEKWMGTK-	608

S cerevisiae	POLGLSAEHGCFMKDVSCODWVNLTEKVDMSWQVRVNEVMEEFTTRTPGSFIERKKVALT	692
Cauris	-NVGLSAEHGCFMKDVGSTKWFNLAEAFDMSWQLKVDEVFKRYTDQTPGSNIERKKVALT	671
Corthopsilosis	-HVGLSAEHGCFIKDLGSKEWVNLAEAYDMSWQPKVEDVFKKYTKQTPGSNIEIKKVALT	673
C parapsilosis	-HVGLSAEHGCFIKDLGSKEWVNLAEAYDMSWOPKVEDVFKKYTKOTPGSNIEIKKVALT	673
C_albicans	-NVGLSAEHGCFMKDIGSKEWVNLAASFDMSWQEKVDDIFKYYTEKTPGSNIERKKVALT	672
C dubliniensis	-NVGLSAEHGCFMKDIGSKEWVNLAASFDMSWOEKVDDIFKYYTEKTPGSNIERKKVALT	672
C tropicalis	-NVGLSAEHGCFMKDLGSKTWVNLAESFDMSWOEKVDDVFKDYTEKTPGSNIERKKVALT	673
C maltosa	-NIGLSAEHGCFMKDIGSKKWVNLAESFDMSWOAKVDDVFKYYTEKTPGSNIERKKVALT	667
_	··************************************	
S_cerevisiae	WHYRRTVPELGEFHAKEL-KEKLLSFTDDFDLEVMDGKANIEVRPRFVNKGEIVKRLVWH	751
Cauris	WHYRRSDPELGKYQADLCLKELRDGIEKEYDVEVMEGKANIEVRPRFVNKGEIVKRLVLN	731
C_orthopsilosis	WHYRGADPELGAYQAQKCLDELNETIATEYDVEVMSGKANIEVRPKFLNKGEIVKRLVTH	733
C_parapsilosis	WHYRGADPELGAYQAQKCLDELNDTIATEYDVEVMSGKANIEVRPKFLNKGEIVKRLVTH	733
Calbicans	WHYRRADPDLGNFOAEKCMKELNDTVAKEYDVEVMAGKANIEVRPKFVNKGEIVKRLVLH	732
C dubliniensis	WHYRRADPDLGNFÖAEKCMKELNDTVAREYDVEVMAGKANIEVRPKFVNKGEIVKRLVLH	732
C tropicalis	WHYRRADPELGAFOAEKCLKOLNDTVAKEYDVEVMAGKANIEVRPKFVNKGEIVKRLVLH	733
C maltosa	WHYRRSDPELGAFOAEKCLKELNDTVAKEYDVEVMAGKANIEVRPKEVNKGEIVKRLVLH	727
	**** * * ** . * * ***********	
S_cerevisiae	WHYRRTVPELGEFHAKEL-KEKLLSFTDDFDLEVMDGKANIEVRPRFVNKGEIVKRLVWH	751
C_auris	WHYRRSDPELGKYQADLCLKELRDGIEKEYDVEVMEGKANIEVRPRFVNKGEIVKRLVLN	731
C_orthopsilosis	WHYRGADPELGAYQAQKCLDELNETIATEYDVEVMSGKANIEVRPKFLNKGEIVKRLVTH	733
C_parapsilosis	WHYRGADPELGAYQAQKCLDELNDTIATEYDVEVMSGKANIEVRPKFLNKGEIVKRLVTH	733
C_albicans	WHYRRADPDLGNFQAEKCMKELNDTVAKEYDVEVMAGKANIEVRPKFVNKGEIVKRLVLH	732
<pre>C_dubliniensis</pre>	WHYRRADPDLGNFQAEKCMKELNDTVAREYDVEVMAGKANIEVRPKFVNKGEIVKRLVLH	732
C_tropicalis	WHYRRADPELGAFQAEKCLKQLNDTVAKEYDVEVMAGKANIEVRPKFVNKGEIVKRLVLH	733
C_maltosa	WHYRRSDPELGAFQAEKCLKELNDTVAKEYDVEVMAGKANIEVRPKFVNKGEIVKRLVLH	727
	**** * * ** * * * * * * * * * * * * * *	
S_cerevisiae	QHGKPQDMLKGISEKLPKDEMPDFVLCLGDDFTDEDMFRQLNTIETCWKEKYPDQKNQ	809
C_auris	GHGAKQDPHSIQLDPKSIPVSELPDFMLCLGDDTTDEDMFRVLKEIEAKWHLNE-LPKNK	790
C orthopsilosis		790
	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKTENQWKLDN-APKNE	150
C_parapsilosis	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE	790
C_parapsilosis C_albicans	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKLENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLNEINKKWKGDN-RPTNK	790 791
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLLLGDDLTDEDMFKSLHKLENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLLLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLLLGDDLTDEDMFNSLNEINKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIDQLPDFMLLLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK	790 791 791
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis	PHGIKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLNEINKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIQLPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFNSLITIEKQWQGKD-VPTNQ	790 791 791 792
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa	PHGIKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLLCGDDLIDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGIKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLIDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLIDEDMFNSLNEINKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIOQLPDFMLCLGDDLIDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQQQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLIDEDMFNSLITIEKQWGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLIDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE	790 791 791 792 786
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLNEINKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: ::***:***********************	790 791 791 792 786
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae	PHGIKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLLLGDDLIDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLLLGDDLIDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLIDEDMFKSLHKIENQWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIDQLPDFMLCLGDDLIDEDMFKSLIEINKKWKDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLIDEDMFKSLITIEKQWQGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLIDEDMFNSLITIEKQWKGEN-VPRNE ** *:: ::***:***********************	790 791 791 792 786
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae C_auris	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLHEINKKWKGDN-RPTNK PHGKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIAIEKQWGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: ::****:**********************	790 791 791 792 786 869 850
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae C_auris C orthopsilosis	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKJENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKJENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLHEINKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIQLPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: ::***:****** ****** ** *: * : *	790 791 791 792 786 869 850 850
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae C_auris C_orthopsilosis C parapsilosis	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKJENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKJENQWKLDN-APKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLHKJENKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIQLPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLITIEKQWGGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: ::***:***** ****** ***** * *: * . *: WGNYGFYPVTVGSASKKTVAKAHLTDPQQVLETLGLLVGDVSLFQSAGTVDLDSRGHVKN CGSYGVFPVLVGPAAKETLATSHLNDPSQVIDTLGLLSGDVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGTYGVFPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGTYGVFPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN	790 791 791 792 786 869 850 850 850 850
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae C_auris C_orthopsilosis C_parapsilosis C albicans	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLHEINKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIOQLPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLITIEKQWGGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLITIEKQWGGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: :::***:****** ****** * *: * * : WGNYGFYPVTVGSASKKTVAKAHLTDPQQVLETLGLLVGDVSLFQSAGTVDLDSRGHVKN CGSYGVFPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGTYGVFPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN	869 850 850 850 851
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae C_auris C_orthopsilosis C_parapsilosis C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIELPDFNLCLGDDLTDEDMFKSLHEINKKWKGDN-RPTNK PHGAKQDXHPSGHCTKDIPIQLPDFNLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFNLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: :::***:****** ****** * *: * * : WGNYGFYPVTVGSASKKTVAKAHLTDPQQVLETLGLLVGDVSLFQSAGTVDLDSRGHVKN CGSYGVFPVLVGPAAKETLATSHLNDPSQVIDTLGLLSGDVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGTYGVFPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGLVSIFESAGTVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLNEPRQVLETLGLLAGLVSIFESAGTVDLDDRGHVAN	869 850 850 851 851
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae C_auris C_orthopsilosis C_parapsilosis C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C tropicalis	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKLDN-VTKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLHKIENQWKGDN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIQLPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFILCLGDDLTDEDMFKSLITIEKQWGGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: :::***:****** ****** * *: WGNYGFYPVTVGSASKKTVAKAHLTDPQQVLETLGLLVGDVSLFQSAGTVDLDSRGHVKN CGSYGVFPVLVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGTYGVFPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLNEPRQVLETLGLLAGLVSIFESAGTVDLDDRGHLAN YGTHGVYPVAVGPASKKTVATAHLNEPRQVLETLGLLAGLVSIFESAGSVDLDDRGHLAN	869 850 850 851 851 852
C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa S_cerevisiae C_auris C_orthopsilosis C_parapsilosis C_albicans C_dubliniensis C_tropicalis C_maltosa	PHGTKQSLEDELKEEVPHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKJENQWKLDN-APKNE PHGTKQSLEEELNKEVSHEELPDFVLCLGDDLTDEDMFKSLHKJENQWKLDN-APKNE PHGAKQEKHPTGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLHEINKKWKGN-RPTNK PHGAKQDKHPSGHCTKDIPIEELPDFMLCLGDDLTDEDMFKSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTKQDQTATGASDENVSVDELPDFILCLGDDLTDEDMFNSLIEINKKWTNDN-RPTNK PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLITIEKQWQGKD-VPTNQ PHGTRQEESATGQCKDNVAVDELPDFMLCLGDDLTDEDMFNSLIAIEKQWKGEN-VPRNE ** *: ::****:****** ****** * : * . *: WGNYGFYPVTVGSASKKTVAKAHLTDPQQVLETLGLLVGDVSLFQSAGTVDLDSRGHVKN CGSYGVFPVLVGPAAKETLATSHLNDPSQVIDTLGLLSGDVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGTYGVFPVAVGPASKKTVATAHLTEPAQVLETLGLLAGTVSLFESAGSVDLDDRGHVAN FGSYGVYPVAVGPASKKTVATAHLNEPRQVLETLGLLAGLVSIFESAGTVDLDDRGHLAN YGTHGVYPVAVGPASKKTVATAHLNEPRQVLETLGLLAGCVSIFESAGSVDLDDRGHLAN YGTHGVYPVAVGPASKKTVATAHLNEPRQVLETLGLLAGCVSIFESAGSVDLDDRGHLAN	790 791 791 792 786 869 850 850 850 850 851 851 851 852 846

Figura 5.14. Alineamiento ordenado de las secuencias de la enzima trehalosa fosfatasa deducidas para las siete especies de *Candida* escogidas, así como de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. El protocolo de análisis informático se describe en Materiales y Métodos. Para otros detalles, ver el texto.

Al comparar las secuencias se corrobora que los aminoácidos situados en las posiciones 39 (serina) y 69 (tirosina) han sido sustituidos por treonina y fenilalanina

respectivamente en *C. parapsilosis* (Figura 5.14). Ni en *C. auris* ni en el resto de especies ocurre esta variación, sin que tengamos por el momento una explicación convincente. Los dos residuos clave involucrados en la formación del tetrámero se localizan en las posiciones 236 y 434 y son iguales en todas las levaduras analizadas. A partir del residuo 535 comienza el extremo C-terminal (Tps2PD) de la molécula, que termina con el aminoácido serina de la posición 833 (Figuras 5.14 y 5.15].

Los residuos involucrados en la catálisis y en la unión al sustrato ocupan las posiciones 559, 561, 566, 599, 601, 605, 621, 667, 673, 675, 712 y 722. En este caso (trehalosa fosfatasa), los aminoácidos que conforman el centro catalítico son idénticos en todas las especies estudiadas. El menor grado de homología se encuentra entre *S. cerevisiae* y el resto de especies de *Candida* con un 54% aproximadamente (Figura 5.14). Por el contrario, el mayor grado de similitud se produce entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (97%). *C. parapsilosis* comparte un 76% de aminoácidos en la secuencia con *C. albicans* y un 68% con la emergente *C. auris* (Figura 5.14).

Posteriormente, se enviaron las secuencias de la trehalosa fosfatasa de S. cerevisiae y de las candidas seleccionadas al servidor Phyre que generó estructuras compatibles con el modelo más cercano (S. cerevisiae) (Figura 5.15). La conformación de la región Tps2NTD (residuos 1-534) se determinó mediante una sustitución molecular, utilizando la estructura de OtsA de Escherichia coli, un homólogo de Tps1, como modelo de búsqueda [58]. La disposición tridimensional de la regiónTps2NTD es similar a la establecida para otras enzimas que pertenecen a la clase GT-B de glicosiltransferasas [81] y contiene dominios de pliegues o plegamientos de Rossmann N- y C- terminales y una hélice C-teminal que interactúa con cada dominio de pliegue de Rossmann [81]. A pesar de tener una estructura y composición muy similar a OtsA, el análisis de las secuencias revela que los residuos G22 de OtsA, involucrados en la unión de UDP, y R9, Y76 y R300, involucrados en la unión de G6P, están reemplazados con una tirosina, serina, triptófano más una deleción en la zona Tps2NTD respectivamente [81]. Esta evidencia sugiere que Tps2NTD podría no intervenir en la defosforilación de T6P per se y se desconoce si posee alguna otra actividad enzimática alternativa. Sin embargo, la molécula se considera esencial para la supervivencia celular a temperatura elevada como se ha subrayado anteriormente.



Figura 5.15. Modelos tridimensionales (3D) de trehalosa 6 fosfato fosfatasa obtenidos para: a) *Saccharomyces cerevisiae* (57%); b) *Candida maltosa* (82%), c) *C. albicans* (100%), d) *C. tropicalis* (85%), e) *C. parapsilopsis* (77%), f) *C. orthopsilopsis* (78%), g) *C. dubliniensis* (94%) y h) *C. auris* (68%). Identidad expresada en porcentaje respecto al modelo cristalizado (Dominio N-terminal de la trehalosa-6-P-fosfatasa de *C. albicans*, pdb 5DXF).

La estructura de Tps2NTD apoya un posible papel en la formación de complejos heteroprotéicos, ya que los residuos clave en la interfaz dímera conservada de OtsA de *E. coli* también están presentes en *C. albicans* [33,42,57,58]. Esta interfaz conservada sugiere la posibilidad de la unión directa con Tps1 en una sola macromolécula, y su posterior desempeño en la formación del complejo biosintético de trehalosa en las especies de *Candida* examinadas. Tps2PD es catalíticamente activo y se presenta como un monómero en solución. La estructura consta de un dominio central (residuos 1-105 y 186-299), que es un plegamiento de Rossmann modificado; y un dominio cap (residuos 106-185), que se inserta entre las dos mitades del dominio central (Figura 5.15). Los residuos 206-214 no se incluyen en la estructura ya que no se observaron en los mapas. BeF₃ está unido covalentemente al residuo conservado de aspartato nucleofílico (D25) y a un Mg^{2+} , lo que conforma el sitio activo de la fosfatasa. Hasta dónde se sabe, la estructura revela el estado de transición de cualquier fosfatasa específica de T6P [81]. En el resto de las especies de *Candida* analizadas, el gen *TPS2* contiene un ORF que codifica un polipéptido con un tamaño promedio de 2.649 equivalentes a 883 aminoácidos (Tabla 5.2; Figuras 5.14 y 5.15).

Establecimiento de árboles filogéneticos a partir de la comparación de secuencias

En el filograma construido a partir de todas las secuencias analizadas (Figura 5.16) se observa cómo la levadura de gemación *S. cerevisiae* muestra una clara divergencia del resto de secuencias, siendo *C. auris* la más próxima a ella. Por su parte, las secuencias correspondientes al resto de especies de *Candida* aparecen más grupadas entre sí (Figura 5.16).



Figura 5.16. Árbol filogenético representando la agrupación de secuencias de trehalosa-6-fosfato fosfatasa (trehalosa fosfatasa) presentes en *S. cerevisiae* y diferentes especies del género *Candida*.

CONCLUSIONES

- I. El análisis bioinformático se ha revelado como una herramienta útil para establecer relaciones filogenéticas consistentes entre especies patogénicas más representativas del género *Candida*, a partir de la comparación de secuencias de aminoácidos correspondientes a las enzimas involucradas en el metabolismo de la trehalosa.
- II. Todas las proteínas con actividad trehalasa neutra comparten la presencia de un dominio de unión a calcio. Las regiones central y C-terminal de la proteína Nth1p/Ntc1p se correlacionan con el dominio catalítico de la familia 37 de las glicosil hidrosilasas.
- III. Con respecto al producto del gen NTC1, *C albicans y C. parapsilosis* tienen una correspondencia del 68% en aminoácidos idénticos y un 77% en similares. La comparación entre *C. parapsilosis* y *C. auris* mostró un 66% de identidad completa y un 80% de alta similaridad. El alineamiento máximo ocurre entre las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*, con un 92% de aminoácidos idénticos. La relación filogenética entre *C. maltosa* y *C. tropicalis* también es elevada.
- IV. El alineamiento de las secuencias correspondientes a las trehalasas ácidas (gen ATC1) revela un grado máximo de homología entre *C. albicans* y *C. parapsilosis*. La coincidencia también es muy alta entre *C. albicans* y *C. dubliniensis. C. auris* es la levadura patógena que más se diferencia del resto de las analizadas.
- V. La superposición de estructuras tridimensionales correspondientes a las dos actividades trehalasa, neutra y ácida, en *C. albicans* y *S. cerevisiae*, revela la presencia de dos residuos (Asp y Glu) altamente conservados. Ambos residuos catalíticos esenciales ocupan posiciones equivalentes en la molécula y explicarían un idéntico mecanismo de acción para todas las trehalasas.
- VI. En la región N-terminal de las secuencias de ambas proteínas (neutra y ácida), aparece un tramo vacío carente de aminoácidos tanto en *S. cerevisiae* como en *C. auris* y en menor medida en *C. maltosa*. A falta de una explicación

convincente, inferimos que esta zona no debe jugar un papel esencial en el reconocimiento del sustrato y la posterior acción catalítica.

- VII. En todas las especies de *Candida* estudiadas, una sola proteína es responsable tanto de la actividad trehalosa sintasa (Tps1p) como de la actividad trehalosa fosfatasa (Tps2p). El análisis estructural de Tps1p en C. albicans, revela que la proteína Tps1p adopta un plegamiento tipo GT-B, caracterizado por dos dominios plegados de Rossmann. El dominio próximo a la región N-terminal contiene un núcleo de seis hojas β paralelas flanqueadas por ocho hélices α . En cambio, el dominio C-terminal adopta una disposición tridimensional $\beta/\alpha/\beta$ con un agrupamiento de seis hojas β paralelas flanqueadas también por ocho hélices α .
- VIII. Tomando como referencia el gen TPS1 que codifica la trehalosa sintasa, se puede concluir una alta homología entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (99%), siendo ligeramente inferior con *C. tropicalis* y *C. maltosa* (95%). A su vez, *C. parapsilosis* y *C. albicans* comparten un 87% de aminoácidos idénticos, mientras los aminoácidos iguales de ambas con C. auris coinciden en un 83%.

Tabla de códigos internacionales de una o tres letras para la designación de los aminoácidos.

Alanina	Ala	А	89
Arginina	Arg	R	174
Asparragina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	С	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	Н	155
Isoleucina	Ile	Ι	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	М	149
Prolina	Pro	Р	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	Т	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):606–625.
- De Toro Crespo M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. Clin Microbiol Infect. 2011;17(3):418–24.
- 3. Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida* parapsilosis. Microbiology. 2005; 151: 1073-1081.
- 4. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, *et al. Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2):1–38.
- 5. Kim SK, El Bissati K, Mamoun C Ben. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. Microbiology. 2006 152(10):2885–94.
- Carruba G, Pontieri E, De Bernardis F, Martino P, Cassone A. DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1991; 29(5):916–922.
- Suh SO, Nguyen NH, Blackwell M. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: Seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2008; 8(1):88–102.
- Pemán J, Salavert M. General epidemiology of invasive fungal disease [Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(2):90–8.
- Hernández-Castro R, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Alvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, *et al.* Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. Eur J Pediatr. 2010; 169(7):783– 7.
- 10. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Vol. 10, Therapeutics and Clinical Risk Management. 2014. p. 95–105.
- Pemán J, Cantón E, Linares-Sicilia MJ, Roselló EM, Borrell N, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: A Spanish multicenter prospective survey. J Clin Microbiol. 2011; 49(12):4158– 63
- 12. Holland LM, Schröder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grózer Z, *et al.* Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans.* PLoS Pathog. 2014; 10(9):e1004365.
- 13. Weems J. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, Pathogenicity, Clinical Manifestations, and Antimicrobial Susceptibility. Clin Infect Dis. 1992
- 14. Chang Y-L, Yu S-J, Heitman J, Wellington M, Chen Y-L. New facets of antifungal therapy. Virulence. 2017;8(2):222–236.

- Seyedmousavi S, Rafati H, Ilkit M, Tolooe A, Hedayati MT, Verweij P. Systemic Antifungal Agents: Current Status and Projected Future Developments. Methods Mol Biol; 1508:107–39.
- 16. Florez J. AJA y MA. Farmacología Humana 5ª Ed.e. 2008. 1301–1316 p.
- 17. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? Intensive Care Medicine. 2014,40: 1241-1255.
- Gómez-López A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Pharmacotherapy of Yeast infections. 2008; 9(16):2801–2816.
- 19. Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifungals for systemic use. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27:353-362.
- Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. PLoS Biol. 2013 11(10):e1001692.
- 21. Klepser M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. J Crit Care. 2011;
- 22. Torres-Rodríguez J.M., Del Palacio-Hernanz A., Guarro-Artigas J. N-BR y P-MM. Micología médica. 1993. 29–41 p.
- 23. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: Mechanisms of action. Vol. 11, Trends in Microbiology. Elsevier Ltd; 2003; 6: 272–9.
- 24. Chen SCA, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: A comparison. Drugs. 2011.
- 25. Murray, P., Rosenthal KS& PM. Microbiología médica. 2017.
- 26. Romero M. Actividad antifúngica de las equinocandinas. Estudio específico de Caspofungina. 2006. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- 27. Perlin D. Current perspectives on echinocandin class drugs. 2011; 4: 441–457.
- Martínez-Esparza M, Aguinaga A, González-Párraga P, García-Peñarrubia P, Jouault T, Argüelles JC. Role of trehalose in resistance to macrophage killing: study with a *tps1/tps1* trehalose-deficient mutant of *Candida albicans*. 2007;13:384–394.
- 29. Argüelles JC. Why Can't Vertebrates Synthesize Trehalose? J Mol Evol. 2014;79(3-4):111-6.
- Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Maicas S, Argüelles J-C & Valentín E. 2014. In *Candida parapsilosis* the *ATC1* Gene Encodes for an Acid Trehalase Involved in Trehalose Hydrolysis, Stress Resistance and Virulence. PLoS One 9: e99113.
- 31. Sánchez-Fresneda R, Guirao-Abad JP, Martinez-Esparza M, Maicas S, Valentín E. & Argüelles, J.C. 2015. Homozygous deletion of *ATC1* and *NTC1* genes in *Candida parapsilosis* abolishes trehalase activity and affects cell growth, sugar metabolism, stress resistance, infectivity and biofilm formation. Fungal Genet Biol. 85: 45–57.

- 32. Argüelles JC. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. Arch Microbiol. 2000;174(4):217–224.
- 33. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule.Glicobiology. 2003;13(4):17R-27.
- 34. Alvarez-Peral FJ, Zaragoza O, Pedreño Y, Argüelles JC. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. Microbiology. 2002;148(8):2599–606
- 35. François J, Parrou JL. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 2001;25(1):125–45.
- 36. Argüelles J-C. Trehalose as antifungal target: The picture is still incomplete. Virulence.2017; 8(2):237–8.
- Pedreño Y, González-Párraga P, Martínez-Esparza M, Sentandreu R, Valentín E, Argüelles J-C. 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. 2007; 153:1372–81.
- González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza O, Argüelles J-C. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta. 2011;1810(8):777–83.
- 39. Eleutherio E, Panek A, De Mesquita JF, Trevisol E, Magalhães R. Revisiting yeast trehalose metabolism. Curr Genet. 2015; 61(3):263-274.
- 40. Maicas S, Guirao-Abad JP, Argüelles JC. Yeast trehalases: Two enzymes, one catalytic mission. Biochim Biophys Acta General Subjects.; 2016; 1860: 2249–54.
- 41. San Miguel PF, Argüelles JC. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1994;1200(2):155–60.
- 42. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, et al. Trehalose: A review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food Chem Toxicol. 2002; 40: 871–98.
- 43. Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B. Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling. Vol. 10, International J Mol Sci. 2009. p. 3793–810.
- 44. Sambrook, J. EF y TM. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harb. 1989;2nd ed.
- 45. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265–275
- 46. Ludovico P, Côrte-Real M, Sansonetty F. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. Biochim Biophys Acta. 2001;147(12):3335–43.

- 47. Hwang JH, Hwang I-S, Liu Q-H, Woo E-R, Lee DG. (+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*. Biochimie. 2012;94(8):1784–93.
- 48. Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. 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. 2014; 58:6627–38.
- 49. González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. Yeast. 2003;20(14):1161–1169.
- 50. Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Alburquerque B, Hernández JA, Argüelles J-C. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. Internat J Med Microbiol. 2017;307:241–248.
- 51. Guirao-Abad JP, Pujante V, Sánchez-Fresneda R, Yagüe G, Argüelles J-C. Sensitivity of the *Candida albicans* trehalose-deficient mutants *tps1*△ and *tps2*△ to amphotericin B and micafungin. J Med Microbiol. 2019; 68: 1479-1488.
- 52. Türel Ö. Newer antifungal agents. Expert Rev Ant Infect. 2011;9(3):325–38.
- 53. Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJP, et al. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. Mol Biol Cell. 2006; 17:1018–1032.
- Guirao-Abad J.P., R. Sánchez-Fresneda, E. Román, J. Plá, J.C. Argüelles y R. Alonso-Monge. The MAPK Hog1 mediates the response to Amphotericin B in *Candida albicans*. Fungal Genet. Biol. 2020; 136:103302.
- Chandra, J. y Mukherjee, P.K. *Candida* biofilms: development, architecture and resistance. Microbiol. Spectr. 2015; 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.
- 56. Eleutherio E, Brasil A de A, França MB, de Almeida DSG, Rona GB, *et al.* 2018. Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons. Fungal Biol. 122:514–525.
- 57. Avonce N., Mendoza-Vargas A., Morett E. & Iturriaga G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. BMC Evol. Biol. 6: 109.
- Sakaguchi, M. 2020. Diverse and common features of trehalases and their contributions to microbial trehalose metabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104(5):1837-1847. doi: 10.1007/s00253-019-10339-7.
- 59. Tournu, H., A. Fiori, P. & Van Dijck, P. 2013. Relevance of trehalose in pathogenicity: some general rules, yet many exceptions, PLoS Pathog. 9: e1003447.
- 60. Thammahong, A, Puttikamonkul, S, Perfect, JR et al. (2017) Central role of the trehalose biosynthesis pathway in the pathogenesis of human fungal infections: opportunities and challenges for therapeutic development. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 81: e00053-16.
- 61. Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. Biochem. J. 280:309-316.
- 62. Pedreño, Y., Maicas, S., Argüelles, J.C., Sentandreu, R., Valentín, 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.
- 63. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignement s earch tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360.
- 64. Skrzypek MS, Binkley J, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G (2017). The Candida Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. Nucleic Acids Res. 45 (D1); D592-D596.
- Sievers F., Wilm, A., Dineen, D. Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D. 2011 Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol. Syst. Biol.7: 539. doi: 10.1038/msb.2011.75.
- 66. Gattiker A., Gasteiger E. & Bairoch A. 2002. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. Applied Bioinformatics 1: 107-108.
- 67. Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C. *et al.* 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10: 845–858. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053
- Larkin, M.A., Blackshields, G. Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0, Bioinformatics, 23: 2947–2948, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404.
- 69. Eck, R., Bergmann, C., Ziegelbauer, K. Schonfeld, W. & Kunkel, A. 1997. A neutral trehalase gene from *Candida albicans*: molecular cloning, characterization and disruption. Microbiology 143: 3747–3756.
- 70. Gancedo, C. & 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.
- 71. Perfect JR, Tenor JL, Miao Y, Brennan RG. 2017. Trehalose pathway as an antifungal target. Virulence 8: 143-147.
- 72. Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Levitz, S. M.; Netea, M. G. & White, T.C. 2012. Hidden killers: Human fungal infections. Sci. Transl. Med. 4: 165rv13.
- 73. Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit. Ver. Microbiol. 36: 1-53.
- 74. Blázquez. M.A., Gancedo, J.M., Gancedo, C., 1994. Use of *Yarrowia lipolytica* hexokinase for the quantitative determination of trehalose 6-phosphate. FEMS Microbiol. Lett. 121: 223-227.
- 75. Zaragoza, O., Blazquez, M.A. & Gancedo, C. 1998. Disruption of the *Candida albicans TPS1* gene encoding trehalose-6P-synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. J. Bacteriol. 180, 3809-3815.

- 76. Zaragoza, O., de Virgilio, C., Ponton, J. & 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.
- 77. Maidan, M.M., De Rop, L., Relloso, M., Diez-Orejas, R., Thevelein, J.M., Van Dijck, P., 2008. Combined inactivation of the *Candida albicans GPR1* and *TPS2* genes results in a virulence in a mouse model for systemic infection. Infect. Immun. 76: 1686-1694.
- 78. Van Dijck, P., De Rop, L., Szlufcik, K., Van Ael, E. & 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.
- 79. Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., de Virgilio, C., Wiemken, A. & Thevelein, J.M. 1998. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. J. Biol. Chem. 273: 33311-33319.
- 80. Vuorio, O.E., Kalkkinen, N. & Londesborough, J. 1993. Cloning of two related genes ebconding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 216: 849-861.
- 81. Miao Y, Tenor JL, Toffaletti DL, Maskarinec SA, Liu J, *et al.* 2017. Structural and *in vivo* studies on Trehalose-6-Phosphate synthase from pathogenic fungi provide insights into its catalytic mechanism, biological necessity, and potential for novel antifungal drug design. MBio 8: e00643-17.
- Miao, Y., Tenor, J.L., Toffaletti, D.L., Washington, E.J., Liu, J., Shadrick, W.R., Schumacher, M.A., Lee, R.E., Perfect, J.R. & Brennan, R.G. 2016. Structures of trehalose-6-phosphate phosphatase from pathogenic fungi reveal the mechanisms of substrate recognition and catalysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 113: 7148-7153.
- 83. De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jeno, P., Boller, T. & Wiemken, A. 1993. Disruption of T*PS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose 6-phosphate synthse/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6P and loss of trehalose-6P phosphatase activity. Eur. J. Biochem. 212: 315-323.
- 84. Piper, P.W. & Lockheart, A. 1988. A temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in the specific phosphatase of trehalose biosynthesis. FEMS Microbiol. Lett. 49: 245-250.