



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Caracterización del Gen *ATC1* de
Candida Parapsilosis: Clonación,
Estudio Fenotípico e Interacción con el
Sistema Inmunitario.

Dña. Ruth Sánchez-Fresneda Pinto
2013



UNIVERSIDAD DE MURCIA



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

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

CERTIFICAN: Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: “**Caracterización del gen *ATC1* de *Candida parapsilosis*: clonación, estudio fenotípico e interacción con el sistema inmunitario**”, que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Murcia **Dña. Ruth Sánchez-Fresneda Pinto** para optar al Título de Doctor, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios de las Facultades de Biología y Medicina en la Universidad de Murcia y de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Valencia, respectivamente.

Una vez examinado su contenido, estimamos que la Memoria cumple con los criterios de rigor y calidad científica exigibles y autorizamos su defensa ante el tribunal correspondiente.

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

Murcia a 1 de Febrero de 2013.

Fdo. María Martínez-Esparza Alvargonzález

Fdo. Juan Carlos Argüelles Ordóñez

Fdo. Eulogio Valentín Gómez

Parte de los resultados contenidos en la presente Memoria, van a ser objeto de una publicación científica especializada que corresponde a la siguiente referencia:

Sánchez-Fresneda *et al.*, 2013

“*ATC1* gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of acid trehalase in virulence” (Manuscrito en preparación.)

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

BIO-BMC 06-01-003. Dirección General de Investigación, Comunidad de Murcia.

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

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

Reflexionar sobre el papel, lo increíble que han sido para mí estos años de trabajo de investigación, resulta difícil, pero más todavía es expresar en unas pocas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas de las cuales he recibido ayuda, apoyo, consejo y orientación.

A mis directores, los Dres: María Martínez-Esparza Alvargonzalez; Juan Carlos Argüelles Ordoñez y Eulogio Valentín Gómez, no sólo por su dirección y orientación en la realización de esta Tesis, sino también por el tiempo dedicado, así como por su constante estímulo y apoyo en los momentos más difíciles, sin los cuales, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo. De manera especial agradecer a Juan Carlos Argüelles, su papel como director, por ofrecerme esta oportunidad de iniciarme y conocer el mundo de la investigación, por confiar desde el primer momento en mí, gracias por tu estímulo incondicional, por tu gran paciencia, tu comprensión y por brindarme además, tu auténtica amistad en los ratos de café y en los ensayos de laboratorio.

A mis compañeros/as de laboratorio: comenzaré por los de Valencia, que convirtieron mi estancia en inolvidable: a Sam, "mi primer profe", por enseñarme todo sobre la biología molecular y por esos cafés tan agradables. A Teresa, por ser tan buena compañera, por tus consejos y por esa alegría y positivismo que transmites con tu sonrisa. A Miguel, por resolver las numerosas dudas experimentales, tú siempre dispuesto a ayudar y a enseñar. A Antonio, por tu ayuda incondicional en todos los sentidos, por hacer agradables esas largas horas de laboratorio. A Leslie, por tu gran ayuda y esas conversaciones tan amenas que teníamos. A Julia, Mapí, Jihene, la Tunecina con más alegría que he conocido. A los botánicos, Richi y Belén por esas amenas comidas. Gracias a todos por ser como soís, amigos para toda la vida.

También agradecer al Dr. Rafael Sentandreu y Dr. Lucas del Castillo, su ayuda científica y su interés por mi trabajo. Al Dr. Sergi Maicas, al que agradezco entre otras cosas, su ayuda en la modelización de la proteína

Y como no, a todos mis compañeros de laboratorio de Murcia, que han compartido mis andanzas desde el comienzo, hasta el final de este proyecto. A José

Pedro "mi primer becario oficial" por tu ayuda, te deseo mucha suerte en este largo camino. A la Dra. Pilar González Párraga gracias por tu ayuda en los experimentos a pesar de tu limitado tiempo y por enseñarme todo lo que tú sabes. A mis compañeros de medicina: Ana, Antonio, David, Marta. .

Al Dr. Oscar Zaragoza, por acogerme con tanta amabilidad en el ISCIH y por la ayuda científica que recibí en su laboratorio y a todos los demás compañeros de dicho centro, que hicieron que esa corta estancia fuera agradable: Luis, Rocío, Agustina, Lili, Cristina, a la Dra. Emilia Mellado y muy especialmente a Ana-Cecilia, por esa alegría y positivismo que transmites y por aquellos cafés tan largos y llenos de consejos, gracias por ser mi amiga.

A mi familia, mis tíos: Gemma, Calixto, Alejandro. Gracias por vuestros ánimos y consejos. A mi Madre que aunque estamos lejos, te siento muy cerca, gracias por apoyarme en mis decisiones, que sé, que a veces han sido duras para ti, pero que gracias a ellas, hoy estoy aquí y soy lo que soy. Papá, estés donde estés, este trabajo es también para ti.

A Javi, gracias por cruzarte en mi camino, por tu gran ayuda en la parte final de este proyecto, por tu enorme paciencia y sacrificio, por estar siempre ahí. Espero que seas el mejor apoyo para mis proyectos futuros durante el resto de nuestra vida.

Por último, pero no por ello menos importante, quería agradecer de una manera muy especial y con todo el cariño del mundo a alguien que para mí, es mi segunda madre, una persona que me ha dado todo en este mundo sin pedir nada a cambio, que siente orgullo en cada éxito que alcanzo. Realmente soy lo que soy gracias a ti: Abuela. Gracias por tus consejos, tu apoyo y sobre todo por la gran fuerza que transmites desde tu interior. Aquí tienes lo que tanto me pediste, la devolución de tu Tesis. Ojala sigamos recorriendo juntas un largo camino científico.

Gracias a todos por compartir conmigo este momento.

A mi Abuela y a mi Madre

Para tí, Javí

*“No basta con dar pasos que puedan conducir
hasta la meta; sino que cada paso sea una meta,
sin dejar de ser un paso. »*

Johann Peter Eckermann

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1. Taxonomía del género <i>Candida</i>	2
I.2. Generalidades de <i>Candida parapsilosis</i>	3
I.3. Distribución por especies de aislados de <i>Candida</i> según diferentes estudios epidemiológicos	6
I.3.1. Distribución a nivel Mundial	6
I.3.2. Distribución a nivel de España	7
I.4. Factores de riesgo	8
I.5. <i>Candida parapsilosis</i> como agente patógeno	9
I.5.1. Factores de virulencia	9
I.5.1.1. Adherencias y formación de biopelículas	10
I.5.1.2. Secreción de enzimas	12
I.5.1.2.1. Secreción de proteasas	12
I.5.1.2.2. Lipasas	13
I.5.1.2.3. Fosfolipasas	13
I.5.2. Terapia antifúngica	14
I.6. Mecanismos moleculares de respuesta a estrés	16
I.6.1. Ruta de respuesta general a estrés	17
I.6.2. Respuesta a estrés oxidativo	19
I.6.3. Respuesta a choque térmico	20
I.6.4. Respuesta a estrés hiperosmótico	20
I.6.5. Acumulación de solutos protectores frente a estrés	21
I.7. Trehalosa	22
I.8. Metabolismo de trehalosa	25
I.8.1. Biosíntesis de la trehalosa	25
I.8.2. Hidrólisis de la trehalosa: trehalasas	26
I.9. Respuesta inmunitaria en hongos	28
I.9.1. Pared celular de levaduras	29
I.9.2. Reconocimiento de levaduras por células del hospedador	32
I.9.3. Activación de las defensas del hospedador en la protección antifúngica	35
I.10. Objetivos	38

II. MATERIALES Y MÉTODOS.	39
II.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	39
II.1.1. Levaduras	39
II.1.2. Bacterias	41
II.2. Líneas celulares humanas y condiciones de cultivo	42
II.3. Medida del crecimiento celular.	43
II.3.1. Turbidimetría	43
II.3.2. Peso húmedo	43
II.3.3. Recuentos celulares	43
II.4. Plásmidos	44
II.5. Transformaciones con ADN exógeno	44
II.5.1. Transformación en bacterias	44
II.5.2. Transformación en levaduras	45
II.6. Purificación de ADN	41
II.6.1. ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	46
II.6.2. ADN cromosómico de levaduras	46
II.7. Tratamiento enzimático del ADN	47
II.7.1. Digestión con endonucleasas de restricción	47
II.7.2. Tratamiento con ligasa de T4	48
II.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
II.8.1. Diseño de cebadores	48
II.8.2. Condiciones de reacción	49
II.8.3. Transcripción reversa (RT-PCR)	50
II.9. Separación y purificación de ADN en geles de agarosa	51
II.10. Purificación del ARN total de levaduras	52
II.11. Cuantificación de ADN y ARN	53
II.12. Detección específica de secuencias de ADN por Southern Blot	53
II.12.1. Separación y transferencias de ADN	53
II.12.2. Marcaje no radiactivo de sondas de ADN	54
II.12.3. Hibridación ADN/ADN y detección	54
II.13. Interrupción génica en <i>C. parapsilosis</i>	55
II.14. Modelización de la proteína Atc1p de <i>C. parapsilosis</i>	56

II.15. Tratamientos de estrés: viabilidad y sensibilidad	56
II.15.1. Ensayo de viabilidad	57
II.15.2. Ensayo de sensibilidad	57
II.16. Obtención de extractos libres de células	58
II.17. Determinación colorimétrica de proteína: método de Lowry	59
II.18. Medidas de actividades enzimáticas	60
II.18.1. Catalasa	60
II.18.2. Glutación reductasa	60
II.18.3. Actividades trehalasas	61
II.19. Valoración analítica de glucosa. Método de la Glucosa-oxidasa	62
II.20. Determinación del contenido intracelular de trehalosa, glicerol y D-arabitol.	63
II.20.1. Valoración enzimática del contenido intracelular de trehalosa	63
II.20.2. Determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del contenido intracelular de trehalosa, glicerol y D-arabitol	64
II.20.2.1. Preparación de las muestras	64
II.20.2.2. Preparación de los patrones	65
II.20.2.3. Cuantificación de las muestras	66
II.21. Ensayos de filamentación en <i>C. parapsilosis</i>	66
II.21.1. Medio líquido	66
II.21.2. Medio sólido	67
II.22. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de diferentes antifúngicos	67
II.23. Análisis de la hidrofobicidad de levaduras	68
II.24. Cuantificación de la resistencia a lisis medida por macrófagos	70
II.25. Determinación de citoquinas mediante Elisa	71
II.26. Determinación de oxido nítrico	72
II.27. Ensayo de invasividad en modelo murino	73
II.28. Ensayo de virulencia en el lepidóptero <i>Galleria mellonella</i>	74
II.29. Fagocitosis <i>in vivo</i> <i>Galleria mellonella</i>	76
II.30. Soporte bioinformático, representación gráfica de los resultados y tratamiento estadístico de los datos	78

III. RESULTADOS.	81
Interrupción de los genes <i>ATCI</i> y <i>NTCI</i>	
III.1. Identificación <i>in silico</i> de posibles trehalasas ácidas	81
III.2. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen <i>CpATCI</i>	84
III.2.1. Estudio de la región 5' no codificante	84
III.2.2. Estudio de la región 3' no codificante	85
III.2.3. Estudio de la región codificante	88
III.3. Características de la secuencia proteica Atc1p	90
III.4. Modelo de homología de Atc1p	93
III.5. Interrupción del gen <i>ATCI</i>	84
III.5.1. Construcción del casete de interrupción	96
III.5.2. Obtención del mutante homocigótico para el gen <i>ATCI</i>	98
III.6. Reintegración del gen <i>ATCI</i> en el mutante nulo	103
III.7. Interrupción del gen <i>NTCI</i> sobre el fondo del mutante nulo (<i>atc1/atc1</i>)	104
III.7.1. Construcción del casete de interrupción	104
III.7.2. Obtención del mutante doble para el gen <i>NTCI</i> y <i>ATCI</i>	106
Caracterización funcional del gen <i>ATCI</i>	
III.8. Análisis del ciclo de crecimiento en medios con distintas fuentes de carbono	111
III.9. El mutante nulo no crece sobre trehalosa como fuente de carbono	113
III.10. Papel funcional del gen <i>ATCI</i> en respuesta a estrés oxidativo, salino y térmico	115
III.10.1. Contenido intracelular de trehalosa, glicerol y D-arabitol en respuesta a estrés oxidativo, salino y térmico	119
III.11. Determinación de las actividades trehalasa neutra (Ntc1p) y ácida (Atc1p) en respuesta a estrés oxidativo, salino y térmico	126
III.12. Determinación de actividades enzimáticas con función antioxidante en respuesta a estrés	127

III.13. Estudio de la transición dimórfica en <i>C. parapsilosis</i>	130
III.13.1. Inducción de filamentación en medio líquido	131
III.13.2. Morfología colonial en placa	133
III.14. Estudio de la sensibilidad celular frente a distintos antifúngicos	134
III.15. Estudio de la hidrofobicidad de la superficie celular en <i>C. parapsilosis</i>	135
Estudio de la interacción del gen <i>ATC1</i> con el sistema inmunitario	
III.16. Análisis de la resistencia a lisis mediada por macrófagos humanos	139
III.17. Estudio de la participación del gen <i>ATC1</i> de <i>C. parapsilosis</i> en la inducción de la producción de citoquinas en macrófagos	140
III.18. Determinación del óxido nítrico	143
III.19. Estudio de la invasividad de <i>C. parapsilosis</i> en modelo murino	144
III.20. Estudio de la virulencia de <i>C. parapsilosis</i> en modelo no mamífero: <i>Galleria mellonera</i>	147
III.20.1. Determinación de la concentración de inóculo en ensayos de virulencia en larvas de <i>G. mellonella</i>	147
III.20.2. Ensayo de virulencia	149
III.21. Estudio de la fagocitosis <i>in vivo</i> de <i>C. parapsilosis</i> en <i>G. mellonella</i>	151
IV. DISCUSIÓN.	155
IV.1. Interrupción de los genes <i>ATC1</i> y <i>NTC1</i>	156
IV.2. Caracterización funcional del gen <i>ATC1</i>	158
IV.3. Estudio de la interacción del gen <i>ATC1</i> con el sistema inmunitario	165
V. CONCLUSIONES.	167
VI. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	169
VII. BIBLIOGRAFÍA.	175

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

En las últimas décadas, las infecciones fúngicas invasivas se han convertido en un importante problema para la salud pública, debido a sus altas tasas de mortalidad y morbilidad, sobre todo, en enfermos afectados de inmunodeficiencias severas y en pacientes hospitalizados con enfermedades subyacentes (Pfaller y Diekema, 2007; 2010). Los patógenos más frecuentemente implicados en micosis sistémicas, pertenecen a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* y *Aspergillus*. La distribución de los agentes causales, se ha visto que varían en función de la geografía, el estado sanitario de los pacientes, así como, de las condiciones que existen en las unidades de hospitalización (Pemán y Salavert, 2012).

Se considera que *Candida albicans* es el principal agente etiológico de las infecciones fúngicas, pero con más frecuencia se aíslan otros microorganismos, que actúan como patógenos emergentes. Es el caso de las especies incluidas como “no-*albicans*” dentro del género *Candida*, entre las que destacamos: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Silva *et al.*, 2011).

Estas recientes investigaciones, confirman que *C. parapsilosis* posee una gran relevancia desde el punto de vista clínico, ya que constituye el segundo aislado más frecuente en hemocultivos y el primero en las manos del personal sanitario (Trofa *et al.*, 2008). Es destacable que *C. parapsilosis*, es un patógeno exógeno, se localiza en la piel, más que en las superficies mucosas y posee una elevada capacidad para formar biopelículas en materiales intravasculares o protésicos. Siendo además, una de las principales especies fúngicas aisladas en neonatos (Trofa *et al.*, 2008; Nosek *et al.*, 2009).

En consecuencia, hemos considerado de gran interés abordar el análisis de la biología molecular de este microorganismo. Ello nos permitirá un mejor conocimiento de su genoma, con el propósito de identificar posibles dianas alternativas para el desarrollo de nuevos antifúngicos, más selectivos y potentes.

En el presente trabajo, a partir del gen *ATC1* (Acid Trehalase *Candida*), previamente identificado en *C. albicans*, como el gen codificante de la proteína trehalasa ácida, se ha procedido a la clonación y caracterización funcional del gen

ortólogo en *C. parapsilosis*. A continuación se realizará una breve introducción general con objeto de facilitar una mejor comprensión de la presente Memoria.

I.1. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Candida*.

El género *Candida* se clasifica taxonómicamente dentro del phylum *Ascomicota*, orden *Saccharomycetales*, perteneciendo a la familia *Saccharomycetaceae*. Su definición taxonómica comprende células vegetativas con gemación multilateral, carentes de reproducción sexual y capaces de formar pseudohifas o verdadero micelio.

Incluye aproximadamente unas 200 especies cuya característica principal es la ausencia de cualquier forma sexual. Su identificación se ha basado en técnicas convencionales, fundamentadas en la descripción morfológica y fisiológica de especies y géneros, aunque se ha visto que éstas, dependen de las condiciones de cultivo de las cepas individuales, lo que ha ocasionado errores en la ubicación taxonómica. Actualmente, estos problemas se han solucionado con la aplicación de técnicas moleculares, cimentadas principalmente en el análisis de fragmentos conservados y representativos de los ácidos nucleicos. Las más utilizadas son la electroforesis de cariotipo, el análisis de microsatélites, el polimorfismo longitudinal tanto del ADN mitocondrial, como de los fragmentos de restricción del ARN ribosomal, el análisis de los ARN de bajo peso molecular (Barns *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1996; Kurtman *et al.*, 2000) y el empleo del gen *RPS0* (García-Martínez *et al.*, 2010; Vercher *et al.*, 2011).

En 1991, Barns y colaboradores propusieron el árbol evolutivo de las especies patógenas del género *Candida* y sus parientes más cercanos, basándose en las divergencias encontradas en el análisis del gen de la subunidad nuclear pequeña (18S) del ADNr. Los resultados indicaron que *C. parapsilosis* estaba íntimamente relacionada en el grupo de *C. albicans* y actualmente, se engloba en el Clado de *Candida*, cuya característica común es el codón CTG que codifica el aminoácido serina, en lugar de leucina, excluyéndose dentro del mismo género, a las especies *C. glabrata* y *C. krusei* (Butler *et al.*, 2009).

I.2. GENERALIDADES DE *Candida parapsilosis*.

El patógeno *Candida parapsilosis*, se aisló por primera vez en Puerto Rico de las heces de un paciente con diarrea y fue descrita por Ashford en 1928 (Ashford 1928) como una especie de *Monilia*, incapaz de fermentar la maltosa. La especie se denominó *Monilia parapsilosis* para distinguirla de *Monilia psilosis*, aislada con más frecuencia y hoy mejor conocida como *Candida albicans* (Trofa *et al.*, 2008). En la Tabla. 1.1, se detallan una breve reseña histórica y evolución de la nomenclatura de dicha levadura.

Tabla I.1. Primeras referencias históricas referentes a la procedencia y nomenclatura de *Candida parapsilosis*.

Cronología de la nomenclatura de <i>C. parapsilosis</i>	
1926	Poll y Nann, propusieron el sinónimo: <i>Monilia onychopila</i>
1928	Ashford, fue el primero en aislarla y la describió como <i>Monilia parapsilosis</i>
1932	Langeron y Talice, la nombraron <i>C. parapsilosis</i> , nombre habitual de esta levadura diploide.
1940	Agente etiológico de una endocarditis en un adicto a drogas por vía parenteral, en este momento se asoció la infección con una introducción exógena de <i>C. parapsilosis</i> , a través de los instrumentos médicos invasivos y las soluciones de nutrición parenteral (Trofa <i>et al.</i> , 2008).
1987	Scherer y colaboradores mostraron que los aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> eran genéticamente heterogéneos y los clasificaron en tres grupos (I, II, III), en base a las regiones ITS y la secuencia del ADN ribosomal 5,8S. A partir de aquí se le denominó <i>C. parapsilosis complex</i> .
2005	Tavanti y colaboradores, estimaron que existían diferencias genotípicas entre los aislamientos de estos grupos, de esta forma, <i>C. parapsilosis</i> grupo I mantiene el nombre de <i>C. parapsilosis</i> y los aislamientos del grupo II y III constituyen las nuevas especies <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> respectivamente.

Las células de *C. parapsilosis* presentan formas ovaladas, redondas o con disposición cilíndrica. Su tamaño oscila entre 2,5-4 x 2,5-9 μm , siendo las colonias de color blanco, cremoso y de aspecto brillante. En cuanto a la morfología de las mismas, ésta puede ser lisa o rugosa. Se han descrito cuatro morfotipos diferentes: la forma crepe, concéntrica, lisa y cráter (Figura I.1). El fenotipo de la colonia va ligado a la morfogenia de la levadura, así mientras que los fenotipos crepe y concéntrico están compuestos principalmente por pseudohifas, los fenotipos cráter y liso lo están por células levaduriformes (Laffey y Butler 2005). (Figura I.1).

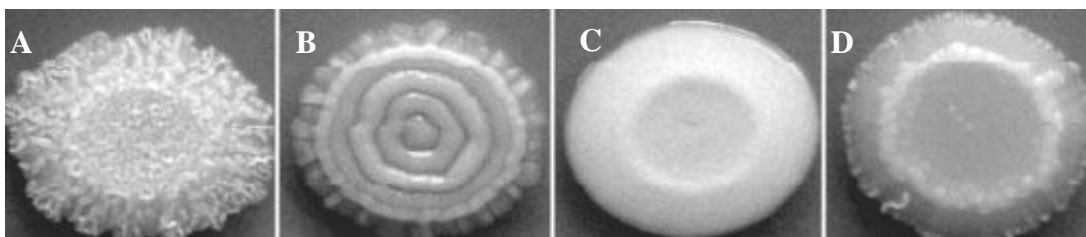


Figura I.1. Diferentes morfologías coloniales obtenidas a partir de un aislado clínico de *C. parapsilosis*. A) Morfología en forma de crepe. B) Colonia con forma concéntrica. C) Colonia con forma lisa. D) Colonia con forma de cráter (Laffey y Butler, 2005).

La morfogénesis constituye un punto crítico en la investigación de *C. parapsilosis*, porque, a diferencia de *C. albicans*, la primera no es capaz de producir un verdadero micelio, aunque sí, puede realizar una transición dimórfica de levadura a pseudohifa. Sin embargo la forma de sus colonias es similar a la de *C. albicans*, pero *C. parapsilosis* difiere microscópicamente por la presencia de pseudohifas largas y curvadas denominadas células gigantes (Silva *et al.*, 2011). A continuación describiremos el patrón morfológico general desarrollado por el género *Candida*.

Como criterio básico, la **morfología levaduriforme** se denomina como blastoconidios o blastosporas (Figura I.2.A), células que se reproducen asexualmente por gemación multilateral, correspondiendo a la fase unicelular del hongo (Figura I.2.B1). Cuando la yema alcanza su tamaño óptimo, se produce la división celular y se forma una cicatriz de gemación entre la célula madre y la hija (Figura I.2.B1). Otro tipo celular son las **hifas**, cuya agrupación da lugar a los micelios; se corresponden con células que han sufrido un crecimiento apical continuo, la elongación va seguida de tabicación interna mediante septos dispuestos a intervalos regulares, conservando una comunicación intraplasmática a través de poros en los septos de división. Pueden generar yemas laterales o ramificaciones que continúan siendo mononucleadas. Por el contrario, las **pseudohifas** (o pseudomicelios), están constituidas por células que permanecen unidas a la madre después de dividirse, dando como resultado agrupaciones de células alargadas unidas, de aspecto variable, en cadenas y racimos, pero sin continuidad citoplasmática (Figura I.2.B2).

Existen evidencias recientes de que la formación de pseudohifas en *C. parapsilosis* va unida a un aminoácido específico, en concreto la citrulina, que causa cambios significativos en la morfología de las células y por tanto de las colonias (Kimet

et al., 2006). *C. parapsilosis*, es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente natural, se encuentra habitualmente como comensal en tejidos epiteliales y mucosas de los seres humanos, pero su hábitat no está restringido exclusivamente al hombre, ya que se ha aislado también de animales domésticos, insectos o de diversos hábitats como el suelo y ambientes marinos (Carruba *et al.*, 1991; Suh *et al.*, 2008).

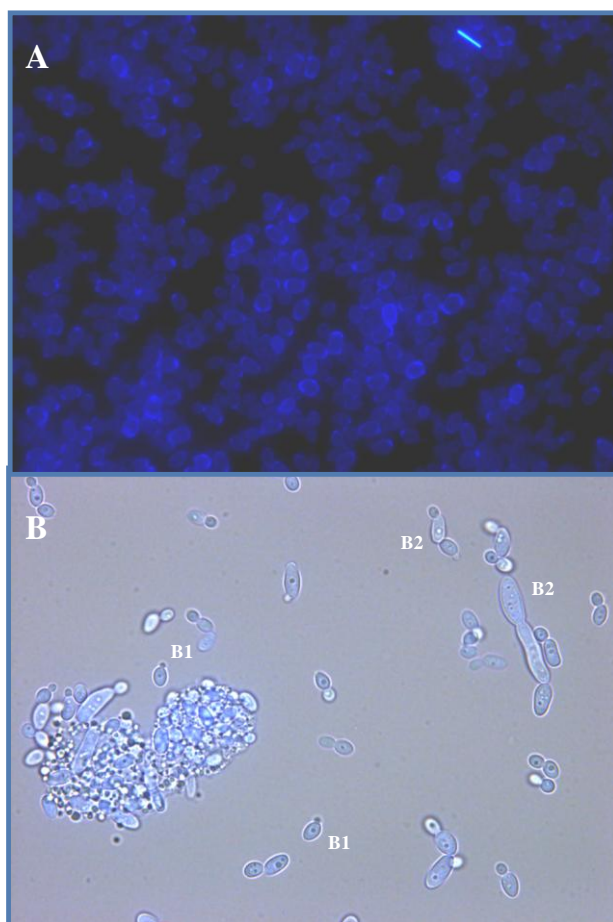


Figura I.2. Micrografías correspondientes a los distintos tipos morfológicos presentes en *C. parapsilosis*. El panel **A**) muestra una imagen correspondiente a una célula levaduriforme o blastoconidios. El panel **B**) muestra una imagen de reproducción por gemación (**B1**), junto con la formación de pseudohifas (**B2**). Las levaduras fueron teñidas de acuerdo con el protocolo descrito en el Apartado II. 29 de Materiales y Métodos y se observaron por microscopía de fluorescencia (x100 aumentos).

Respecto a las condiciones de cultivo, *C. parapsilosis* presenta requerimientos nutritivos relativamente simples, pudiendo crecer sobre un sustrato mineral que contenga fuente de carbono (glucosa u otros azúcares), nitrógeno (sales de amonio), fosfato, azufre y algunos cationes divalentes, pero en cambio es incapaz de asimilar y fermentar la lactosa (Tabla I.2) (Silva *et al.*, 2011).

Tabla.I.2. Asimilación de azúcares por *C. parapsilosis*. (+) Reacción positiva; (-) reacción negativa (V), reacción variable y (D) demorada.

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	-	Ribitol	+
Sacarosa	+	Almidón	-	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	+
Celobiosa	-	D-ribosa	v(D)	D-arabinosa	-
Trehalosa	+	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	+	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	+	Insulina	-

I.3. DISTRIBUCIÓN POR ESPECIES DE AISLADOS DE *Candida* SEGÚN DIFERENTES ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.

I.3.1. DISTRIBUCIÓN A NIVEL MUNDIAL.

Más del 90% de las infecciones invasivas causadas por *Candida*, se atribuyen a cinco especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Issatchenkia orientalis*. Sin embargo, *C. albicans* sigue siendo la especie con mayor prevalencia dentro de su género y se aísla frecuentemente como responsable de infecciones superficiales y sistémicas en humanos. Las restantes especies denominadas genéricamente como “no-*albicans*” han sido asociadas de forma creciente con otras enfermedades desde 1990 (Tavanti *et al.*, 2005). Los trabajos de Colombo y colaboradores (2006), indican que se está invirtiendo la relación entre infecciones provocadas por *C. albicans* y *C. no-albicans*, aumentando estas últimas, hasta un 57% del total de casos (Figura I.3).

Sin embargo, los episodios de infección por *C. parapsilosis* se están incrementando en todo el mundo, existiendo variaciones geográficas, en función de las características y de las enfermedades de base de cada paciente. Según datos del “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program” de 2003, *C. parapsilosis* fue la segunda especie más común, aislada de lugares del cuerpo inocuos en personas hospitalizadas, representando un 15,5% de los casos en Norteamérica, el 16,3% en Europa y el 23,4% en Latinoamérica. Tan sólo fue superada por *C. albicans* (51,5%, 47,8% y 36,5%, respectivamente) y por *C. glabrata* (21,3%) en Norteamérica (Messer *et al.*, 2006; Trofa *et al.*, 2008).

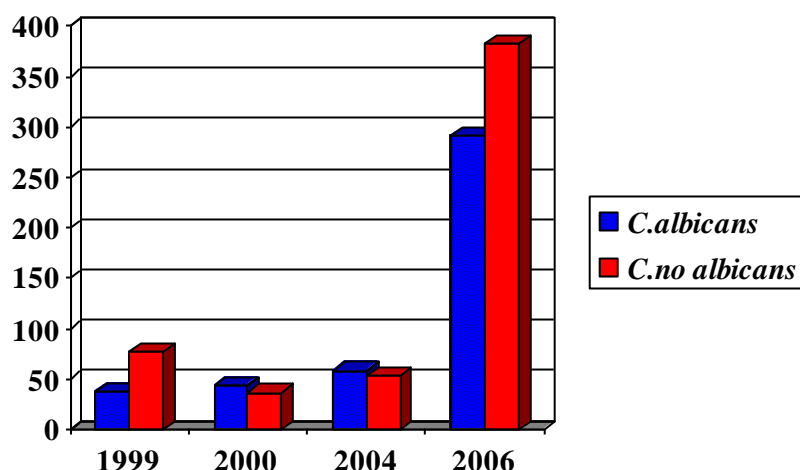


Figura I.3. Representación gráfica del número de candidemias anuales diagnosticadas en Brasil. Está considerado como un país con gran incidencia clínica de infecciones emergentes por hongos oportunistas. Los datos aparecen agrupados en infecciones provocadas por *C. albicans* y *C. no-albicans* (Colombo *et al.*, 2006).

I.3.2. DISTRIBUCIÓN A NIVEL DE ESPAÑA.

En España, los últimos estudios multicéntricos revelaron que *C. albicans* (44,66%) fue la especie aislada en mayor proporción, seguida de *C. parapsilosis* (26,58%), *C. glabrata* (11,47%), *C. tropicalis* (8,21%) y *C. krusei* (1,96%), tal y como se muestra en la Figura I.4 (Pemán *et al.*, 2012).

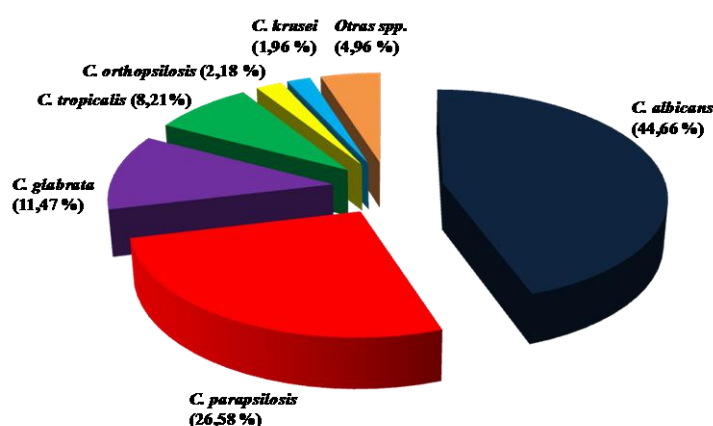


Figura I.4. Gráfico mostrando a nivel de España el porcentaje de aislamientos clínicos de micosis infecciosas causadas por las distintas especies del género *Candida*. El diagrama ha sido elaborado a partir de los datos obtenidos de un estudio multicéntrico realizado en las distintas autonomías del estado (Pemán *et al.*, 2012).

Adicionalmente, un estudio epidemiológico multicéntrico anterior realizado en las diferentes regiones de España, reveló cómo la distribución de las especies del género *Candida* fue homogénea siendo *C. albicans* la especie predominante, a excepción de Galicia y Extremadura, donde *C. parapsilosis* fue la más frecuente; con unas tasas de prevalencia muy superiores a las del resto del país: 47,6% y 58,3%, respectivamente (Saiman *et al.*, 2001; Pemán *et al.*, 2002).

I.4. FACTORES DE RIESGO.

A modo de comparación, las infecciones producidas por *C. albicans* están precedidas por una colonización anterior, 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. Por el contrario, las infecciones causadas por *C. parapsilosis*, pueden ocurrir sin colonización previa del patógeno, transmitiéndose horizontalmente a través de fuentes contaminadas externas, tales como dispositivos médicos, las manos de trabajadores sanitarios, prótesis, catéteres, etc, como ya se ha indicado anteriormente (Trofa *et al.*, 2008).

El aumento de las infecciones debidas a *C. parapsilosis*, se ha atribuido a una amplia variedad de factores de riesgos, incluida la gran capacidad selectiva del organismo para crecer en soluciones de hiperalimentación ricas en glucosa, empleadas en hospitales como nutrición parenteral. Los pacientes inmunocomprometidos, como los afectados de SIDA y otros quirúrgicos, especialmente los sometidos a una cirugía extensiva del tracto gastrointestinal, presentan un riesgo elevado de candidiasis por *C. parapsilosis*. No obstante, la población más sensible a sufrir infecciones nosocomiales por dicha levadura, son los neonatos con muy bajo peso al nacer (Shin *et al.*, 2002; Wisplinhoff *et al.*, 2004 Trofa *et al.*, 2008; Van Asbeck *et al.*, 2009). Otros factores de riesgo a considerar fueron: cateterismo vascular, nutrición parenteral, terapia inmunosupresora, transplante y neutropenia (Almirante *et al.*, 2006). En la Tabla I.3 se resumen las diferentes manifestaciones clínicas producidas por dicho patógeno.

Tabla I.3. Características epidemiológicas y principales manifestaciones clínicas del patógeno emergente *C. parapsilosis* en relación con otras especies de *Candida*.

Manifestaciones clínicas	Datos relevantes
Candidemia	Los índices de mortalidad de candidemias, producidas por <i>C. parapsilosis</i> es del 28,5 % frente a 44,8% de <i>C. albicans</i> (Trofa <i>et al.</i> , 2008).
Endocarditis	<i>C. parapsilosis</i> es la segunda causa más común de las endocarditis fúngicas después de <i>C. albicans</i> , suponiendo el 17% de los casos identificados (Garzoni <i>et al.</i> , 2007).
Meningitis	<i>C. parapsilosis</i> es causa infrecuente de meningitis fúngica, pero se puede presentar en el 1,6 % de los casos frente a <i>C. albicans</i> que es responsable del 90,1 % (Voice <i>et al.</i> , 1994).
Peritonitis	<i>C. albicans</i> es la principal causa de peritonitis fúngica, pero <i>C. parapsilosis</i> se asocia con más frecuencia en pacientes sometidos a diálisis peritoneal (Yinnon <i>et al.</i> , 1999).
Artritis	En un estudio realizado en 1992, identificaron a <i>C. parapsilosis</i> como el agente responsable de 8 casos de artritis, asociados a la implantación de prótesis o a la práctica de artocentesis (Weems., 1992).
Endoftalmitis	<i>C. parapsilosis</i> se asocia con la enfermedad invasiva ocular como endoftalmitis y queratitis, debido a infecciones postoperatorias (Trofa <i>et al.</i> , 2008).
Otomicosis	En un estudio realizado en España se encontró que de los 40 pacientes con otomitosis en un 42,9% se identificó como agente patógeno a <i>C. parapsilosis</i> . (García-Martos <i>et al.</i> , 1993).
Onicomicosis	Las onicomicosis producidas por <i>C. parapsilosis</i> están asociadas con enfermedad distal de la uña, al contrario que la producida por <i>C. albicans</i> que se manifiesta como una onicomicosis proximal o total (Segal <i>et al.</i> , 2000).
Vulvovaginitis	<i>C. parapsilosis</i> se aísla poco en casos de vulvovaginitis, sigue siendo la más predominante <i>C. albicans</i> (Otero <i>et al.</i> , 1998).

I.5. *Candida parapsilosis* COMO AGENTE PATÓGENO.

I.5.1. FACTORES DE VIRULENCIA.

Actualmente, existe un cierto debate sobre la verdadera naturaleza y la definición precisa de los factores de virulencia en las levaduras (Silva *et al.*, 2011). Como norma, se podría proponer que todos los rasgos necesarios para el establecimiento de una enfermedad, deben ser considerados factores de virulencia y serán aquellos que interactúan con las células del hospedador causando daño (Haynes, 2001).

La patogénesis en las especies de *Candida* está mediada por un gran número de atributos responsables de su virulencia; entre los que destacan la adherencia y la formación de biopelículas tanto en el tejido del hospedador, así como en dispositivos médicos o la producción de diversas enzimas hidrolíticas que dañan al hospedador: hidrolasas, proteasas, fosfolipasas y hemolisinas, entre otras (Trofa *et al.*, 2008; Silva *et*

al., 2011). Se ha investigado mucho en la identificación de estos factores en *C. albicans*, pero en el caso de *C. parapsilosis* los datos obtenidos son relativamente escasos. A continuación se describen de manera independiente, cada uno de estos factores de virulencia.

I.5.1.1 ADHERENCIA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

La adhesión es la primera etapa de la colonización de los microorganismos a la superficie de células hospedadoras y es un factor crucial para que la infección se desarrolle con éxito. Los receptores fúngicos implicados en este proceso se denominan adhesinas y se expresan en la superficie del hongo (Chaffin *et al.*, 1998).

Concretamente en *C. parapsilosis* se han descrito genes ortólogos a *C. albicans*, entre los que se incluyen miembros de la familia *HWPI* y *ALS*. Se han identificado cinco genes pertenecientes a la familia *ALS* y parece posible que la expresión de algunos de ellos, este regulada por *BCR1* (Biofilm and Cell Wall Regulator 1), un factor de transcripción requerido para la formación de biopelículas en ambas especies: *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Dicho factor transcripcional regula genes que codifican para adhesinas y proteínas de la pared celular como *ALS1*, *ALS3*, *HWPI* y *RBT5* (Blankenship y Mitchell, 2006; Ding *et al.*, 2011). A pesar de que el genoma de *C. parapsilosis* contiene miembros de alguna de esta familia de adhesinas, existen notables diferencias entre las especies, por ejemplo *ALS3* solo ha sido identificada en *C. albicans* y no en ninguna otra especie de *Candida* (Butler *et al.*, 2009).

Cuando *C. parapsilosis* se adhiere a una superficie, produce una biopelícula consistente en una estructura compleja donde están inmersas levaduras y pseudohifas, dispuestas en una estructura tipo bicapa (Figura I.5). Las biopelículas son comunidades celulares, de una o varias especies de microorganismos, embebidas en una matriz polisacárida altamente hidratada, adheridas sobre superficies biológicas o inertes y comunicadas con el exterior mediante canales de agua. Estas formaciones biológicas son organizaciones muy heterogéneas con diferentes ambientes de pH, concentración de iones, oxígeno, carbono y nitrógeno (Pemán *et al.*, 2008).

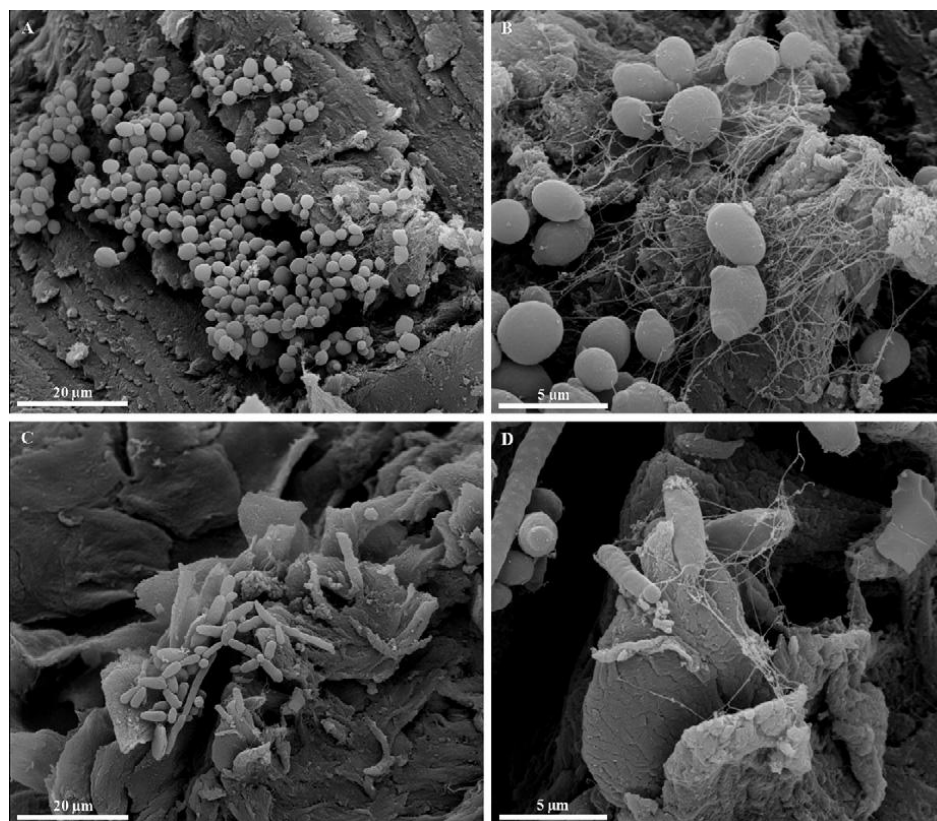


Figura I.5. Micrografía electrónica de barrido donde se pone de manifiesto la adhesión *in vitro* de *C. parapsilosis* sobre la superficie de la uña humana. **A)** Agrupación de levaduras unicelulares (blastoconidios o blastosporas). **B)** En esta imagen con mayor aumento se observa como las levaduras se conectan entre sí, a través de una matriz fibrilar extracelular, que además también conecta con la superficie de la uña. **C)** Se presenta el otro tipo morfológico que posee *C. parapsilosis*, la forma de pseudohifa. **D)** Matriz fibrilar extracelular que mantiene unidas las pseudohifas entre sí, y también con la superficie de la uña (Oliveira *et al.*, 2010).

Las biopelículas de *C. parapsilosis* se pueden desarrollar tanto en superficies naturales del hospedador, como en utensilios y dispositivos médicos tipo implantes, catéteres, válvulas cardíacas, lentes oculares, prótesis articulares, etc., convirtiéndose en un foco de diseminación de la infección (Weems, 1992; Trofa *et al.*, 2008).

En contraste con *C. albicans*, *C. parapsilosis* suele producir menos biopelículas y con menor complejidad estructural (debido a la ausencia de hifas verdaderas), no obstante, muestra un grado de resistencia similar frente a los tratamientos antifúngicos como las formadas por *C. albicans* (Kuhn *et al.*, 2002; Ding y Butler 2007). Las matrices extracelulares de las biopelículas producidas por *C. parapsilosis*, contienen una gran cantidad de hidratos de carbono, siendo menor el de proteína (Ding *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que en *C. parapsilosis* también existe una correlación directa entre el fenotipo de la colonia y la tipología de las biopelículas formadas, así un fenotipo concéntrico (Figura I.1B), genera cuantitativamente más biopelículas y es capaz de invadir más profundamente el agar que el fenotipo liso (Figura I.1C). Para el resto de fenotipos, junto con las morfologías de crepe (Figura I.1A) y de cráter (Figura I.1D) no se observaron diferencias en la tasa de producción de biopelículas. Por tanto, la forma concéntrica, en principio sería la más eficiente a la hora de adherirse a las superficies y tendría una mayor capacidad de invasión. Se desconocen los mecanismos moleculares que regulan el cambio fenotípico de las colonias y el desarrollo de biopelículas en *C. parapsilosis* (Laffey y Butler, 2005).

I.5.1.2. SECRECIÓN DE ENZIMAS.

En los últimos años, las enzimas secretadas extracelularmente por los patógenos fúngicos, han ganado una considerable atención por su papel esencial por constituir posibles dianas para el diseño de inhibidores sintéticos de interés clínico en el tratamiento de las infecciones.

I.5.1.2.1. SECRECIÓN DE PROTEASAS.

La producción y secreción de proteasas extracelulares, es uno de los factores determinantes de virulencia, ya que favorece la adhesión e invasión del hongo y debilita el sistema inmunitario del hospedador, al degradar o distorsionar estructuras básicas de la superficie celular del mismo y también las sustancias intracelulares y componentes fundamentales de la respuesta inmune. Algunos ejemplos de estas moléculas son: α 2-macroglobulina, β -lactoglobulina, colágeno, fibronectina, o las cadenas pesadas de la inmunoglobulina G (Collina *et al.*, 1996; Pichova *et al.*, 2001). En *C. parapsilosis*, se han identificado tres genes *SAP* (*SAP1*, *SAP2*, *SAP3*), pero la producción de proteínas Sap entre distintas cepas aisladas de *C. parapsilosis*, varía notablemente (Trofa *et al.*, 2008).

I.5.1.2.2. LIPASAS.

Las lipasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos y se caracterizan por su estabilidad a altas temperaturas y en disolventes orgánicos, así como su alta resistencia a la proteólisis (Brockhoff, 1974).

Frente a los diez genes que codifican actividades lipasa en *C. albicans*, sólo se han identificado en *C. parapsilosis* dos genes codificantes de dos lipasas: *LIP1* y *LIP2*, solo *LIP2* codifica una proteína activa (Brunel *et al.*, 2004). También se ha demostrado que inhibidores de las lipasas reducen el daño tisular de infecciones en tejidos humanos y que mutantes homocigóticos para ambos genes producen menos biopelículas (más finas y menos complejas), observándose un crecimiento más reducido en medios ricos en lípidos. Por tanto, dichos mutantes resultaban ser más fácilmente fagocitados por los macrófagos (Gacser *et al.*, 2007). Estos hallazgos son particularmente importantes en relación con el dato previamente mencionado, de que las infecciones por *C. parapsilosis* ocurren con mayor incidencia en pacientes con bajo peso al nacer y los que reciben una nutrición parenteral rica en lípidos.

I.5.1.2.3. FOSFOLIPASAS.

Las fosfolipasas conforman un grupo heterogéneo de enzimas capaces de hidrolizar una o más uniones éster de los fosfoglicéridos. Las membranas biológicas, al estar constituidas por lípidos y proteínas, constituyen una diana principal para el ataque de fosfolipasas y proteasas. La acción de las fosfolipasas tiende a provocar la disgregación de las membranas biológicas (Ibrahim *et al.*, 1995). Se ha demostrado que las fosfolipasas en *C. albicans* afectan a la virulencia en un modelo de infección murino y también a la adhesión y penetración en células epiteliales (Fernandao *et al.*, 1999), pero la función específica de las fosfolipasas en la patogénesis de *C. parapsilosis*, todavía no está muy clara. Al respecto, existen resultados contradictorios en la literatura científica. Algunos estudios han encontrado elevados valores de actividad lipasa en cepas clínicas de *C. parapsilosis* (Ghannoum, 2000), mientras otros investigadores desmienten estas evidencias (Kautarciogh y Yupei, 2002; Silva *et al.*, 20011). No es descartable que haya una gran heterogeneidad en los niveles de expresión de dichas enzimas, dependiendo de los aislados clínicos analizados, como ocurre con la expresión de la proteína Sap anteriormente citada.

I.5.2. TERAPIA ANTIFÚNGICA.

Las candidemias y candidiasis invasivas (CI) constituyen una importante causa de infección nosocomial. Un problema importante en pacientes portadores de candidiasis invasivas, es que las infecciones a veces son difíciles de diagnosticar clínicamente y a menudo se confunden con sepsis bacterianas, por lo menos al principio de la infección. Todo esto conlleva un retraso inicial en la aplicación de terapia antifúngica y el resultado suele tener un mal pronóstico. Diversos estudios han demostrado, que una identificación precoz correcta, junto con un tratamiento antifúngico adecuado, se produce una reducción significativa de la mortalidad de los pacientes desde el 46% al 27% (Armstrong-James, 2007).

La organización estructural eucariótica compartida entre células fúngicas y células hospedadoras, determina el escaso número disponible de fármacos, en comparación con los antibióticos antibacterianos existentes, así como la posible aparición de efectos secundarios y/o tóxicos. En la actualidad, la mayoría de los antifúngicos que se utilizan en clínica, actúan sobre la biosíntesis del ergosterol presente en la membrana de los hongos, otros como las equinocandinas, actúan sobre la biosíntesis del β -1,3-glucano, componente principal de la pared celular fúngica (Vandeputte *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta la importancia actual de las micosis invasivas y las nuevas tendencias en su epidemiología, es necesario manejar múltiples estrategias terapéuticas. Hasta hace algunos años, los azoles y la anfotericina B fueron empleados como antifúngicos de elección. Sin embargo, dada la creciente resistencia a los primeros, sobre todo entre especies “no-*albicans*” y la toxicidad renal de la anfotericina B, las equinocandinas surgieron como un nuevo grupo farmacológico y una nueva opción terapéutica (Cortés y Russi, 2011), mientras las nuevas formulaciones liposomales de la anfotericina B han reducido sustancialmente sus efectos secundarios. En la Tabla I.4 se indican los tratamientos antifúngicos frente a los principales patógenos responsables de micosis invasivas.

Tabla I.4. Principales antibióticos con actividad antifúngica empleados para el tratamiento de las micosis invasivas. (La presente Tabla ha sido elaborada a partir de las siguientes referencias bibliográficas: Verweij *et al.*, 2007; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008; Dromer *et al.*, 2008; Cateau *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2010; Fortún, 2011).

Especies fúngicas invasivas	Tratamiento	Características	
<i>Candida spp.</i>	Fluconazol	-Bajo coste -Menor toxicidad -Tratamiento oral e intravenoso	-Eficaz tratamiento de CI en pacientes neutropénicos -Similar eficacia en cuanto a mortalidad y duración que la Anfotericina B desoxicolato, pero menor toxicidad y efectos secundarios -Reducida actividad en <i>C. glabrata</i>
	Voriconazol	-Comparte resistencia cruzada con Fluconazol en cepas de <i>C. glabrata</i>	Tratamiento de pacientes no neutropénicos
	Caspofungina	-Alto coste -Menos interacciones -Menor efectos secundarios -Activas frente a cepas resistentes a azoles	-Recomendadas en pacientes con inestabilidad hemodinámica -Respuesta por especies: 71 % en <i>C. parapsilosis</i> ; <i>C. krusei</i> ; <i>C. tropicalis</i> 76% <i>C. albicans</i> y 78% <i>C. glabrata</i> . -Reduce la formación de biopelículas en <i>C. albicans</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>		-Sensible a anfotericina B, voriconazol, itraconazol, posaconazol y equinocandinas. <i>A. terreus</i> y <i>A. nidulans</i> son resistentes a anfotericina B. <i>A. lentulus</i> y <i>A. fumigatiaffinis</i> son resistentes a anfotericina B y voriconazol.	Los últimos dos años están apareciendo cepas resistentes a voriconazol e itraconazol en Países Bajos y Norte de Europa
<i>Cryptococcus spp.</i>	Combinación de Anfotericina B y Flucitosina		
<i>Zygomycetos</i>	Anfotericina lipídica más posaconazol		
<i>Scedosporium spp.</i>	Combinación de voriconazol y posaconazol		
<i>Fusarium spp.</i>	Anfotericina lipídica a altas dosis		Resistente a equinocandinas. La sensibilidad a anfotericina B, voriconazol y posaconazol es variable

Las revisiones exhaustivas de vigilancia epidemiológica y terapia antifúngica (Pfaller y Diekema, 2007; 2010) revelan la excelente potencia y espectro de acción mostrado por tres equinocandinas frente a más de 4.000 aislamientos sanguíneos. En cambio, especies como *C. parapsilosis (complex)* y *C. guilliermondi* muestran CMI elevadas (1-4 mg/L) (Messer *et al.*, 2010). Los datos clínicos disponibles indican que todas las especies responden de forma similar a las equinocandinas, pero debemos resaltar que se han observado candidemias persistentes por *C. parapsilosis complex* tratadas con caspofungina (Cuenca-Estrella *et al.*, 2001). Esta menor susceptibilidad a las

equinocandinas se debe a un polimorfismo en la proteína diana Fks1p (β -1,3-glucano sintasa) (Garcia-Effron *et al.*, 2008).

Respecto a la futura aplicación de antifúngicos en fase de investigación hay que destacar, los estudios con isavuconazol que en la actualidad están en la Fase 3. Sus resultados son prometedores en el tratamiento y prevención de infecciones por *Candida*, *Aspergillus*, *Zygomycetos*, *Cryptococcus* y otros hongos, aunque todavía no hay información clínica concluyente (Guinea *et al.*, 2008; Fortún, 2011). El Ravuconazol es otro potente triazol actualmente en ensayos de fases I y II, con similar actividad al voriconazol y una mayor vida media (Pasqualotto *et al.*, 2010). La Aminocandina es una candina hidrosoluble con una actividad potente en *Candida* spp. y *Aspergillus* sp., aunque hasta el momento tampoco hay experiencia clínica (Warn *et al.*, 2010). Por otro lado, en una línea novedosa, se han investigado los posibles beneficios clínicos de cócteles farmacológicos combinando antifúngicos e inmunomoduladores; por ejemplo, una diana terapéutica ha sido el antígeno obtenido de la proteína 90 de choque térmico (HPS90), presente en la superficie de levaduras y algunas células tumorales. El anticuerpo monoclonal humano recombinante frente a HPS90 (Mycograb®, NeuTec Pharma, Antwerpen, Bélgica) posee sinergismo con anfotericina B en el tratamiento de ciertas candidiasis sistémicas (Pachl *et al.*, 2006; Fortún, 2011).

I.6. MECANISMOS MOLECULARES DE RESPUESTA A ESTRÉS.

Los microorganismos necesitan desarrollar unos sistemas defensivos y de protección sólidos para sobrevivir en las diferentes condiciones ambientales y deben ser muy eficientes en sus respuestas, con el fin de contrarrestar los mecanismos protectores del hospedador. Las respuestas celulares y moleculares inducidas en el patógeno frente a un determinado estrés, en general se involucran en dos fases: (i) Aguda e inmediata, donde el microorganismo trata de minimizar los daños causados por los efectos nocivos del estrés *in situ* y (ii) Adaptativa más prolongada, donde se promueve la restauración de la homeostasis celular, que permite el crecimiento de los microorganismos en las nuevas condiciones. Para ello, es necesario la activación de rutas de transducción intracelular de señales que generen estas repuestas (Mager y Siderius, 2002; Nikolaou *et al.*, 2009).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que las vías de señalización por estrés en diversas especies de hongos han evolucionado rápidamente, con dependencia

de su nicho ecológico e independientemente de la filogenia (Nikolaou *et al.*, 2009). Estas vías de respuesta a estrés se han caracterizado muy bien en la levadura *S. cerevisiae*. Sin embargo, existen diferencias con otros modelos arquetipos de hongos; caso de *Schizosaccharomyces pombe* y *C. albicans* (Smith *et al.*, 2004; Enjalbert *et al.*, 2006; Cheetham *et al.*, 2007). Esta variabilidad reflejaría una evolución diferencial inducida tanto en los diferentes hábitats ocupados como por su actividad biológica específica (Gasch, 2007).

I.6.1. RUTA DE RESPUESTA GENERAL A ESTRÉS.

Se ha propuesto la existencia en levaduras de una denominada “**Respuesta General al Estrés**”, como mecanismo global que regula la expresión coordinada de genes detoxificantes, portadores de secuencias promotoras, conocidas como “elementos de respuesta a estrés” (STRE) (Moradas-Ferreira y Costa, 2000), inducibles por distintos tipos de estímulos metabólicos o ambientales. Las denominadas MAP (**Mitogen Activating Protein**) quinasas (MAPK) representan un mecanismo esencial presente en células eucarióticas que transducen la señal intracelular provocada por estímulos ambientales externos y desencadenan una respuesta de reprogramación génica a nivel transcripcional (Alonso-Monge *et al.*, 2006).

Como patrón básico, las MAPK están constituidas por una familia de “proteínas quinasas” dependientes de serina y treonina (Xu, 2000) y comprenden un elaborado sistema de regulación compuesto normalmente por una cascada de tres quinasas que se activan consecutivamente mediante fosforilación reversible: la MAP quinasa (MAPK), la MAP quinasa quinasa (MAPKK) y la MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) (Alonso-Monge *et al.*, 2006; Fuchs y Mylonakis 2009). Cuando la MAPK inicial se fosforila, es translocada al núcleo donde fosforila a su vez, un factor de transcripción o una molécula represora (regulador). Como consecuencia, la expresión de gen(es) diana (TG) se activa posibilitando una respuesta eficaz con la adaptación a las nuevas condiciones.

Esta activación es transitoria debido a la existencia de mecanismos de retroalimentación que desactivan la ruta y recuperan la situación basal inicial (Roman *et al.*, 2007). *C. albicans* constituye la levadura donde mejor se han elucidado estos mecanismos, hasta el momento se han descrito cuatro rutas esenciales mediadas por

MAP quinasas (Figura I.6).

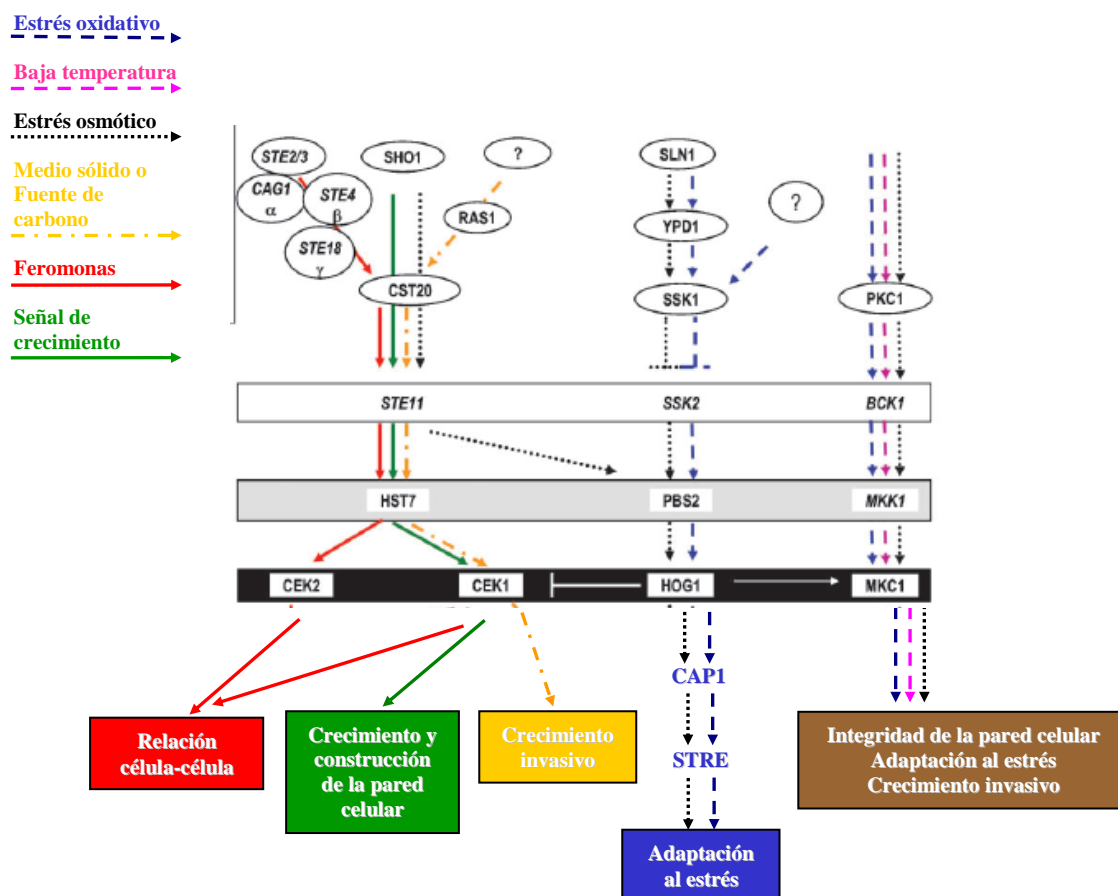


Figura I.6. Esquema representativo conteniendo los elementos principales identificados en las rutas de transducción de señales mediadas por MAP quinasas (MAPK) en *C. albicans* (Gráfica parcialmente adaptada de Alonso-Monge *et al.*, 2006).

La ruta mediada por la **MAPK Mkc1p**, participa en la construcción de la pared celular (Navarro-García *et al.*, 1995; 1998), así como en la respuesta a estrés ambiental (Navarro-García *et al.*, 2005), la transición morfológica (Navarro-García *et al.*, 1998) y la formación de biopelículas, proceso relevante en la propagación y penetración de la levadura en superficies sólidas (Kumamoto, 2005).

La ruta HOG mediada por la **MAPK Hog1p** está implicada en la resistencia al estrés osmótico y oxidativo (Alonso-Monge *et al.*, 1999; 2003; Arana *et al.*, 2005; González-Parrága *et al.*, 2010), ya que células carentes del gen *HOG1* son mucho más sensibles al tratamiento con oxidantes como H₂O₂, menadiona o incluso luz UV (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Ikner y Shiozaki, 2005).

La ruta HOG está implicada también en morfogénesis. Los mutantes *hog1* presentan hiperfilamentación en condiciones no inductoras, como la disminución de temperatura o del pH en ciertos medios o en concentraciones limitantes de suero (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Arana *et al.*, 2005), además también está implicada en la formación de clamidosporas (Alonso-Monge *et al.*, 2003). Por último, las rutas mediadas por las **MAPK Cek1p** y la **MAPK Cek2p** están implicadas en morfogénesis, formación hifal, así como en el proceso de apareamiento y conjugación (Whiteway *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2002).

I.6.2. RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO.

Los organismos aerobios están sometidos a una constante exposición a estrés oxidativo tóxico, debido a la formación intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS), que incluyen: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura I.7). Dichos ROS, se producen bien por el propio metabolismo oxidativo (respiración o β -oxidación de ácidos grasos) o por la adición de agentes externos (Jamieson, 1998; Estruch, 2000; González-Párraga *et al.*, 2008). El efecto tóxico de los ROS resulta esencial para la destrucción de los patógenos intracelulares, ya que daña componentes esenciales de las células como son los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos (Storz *et al.*, 1987; Estruch, 2000; Frohner *et al.*, 2009; Seider *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha comprobado que las perturbaciones oxidativas causadas por ROS están asociadas con enfermedades humanas, tales como el Parkinson, la diabetes o la esclerosis múltiple (Berlett & Stadtman, 1997).

Entre las actividades enzimáticas detoxificantes capaces de eliminar ROS se encuentran, las superóxido dismutasas (SOD), encargadas de catalizar la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 , manteniendo bajos los niveles de anión superóxido. Además, otras enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa se encargan de mantener bajos los niveles de H_2O_2 catalizando su descomposición en O_2 y H_2O o utilizando residuos de cisteína para reducir peróxidos (González-Párraga *et al.*, 2003; 2008).

Por otro lado, el glutatión y la tiorredoxina de forma no enzimática, y la glutarredoxina, con actividad enzimática, reparan los daños inducidos por ROS, reduciendo los puentes disulfuro generados por la oxidación de los residuos de cisteína de ciertas proteínas. El glutatión y la tiorredoxina, además, son necesarios para la

actividad catalítica de la glutatión peroxidasa y la peroxirredoxina, participando también en los procesos de reducción de los peróxidos (Toledano *et al.*, 2012).

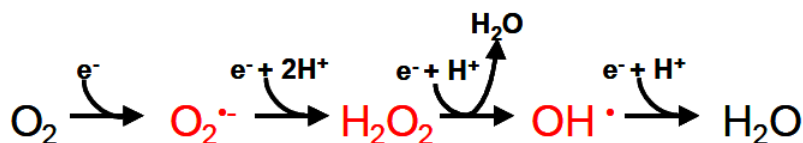


Figura I.7. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2). Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}).

I.6.3. RESPUESTA A CHOQUE TÉRMICO.

Globalmente se define como el conjunto de alteraciones y daños fisiológicos que experimentan las células cuando son sometidas a temperaturas superiores al óptimo de crecimiento. Numerosos microorganismos eucariotas y procariotas presentan el mecanismo de “**termotolerancia adquirida**”, fenómeno consistente en que las células en fase de crecimiento activo son capaces de resistir la exposición a altas temperaturas ($>50^\circ\text{C}$) incompatibles con el crecimiento, si previamente se han expuesto a temperaturas permisivas y no letales, (como referencia: incubación a 28°C , pretratamiento a 42°C y choque térmico a $52,5^\circ\text{C}$) (Thevelein, 1996; Argüelles, 2000). Un marcador del estado de termotolerancia consiste en la síntesis masiva de trehalosa (hasta 6 veces sobre los niveles basales). La acumulación de trehalosa tiene lugar en paralelo con la aparición de un grupo específico de proteínas llamadas “**Heat Shock Proteins**” (HSPs) (Hottiger *et al.*, 1989; Craig *et al.*, 1993; Piper, 1993; Mayer *et al.*, 2012). Se ha visto que algunas HSPs funcionan como chaperonas previniendo la agregación proteica y las alteraciones causadas por el calentamiento excesivo de proteínas y de las membranas biológicas, restableciendo así la estructura nativa de las proteínas (Singer y Lindquist, 1998; Mayer *et al.*, 2012).

I.6.4. RESPUESTA A ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.

Las membranas biológicas son más permeables al agua que a otros solutos, proceso que afecta a la composición y concentración total de solutos internos en las células. El estrés osmótico de fase exponencial se genera habitualmente adicionando al

medio de cultivo NaCl, debido a que el ión Na⁺, causa toxicidad sódica además del estrés osmótico (Hohmann y Mager, 2003; Mayer *et al.*, 2012). Este tipo de perturbación induce el cese del crecimiento, debido a que provoca la contracción celular y la pérdida de turgencia, entendida como la diferencia de presión entre el exterior e interior osmótico celular, mantenido gracias a la pared celular, siendo ligeramente superior dentro de la célula (Mager y Moradas-Ferreira, 1993; Albertyn *et al* 1994; Hohmann y Mager, 2003).

La acumulación de glicerol como soluto compatible, es una respuesta esencial al incremento de osmolaridad externa, e incluye tanto la regulación de su producción como de su flujo (Estruch, 2000), junto con un incremento en la síntesis de transportadores específicos de sal, con el fin de adaptar su fuerza iónica interna a las variaciones de presión osmótica externa (Enjalbert *et al.*, 2003).

I.6.5. ACUMULACIÓN DE SOLUTOS PROTECTORES FRENTE A ESTRÉS.

En levaduras, la acumulación del disacárido no reductor, trehalosa (ver epígrafe I.7), (Figura I.8) es un importante mecanismo defensivo frente a diferentes condiciones de estrés nutritivo y ambiental, tales como: choques térmicos a altas temperaturas, ya comentado, ausencia de nutrientes, deshidrataciones, exposiciones a compuestos tóxicos o frente a estrés oxidativo (Colaço *et al.*, 1992; Hottiger *et al.*, 1994; Thevelein, 1996; Argüelles, 2000; Benaroudj *et al.*, 2001).

El glicerol es un alcohol con tres grupos hidroxilos (-OH) (Figura I.8). La capacidad para crecer y sintetizar **glicerol** cuando las levaduras se someten a un choque osmótico severo, depende funcionalmente de la activación de la ruta HOG, que induce la acumulación de glicerol como soluto compatible previniendo la deshidratación celular, como ocurre en *S. cerevisiae* (San José *et al.*, 1996) y en *C. albicans* (Sánchez-Fresneda *et al.*, 2012). Además, también se ha investigado la posible acumulación de otros solutos como el polialcohol **D-arabitol** (Figura I.8), un metabolito exclusivo de hongos, regulado a través de la ruta HOG en *S. cerevisiae*, mientras que en *C. albicans* esta regulación es menos evidente (Kayingo y Wong, 2005; Sánchez-Fresneda *et al.*, 2012).

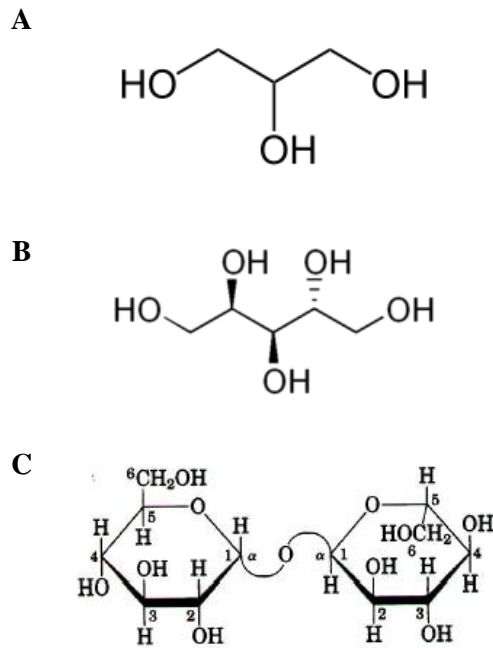


Figura I.8. Estructura molecular de los diferentes solutos protectores de estrés. A) glicerol B) D-arabitol y C) trehalosa.

I.7. TREHALOSA.

El disacárido trehalosa se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de la escala biológica, encontrándose en numerosos organismos incluyendo bacterias, hongos, plantas o invertebrados, pero está ausente en mamíferos (Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003). Fue descrita por primera vez por Wiggers en 1832 como un azúcar desconocido presente en el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*), un hongo patógeno que produce una toxina letal para los humanos. Posteriormente fue descubierta en la cutícula de los capullos o pupas del escarabajo *Larinus maculata* de nombre común “trehala manna”, lo cual inspiró al químico Berthelot para designarlo como trehalosa (Singer y Lindquist, 1998). La **trehalosa** es un disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de glucosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido), unidas con enlace α , $\alpha \rightarrow 1:1$ a través de sus carbonos anoméricos (Figura I.8).

El papel fisiológico de la trehalosa como protector celular, se ha demostrado inequívocamente. La síntesis del disacárido favorece la tolerancia de cultivos exponenciales frente a choques térmicos drásticos y sus niveles se incrementan fisiológicamente en cultivos al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento

(Wiemken, 1990; Thevelein, 1996; Álvarez-Peral y Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003). Adicionalmente, el doble mutante *tps1Δ/tps1Δ*, incapaz de sintetizar trehalosa (Zaragoza *et al.*, 1998), muestra un fenotipo de alta sensibilidad frente al estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno (H₂O₂), pero no frente a otros tipos de estrés como el salino o el térmico (Álvarez-Peral *et al.*, 2002; González-Párraga *et al.*, 2003; 2008).

Por sus inusuales propiedades físico-químicas, posee igualmente amplias aplicaciones biotecnológicas; es el caso de su empleo como conservante de alimentos, edulcorante alimentario en panadería, así como profiláctico para enzimas, vacunas, células, tejidos y órganos. En la Tabla I.5 se detallan los usos biotecnológicos actuales del disacárido.

La síntesis preferencial de este carbohidrato tiene lugar en circunstancias fisiológicas desfavorables y períodos de ayuno o ausencia de crecimiento, que ocurren tras la entrada en fase estacionaria o la brusca eliminación de nutrientes esenciales; también en estructuras celulares reproductoras o de resistencia (esporas, conidios, esclerocios), donde incrementa la estabilidad celular frente a condiciones ambientales extremas, como altas temperaturas, congelación o desecación (Lillie y Pringle, 1980; San Miguel y Argüelles, 1994; Thevelein, 1996; Jorge *et al.*, 1997; Elbein *et al.*, 2003). A su vez, la recuperación del crecimiento activo en medio fresco, implica la rápida movilización de la reserva intracelular de trehalosa, que provee de la energía necesaria en las etapas iniciales de germinación. Así, cuando a un cultivo de células en reposo que ha agotado su reserva de fuente de carbono fermentable, se le añade de nuevo glucosa o cualquier otro monosacárido, el contenido de trehalosa endógena es degradado rápidamente (Wiemken, 1990; Elbein *et al.*, 2003).

Tabla I.5. Principales aplicaciones biotecnológicas del disacárido no reductor trehalosa (α -D-glucopiranosil 1,1 α -D-glucopiranosido).

Aplicaciones Biotecnológicas	
Protector de la actividad enzimática	-Mantenimiento a temperatura ambiente de enzimas de restricción y ADN ligasa (Colaco <i>et al.</i> , 1992).
Estabilizador y protector de moléculas complejas	-Mantenimiento de moléculas biológicas inestables: anticuerpos (Roser y Colaco, 1993) y sustitutivos de sangre y hemoglobina (Weisburd, 1988, Brumfiel, 2004).
Aditivo de diversos alimentos	-Utilización en alimentos desecados o procesados (frutos y legumbres) mejorando sus propiedades organolépticas. (Kidd y Devorak, 1994).
Sustitutivo de azúcar	-En panadería y confitería en combinación con la sacarosa, compensan la reducción en dulzor con la mejor conservación de las propiedades de la masaorneada (Richards <i>et al.</i> , 2002)
Preservador de células, tejidos y órganos	-Pueden mantenerse desecados o congelados en presencia de trehalosa, mejorando la supervivencia (Eroglu <i>et al.</i> , 2000; Guo <i>et al.</i> , 2000)
Osmoprotector de plantas ornamentales y transgénicas además de marcador de selección en la producción de plantas transgénicas.	-Retarda la senescencia debida a la perdida de agua por transpiración (Iwaya-Inoue y Takata, 2001). En plantas transgénicas que acumulan trehalosa incrementan la tolerancia a la sequia, salinidad y frio (Avonce <i>et al.</i> , 2004). -El gen <i>AtTPS1</i> de <i>A. thaliana</i> , cuando se sobre-expresa, confiere insensibilidad a la glucosa en semillas y tejidos bajo cultivo <i>in vitro</i> que de otra forma se verían inhibidos por este monosacárido para germinar, proliferar y diferenciarse (Avonce <i>et al.</i> , 2004; Leyman <i>et al.</i> , 2004).
Uso en industria de cosméticos	-La trehalosa atrapa y reduce la liberación de malos olores de la piel, es utilizada en cremas faciales, corporales y en desodorantes (Higashiyama, 2002).
Usos médicos y nutricéuticos	-En la enfermedad Corea de Huntington, evita la formación de agregados poli-glutamínicos (Katsuno <i>et al.</i> , 2004) y en la osteoporosis, reduce la degeneración de los huesos en modelos de ratones (Higashiyama, 2002).

Este fenómeno también ocurre en células sometidas a condiciones de estrés que retornan a condiciones fisiológicas normales. La recuperación del crecimiento activo en medio fresco, conlleva la inmediata movilización de las reservas intracelulares de trehalosa (Hottiger *et al.*, 1987; Wiemken, 1990; Thevelein, 1996; Argüelles, 2000). Adicionalmente, se ha propuesto que la trehalosa en levaduras y hongos filamentosos, desempeña otra función primordial como **reserva de carbono y de energía**, de manera

análoga al glucógeno. Se sugiere que ambas moléculas constituyen un depósito de carbono cuando este polímero se ha consumido; pero cuando las condiciones mejoran y vuelve a haber disponibilidad de glucosa en el medio externo, proveen de un rápido flujo de carbono y ATP para retomar rápidamente el crecimiento (Sillje *et al.*, 1999; François y Parrou, 2001).

I.8. METABOLISMO DE TREHALOSA.

Además de su amplia diversidad en actividades fisiológicas, existen considerables diferencias entre organismos procariontas y eucariotas respecto a la organización genética, sistemas enzimáticos y mecanismos reguladores, involucrados en el metabolismo global de la trehalosa (Strom y Kaasen, 1993; Thevelein, 1996; Nwaka y Holzer, 1998; Argüelles, 2000). El contenido específico del disacárido en cada etapa concreta del ciclo de crecimiento depende del balance entre su biosíntesis, mediada por el complejo trehalosa sintasa y su hidrólisis. Mientras en algunos procariontas se han descrito actividades hidrolíticas tipo trehalosa fosforilasa o fosfotrehalasa, en levaduras la movilización de trehalosa depende exclusivamente de una α -glicosidasa con elevada especificidad de sustrato, denominada trehalasa (Strom y Kaasen, 1993; Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003).

I.8.1 BIOSÍNTESIS DE LA TREHALOSA.

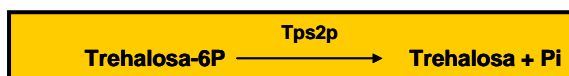
La ruta de biosíntesis de trehalosa fue descubierta por Cabib y Leloir hace cincuenta años (Gancedo y Flores, 2004). El proceso tiene lugar en dos etapas consecutivas en el citosol:

Primera etapa: se realiza la transferencia de D-glucosa desde uridina difosfoglucosa (UDP-glucosa) a glucosa-6-fosfato para producir trehalosa-6-fosfato. Esta reacción es catalizada por la trehalosa-6-fosfato sintasa (E.C. 2.4.1.15), codificada por el gen *TPS1*. Es una enzima dependiente de Mg^{2+} que muestra una actividad máxima a pH 6,6. La reacción es irreversible. Por lo que el equilibrio queda desplazado hacia la formación de trehalosa-6-P:



Aunque en levaduras UDP-glucosa es el único donador de D-glucosa, en actinomicetos se ha descrito una trehalosa sintasa que utiliza alternativamente GDP-glucosa y no requiere Mg^{2+} (Elbein, 1967).

Segunda etapa: consiste en la desfosforilación de trehalosa-6-fosfato por una fosfatasa intracelular específica, dando lugar a la formación de trehalosa libre, que es la forma de almacenamiento intracelular del disacárido.



Esta segunda etapa, está catalizada por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa codificada por el gen *TPS2*, siendo la enzima activada por fosfato inorgánico (Pi) (De Virgilio *et al.*, 1993).

I.8.2 HIDRÓLISIS DE LA TREHALOSA: TREHALASAS.

La hidrólisis de trehalosa es catalizada por α -glucosidasas específicas denominadas trehalasas (E.C. 3.2.1.28). Son enzimas que pertenecen al grupo de las α -glucosidasas y que se han aislado en un amplio rango de organismos.

Las trehalasas utilizan trehalosa como sustrato exclusivo, actúan sobre el enlace α :1-1 y generan dos moléculas de glucosa. No se han descrito hasta el momento en levaduras otras glucosidasas distintas con capacidad para hidrolizar trehalosa (Thevelein, 1996; Jorge *et al.*, 1997; François y Parrou, 2001). Estas enzimas están clasificadas en trehalasas ácidas y neutras. Las trehalasas ácidas exhiben su máxima actividad con un pH alrededor de 4,5, su actividad es independiente de cationes divalentes y están sometidas a represión catabólica. Por el contrario, las trehalasas neutras exhiben su máxima actividad con un pH alrededor de 7,0, alcanzan máxima actividad en presencia de Ca o Mn y en algunas levaduras están reguladas por fosforilación irreversible dependiente de proteínas quinasas A (cAMP-PKA) (Thevelein, 1996; Jorge *et al.*, 1997; Argüelles, 2000).



El trabajo previo de nuestro grupo con *C. albicans*, ha permitido identificar hasta el momento dos tipos diferentes de trehalasas, de acuerdo con los criterios previamente establecidos: localización, propiedades catalíticas, función y sistemas reguladores.

Trehalasa neutra (Ntc1p o trehalasa citosólica), es la responsable directa de la movilización fisiológica de la trehalosa endógena en respuesta a distintos tipos de estímulos fisiológicos (germinación, reanudación del crecimiento activo, etc.) (Eck *et al.*, 1997; Argüelles, 2000). Aunque no totalmente comprobado, por analogía con *S. cerevisiae* se cree que la actividad catalítica estaría controlada por fosforilación reversible mediada por PKAs, requiriendo para su activación cationes divalentes como el Ca^{2+} o Mn^{2+} . (Thevelein, 1988; 1996; Argüelles *et al.*, 1990). La trehalasa neutra no parece estar involucrada en los procesos de cambio dimórfico e infectividad de este patógeno oportunista (Eck *et al.*, 1997; Argüelles *et al.*, 1999).

Trehalasa ácida o vacuolar (Atc1p o trehalasa externa), se encarga de hidrolizar la trehalosa exógena del medio. El gen *ATC1* codifica una proteína de 1040 aminoácidos y 117kDa, que se encuentra asociada a la superficie celular, concretamente se encuentra localizada en la pared celular. La proteína posee un teórico péptido señal hidrofóbico en la región N-terminal y 20 sitios potenciales de N-glicosilación. No parece regulada por fosforilación dependiente de AMPc y no depende de cationes divalentes (Pedreño *et al.*, 2004). La expresión transcripcional del gen *ATC1*, así como la capacidad catalítica de la trehalasa ácida están sujetas a control mediante represión catabólica por glucosa (Pedreño *et al.*, 2004). Se ha comprobado que la mutación homocigótica en el gen *ATC1* confiere a *C. albicans* una mayor capacidad de resistencia frente a estrés oxidativo, térmico y salino, así como un retraso en el inicio del proceso de transición dimórfica levadura-micelio (Pedreño *et al.*, 2004, 2007).

Sin embargo, esta distinción entre ambas reacciones catalíticas no es absoluta. Niveles significativos de actividad Atc1p pueden ser medidos a pH neutro, mientras la actividad neutra (Ntc1p) mostró similares valores a pH neutro (7,0) y pH ácido (4,5), siendo intensamente inhibida por ATP (Sánchez-Fresneda *et al.*, 2009). Por otra parte,

parece existir además de una separación física entre ambas enzimas (San Miguel y Argüelles, 1994), una regulación inversamente coordinada entre ambas. Así, la actividad ácida aumenta en fase estacionaria, coincidiendo con la acumulación de trehalosa citosólica, en cambio la actividad neutra es más alta en cultivos exponenciales y disminuye en fase estacionaria (Sánchez-Fresneda *et al.*, 2009). Además, la secuencia del gen *ATCI* (trehalasa ácida) no muestra semejanza con la secuencia del gen *NTCI* (trehalasa neutra) (Pedreño *et al.*, 2004; 2007).

Por lo que hace referencia a la levadura objeto de estudio en esta Memoria, *C. parapsilosis*, hasta el momento se desconoce todo lo referente a los genes y enzimas implicados en el metabolismo de la trehalosa. En consecuencia, el primer objetivo abordado se centra en el estudio de los mismos.

I.9. RESPUESTA INMUNITARIA EN HONGOS.

Actualmente no disponemos de vacunas estandarizadas para prevenir ninguna de las infecciones humanas causadas por hongos. Esta situación es atribuible tanto a la complejidad de los patógenos, como a sus sofisticadas estrategias de evasión de la respuesta inmune. Los mecanismos defensivos contra las infecciones fúngicas son muy numerosos e implican una respuesta bien coordinada de la inmunidad innata y de la adaptativa (revisado por Romani, 2004).

La inmunidad natural o innata, representa el sistema defensivo inicial del organismo, siendo de especial significación en la protección del mismo contra las infecciones, pues no requiere sensibilización previa. La piel y las mucosas, constituyen las primeras barreras naturales que posee el organismo para su defensa. En la inmunidad innata también participan los fagocitos (neutrófilos y macrófagos), las células dendríticas, las células asesinas naturales (NK) y una gran variedad de proteínas como el complemento, o las citoquinas, que son proteínas que regulan y coordinan muchas actividades celulares (Figura I.9). El sistema inmune innato está conservado filogenéticamente y aparece en casi todos los organismos multicelulares, desde invertebrados hasta los vertebrados (Hoffmann *et al.*, 1999).

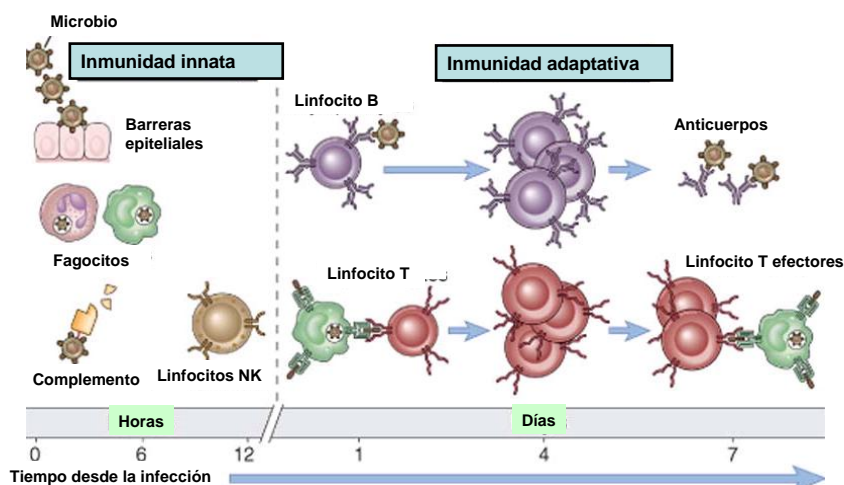


Figura I.9. Respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Los mecanismos de la inmunidad innata aportan la primera defensa contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas surgen más tarde y consiste en la activación de los linfocitos (Abbas *et al.*, 2009).

La inmunidad específica o adaptativa es una defensa del hospedador específica para el patógeno que tiene capacidad de adaptarse para así reconocer patógenos concretos de forma más eficiente. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos (T y B) y sus productos, como los anticuerpos (Figura I.9). A pesar que, la inmunidad adaptativa contra los patógenos es altamente específica y efectiva, su respuesta defensiva tarda días en desarrollarse. Por ello aunque la inmunidad innata y adaptativa actúan de maneras diferentes lo hacen de manera acoplada y sinérgica para potenciar la defensa del hospedador.

Defectos específicos en la respuesta inmune predisponen a los pacientes a contraer micosis superficiales o sistémicas. Desordenes cuantitativos o cualitativos de la función de los fagocitos del sistema inmune innato, suponen el factor de riesgo principal para sufrir una aspergilosis o candidiasis diseminada (Mansour y Levitz, 2002).

I.9.1. PARED CELULAR DE LEVADURAS.

La pared celular es una estructura esencial y está presente aunque con distinta composición en bacterias, hongos y plantas e invertebrados. En cambio, las células de mamíferos carecen de pared. Por tanto, el conocimiento de su composición, mecanismos de síntesis y de las funciones que realiza pueden proporcionar claves para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Cassone, 2008). La pared tiene una importante

contribución en la patogenia, ya que es la primera estructura que contacta con las células hospedadoras, siendo portadora de numerosos antígenos y la responsable directa de la adherencia celular con el hospedador (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Además la pared desempeña otras varias funciones esenciales: como el mantenimiento de la forma celular y adaptación plástica a las diferentes morfologías (Ruiz-Herrera, 1992). Igualmente, sirve como protección contra el estrés físico y químico (Klis *et al.*, 2001) y como anclaje para las proteínas externas.

El número total de proteínas de pared celular y sus funciones concretas aún permanece desconocido, especialmente en las especies *no-albicans* del género *Candida*. Por ello, nos centraremos aquí en detallar los componentes de la pared en la levadura de referencia *Candida albicans*, ya que es, de la que más datos se disponen. Estructuralmente, la pared representa el 15-30% del peso seco de la célula (Fleet, 1991; Valentín *et al.*, 2000).

Es una estructura en multicapa compuesta por **glucanos** (polímeros de D-glucosa con enlaces β -1,3 y β -1,6 que representan el 50-60 % del total de la pared celular), **quitina** (un polímero de N-acetil glucosamina (GlcNAc) unido por enlaces β -1,4, que representa un 1-2 %) y **manano** (también llamado fosfopeptidomanano) que consiste en manoproteínas, que supone el 35-40 % del total (Klis *et al.*, 2001). Un esquema representativo de la organización y las diferentes interacciones entre los componentes de la pared celular puede observarse en la Figura I.10. Los **glucanos** son las moléculas que participan directamente en las interacciones fisicoquímicas entre la célula fúngica y el hospedador (Calderone y Brown, 1991; Calderone, 1993; Hostetter, 1994; Chaffin *et al.*, 1998). La **quitina** presente en la cara más interna de la pared consiste en homopolímeros de β -1,4 N-acetilglucosamina (GlcNAc). Tanto el β -1,3-glucano como la quitina son los principales responsables de la solidez de la pared (Douglas, 2001). El β -1,3-glucano se distribuye homogéneamente a través de la superficie celular y está unido covalentemente a las cadenas de quitina, proporcionando un anclaje para las manoproteínas.

Las **manoproteínas** se encuentran, fundamentalmente, en la capa más externa de la pared y juegan un papel importante en la porosidad de la pared celular y también en aspectos relacionados con la patogenicidad, como la adhesión a tejidos y la inmunogenicidad (Calderone, 1993). Estas manoproteínas poseen una estructura básica

común, que consiste en una matriz proteica a la cual se unen covalentemente cadenas de carbohidrato que contienen mayoritariamente unidades de manosa. El carbohidrato presente en las manoproteínas puede estar unido a través de un enlace N-glicosídico a un residuo de asparragina de la proteína o a través de una unión O-glicosídica, a restos de serina y/o treonina.

La O-glicosilación ocurre en los residuos serina y/o treonina e implica la adición de manosas a través de enlaces α -1,2 (como ocurre en *C. albicans*) o α -1,3 (como ocurre en *S. cerevisiae*). La familia de proteínas manosiltransferasas (Pmts) participa en este proceso en *C. albicans* (Ernst y Prill, 2001; Prill *et al.*, 2005) y catalizan la reacción inicial de O-glicosilación mediante la transferencia de residuos manosa a la serina/treonina de la proteína diana. Este proceso tiene lugar, probablemente, en la cara luminal de la membrana del retículo endoplásmico (RE). El proceso de O-glicosilación tiene una gran relevancia, ya que mutantes carentes de las proteínas que llevan a cabo el proceso muestran una virulencia reducida en modelos animales de infección experimental y otros sistemas *in vitro* (Rouabhia *et al.*, 2005).

La N-glicosilación tiene lugar en residuos de asparragina y lo llevan a cabo proteínas como Och1, Pmr1, Mnn4 y Mnt1/2 (Cutler, 2001; Bates *et al.*, 2005). Se ha descrito la presencia de componentes estructurales glucosídicos vía un enlace tipo β -1,2 en algunos hongos patógenos, entre ellos *C. albicans*, y se piensa que juegan un papel en la protección contra la candidiasis sistémica (Martinez-Esparza *et al.*, 2006). Recientemente, se ha identificado una familia de genes (BMTs) implicados en la β -1,2 manosilación de glicanos en *C. albicans* y *Pichia pastoris* (Mille *et al.*, 2008).

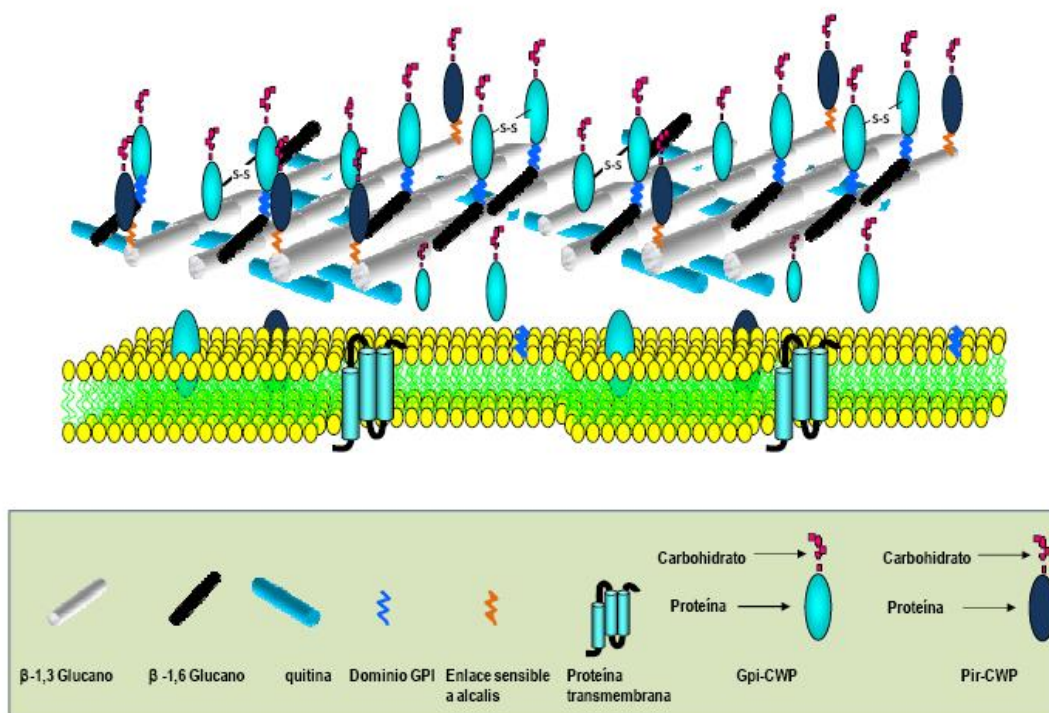


Figura I.10. Diagrama representativo de la organización estructural que adoptan los distintos componentes de la pared celular de *Candida albicans*. Como se observa, el β -1,3-glucano y la quitina son los principales componentes y están localizados en la capa interna de la pared, mientras que la capa externa está compuesta de manoproteínas unidas a β -1,3 y β -1,6-glucano. Además la capa más externa está enriquecida con proteínas de pared celular (CWPs) que contienen una estructura derivada de glicosil fosfatidil inositol (GPI-CWPs) o repeticiones internas (Pir-CWPs) (Molina, 2008).

I.9.2. RECONOCIMIENTO DE LEVADURAS POR CÉLULAS DEL HOSPEDADOR.

El reconocimiento de patógenos por parte de los componentes de la inmunidad innata, implica la identificación en los mismos de los llamados Pathogen-Associated Molecular Patterns (**PAMPs**) (Janeway, 1992; Seider *et al.*, 2010), estas estructuras, altamente conservadas en microorganismos, representan determinantes superficiales que no están presentes en células de mamífero y que son reconocidas por receptores específicos (Pattern Recognition Receptors) (**PRRs**), presentes en la superficie de las células inmunitarias. Diferentes PRRs reconocen diferentes PAMPs y contribuyen, de esta manera, a la generación de diferentes respuestas frente al microorganismo (Aderem

y Underhill, 1999). La distribución de estos PRRs y su abundancia varía entre las distintas poblaciones de células inmunitarias y contribuye a modular la propia respuesta.

Se han identificado una gran variedad de receptores presentes en las membranas del hospedador, implicados en el reconocimiento de las levaduras, a continuación describiremos algunos receptores implicados en el reconocimiento de *C. albicans*, y la subsiguiente transducción de señales (Figura I.11.) (Jouault *et al.*, 2009). Entre los receptores tipo lectinas destacamos:

- **Receptor de manosa de los macrófagos (MMR)**, se une específicamente a α -manosas, actualmente designado como MR (receptor de manano). Este receptor está implicado en adhesión y fagocitosis principalmente, pero también está asociado a la producción de las citoquinas IL-1 β , IL-6 y GM-CSF. Se considera el receptor más importante para una eficiente presentación antigénica.
- **DC-SIGN** es otro receptor de α -manano presente en células dendríticas.
- **Dectina-1**, parece ser el principal receptor de β -glucanos que se expresa en la membrana de los macrófagos y neutrófilos (Brown *et al.*, 2003). La unión a su ligando está implicada en la producción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α).
- **Dectina 2**, es un receptor que reconoce manosas de la pared de *C. albicans*, preferentemente en la superficie de las hifas, pero carece de dominio de señalización intracelular, por lo que se asocia con el receptor FCR γ para inducir respuestas inmunes innatas (Sato *et al.*, 2006).
- **La galectina-3**, designada inicialmente como Mac2, es un receptor que reconoce específicamente β -mananos. Otros receptores importantes son:
- Los **receptores del sistema del complemento (CR) y de Inmunoglobulinas (FcR)**, que median la fagocitosis de las levaduras opsonizadas con factores de complemento e inmunoglobulinas respectivamente.
- Los **receptores tipo Toll (TLR)**, TLR-2 y 4 son los principales miembros de esta familia implicados en el reconocimiento de *C. albicans* (Netea *et al.*, 2002). Para el reconocimiento de mananos por TLR4 se requiere además la participación de CD14. Se ha comprobado una asociación entre TLR-2 y 6 en el reconocimiento de zymosan. La señalización celular inducida por los TLR está

mediada a través de la molécula MyD88, y es necesaria para la fagocitosis y la lisis de *C. albicans*. Tras la estimulación de las células a través de TLR-2 o 4, se pueden producir las citoquinas IL-10 o IL-12, dependiendo de la naturaleza de los otros receptores implicados en el reconocimiento. Si participa además el MR, se produce la citoquina IL-12 (activa respuesta T_{H2}) pero si lo hacen DC-SIGN o CR3 produce IL-10 o IL-4 (activa respuesta T_{H1}).

Las células dendríticas emplean diferentes receptores en el reconocimiento de las morfologías de hifa y levadura, lo que se traduce en eventos de señalización intracelular que en último término, regulan la producción de citoquinas y la co-estimulación, determinando el tipo de respuesta iniciada, T_{H2} frente a la forma hifa, y T_{H1} frente a la forma levadura (Mansour y Levitz, 2002). Por todo ello, el balance final entre protección e infección es el resultado de un complejo equilibrio molecular entre los componentes de *C. albicans* accesibles a las células del hospedador y los receptores con los que interactúan (Jouault *et al.*, 2009).

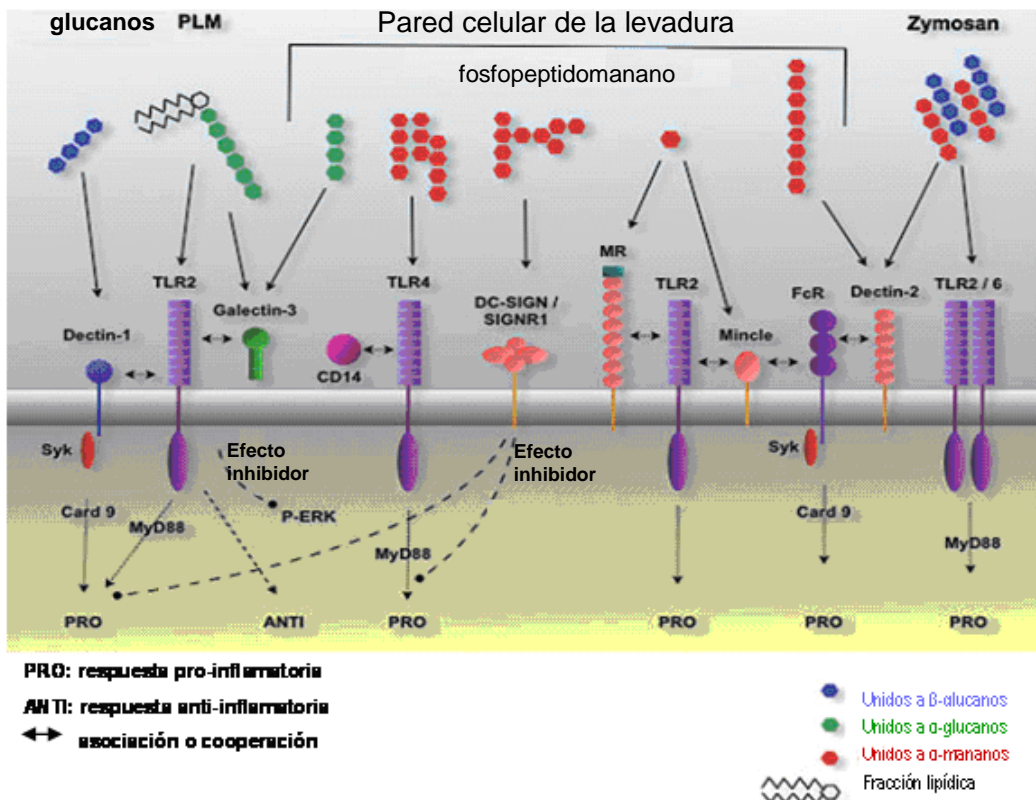


Figura I.11. Receptores implicados en la interacción entre los diferentes componentes de la superficie de *C. albicans* y las células del hospedador (Jouault *et al.*, 2009).

I.9.3. ACTIVACIÓN DE LAS DEFENSAS DEL HOSPEDADOR EN LA PROTECCIÓN ANTIFÚNGICA.

El reconocimiento de PAMPs de levaduras mediado por receptores de los fagocitos del hospedador desencadena la activación de rutas de señalización que estimulan la fagocitosis, la acción fungicida y la producción de citoquinas. Varios PRRs permiten al sistema inmunitario no sólo reconocer PAMPs específicos, sino modular específicamente la respuesta inmunitaria posterior. Además, los PRRs tienen cierto grado de especificidad en la respuesta innata induciendo citoquinas de forma dependiente de la estructura reconocida (Seider *et al.*, 2010).

Tras la **fagocitosis**, se produce la fusión del fagosoma con los lisosomas para generar el fagolisosoma, en donde tiene lugar la producción de moléculas microbicidas y la destrucción del patógeno. La denominada “explosión respiratoria” (Figura I.12) en la cual, la activación del complejo de la oxidasa dependiente de NADPH (NADPH oxidasa) asociada a membrana, junto con un consumo aumentado de oxígeno, da lugar a la reducción del O₂ a superóxido que se secreta al fagosoma ($\cdot\text{O}_2^-$). El peróxido rápidamente se dismuta en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o se combina con óxido nítrico (NO) para acabar formando el oxidante peroxinitrito (ONOO⁻), fungicida y más perjudicial para el microorganismo que el NO (Brunelli *et al.*, 1995). Otras reacciones tienen lugar generando compuestos altamente reactivos que son liberados en los fagosomas como son las cloramidas, por la acción de la enzima mieloperoxidasa (Nathan y Shiloh, 2000).

Las citoquinas y quimioquinas tienen un papel regulador importante activando o inhibiendo la respuesta de fagocitosis (Lalgé y Calderone, 2002). Algunas citoquinas como el interferón- γ (IFN- γ), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), M-CSF o IL-13 activan a los macrófagos para que incrementen la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mansour y Levitz, 2002; del Rio *et al.*, 2002). Investigaciones del grupo de Brown han puesto de manifiesto que *C. albicans* está sometida a un gran estrés oxidativo cuando se enfrenta a los neutrófilos y no tras la fagocitosis de los macrófagos (Enjalbert *et al.*, 2007).

Los patógenos han desarrollado diferentes estrategias para defenderse y superar el ataque oxidativo de ROS, entre ellas destaca la síntesis de moléculas capaces de secuestrar radicales libres del oxígeno, como el ascorbato, el tocoferol o los carotenoides (González-Párraga, *et al.*, 2003), o diversas enzimas antioxidantes, caso de la catalasa, la glutatión

reductasa (GR) o la superóxido dismutasa, además de especies reactivas de nitrógeno (RNS), así como especies cloradas, con el fin de eliminar el microbio (Missall *et al.*, 2004; Seider *et al.*, 2010).

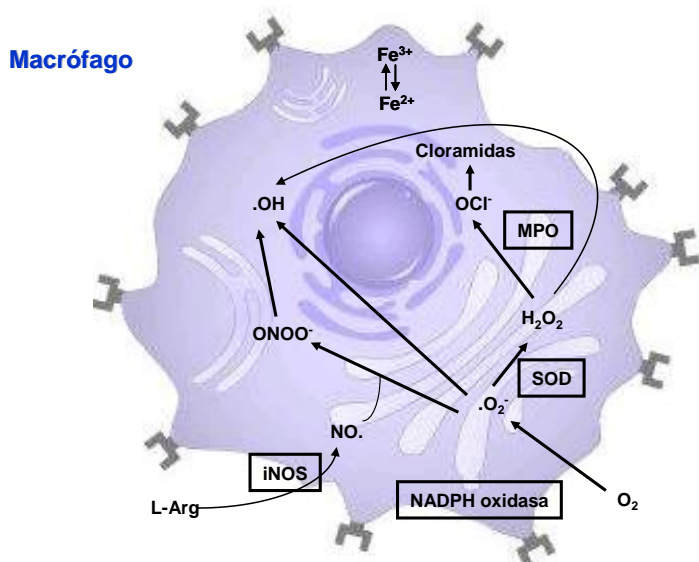


Figura I.12. Esquema de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en el interior de una célula fagocítica. Se muestran las principales rutas en la generación de ROS, RNS y especies cloradas.

La enzima catalasa se ha descrito en *C. albicans*, como un importante antioxidante que protege a estos microorganismos de los efectos tóxicos del H_2O_2 , siendo en algunos casos propuesta como factor de virulencia, ya que mutantes deficientes en actividad catalasa eran menos virulentos en infecciones provocadas en ratones, que el tipo silvestre. Consecuentemente, las células de *C. albicans* que carecen totalmente de actividad catalasa, sufren una reducción significativa en su capacidad infectiva de los tejidos *in vivo* (Wysong *et al.*, 1998).

Los macrófagos activados producen **citoquinas** que participan en la inducción y regulación de la respuesta inflamatoria. Las citoquinas pro-inflamatorias más importantes producidas por macrófagos son: $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN-\gamma$, $IL-6$ e $IL-12$. Como citoquinas anti-inflamatorias podemos citar la $IL-10$ y el $TGF-\beta$. En la Tabla I.6 se señalan las características de algunas de estas citoquinas.

Tabla I.6. Características principales y funciones de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10.

Citoquinas	Características	Función
Factor de necrosis tumoral (TNF- α)	<ul style="list-style-type: none"> -Pro-inflamatoria. -Producida por monocitos y macrófagos, además de linfocitos T activados, células NK y mastocitos. -Sintetizada como homotrímero. 	-Estimular atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activar a los mismos para erradicar los microorganismos (Evans CH, 2000)
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> -Pro-inflamatoria. -El receptor de la familia de citoquina tipo I. -Sintetizada por fagocitos mononucleares, células endoteliales vasculares, fibroblastos y algunos linfocitos T activados y otras citoquinas sobre todo IL-1β y TNF-α. -La forma funcional es un homodímero. 	-Estimula síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, aumenta la producción de neutrófilos por la médula ósea, estimula el crecimiento de linfocitos B, favorece la síntesis de IL-17 e inhibe la generación y acciones de los linfocitos Treg (Heinrich <i>et al.</i> , 2003)
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> -Anti-inflamatoria. -Inhibidor de la respuesta inmunitaria del huésped. -Sintetizada por macrófagos activados y linfocitos T reguladores (Treg). -Molécula trimérica. 	-Es un regulador de retroalimentación negativo para los macrófagos.

Según los PAMPs y PRRs implicados en la interacción entre las levadura y los macrófagos, se estimulan rutas de señalización diferentes que conducen a la producción de citoquinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias (Figura I.11), que determinan la protección del hospedador mediante la eliminación del patógeno, o la invasión del hospedador por la persistencia de la infección debida al bloqueo de la función inmunitaria, respectivamente (Jouault *et al.*, 2009).

I.10. OBJETIVOS.

Después de hacer una extensa revisión bibliográfica sobre la importancia del aumento de las candidemias oportunistas y más concretamente sobre la incidencia de *C. parapsilosis* como un nuevo patógeno emergente, todo ello sumado a la amplia experiencia de nuestro grupo investigador, sobre la regulación y el metabolismo de la trehalosa en determinadas especies arquetipo de levaduras, planteamos como objetivo central de este trabajo, abordar el estudio del gen *ATC1*, que presumiblemente debería codificar una enzima con actividad hidrolítica sobre trehalosa, así como, su posible función en la fisiología celular de esta levadura.

Entendemos que la caracterización del nuevo producto génico en *C. parapsilosis* contribuirá en parte, al conocimiento molecular de la fisiología de este patógeno todavía no bien definido en clínica, pero cuya importancia en infecciones micóticas oportunistas resulta inequívoco. Para ello el trabajo experimental desarrollado en la presente Memoria, se ha planificado atendiendo a los siguientes objetivos, más específicos:

1. Identificación y clonación del gen *ATC1* de *C. parapsilosis*. Para este propósito contamos como herramienta inestimable, las investigaciones previas sobre el gen ortólogo en *C. albicans*.
2. Obtención de los mutantes homo y heterocigóticos del gen *ATC1* en *C. parapsilosis*, con la finalidad de esclarecer la posible función de este gen en la fisiología celular de dicha levadura.
3. Análisis fenotípico de dichos mutantes en distintas situaciones de estrés nutritivo y ambiental. Ello permitirá elucidar si, junto a su presumible actividad enzimática, la proteína codificada por el gen participa en otros procesos celulares.
4. Estudios *in situ* patógeno-hospedador. Se pretende determinar la hipotética interacción de los mutantes afectados en el gen *ATC1* con el sistema inmunitario, empleando distintos modelos experimentales y midiendo tanto procesos fagocíticos como mediadores específicos de la respuesta inmune.
5. Identificación y clonación del gen *NTC1* y obtención de los mutantes deficientes para ambos genes: *ATC1* y *NTC1* en *C. parapsilosis*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

II.1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

II.1.1. LEVADURAS.

Las características de las distintas cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* utilizadas en el presente trabajo, así como su procedencia, se detallan en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Relación de cepas de *C. parapsilosis* y *C. albicans* utilizadas en la presente Memoria: genotipo y procedencia.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>C. albicans</i>		
SC5314	ATC1/ATC1, NTC1/NTC1	Guillum <i>et al.</i> , 1984
<i>C. parapsilosis</i>		
AM2001/0013	ATC1/ATC1, NTC1/NTC1	Odds, 2008
ATC1-1	ATC1/ Δ atc1::SAT1-FLP	Este trabajo
ATC1-2	ATC1/ Δ atc1::FRT	Este trabajo
ATC1-3	Δ atc1::FRT/ Δ atc1::SAT1-FLP	Este trabajo
ATC1-4	Δ atc1::FRT/ Δ atc1::FRT	Este trabajo
ATC1-RE	ATC1/ Δ atc1::FRT	Este trabajo
NATC1-1	NTC1/ Δ ntc1::SAT1-FLP Δ atc1::FRT/ Δ atc1::FRT	Este trabajo
NATC1-2	NTC1/ Δ ntc1::FRT Δ atc1::FRT/ Δ atc1::FRT	Este trabajo
NATC1-3	Δ ntc1::FRT/ Δ ntc1::SAT1-FLP Δ atc1::FRT/ Δ atc1::FRT	Este trabajo
NATC1-4	Δ ntc1::FRT/ Δ ntc1::FRT Δ atc1::FRT/ Δ atc1::FRT	Este trabajo

Las levaduras fueron mantenidas en el laboratorio a 4° C mediante resiembras periódicas en medio YPD tanto sólido como líquido cada 30 días, a partir del material conservado en YPD líquido a -80°C con 50% de glicerol (v/v) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU). La composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las diferentes cepas de levaduras se detalla en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Medios de cultivos utilizados para el cultivo y análisis fenotípico de *C. parapsilosis* y sus respectivos mutantes.

Medio	Composición	Utilidad	Referencia
YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)	20 g/l de glucosa, 20 g/l de peptona 10 g/l de extracto de levadura. Las fuentes de carbono (al 2 %) pueden variar, según se detalla en los experimentos pertinentes.	Medio complejo que contiene todas las sales minerales y vitaminas necesarias para el crecimiento rutinario de levaduras.	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
Sabouraud-dextrosa	10 g/l de peptona 40 g/l de glucosa	Medio complejo para el crecimiento rutinario de levaduras.	(Raymond Sabouraud, 1892)
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1,7 g/l de yeast Nitrogen Base sin aminoácidos y sin (NH ₄)SO ₄ , 5 g/l de (NH ₄)SO ₄ 20 g/l de glucosa (u otra fuente de carbono, trehalosa, sacarosa o lactosa).	Medio mínimo sintético (SD) de composición definida que se utiliza como medio base para el análisis del comportamiento de las distintas cepas en función de la fuente de carbono empleada.	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
REMEL (Rapid Trehalose Assimilation Broth)	Medio mínimo YNB con trehalosa (4%) como única fuente de carbono y un indicador de pH el verde de bromocresol (8%)	Determinación de la utilización de trehalosa exógena y crecimiento celular en levaduras mediante cambio de color y viraje de pH	(Pedreño <i>et al.</i> , 2004)
RPMI 1640	Medio rico en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa al que se le añade suero de ternera fetal (10%), glutamina y antibióticos (penicilina/estreptomycin (1%)).	Medio rico para el cultivo de células eucariotas.	(Moore <i>et al.</i> , 1966)
Medio Lee	K ₂ HPO ₄ 2,5g/l MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2 g/l (NH ₄)SO ₄ 5 g/l NaCl 5 g/l Glucosa 12,5 g/l Prolina 0,5 g/l Biotina 0,001 g/l. El pH final se ajustó a un valor de 6,8 con una solución de NaOH 1N	Inducción de filamentación de levaduras en medio líquido	(Lee <i>et al.</i> , 1975, modificado por Elorza <i>et al.</i> , 1988)
Medio Spider	Caldo nutritivo 10 g/l manitol 10 g/l K ₂ HPO ₄ 2 g/l agar 20 g/l	Medio sólido empleado en los ensayos de filamentación	(Liu <i>et al.</i> , 1994)

Los medios líquidos se prepararon en agua bidestilada y se esterizaron en autoclave a 120 °C durante 20 min. Los medios sólidos fueron suplementados con agar al 2 %. En los ensayos de cultivo líquido, los medios se dispensaron en matraces Erlenmeyer de vidrio, con una relación entre el volumen del medio y su capacidad total de 1/3. Salvo que se indique lo contrario, los cultivos de *C. parapsilosis* se crecieron de forma rutinaria a 30°C, tanto en medio sólido como en líquido. Para el crecimiento se

utilizó un incubador Certomat H (Braun), dotado de agitación orbital (210 rpm). Dichos cultivos se hicieron crecer hasta alcanzar la fase exponencial equivalente a una densidad óptica (D.O.) medida a una longitud de onda (λ) de 600 nanómetros de entre 1,0-1,2, que corresponde a una densidad celular de $1,2-1,5 \times 10^7$ células/ml. En cultivos incubados hasta fase estacionaria de crecimiento, se recogieron a una D.O._{600nm} de entre 6,0-10, equivalente a una concentración celular en torno a 5×10^8 células/ml.

Todos los procesos de manipulación microbiológica, se efectuaron en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar Captair que incorpora gas, luz y ventilación.

II.1.2. BACTERIAS.

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (*F*, ϕ 80, *lac4M15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, (*rK-*, *mK-*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169*) (Hanahan, 1985), ha sido utilizada en los distintos protocolos de Biología Molecular. Los medios utilizados para la propagación celular fueron los descritos por Sambrook *et al.* (1989) para el crecimiento de *E. coli*. Todos se prepararon con agua bidestilada, siguiendo los protocolos indicados y fueron esterilizados en autoclave. En los medios sólidos se adicionó agar al 2 %.

Los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C en un agitador orbital New Brunswick Scientific modelo Innova™ 6000 xg. El medio LB (Luria-Bertani) para el crecimiento bacteriano contiene 10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl. La mezcla se preparó a un pH final de 7.4. La selección de los transformantes se llevó a cabo en el mismo medio, adicionando cloranfenicol a 30 μ g/ml (LB-Clo) o ampicilina a 50 μ g/ml (LB-Amp) según el vector utilizado para la transformación. Para el vector comercial pCloneJet se utilizó el medio LB-Amp y para el vector con el casete de disrupción (pCD8), el medio LB-Clo.

Para su conservación las células se mantuvieron en medio LB con 70 % de glicerol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU), congeladas a -80 °C.

II.2. LÍNEAS CELULARES HUMANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

En este trabajo, se utilizó la línea celular humana, U937 (procedente de una leucemia monocítica) que se diferencia *in vitro* a macrófagos. Las células se cultivaron, de forma rutinaria, en suspensión en frascos para cultivos ventilados de 25 ó 75 cm³ (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania), en una estufa de cultivos celulares a 37 °C con un 5% de CO₂. El medio de cultivo empleado consistió en medio RPMI 1640 con glutaMAX (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EEUU), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) (Gibco Laboratories) previamente descomplementado por calentamiento a 56° C durante 30 min. y con 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (Flow Laboratories, Irvine, Gran Bretaña). A este medio nos referiremos en adelante como MCC (Medio de Cultivo Completo).

De forma rutinaria se mantuvieron las células en cultivo refrescando el mismo cada dos días. Para realizar un nuevo subcultivo, se lavaron las células (se retiró el medio junto con las células en suspensión del frasco de cultivo y centrifugó a 2000 xg, 5 min.) y resuspendieron en MCC fresco. Tras el recuento celular en hemocitómetro, se comenzó el nuevo subcultivo con una concentración de 0.05x10⁶ células/ml.

Para llevar a cabo la diferenciación a macrófagos de la línea celular U937, se sembraron 0.5x10⁶ células por pocillo en MCC, en placas de cultivo celular de 96 pocillos y se incubaron durante 24h con forbol miristato acetato (PMA) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU) a concentración de 10 ng/ml. Esta sustancia es un activador de la enzima proteín-quinasa C (PKC) análogo a su activador natural, el diacilglicerol, que juega un papel crucial en cascadas de transducción de señales como regulador de la transcripción, mediador de la respuesta inmune y regulador del crecimiento celular, entre otros. Durante las 24h de incubación, las células que estaban en suspensión, se adhirieron al fondo del pocillo adquiriendo la morfología característica de los macrófagos. Posteriormente se eliminó el medio con el PMA, se adicionó medio fresco y se incubaron otras 24h. Transcurrido este tiempo los macrófagos diferenciados están dispuestos para su empleo en los ensayos pertinentes.

Para su conservación las células se mantuvieron en medio de cultivo completo con 20% de suero de ternera fetal y 10% de DMSO (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU), congeladas a -196° C en nitrógeno líquido.

II.3. MEDIDA DEL CRECIMIENTO CELULAR.

II.3.1. TURBIDIMETRÍA.

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

II.3.2. PESO HÚMEDO.

Para la determinación del peso húmedo, alícuotas de 1 ml del cultivo se recogieron en tubos Eppendorf de 1,5 ml que previamente se pesaron vacíos, (peso vacío = p0). Se centrifugaron a 3000 xg a 4° C durante 7 min., retirando el sobrenadante por capilaridad mediante papel absorbente y después los tubos fueron pesados de nuevo, peso final (pF). El cálculo del contenido en masa celular se efectuó por diferencia entre las dos medidas de peso (pF-p0).

II.3.3. RECUEENTOS CELULARES.

El recuento celular para levaduras y células humanas se llevó a cabo mediante el uso de un hemocitómetro Neubauer utilizando un microscopio de contraste de fases (Nikon u Olympus BH-2). La concentración se calculó como número de células por mililitro (N) según la ecuación:

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

A = media de los recuentos efectuados por cuadrícula del hemocitómetro.

D = factor de dilución correspondiente.

Para efectuar el recuento de los macrófagos, se verificó el nivel de viabilidad de éstos, mediante la técnica de exclusión con azul tripán (para 100 ml: 0,81 g NaCl; 0,66g KH₂PO₄, y 0,4g azul tripán, pH 7,2 Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU) en una proporción 1:1 (v:v) de suspensión celular: azul tripán. Las células muertas, con

la membrana deteriorada, permiten el paso del colorante y se tiñen intensamente. El número de células vivas de la muestra se calculó contabilizando el número de células no teñidas.

II.4. PLÁSMIDOS.

En la siguiente Tabla II.3 se detallan los plásmidos usados como vectores de clonación y también aquellos que se han construido para las diferentes etapas de interrupción del gen *ATC1*.

Tabla II.3 Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Característica	Referencia
pClone-Jet	AmpR, β -galactosidasa	Fermentas
pClone-F1	pClone-Jet con el fragmento de 621 pb de la región 5' del gen <i>ATC1</i>	Este trabajo
pClone-F2	pClone-Jet con el fragmento de 495 pb de la región 3' del gen <i>ATC1</i>	Este trabajo
pCD8	CloR, con los genes <i>CpSAT1</i> y <i>CpFLP</i> y las secuencias de reconocimiento FRT	Ding y Butler 2007
pRes1	pCD8 con el fragmento de 621 pb de la región 5' del gen <i>ATC1</i>	Este trabajo
pRes2	pCD8 con el fragmento de 495 pb de la región 3' del gen <i>ATC1</i>	Este trabajo
pRes12	Plásmido con el casete de interrupción compuesto por los genes <i>CpSAT1</i> y <i>CpFLP</i> , las secuencias FRT y los fragmentos de homología F1 y F2	Este trabajo

II.5. TRANSFORMACIONES CON ADN EXÓGENO.

II.5.1. TRANSFORMACIÓN EN BACTERIAS.

La transformación de *E. coli* se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1985). La introducción de moléculas de ADN en *E. coli* requiere la obtención previa de células competentes adecuadas para que puedan incorporar el ADN foráneo.

Para obtener células competentes se inocularon 100 ml de medio LB con 500 μ l de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,6. Las células se recogieron por centrifugación a 5000 xg durante 10 min. a 4 °C y se resuspendieron en 20 ml de una solución fría de CaCl₂ 100 mM / MnCl₂ 70 mM / acetato sódico 40 mM, pH 5,5, manteniéndose el conjunto a 4 °C durante 45 min. Posteriormente, se recogieron por centrifugación a 4 °C, se resuspendieron en 5 ml de la solución anterior y se adicionaron 0,94 ml de glicerol estéril al 80% para su conservación en alícuotas de 100 a 500 μ l a -80 °C.

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron suavemente, manteniéndose en hielo durante 10 min. Una vez descongeladas, se añadieron 100 μ l sobre el DNA transformante (10 μ g, en 20 μ l) a 0 °C y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico calculado para cada cepa (5 min. a 37 °C para *E. coli* DH5 α) e inmediatamente después se pusieron en hielo durante 2 min. Mediante este procedimiento las células competentes adquieren el ADN exógeno. Tras el choque térmico, se adicionó 1 ml de LB al tubo con las células transformadas y la mezcla se incubó a 37 °C durante una hora, con objeto de que las células transformadas expresaran la resistencia a ampicilina o cloranfenicol, según el plásmido empleado.

Tras este tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación (5000 xg, durante 5 min.) y se resuspendieron en 100 μ l de LB. La selección de los transformantes se llevo a cabo, sembrando la suspensión de células o la dilución adecuada en medio LB-ampicilina o cloranfenicol. Si las colonias transformantes habían incorporado el plásmido con el inserto, serían capaces de crecer en el medio correspondiente conteniendo el antibiótico, siendo así seleccionadas respecto de las que no lo habían integrado. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias visibles (generalmente 24 h.).

II.5.2 TRANSFORMACIÓN EN LEVADURAS.

Para la transformación integrativa en *C. parapsilosis* se utilizó el método de Reuss *et al.* (2004). A partir de un preinóculo de blastosporas, crecido a 30°C en YPD durante 16 horas, de la cepa de *C. parapsilosis* a transformar, se inocularon en 50 ml de medio YPD fresco a una densidad final de 10⁷ células/ml. Las células fueron recogidas por centrifugación a 3000 xg durante 10 min., se lavaron 2 veces con agua destilada

estéril y se resuspendieron en 8 ml de agua estéril además, a la suspensión celular se añadió 1 ml de tampón TE 10X (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) y 1 ml de acetato de litio 1 M. La suspensión fue incubada a 30 °C durante 1 h en agitación. Posteriormente, se añadieron 250 µl de ditioneitol (DTT) y se incubó durante 30 min. más en las mismas condiciones. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las células dos veces con agua fría y un lavado con sorbitol 1 M frío con poco volumen (5 ml), y se recogieron por centrifugación a 4° C. A continuación, las células electrocompetentes se resuspendieron con 50 µl de sorbitol 1 M frío y se mantuvieron en hielo. A 40 µl de la suspensión de células se añadió el fragmento a integrar cortado con las enzimas de restricción adecuadas y purificado por electroforesis y elución en columna (Gel Extraction Kit). El ADN a integrar se añadió muy concentrado (2 µg/µl). Finalmente, se procedió al proceso de electroporación en una cubeta de 0,2 cm (BioRad) y a 1,8 kV. El proceso se llevó a cabo en un electroporador modelo GenePulser de BioRad. Después de la electroporación, las células fueron lavadas con 1 ml de sorbitol 1 M y resuspendidas en 1 ml de YPD e incubadas durante 4h a 30 °C en agitación suave. A continuación las células fueron sembradas en placas de YPD con 200 µg/ml de nurseotricina e incubadas a 30 °C durante 48 h.

II.6. PURIFICACIÓN DE ADN.

II.6.1. ADN PLASMÍDICO DE *Escherichia coli*.

Se inocularon 5 ml de medio LB con la cepa de la que se iba a obtener el plásmido y se añadió ampicilina o cloranfenicol según la cepa. Se recogieron las células por centrifugación y se prepararon los extractos de ADN plasmídico usando el kit de purificación de plásmidos de Roche®.

II.6.2. ADN CROMOSÓMICO DE LEVADURAS.

La purificación del ADN genómico de *C. parapsilosis*, se realizó siguiendo el método de Fujimura y Sakuma (1993). Se partió de 5 ml de cultivo crecido durante 24 h en YPD a 30 °C; las células fueron recogidas por centrifugación y lavadas con agua destilada estéril. Seguidamente, se resuspendieron en 200 µl de una solución de EDTA 20 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,5 y SDS al 1 %, adicionándose 0,6 g de perlas de vidrio

estériles de 0,45 mm de diámetro. A continuación, las suspensiones celulares se agitaron vigorosamente en vórtex, cinco veces durante 1 min con intervalos idénticos de reposo en hielo, finalizada la rotura, el volumen se llevó hasta 500 µl con la solución anterior y la mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min. Tras una ligera agitación, se adicionaron 200 µl de AcK 5 M y 150 µl de NaCl 5 M, se homogeneizó la mezcla y se mantuvo en hielo 20 min.

Finalmente se centrifugó a 10 000 xg durante 20 min. en centrífuga de mesa y al sobrenadante se le añadió 1/3 de volumen de polietilenglicol 8000 al 30 % en TE, dejando la mezcla en hielo 10 min para favorecer la precipitación del ADN genómico, que fue recogido mediante centrifugación en frío a 10,000 xg durante 10 min y resuspendido en 300 µl de TE. Se realizó una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:25:1). Para ello, ambas fases se homogeneizaron por inversión y fueron separadas posteriormente mediante centrifugación a 10 000 xg durante 10 min. La extracción se repitió hasta la total eliminación de las proteínas. Finalmente, el ADN se precipitó con NH₄Ac 4 M al 10 % y 3 volúmenes de etanol absoluto durante un período entre 30 min. y 1 h a -70 °C, se centrifugó, se lavó con 300 µl de etanol al 70 % y tras secado al vacío se resuspendió en TE.

II.7. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL ADN.

II.7.1. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

El análisis de restricción de las moléculas de ADN se llevó a cabo mediante el tratamiento con endonucleasas de restricción y posterior análisis de los fragmentos resultantes, tras separación por electroforesis en geles de agarosa. Las condiciones empleadas para el uso de las enzimas de restricción fueron las recomendadas por las casas comerciales suministradoras (Roche, Amersham-Pharmacia-Biotech, Promega). Los ADNs fueron tratados con 5µl de RNasa (10mg/ml) libre de actividad DNasa (Roche) para eliminar el ARN contaminante.

Para la realización de digestiones múltiples con varias enzimas que requieren diferentes tampones a distintas concentraciones salinas se utilizó el tampón «One for All Buffer PLUS» (Amersham Pharmacia Biotech). Si las enzimas necesitaban diferentes concentraciones de este tampón, se adicionó primero la enzima que actuaba

con menor fuerza iónica y, una vez considerada como concluida esta primera digestión, se adicionó la segunda enzima, más la cantidad de agua adecuada.

II.7.2. TRATAMIENTO CON LIGASA DE T4.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo principalmente para subclonar fragmentos de ADN en vectores de clonación. Los fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción se mezclaron en proporción molar vector : inserto 5:15. El volumen total de reacción fue 20 µl y se llevaron a tubos de T4 DNA Ligase Ready to Go™ (Amersham Pharmacia Biotech) que incluían liofilizadas las cantidades de tampón y enzima T4 necesarios para la reacción. Las reacciones se incubaron a 15 °C, durante un mínimo de 1 hora.

II.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Las amplificaciones de los fragmentos de ADN se realizaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) utilizando oligonucleótidos específicos flanqueantes de la zona que se desea amplificar.

II.8.1. DISEÑO DE CEBADORES.

Para el diseño de cebadores específicos se siguieron las recomendaciones de Saiki (1989). Básicamente se tomaron secuencias de al menos 20 nucleótidos, con un 50 % de C y G, se evitaron secuencias palindrómicas y se procuró en lo posible que los oligonucleótidos tuviesen en el extremo 3´ la secuencia CG, GG, CC o GC.

La secuencia de los cebadores ya diseñados se introdujo en el programa de ordenador Vector NTI 9 Distribute, para estudiar sus características y confirmar que cumplía con los requisitos citados. En la Tabla II.4 se describen los cebadores empleados en este trabajo, los nucleótidos en rojo y subrayados, corresponden a secuencias específicas para corte de endonucleasas de restricción, con la finalidad de facilitar la posterior subclonación en los vectores adecuados.

Tabla II.4. Cebadores empleados en este trabajo. En rojo y subrayados se muestran los puntos de reconocimiento para las endonucleasas de restricción.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción diseñado
FCpATC5'-5'	5'-AAACTT <u>GGTACC</u> TCGTGGATGGTTATTTTCTCTTCC-3'	<i>KpnI</i>
RCpATC5'-3'	5'-AAACTT <u>GGGCCC</u> ATCTCCTAATACCTTTGATTCTGG-3'	<i>ApaI</i>
FCpATC3'-5'	5'-AAACTT <u>CCGCGG</u> ATTAGAGCCCAAAAGCAATAAC-3'	<i>SacII</i>
RCpATC3'-3'	5'-AAACTT <u>GAGCTC</u> TGAATGAGCAACCACCAGCGGC-3'	<i>SacI</i>
But237	5'-GCTGTTCCGTTATGTGTAATCATCC-3'	
FCpATC5Out	5'-ACATCAGAGTCCCAGTTACGC-3'	
RCpATC-central	5'-TTCAATGTGGTCCATTGTGG-3'	
FCpNTC5'-5'	5'-AAACTT <u>GGTACC</u> AAGGTCCTTTTCATCTTGTGTACC-3'	<i>KpnI</i>
RCpNTC5'-3'	5'-AAACTT <u>GGGCCC</u> ATAGAAGATTGTCTTCTATGG-3'	<i>ApaI</i>
FCpNTC3'-5'	5'-AAACTT <u>CCGCGG</u> AGGTTGTGTGTGGCTATTACG-3'	<i>SacII</i>
RCpNTC3'-3'	5'-AAACTT <u>GAGCTC</u> TTCTTAGCATGTGAATGGAGG-3'	<i>SacI</i>
FSAT5	5'-ATGAAAATTTCCGGTGATCCCTGAGC-3'	
RCpNTC-3-59	5'-TGTCTTGAATGAATTAGTACC-3'	
ISARPS5C	5'-ATGTCATTACCAGCTTCATTTGA-3'	
ISARPS3C	5'-GCAGTAGCACCAGTGTGAGC-3'	
RT-FCpNTC5	5'-ATCCTGGTGATGTCAATGAAGC-3'	
RT-RCpNTC3	5'-ATCCCATTGACGTGAGGGCC-3'	

II.8.2. CONDICIONES DE REACCIÓN.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Minicycler™ modelo PTC 150 (MJ Research).

Se utilizó como molde ADN genómico ó plasmídico, obtenido como ha sido descrito previamente en los Apartados II.6.1 y II.6.2. También se utilizaron células enteras de levadura en el método rápido o «PCR de colonia», mediante el cual las colonias fueron resuspendidas en 100 µl de una solución que contenía NaOH 10 mM, Tween20 0,5%, Nonidet P-40 0,5% y fueron incubadas durante 10 min a 100 °C. Finalizado este tratamiento, se centrifugaron las muestras y se tomaron 10 µl del sobrenadante que sirvió como molde para la reacción de PCR, mezcla que fue ajustada a la misma concentración de la reacción que se describe a continuación para los ensayos

realizados con ADN genómico y plasmídico, descontando el volumen de agua de la suspensión y llevando la reacción a 50 µl.

Las mezclas de reacción contenían entre 0,25 y 2 unidades de ADN Taq polimerasa (Amersham-Pharmacia-Biotech), EcoTaq o EcoTaq® Plus polimerasa (Ecogen), 0,25 mM de dNTP, 0,4 µM de oligonucleótidos cebadores y del orden de 10 a 100 ng de ADN molde, en un volumen final entre 25 y 50 µl. En todos los casos, se escogió el tampón suministrado por el fabricante.

Los programas utilizados constaron de un ciclo de 5 min a 94 °C, 30 ciclos de: entre 30 seg. a 1 min. a 94 °C para la desnaturalización, de entre 30 seg. a 1 min. a la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos y un tiempo variable a 72 °C para la extensión (generalmente 1 min. por cada 1000 pares de bases). En el ciclo final, se realizó una incubación adicional de 5 min. a 72 °C para asegurar la completa polimerización. La temperatura de hibridación viene recomendada por las empresas que sintetizaron los oligonucleótidos y puede calcularse mediante la fórmula:

$$T^{\text{a}} \text{ fusión} = 2 \times (A/T) + 4 \times (C/G); T^{\text{a}} \text{ hibridación} = T^{\text{a}} \text{ fusión} - 5 \text{ }^{\circ}\text{C}.$$

II.8.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR).

La obtención del ARN total se describe en el Apartado II.10. Para la síntesis de la cadena correspondiente al ADN complementario (ADNc), se empleó el Oligo(dT) y la retrotranscriptasa SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. La técnica se fundamenta en la síntesis de ADN empleando ARN como molde, gracias a la acción de la transcriptasa inversa murina (MMLV) y usando como cebadores oligo d(T) de longitud variable, que se unen a las colas de poli(A) de los ARNm. La síntesis de la segunda cadena ocurre por acción de la DNA polimerasa I en presencia de RNasa H. La RNasa H irá digiriendo el ARNm mientras se produce la copia de la segunda cadena de ADN. El resultado final es la obtención de ADNc de doble cadena.

Se utilizó un microgramo de ADNc como molde para cada reacción de PCR. Se usaron como cebadores RT-FCpNTC5 y RT-RCpNTC3 (Tabla II.4), que amplifican una banda de 755 pb del gen *NTC1*. Para tener una aproximación de la cantidad relativa de ADNc en cada muestra, los oligonucleótidos ISARP5C y ISARP3C (Tabla II.4) se

añadieron en cada reacción de PCR. Este par de oligonucleótidos amplifican un fragmento específico de 277 pb del gen constitutivo *RPS0* de *C. parapsilosis* (Vercher *et al.*, 2011). Como el gen *RPS0* contiene un intrón, los cebadores ISARPS5C y ISARPS3C sirven como control para confirmar que no hay contaminación de ADN genómico en las muestras de ADNc (en el caso de que existiera contaminación, aparecería una banda de 580 pb).

Las condiciones de ensayo en la PCR fueron las siguientes: se le añadió EcoTaq polymerase (2 U, Ecogen) a 49,4 µl de una solución consistente en 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,3 µM de cada uno de los cebadores: RT-FCpNTC5, RT-RCpNTC3, ISARPS5C, ISARPS3C y 1 µg de ADNc. La amplificación mediante la PCR se llevó a cabo usando un primer ciclo de 94 °C durante 5 min., y después 30 ciclos como se describe a continuación: 30 seg. de desnaturalización a 94 °C, 30 seg. de hibridación de los oligos a 60 °C y 1 min. de extensión a 72 °C. Los amplicones obtenidos en los diferentes ciclos se corrieron en geles de agarosa al 2 % para permitir la correcta separación de las bandas de pequeño peso molecular.

II.9. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN EN GELES DE AGAROSA.

La separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Debido a que el ADN posee una carga neta negativa, éste migra hacia el polo positivo al someterlo a una corriente eléctrica. La movilidad de fragmentos lineales de ADN depende de su tamaño, siendo independiente de la composición en bases. Los geles de agarosa (Roche Diagnostics) se usaron a una concentración entre 0,7 y 2,0 %, dependiendo de los tamaños del ADN a separar, de acuerdo con las condiciones descritas por Sambrook *et al.*, (1989).

En general los geles se prepararon al 0,8 % de agarosa en el tampón de electroforesis TAE (Tris-acetato 40 mM/EDTA 1 mM, pH 8,0) y la separación de los fragmentos se produjo al aplicar un voltaje constante (entre 40 y 90 V) en una cubeta horizontal de electroforesis que contenía el mismo tampón (TAE).

Antes de realizar la electroforesis, la muestra con el ADN a estudiar se mezcló en una proporción 6:1 con una solución de azul de bromofenol al 0,025 % y glicerol al 30 % en tampón TAE (para visualizar el frente de la electroforesis y aumentar la

densidad de la muestra). Paralelamente, se dispuso una calle con marcadores de peso molecular conocido, obtenidos mediante la digestión del ADN del fago λ gt11 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Roche).

Para visualizar el resultado de la electroforesis, en la preparación del gel se añadió el fluoróforo SYBR-Safe® (InvitroGen) a una dilución de 1:20,000. Luego se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomaron unas fotografías en el equipo GelPrinter Plus.

Concluida la separación por electroforesis en agarosa, aquellos fragmentos que debían ser recuperados del gel una vez identificados, fueron recortados del mismo lo más rápidamente posible, para evitar su alteración por efecto de la radiación. La purificación del ADN se llevó a cabo utilizando el sistema Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche), basado en la fusión de la agarosa y posterior empleo de una resina o matriz de silicio con afinidad por el ADN. Se siguieron estrictamente las instrucciones del fabricante.

II.10. PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL DE LEVADURAS.

La obtención de ARN total de *C. parapsilosis* se obtuvo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante empleando el reactivo Tripure Isolation Reagent (Roche). Las células crecidas en las condiciones adecuadas fueron recogidas por centrifugación durante 10 min a 2000 xg y se llevaron a un volumen de 100-200 μ l de agua que contenía el inhibidor de ARNsas DEPC (dietilpirocarbonato), con el fin de evitar la degradación del ARN. Las células se llevaron a tubos que contenían 500 μ l de perlas de vidrio estériles de diámetro de 425-600 micras y se agregó 1 ml del reactivo Tripure Isolation Reagent por cada $5-10 \times 10^6$ células. Las células se rompieron en un agitador Fast-Prep tras 6 agitaciones de 30 segundos con intervalos de 30 segundos en hielo. Una vez rotas las células se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se les agregaron 200 μ l de cloroformo por cada ml de Tripure Isolation Reagent, y se agitaron 15 segundos.

Se incubaron 15 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 xg 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se precipitó el ARN adicionando 0,5 ml de isopropanol. Se homogeneizó la mezcla y se mantuvo 10 min. a temperatura ambiente. Luego se recogió el precipitado por centrifugación a 12000 xg durante 10 min. a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se

centrifugó a 4°C a 7500 xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó en bomba de vacío durante 10 min. Posteriormente, el ARN se resuspendió en agua adicionada de DEPC y se cuantificó mediante un espectrofotómetro GeneQuant II (Amersham-Pharmacia-Biotech). Para el estudio de la expresión de genes mediante RT-PCR el ARN se trató con Dnasa I (Roche) según las instrucciones del fabricante

II.11. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ARN.

Para el cálculo de la concentración y pureza de las muestras de ADN, se empleó un espectrofotómetro GeneQuant II (Amersham-Pharmacia-Biotech). Dicho aparato mide las densidades ópticas a 260 nm y 280 nm simultáneamente, y realiza automáticamente el cálculo de la concentración, empleando la fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times \text{Factor de conversión}$$

El factor depende del tipo de ácido nucleico, siendo 50 para ADN de doble cadena y 40 para el ARN. Asimismo, el aparato estima la pureza de la muestra mediante el cálculo de la relación A_{260}/A_{280} . Muestras puras de ADN y ARN tienen valores cercanos a 1,8 y 2 respectivamente.

II.12. DETECCIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIAS DE ADN POR SOUTHERN BLOT.

La identificación de secuencias específicas del ADN genómico se realizó siguiendo la técnica descrita por Southern (1975) y modificada por Sambrook y Russell (2001).

II.12.1. SEPARACIÓN Y TRANSFERENCIA DE ADN.

Las muestras de ADN genómico (20 μg) se digirieron con una o varias endonucleasas de restricción y los fragmentos resultantes se separaron de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa al 0,8-1,5 % en TAE. Una vez teñido el gel y comprobado que las digestiones habían sido correctas, los fragmentos de ADN se depurinizaron parcialmente sumergiendo el gel en HCl 0,25 M durante 15 min. (2 veces). Con este

paso se reduce el tamaño de los fragmentos de ADN para facilitar su ulterior transferencia a la membrana. Después se desnaturizó con NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M mediante dos tratamientos de 15 min y se neutralizó con Tris-HCl 0,5 M, pH 7,0/NaCl 1,5 M durante 30 min. Por último se realizó un lavado con el tampón 5xSSC (NaCl 1 M/citrato sódico 0,1 M, pH 7,0). A continuación, el ADN fue transferido por capilaridad desde el gel a una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche) capaz de retener las moléculas de ADN. La transferencia se llevó a cabo durante 12 h a temperatura ambiente en el tampón 5xSSC o bien mediante una Vacuum blot (Amersham-Pharmacia-Biotech) durante 1h, a una presión constante entre 50 y 55 mbar en el mismo tampón. Posteriormente, la membrana fue lavada con 5xSSC para eliminar el exceso de sales y el ADN se fijó por calor a 120 °C durante 30 min.

II.12.2. MARCAJE NO RADIATIVO DE SONDAS DE ADN.

Los fragmentos de ADN empleados como sonda, se marcaron por métodos no radiativos utilizando el sistema comercial «DIG DNA Labeling and Detection kit» (Roche). El ADN se marcó con dNTPs acoplados a digoxigenina, en una reacción catalizada por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (Roche), o bien utilizando la técnica de la PCR. En ambos casos, el ADN a marcar era desnaturizado previamente por calor (10 min. a 100 °C). Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en presencia de 1 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,65 mM de dUTP y 0,35 mM de digoxigenina-11-dUTP. Como cebadores se emplearon mezclas de hexanucleótidos aleatorios (en la reacción con el fragmento Klenow), o bien los oligonucleótidos específicos (en el marcaje por PCR).

II.12.3. HIBRIDACIÓN ADN/ADN Y DETECCIÓN.

Las membranas con el ADN fijado fueron incubadas con la solución de prehibridación (formamida desionizada al 50 %, 5xSSC, N-laurilsarcosina 0,1 %, SDS 0,02 %, agente bloqueante 2 % (Roche)) durante al menos 1 h a 42 °C. Posteriormente, se llevó a cabo la hibridación con la sonda de ADN marcada con digoxigenina, previamente desnaturizada por calor (10 min a 100 °C) en solución de hibridación nueva durante al menos 16 h a 42 °C. Transcurrido este tiempo las membranas fueron lavadas 2 veces con 2xSSC/SDS 0,1 % durante 5 min. a temperatura

ambiente y otras 2 veces con 0,1xSSC/0,1 % SDS durante 15 min. a 68 °C, para eliminar el exceso de sonda, así como la unida de forma inespecífica.

La detección se realizó por quimioluminiscencia, incubando la membrana durante 30 min. en una dilución 1:10 000 con anticuerpos anti-digoxigenina acoplados a fosfatasa alcalina (Roche) previo bloqueo de la membrana. Se eliminó el exceso de anticuerpos por lavados sucesivos en tampón Tris-HCl 0,1 M/NaCl 0,15 M/ Tween-20 0,3 % a pH 7,5 y la membrana se incubó en una dilución 1:100 del complejo fosfatado 1,2 dioxetano CSPD (Roche) en el tampón de la fosfatasa alcalina (NaCl 100 mM/ MgCl₂ 5 mM en Tris-HCl 100 mM a pH 9,5). A continuación, la membrana se incubó a 37 °C durante 15 min. y fue expuesta en oscuridad sobre una película fotográfica X-Omat AR (Kodak), por períodos de tiempo variables, para posteriormente proceder a su revelado.

II.13. INTERRUPCIÓN GÉNICA EN *C. parapsilosis*.

En el método de interrupción génica empleado en el presente trabajo, se partió de un aislado clínico utilizando el plásmido pCD8 (Ding y Butler, 2007) que contiene un casete que lleva los genes *CpSAT1* (que codifica para la Estreptotricin Acetil Transferasa 1, un gen de resistencia a antibióticos del tipo estreptomycin) y *CpFLP* (que codifica para una Flipasa que permitirá eliminar el casete para una siguiente ronda de transformación). A este casete se le añadió a cada flanco, una secuencia de homología de la zona 5' y 3', respectivamente, del gen a interrumpir. Una vez obtenido el casete de interrupción se digirió con las enzimas de restricción adecuadas, con el fin de conseguir un fragmento de DNA lineal para aumentar la eficiencia de la transformación integrativa. Aproximadamente 5µg de casete digerido, se utilizaron para transformar la cepa de *C. parapsilosis* según el protocolo descrito por (Reuss *et al.*, 2004) tal y como se indica en el Apartado II.5.2.

Los transformantes obtenidos de cada una de las interrupciones secuenciales se seleccionaron en placas de medio YPD con nurseotricina en una concentración de 200 µg/ml, posteriormente se extrajo su ADN genómico tal y como se indica en el Apartado II.6.2 y se estudió por PCR (Apartado II.8) y por Southern Blot (Apartado II.12).

II.14. MODELIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Atc1p DE *C. parapsilosis*.

La secuencia de aminoácidos (1-1039) de la proteína Atc1p madura de *C. parapsilosis* se envió al servidor Jigsaw (<http://www.w3.org/Jigsaw/>) (Bates *et al.*, 2001) para predecir su modelización tridimensional. Se identificaron de manera satisfactoria a través del Servidor Jigsaw, dos regiones en la proteína que coincidían con el dominio catalítico de las glicosidasas. La secuencia también se envió para su modelización al servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>) (Kelley y Sternberg, 2009) que permite generar un modelo de homología más preciso. Adicionalmente al dominio catalítico de glicosidasas predicho por Jigsaw, Phyre2 reconoció un dominio de unión a carbohidratos en la secuencia de Atc1p. Ambas propuestas de alineación (Jigsaw y Phyre2) se perfeccionaron mediante inspección visual y utilizando el servidor SSM (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) (Krissinel y Henrick, 2004) que tiene en consideración la estructura secundaria de la proteína. La utilización conjunta de los programas descritos, permitió obtener una estructura superpuesta y consensuada que implica la modelización casi completa de la secuencia aminoacídica de Atc1p. Posteriormente, la secuencia se envió al servidor 3DLigandSite (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite>) (Wass *et al.*, 2010) para intentar predecir en la proteína, sitios de unión a ligandos.

II.15. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS: VIABILIDAD Y SENSIBILIDAD.

Los cultivos crecidos en medio YPD y recogidos en fase exponencial ($D.O_{600nm} = 1,0-1,2$) o fase estacionaria de crecimiento ($D.O_{600nm} = 6,0-10$) se dividieron en alícuotas idénticas, que fueron sometidas a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ó estrés osmótico/salino (NaCl), indicadas en cada experimento particular o, en su defecto, se mantuvieron en ausencia de estos compuestos a 30° C como ensayos control de referencia. De la misma forma, para los tratamientos de choque térmico, los cultivos en fase exponencial fueron expuestos durante 1 h a las temperaturas indicadas en cada caso, manteniendo siempre un cultivo control en ausencia de estrés.

II.15.1. ENSAYO DE VIABILIDAD.

El efecto provocado en los cultivos de las cepas estudiadas por varios tipos de estrés, se midió mediante un análisis comparativo entre la viabilidad registrada en ensayos control y los sometidos a tratamientos específicos. Para ello, se recogió una alícuota de 1 ml de cada cultivo en condiciones estériles, y se realizaron varias diluciones con agua destilada estéril, en función de la D.O._{600nm} alcanzada (en el rango de 10^2 - 10^6). Se dispensaron 100 μ l de cada dilución en duplicado sobre placas Petri conteniendo medio sólido YPD. La suspensión se extendió en césped por toda la placa mediante agitación suave con perlas de vidrio (3 mm de diámetro).

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

II.15.2. ENSAYO DE SENSIBILIDAD.

Se trata de una medida distinta referente al crecimiento y comportamiento de los mutantes en medios sólidos con distintos agentes estresantes o diferentes fuentes de carbono. Se realizó mediante diluciones seriadas y posterior dispensa en gotas de los inóculos correspondientes. A tal fin, se tomó una alícuota de cada cultivo, ajustando su volumen con agua destilada estéril hasta una D.O._{600nm} final de 1,0. A partir de la misma, se practicaron diluciones seriadas en el rango de 10^2 hasta 10^6 , y se depositaron gotas de 5 μ l de cada dilución sobre placas Petri conteniendo los agentes estresantes. Un crecimiento colonial suficiente se obtuvo tras incubación a 30° C, durante 2 ó 3 días y posteriormente las placas se fotografiaron.

II.16. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS.

Para ensayar las actividades enzimáticas intracelulares, se obtuvieron extractos celulares crudos de las cepas de *C. parapsilosis* objeto de estudio. Para ello, se tomaron alícuotas de 45 ml de cada cultivo y las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 xg durante 10 min. a 4° C, en diferentes fases de crecimiento. Se lavaron una vez con agua destilada fría y finalmente se resuspendieron en 1,25 ml de tampón ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 100 mM a pH 6,0 que contiene fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 0,1 mM y cisteína 5 mM. Se empleó PMSF y cisteína por su propiedad de estabilizar las proteínas de bajo peso molecular e inhibir la acción de las proteasas. A continuación, las suspensiones celulares mantenidas en hielo, fueron sometidas a rotura mecánica en tubos de hemólisis (0,5 cm de diámetro) mediante perlas Ballotini (0,45 mm de diámetro), durante 6 ciclos alternativos de rotura y reposo de 45 seg. cada uno, manteniendo siempre las muestras en frío para evitar la desnaturalización enzimática por el efecto del calor liberado en la fricción mecánica de las perlas.

Los extractos crudos se recogieron con pipetas Pasteur en tubos Eppendorf y se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada a 4°C MSE (10000 xg durante 7 min.), obteniéndose los sobrenadantes correspondientes y eliminando restos celulares y polvo de vidrio residual. Ambas fracciones (extracto citosólico y fracción particulada que engloba la pared y resto celular) se guardaron de forma independiente y se conservaron a 4°C.

El precipitado del tubo Eppendorf se resuspendió en un 1 ml de agua destilada estéril y se volvió a centrifugar en frío durante un tiempo de 7 min. a 13.000 xg, para lavar los posibles restos de citosol y obtener mayoritariamente la fracción de pared celular. Una vez centrifugado, se desechó el sobrenadante y se le añadió 1 ml del mismo tampón (MES 100mM a pH 6,0) utilizado para el extracto del citosol (ambos extractos se mantuvieron en hielo).

II.17. DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE PROTEÍNA: MÉTODO DE LOWRY.

La estimación de la proteína presente en el sistema enzimático se realizó siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951). Es un método de valoración cuantitativa de las proteínas, que se basa en la adición de un compuesto, el cual, forma un complejo coloreado con determinados aminoácidos, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, dentro de un rango de linealidad, según la ley de Lambert-Beer. El color final es el resultado de la reacción con el cobre en solución alcalina y de la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la tirosina y el triptófano de la proteína tratada. Los reactivos que se emplearon fueron los siguientes:

A) Solución alcalina de cobre:

-Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 N

-CuSO₄ al 1% en agua destilada

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

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

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

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

II.18. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

II.18.1. CATALASA (E.C.1.11.1.6).

La catalasa, enzima con actividad antioxidante, lleva a cabo la descomposición del H₂O₂, mediante la siguiente reacción:



Para su determinación, se empleó el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), que está basado en la detección de la disminución de absorbancia a 240 nm (Abs_{240nm}), originada por la desaparición del H₂O₂. El ensayo se efectuó a 25° C en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1203 equipado con un accesorio de termostatación y empleando 1,475 ml de una mezcla de reacción que contenía H₂O₂ 10,6 mM en tampón fosfato potásico (BPK⁺) 50 mM a pH 7,0.

La reacción se inició por la adición de 25 µl de muestra. El registro se efectuó midiendo cada muestra problema frente a un blanco compuesto por BPK⁺ 50 Mm a pH 7,0. La actividad enzimática, expresada en µmoles x min⁻¹ x ml⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción (ΔAbs_{240nm}/min) y de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de 39,58 M⁻¹ x cm⁻¹ (Del Río *et al.*, 1977).

II.18.2. GLUTATIÓN REDUCTASA (E.C.1.6.4.2).

Esta actividad se valoró siguiendo método descrito por Edwards y col., (1990), basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH durante la conversión de glutatión oxidado a glutatión reducido por acción de la enzima glutatión reductasa (GR).

El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo UV-1203. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.8; 1 mM EDTA; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM de glutatión oxidado y 50-100 µl de muestra. La reacción se inicia por la adición de 50 µl de NADPH 4 mM, siguiéndose su oxidación durante 2 min. frente a un blanco de

muestra que contenía el tampón Tris-HCl 100 mM, 50-100 μ l de muestra y 50 μ l de NADPH 4mM.

En cada ensayo cada medida correspondiente a la reacción problema que contenía el extracto enzimático fue corregida restando el valor obtenido en el blanco de muestra. La actividad enzimática, expresada en nmoles de NADPH oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.18.3. ACTIVIDADES TREHALASAS (E.C.3.2.1.28).

La determinación analítica de la actividad trehalasa valora en un ensayo acoplado, la glucosa generada a partir de la hidrólisis del sustrato trehalosa (Merck, Fluka) que se realizó según el método descrito previamente (San Miguel y Argüelles, 1994), con arreglo a la siguiente estequiometría:

Trehalosas
(ácida/neutra)

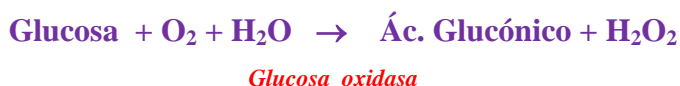
Trehalosa \Rightarrow 2 Glucosa

El ensayo enzimático para medir tanto la actividad ácida (Atc1p) como la actividad neutra (Ntc1p), contenía en un volumen final de 0,25 ml: 50 μ l de extracto celular como fuente enzimática, 200 μ l de trehalosa 200 mM como sustrato, preparada en tampón MES 25 mM a pH 7,1 incluyendo CaCl_2 125 μ M, para valorar la actividad trehalasa neutra y para la determinación de actividad trehalasa ácida, se preparó trehalosa 200 mM en tampón citrato-fosfato 0,2 mM a pH 4,5 y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Ambas reacciones se incubaron a 30° C durante 30 min. y se detuvieron por inmersión en un baño de agua hirviendo durante 5 min.

La glucosa liberada en el sobrenadante del ensayo se midió con el método glucosa-oxidasa (ver epígrafe II.19). Blancos carentes de enzima y de sustrato, respectivamente, así como ensayos control detenidos a tiempo 0, se dispusieron en paralelo para descartar potenciales autohidrólisis o interferencias del ensayo. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de producir 2 μ moles de glucosa por minuto a 30° C. La actividad específica se expresa como (nmoles de glucosa liberados por minuto) por miligramo de proteína.

II.19. VALORACIÓN ANALÍTICA DE GLUCOSA. MÉTODO DE LA GLUCOSA-OXIDASA.

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



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



Tras la primera reacción “standard” de trehalasa explicada en el epígrafe II.18.3., que se detuvo a los tiempos deseados, se añadió a dicha reacción, 1 ml del reactivo formado por las siguientes soluciones, mezcladas en la proporción 20:1 (v/v), inmediatamente antes de cada valoración:

a) Solución de glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4) **tipo V + peroxidasa** (E.C.1.11.1.7) (Sigma), compuesta por 1 ml de glucosa oxidasa y 5,25 mg de peroxidasa en 1 l de tampón fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0.

b) Solución de O-dianisidina: 600 mg de O-dianisidina-HCl (Sigma) disueltos en 100 ml de agua destilada. Esta solución se mantiene a 4° C protegida de la luz.

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

Los valores procedentes de ensayos experimentales se refirieron a una recta de referencia de glucosa (Figura II.1) y se midieron en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1203) a 540 nm (Abs_{540nm}), estableciéndose un rango de linealidad entre 10 y 100 μ g de glucosa/ 200 μ l.

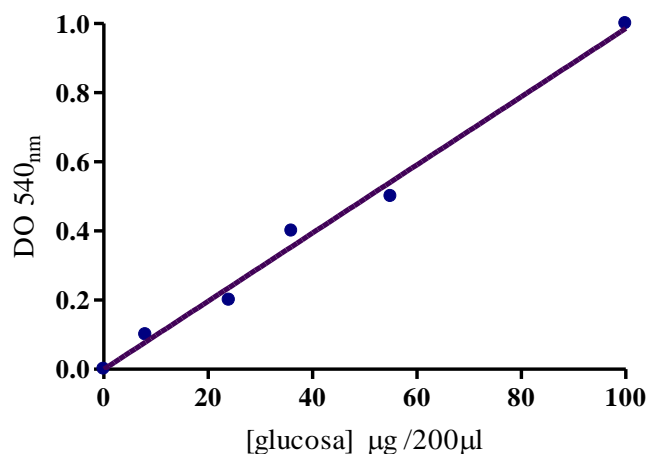


Figura II.1. Gráfica patrón para la valoración de glucosa con el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa.

II.20. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE TREHALOSA, GLICEROL Y D-ARABITOL.

II.20.1. VALORACIÓN ENZIMÁTICA DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE TREHALOSA.

La determinación de trehalosa endógena se realizó esencialmente siguiendo el protocolo descrito por Blázquez *et al.*, (1994). La extracción se realizó a partir de muestras de cultivo celular (15 ml) recogidas en fase exponencial o estacionaria, que se centrifugaron y lavaron en agua fría y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada, pudiendo conservar las muestras a -20° C hasta su análisis. Los tubos se introdujeron en un baño de agua a 95° C, durante 45 min, con agitación esporádica. Este tratamiento provoca la lisis celular, liberándose el contenido interno de trehalosa y otros metabolitos al medio. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 10000 \times g durante 10 min, recuperándose el sobrenadante.

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

Trehalasa

Trehalosa ⇒ 2 Glucosa

Paralelamente, se dispuso una mezcla control preparada de igual modo, pero sustituyendo las muestras problema por trehalosa standard (Merck, 1-5 mM, recta patrón). En los blancos, la trehalasa comercial es reemplazada por agua destilada, debiendo incluirse al menos un blanco y dos medidas de referencia por cada valoración distinta. La incubación se realiza a 37° C durante toda la noche. El método mide la cantidad de glucosa formada en el extracto, siendo valorada mediante el empleo de una reacción acoplada con glucosa oxidasa-peroxidasa. (Apartado II.19).

II.20.2. DETERMINACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE TREHALOSA, GLICEROL Y ARABITOL.

Las determinaciones analíticas se realizaron con un cromatógrafo líquido de alta resolución, modelo VWR Hitachi Elite LaCrom, con un detector de índice de refracción modelo Detector L-2490 RI. Se utilizó una columna de Bio-Rad HPX-87H junto con una pre-columna de BIO-Rad específica a 25°C. Como fase móvil se empleó ácido sulfúrico 1,5 mM, con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. El volumen de inyección fue de 20µl.

II.20.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras se procesaron tal y como se indica en el apartado anterior (II.20.1). Tras la centrifugación (10000 xg durante 10 min) se recuperó el sobrenadante, que fue empleado para la determinación de los diferentes metabolitos mediante HPLC (trehalosa y los polioles glicerol y D-arabitol).

II.20.2.2. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES.

Se prepararon disoluciones en ácido sulfúrico (fase móvil) a distintas concentraciones (0,1-0,5-1-5-10 mg/ml) de una muestra standard, correspondiente a cada uno de los metabolitos objeto de estudio, con la finalidad de establecer una curva patrón de calibración.

Para determinar el rango de linealidad, se realizó una representación gráfica, tomando el área relativa de los picos obtenidos para cada uno de los metabolitos de referencia (trehalosa, glicerol y D-arabitol) frente a las diferentes concentraciones de los mismos. Se observó una adecuada linealidad obteniéndose en todos los casos unos coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0,999. Figura II.2.B.

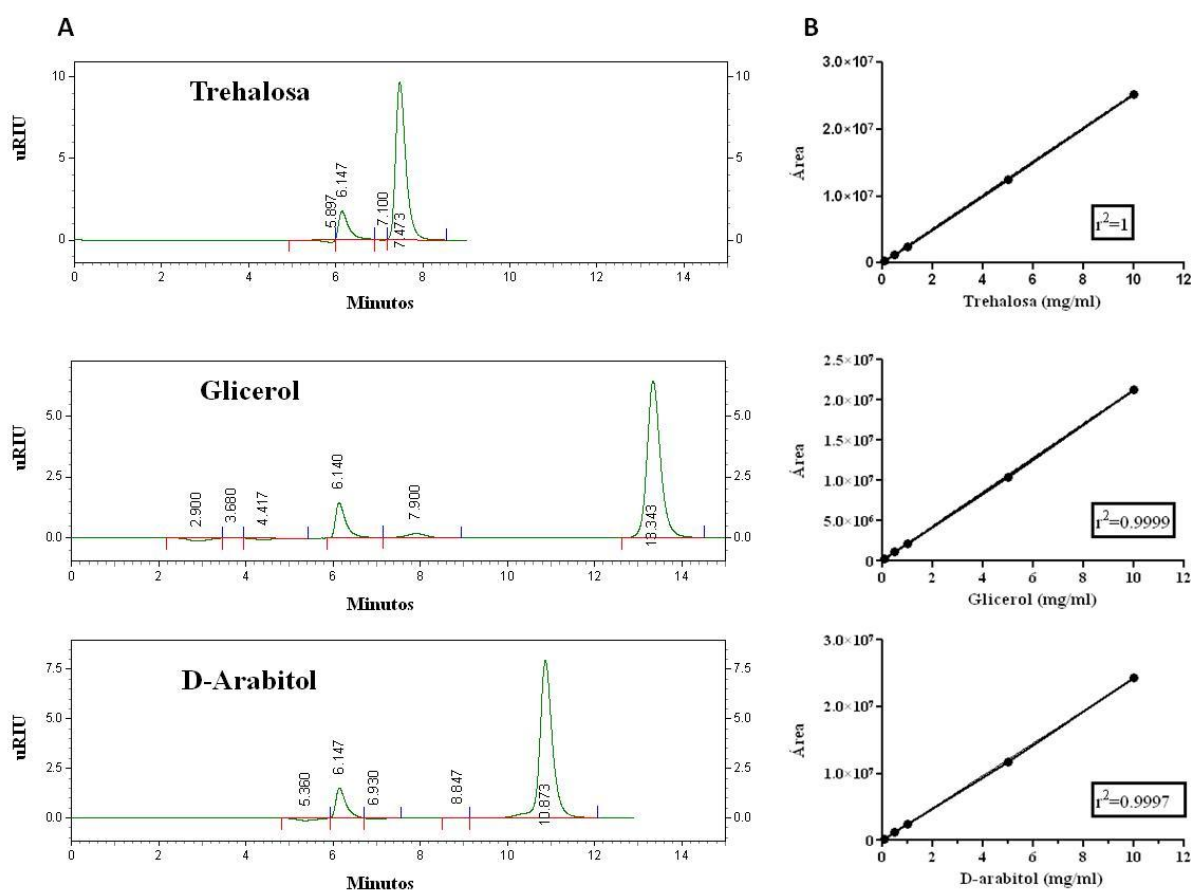


Figura II.2. A) Representación gráfica de las áreas correspondientes a los diferentes picos de elución para los patrones de trehalosa endógena (7,540 min), glicerol (13,343 min) y D-arabitol (10,873 min), determinados por HPLC. B) Recta patrón individual para cada metabolito con su coeficiente de regresión (r^2).

II.20.2.3. CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS.

La identificación de las muestras se realizó por comparación directa con los tiempos de retención (picos cromatográficos) obtenidos para los diferentes patrones (Figura II.2). La cuantificación se llevo a cabo, extrapolando las áreas de los picos de cada compuesto sobre las correspondientes rectas de calibrado, obteniendo así, la concentración de cada uno de ellos. Los ensayos se realizaron por duplicado.

II.21. ENSAYOS DE FILAMENTACIÓN EN *C. parapsilosis*.

II.21.1. MEDIO LÍQUIDO.

Para inducir la emisión de tubos germinativos en *C. parapsilosis*, se empleó el método descrito en *C. albicans* por Argüelles *et al.*, (1999), consistente en provocar la la conversión de levadura a hifa mediante la adición de suero humano procedente de muestras clínicas (Hospital General Reina Sofía Murcia) y transferencia simultánea de 30° C a 37° C. Los cultivos se incubaron en medio YPD a 30°C hasta alcanzar fase exponencial temprana (D.O. $_{600nm}$ = 0,3-0,5). Las muestras (5-10 ml) se recogieron y lavaron rápidamente con agua destilada fría estéril y se resuspendieron a una densidad de 0,8-1,0 mg/ml (peso seco) en medio YPD fresco conteniendo suero humano al 10 % (v/v), siendo incubadas a 37° C. Previamente a su adición, las muestras de suero se esterilizaron por filtración (0,45 μ m, Millipore).

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

II.21.2. MEDIO SÓLIDO.

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

II.22. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI) DE DIFERENTES ANTIFÚNGICOS.

La concentración mínima inhibitoria para un grupo escogido de antifúngicos que afectan a la actividad celular se determinó mediante el método de microdilución PNT (MIC-PT-000017-005), puesto a punto en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología, Carlos III de Madrid.

Tanto las cepas problema, como los controles se cultivaron en placas de Sabouraud-dextrosa a 35°C \pm 2°C durante 24 horas antes de realizar el test. Al día siguiente se preparó el inóculo, que consistió en coger al menos 5 colonias (con un diámetro mínimo de 1mm) de cada cepa en 5 ml de agua destilada estéril, realizando el proceso en la vecindad de un mechero y esterilizando el asa en la llama para cada suspensión.

La turbidez de esta suspensión se midió en un espectrofotómetro Génesis TM 20 y se ajustó, añadiendo más suspensión celular o diluyendo con agua estéril, según fuera necesario, para que contuviera aproximadamente $1-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml). Se realizó una dilución 1:10 en agua destilada estéril para obtener $1-5 \times 10^5$ UFC/ml, que es la concentración necesaria para inocular en cada placa de microdilución. Como se adicionaron 100 μ l de dicha suspensión, la concentración final de levaduras en el pocillo será de $1-5 \times 10^4$ UFC/ml.

Previamente se dispusieron placas de 96 pocillos con el medio de cultivo adecuado (RPMI 2% glucosa) y las diluciones seriadas de los antifúngicos en concentraciones decrecientes. Finalmente, a cada pocillo se adicionó 100 μ l de la suspensión de dichas levaduras.

Las placas se incubaron a 35°C \pm 2°C durante 24 y 48°C (1º y 2º lectura), en ambiente húmedo para prevenir la evaporación del medio.

Trascurrida la incubación, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm en un espectrofotómetro (DINEX MRXII) para placas de microdilución y se calculó automáticamente la CMI como un porcentaje de inhibición variable según el antifúngico ensayado. Como control de la técnica, en cada placa se incluyeron dos levaduras de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) que contienen CMIs conocidas y definidas como cepas control en los protocolos normalizados de EE.UU. Los criterios de aceptación o rechazo de los resultados dependen de los valores que se obtengan con las cepas control, que deben estar en unos determinados intervalos que se indican en la siguiente Tabla II.5. Cada ensayo se realizó por duplicado, utilizándose los datos más representativos.

Tabla II.5. Antifúngicos ensayados e intervalos de CMIs de dos especies control de *Candida*, tomadas como referencia en protocolos normalizados.

Intervalos de CMI (µg/ml) EUCAST		
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019
Anfotericina B	0,12-0,5	0,12-0,5
5-Fruorocitosina	2,0-8,0	0,12-0,5
Fluconazol	16,0-64,0	0,5-2,0
Itraconazol	0,03-0,12	0,03-0,12
Voriconazol	0,06-0,25	0,015-0,06
Ravuconazol	0,03-0,12	0,015-0,03
Posaconazol	0,015-0,06	0,015-0,03
Caspofungina	0,12-0,5	0,5-2,0
Micafungina	0,03-0,12	0,25-1
Anidulafungina	0,03-0,12	0,25-1

II.23. ANÁLISIS DE LA HIDROFOBICIDAD DE LEVADURAS.

El grado de hidrofobicidad de las cepas investigadas en esta Memoria, se analizó mediante el ensayo de unión a microesferas descrito previamente (Colling *et al.*, 2005). El procedimiento consistió en cultivar las levaduras en placas de YPD sólido a 30 °C durante 12 horas aproximadamente. Posteriormente se recogieron las células y se lavaron con 10 ml de PBS, seguido de centrifugación (5000 xg durante 10 min) a temperatura ambiente. El precipitado celular se resuspendió en PBS y tras calcular su

concentración, se ajustó a 2×10^7 levaduras/ml que equivale a una densidad óptica de D.O._{600nm} de 1,0.

La suspensión madre de microesferas de estireno marcadas de 0.80 μm de diámetro (deep blue-dyed styrene microspheres, Sigma), se diluyeron $\frac{1}{4}$ en PBS. Se tomaron volúmenes iguales (10 μl) de levaduras y microesferas y se mezclaron en tubos con 580 μl de PBS, que fueron analizados mediante citometría de flujo inmediatamente (tiempo cero) o tras incubación durante 15 ó 30 min con agitación orbital a y a temperatura ambiente.

La adquisición y el análisis de las muestras se realizó en un citómetro de flujo FACsort (Becton-Dickinson, Montan View, CA, EEUU), equipado con un láser de argón de 488nm. Como software de adquisición y análisis se empleó el programa CellQuest; con parámetros FCS (tamaño) y SSC (granularidad) en escala lineal y FL4 (fluorescencia roja) en escala logarítmica. Para analizar los resultados, se seleccionó la población principal, aquella que se correspondía con la población de levaduras representada en la Figura II.3 dentro de un polígono designado como R2, diferenciándolos así, de la población de bolas sin unir a la levadura (polígono R1). El número de células analizado dentro del polígono, fue de un mínimo de 5000 (Figura II.3). Los datos que se presentan muestran la intensidad de fluorescencia (FL4) asociada con las levaduras, resultado de la unión a las microesferas.

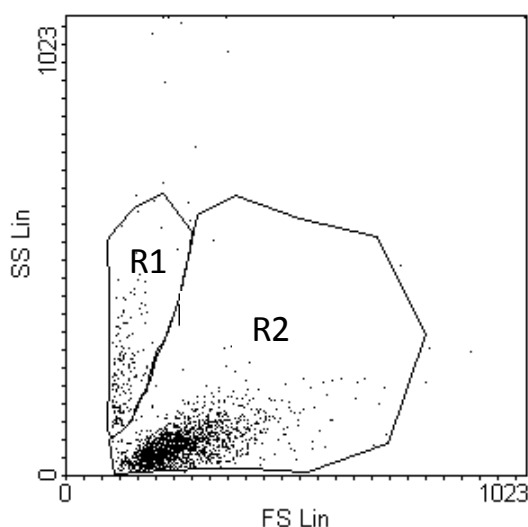


Fig. II.3. Selección de la población de levaduras (R2) por criterios de tamaño y granularidad mediante citometría de flujo.

II.24. CUANTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A LISIS MEDIADA POR MACRÓFAGOS.

En los experimentos sobre interacción entre levaduras y macrófagos, se utilizaron macrófagos de la línea celular U937 diferenciados tal y como se indica en el Apartado II.2 y posteriormente sembrados en placas de 96 pocillos a una concentración $0,5 \times 10^6$ cels/pocillo en 250 μ l de MCC. Por su parte, las levaduras fueron crecidas en placas de YPD incubadas a 30 °C durante las 12 horas previas a la infección. Al día siguiente se recogieron las levaduras, se lavaron con 10 ml de PBS y se centrifugaron a 10000 xg durante 10 min a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en PBS y tras calcular su concentración, se ajustó a $0,5 \times 10^6$ levaduras/pocillo, en la misma proporción que los macrófagos. Una vez adicionadas las levaduras a los correspondientes pocillos con los macrófagos, se mantuvo la infección durante 2 h en una estufa a 37° C con 5% CO₂.

Tras las 2 horas de co-infección, se retiró el sobrenadante de cada pocillo, para el posterior estudio de citoquinas y óxido nítrico, que fue congelado a -20 °C hasta su procesamiento (Apartados II.25 y II.26). A continuación se adicionó a cada pocillo 1 ml de agua destilada estéril con 1% de Tritón X-100, para conseguir la lisis osmótica de los macrófagos y así la liberación de las levaduras fagocitadas del interior de sus fagolisosomas. Posteriormente, se realizaron diluciones de las distintas muestras, con la finalidad de obtener un número teórico de levaduras en la placa de entre 100-150. Se sembraron 100 μ l de cada muestra en placas de medio YPD sólido mediante extensión uniforme de la suspensión celular con perlas estériles (Ballotini) de 3 mm de diámetro.

El recuento del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se llevó a cabo tras la incubación a 30 °C durante 48 horas. En todos los casos se hallaron valores promedio para cada muestra y el porcentaje de supervivencia se refirió a un ensayo control de levaduras sometidas al mismo tratamiento exceptuando la exposición a los macrófagos (100% de viabilidad).

II.25. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE ELISA.

La cuantificación de las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos en presencia o ausencia de levaduras, se realizó mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays). Para ello, se emplearon indistintamente los ELISAs comerciales de R&D Systems (Minneapolis, USA) y de eBioscences (San Diego, USA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes, ya que los resultados obtenidos con ambos reactivos son comparables.

En primer lugar la placa fue tapizada con anticuerpo primario o anticuerpo de captura a una dilución 1/250 en el tampón fosfato salino 0,1M, NaCl 0,138M, KCl 0,0027M en 1l de agua bidestilada pH 7.4 y se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se recuperó la placa, eliminando mediante lavados con PBS-Tween 0,05% el anticuerpo de captura que no hubiera quedado adherido a la placa. Posteriormente se incubó durante 1h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo del kit comercial, para asegurar que el pocillo queda cubierto de proteínas y evitar una posible unión inespecífica posterior de otras proteínas. En el kit de R&D, la placa ya está tapizada con el primer anticuerpo, por lo que los pasos mencionados hasta ahora no son necesarios.

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

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

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

ambiente. Para el kit de R&D, el anticuerpo secundario va conjugado directamente con la peroxidasa y sólo se incubó durante 1 h.

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

La absorbancia de cada pocillo fue medida directamente en un espectrofotómetro lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm y corregida en 570 nm. En la Figura II.4 se muestra un ejemplo de la recta de calibrado obtenida para el ELISA específico de TNF- α .

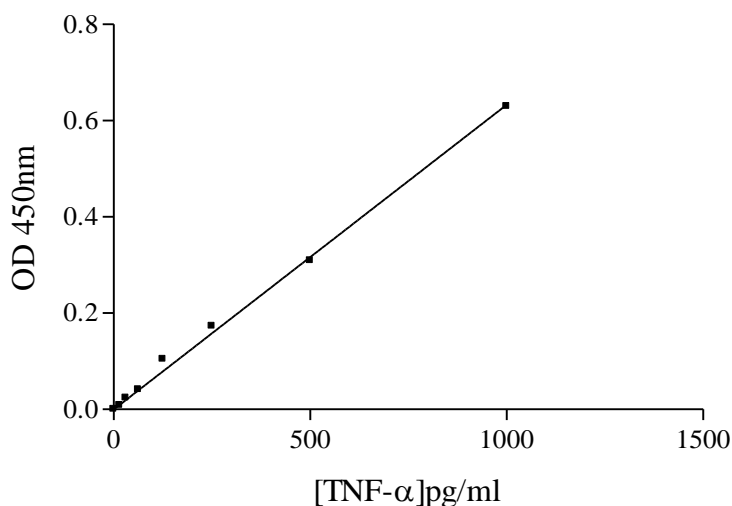


Figura II.4. Recta de calibrado para TNF- α .

II.26. DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO.

La cuantificación del óxido nítrico en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos en presencia o ausencia de levaduras, se realizó mediante un kit (Molecular Probes), que se basa en la reacción de diazotación de Griess, una prueba química, que detecta la presencia de nitritos orgánicos. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rojo rosado, al tratamiento de una muestra conteniendo NO₂⁻, con

el reactivo de Griess. Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio y cuando se agrega la α -naftilamina, se desarrolla un color rosado.

Se siguió el protocolo del kit; se mezclaron en volúmenes iguales de N-(1-naftil) etilendiamina (componente A) y el ácido sulfanílico (componente B), formándose el reactivo de Griess. En cada pocillo de la placa de 96, se dispensaron 20 μ l del reactivo de Griess, 150 μ l de la muestra (en este caso eran los sobrenadantes), y 130 μ l de agua destilada. La muestra se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. En un pocillo, se colocó una muestra de referencia que contenía 20 μ l de reactivo de Griess y 280 μ l de agua destilada, además de realizar también, una recta patrón con concentraciones entre 1 y 100 mM de la solución nitrito estándar (Figura II.5), con agua destilada. Transcurridos los 30 min., la absorbancia fue medida en un lector de placas espectrofotométrico a una longitud de onda de 548 nm.

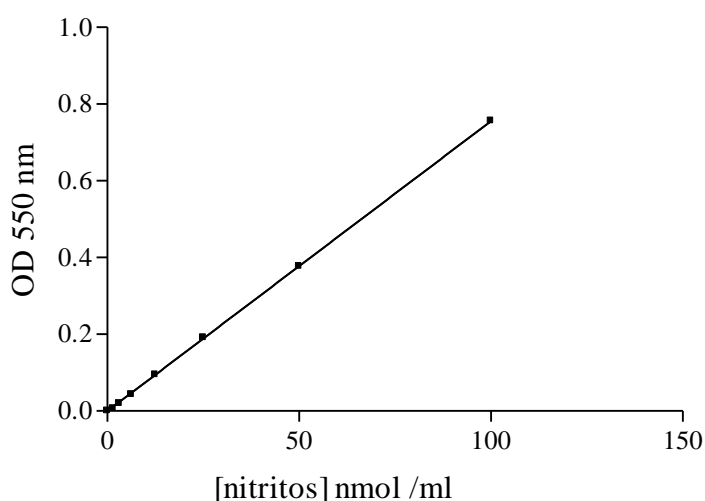


Figura II.5. Recta de calibrado de los nitritos.

II.27. ENSAYO DE INVASIVIDAD EN MODELO MURINO.

Para este ensayo, se utilizaron ratones hembra CD Swiss-inmunocompetentes obtenidos en el animalario de la Universidad de Murcia, respetando las directrices de ética del cuidado de los animales sometidos a experimentación.

Las cepas de *C. parapsilosis*, objeto del análisis fueron crecidas en medio de YPD a 30 °C durante 12 h, recogidas, lavadas con tampón salino fisiológico (PBS) y resuspendidas, en el mismo tampón. Se inyectó un inóculo de 30×10^6 levaduras en un

volumen de 150 µl, por vía intraperitoneal en ratones de 6 a 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 26-28 g. Se hicieron tres grupos experimentales, cada uno formado por 6 ratones. Transcurridos 3 días tras la inyección intraperitoneal, se procedió al sacrificio de los animales. Para ello, se anestesiaron con éter y después se sacrificaron por dislocación cervical. A cada ratón, se le extrajeron los dos riñones, que se pusieron en tubos de solubilización previamente pesados y se determinó el peso de los órganos. Posteriormente se añadió 1ml de agua destilada estéril con 0,1% de Tritón X-100 y se procedió a su homogenización con una trituradora de la casa comercial Polytron. Posteriormente, se realizaron diluciones de las distintas muestras, sembrando 100 µl de cada muestra por duplicado en placas de medio YPD sólido mediante extensión uniforme de la suspensión celular con perlas estériles (Ballotini) de 3 mm de diámetro.

Tras la incubación a 30° C en una estufa durante 48 horas, se procedió al recuento del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), referidas al peso del riñón extraído del animal (UFC/mg tejido).

II.28. ENSAYO DE VIRULENCIA EN EL LEPIDÓPTERO *Galleria mellonella*.

Para la realización de los ensayos de virulencia en *Galleria mellonella*, una larva de mariposa de distribución mundial, que causa plagas ocasionales. En los últimos años se ha introducido como organismo de referencia en ensayos de virulencia frente a patógenos microbianos (Kavanagh y Reeves 2003; Fuchs y Mylonakis 2006; Fuchs *et al.*, 2010; Mesa-Arango *et al.*, 2012). Como material experimental se emplearon larvas de las mismas procedentes de la casa comercial de Holanda (Mous Livebait R.J., The Netherlands). Las larvas se seleccionaron según el criterio establecido por Fuchs y colaboradores (Fuchs *et al.*, 2010), seleccionando las de color más claro y ausencia de manchas negras en la cutícula, descartando así las larvas con cualquier tipo de infección, ya que el sistema inmune de las mismas tiende a responder con la melanización inmediata frente a cualquier infección (visualización de manchas negras en la cutícula). Una vez seleccionadas se pesaron, escogiendo las que tenían un peso comprendido entre 300-600 mg. Posteriormente, se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad.

El día previo al experimento se mantuvieron en una estufa a 37°C en oscuridad, simultáneamente, se preparó un preinóculo de las cepas a inocular, en medio Sabouraud-dextrosa líquido que se mantuvo a 30°C en incubador con agitación.

Al día siguiente se recogió cada preinóculo, se centrifugó y se lavó dos veces con PBS, en el último lavado las levaduras se resuspendieron en 1ml de PBS que contenía ampicilina (20µg/ml) (para asegurarnos que la muerte de las larvas era por nuestras levaduras y no por cualquier infección bacteriana). A continuación se realizó un recuento en cámara de Neubauer de las diferentes cepas, para tener un inóculo de distintas concentraciones (1×10^9 ; 5×10^8 ; $2,5 \times 10^8$ lev/ml). Después se inyectaron 10 µl de cada concentración del inóculo y cepa en la pro-pata de la larva como se muestra en la Figura II.6.B, utilizando una jeringa Hamilton de 10 µl de volumen. Previamente se había limpiado la zona con etanol 70%. Para cada cepa la jeringa Hamilton se limpiaba pasándola por lejía, etanol 70% y por agua destilada estéril. Para cada cepa y condición deseada se utilizaron 20 larvas, 10 larvas por placa de Petri. En cada experimento se introdujeron 2 controles: larvas sin inocular y larvas inoculadas con PBS y ampicilina. Primeramente, se realizó un ensayo de virulencia con el fin de estandarizar la concentración del inóculo adecuada para abordar, los sucesivos ensayos experimentales. Una vez estandarizada la concentración, se tomó un único inóculo para los sucesivos experimentos que fue de 5×10^8 levaduras/ml.

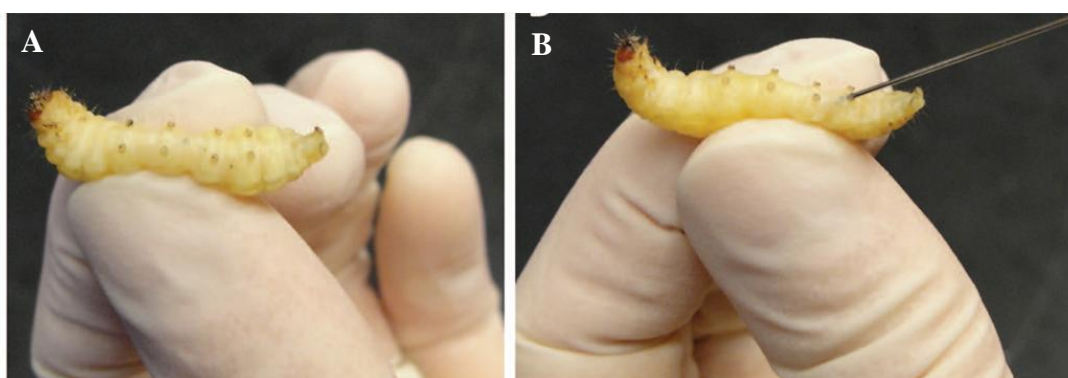


Figura II.6. Método de manipulación de la larva *Galleria mellonella*. A) Las larvas se cogen con los dedos, realizando una ligera presión para evitar su movimiento durante la inyección. B) La aguja se inserta en la última pro-pata izquierda (Fuchs *et al.*, 2010).

La estimación de la supervivencia se calculó mediante examen periódico de las larvas diariamente durante un máximo de 7 días y consistió en evaluar la respuesta de las mismas a estímulos físicos, con la ayuda de unas pinzas. Las larvas muertas se retiraron anotando la fecha de la muerte, el resto se dejó en estudio, prosiguiendo la incubación. Las larvas que habían alcanzado la fase de pupa fueron descartadas del experimento (Figura II.7).



Figura II.7. Examen periódico del nivel de supervivencia registrado en larvas del lepidóptero *Galleria mellonella*. A la izquierda se muestra una placa Petri con larvas sin tratar (control) y a la derecha larvas tratadas. **A)** Larva viva **B)** Larva inoculada **C)** Larva muerta **D)** Larva en estado de pupa.

II.29. FAGOCITOSIS *IN VIVO* EN *Galleria mellonella*.

Para el estudio de la fagocitosis *in vivo* en *G. mellonella* se siguió el protocolo establecido por Fuchs y colaboradores (Fuchs *et al.*, 2010). El día previo al experimento se preparó un cultivo líquido de Saboraud-dextrosa con las diferentes cepas de levadura a utilizar. El cultivo se mantuvo a 30°C con agitación. Al día siguiente, dicho cultivo se lavó con PBS y se preparó 1 ml de suspensión celular con una concentración de levaduras de 1×10^9 levaduras/ml. A continuación, la suspensión celular se tiñó con blanco de calcofluor (10-15 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó a 37°C durante 30 min. en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se lavó con PBS y se inocularon 10 μl de la suspensión a cada larva, seguido de incubación a 37°C durante 2 h. en oscuridad. Se utilizaron un mínimo de 5 larvas por cepa y/o condición.

Transcurrido ese tiempo, se preparó un tubo Eppendorf para cada larva, con adición de 100µl de PBS o IPS (Insect Physiological Saline) frío. El IPS es una solución salina que evita la coagulación y la lisis de las células, contiene: 150 mM cloruro sódico, 5 mM cloruro potásico, 10 mM Tris-HCl pH 6,9, 10 mM EDTA y 30 mM citrato sódico. Con la ayuda de una cuchilla, se practicó una pequeña incisión en la parte inferior ventral de la larva sobre el Eppendorf que incluía los 100µl de IPS y se recogieron las 2-3 primeras gotas que salieron, correspondientes a la hemolinfa (de color amarillento). Todos los Eppendorfs se lavaron con PBS o IPS. Se centrifugaron a 700 xg durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante con mucho cuidado y el precipitado fue resuspendido en 200 µl de PBS o IPS. Se colocaron aproximadamente 10 µl de muestra sobre un portaobjetos y se visualizó en el microscopio de fluorescencia. Para calcular el porcentaje de fagocitosis se buscaron distintos campos ópticos donde contar hemocitos (Figura II.8) frente a hemocitos con levaduras en su interior. Los distintos recuentos fueron representados en gráficas de barras mostrando la media y la desviación estándar mediante el software Graph Pad Prism.

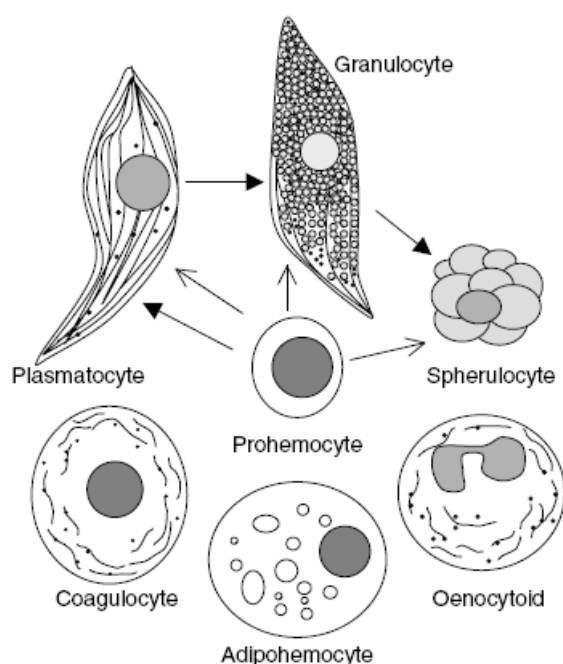


Figura II.8. Sistema celular de defensa de la larva *Galleria mellonella*. El sistema de defensa de la larva está compuesto por un grupo de células llamadas hemocitos, que circulan por el hemocele y son capaces de reconocer los elementos extraños mediante receptores tipo Toll. Se conocen 6 tipos de hemocitos: pro-hemocitos, plasmocitos, granulocitos, coagulocitos, esferulocitos, aenocitos. Los plasmocitos y granulocitos participan en la fagocitosis y en la encapsulación de organismos extraños. (Kavanagh y Reeves; 2004).

II.30. SOPORTE BIOINFORMÁTICO, REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

A lo largo del extenso desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral, se han consultado diferentes bases de datos y 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Trust Sanger Institute. Base de datos donde disponemos del genoma de *Candida parapsilosis*. <http://www.sanger.ac.uk/>

Candida albicans Genome Sequence Project. Base de datos de Stanford Genome Technology Center en el cual disponemos del genoma de *C. albicans*. <http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Permite la búsqueda de secuencias homologas comparándolas entre todas las secuencias disponibles en las bases de datos, tanto de ADN como de proteínas. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

EMBL-EBI. Programa ampliamente utilizado para realizar alineamientos múltiples de secuencias. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Para el análisis de la **secuencia nucleotídica** y **proteica** del gen *ATC1*, se empleó el programa: www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html, este programa nos permite determinar la utilización de codones por dicho gen. Para la predicción del péptido señal, se empleó la siguiente base de datos: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. Con el programa: ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) fue posible la determinación de la masa molecular teórica y el punto isoeléctrico teórico de la secuencia proteica Atc1p. El perfil de hidrofobicidad de la proteína Atc1p se determinó a través del programa ProtScale Tool (<http://www.expasy.ch/tools/pscale/Hphob.Doolittle.html>). Para la búsqueda de motivos proteínicos en Atc1p se empleó el servidor informático PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y PROSITE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite/>)

Para la **modelización de la proteína Atc1p** de *C. parapsilosis*, se utilizaron los siguientes programas: El Servidor Jigsaw (<http://www.w3.org/Jigsaw/>) para predecir su modelización tridimensional, Servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>), el Servidor SSM (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) y el Servidor 3DLigandSite (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite>) para intentar predecir en la proteína, sitios de unión a ligandos.

Con el fin de llevar a cabo la correcta representación gráfica de los resultados y el tratamiento estadístico de los datos, se empleó el programa Graph Pad Prism versión 5.00 para Windows, Graph Pad Prism Software, (La Jolla, CA, USA), www.graphpad.com.

Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron un mínimo de tres veces. En las correspondientes gráficas aparece representado 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. La distinción entre los valores medios obtenidos fue estadísticamente significativa en $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), según el test t de Student. Cuando los datos se presentan mediante imágenes, estas son representativas de los resultados obtenidos en al menos dos experimentos independientes.

Para el análisis del impacto de la disrupción del gen *ATC1*, en los ensayos de virulencia en larvas de *Galleria mellonella*, se realizaron curvas de Kaplan-Meier. El valor de significación estadística se calculó mediante el test de la t de Student, para el ensayo en modelo murino, ya que consideramos que la población sigue una distribución normal (prueba paramétrica) y para el caso del modelo de *G. mellonella*, se utilizó el test estadístico Long-rank (Mantel-Cox), asumimos que la población sigue una distribución no normal (prueba no paramétrica).

Para establecer si la población seguía una distribución normal, se aplicó a los datos el test estadístico Shapiro-wilk, este test nos permite establecer la normalidad.

III. RESULTADOS

INTERRUPCIÓN DE LOS GENES:
ATC1 Y NTC1

III. RESULTADOS.

III.1. IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE POSIBLES TREHALASAS ÁCIDAS.

La secuenciación del genoma completo de *Candida parapsilosis* (Butler *et al.*, 2009) representa la culminación de un importante proyecto internacional de investigación, liderado por el Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis/>), que ha permitido la creación de una base de datos donde se hayan representados todos los *contig* de este microorganismo eucariota.

En la búsqueda del gen que codifica la enzima trehalasa ácida de *C. parapsilosis*, se procedió al rastreo en la base de datos del genoma de este hongo emergente, usando la secuencia nucleotídica de la trehalasa ácida de *C. albicans* (*CaATC1*). Como resultado, se identificó en el *contig* 005809 una secuencia nucleotídica, que presentaba una homología del 67% con el gen *ATC1* de *C. albicans*. La secuencia aminoacídica deducida de este *contig*, fue comparada con secuencias de proteínas homólogas de la trehalasa ácida en otras especies dentro del género *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* obtenidas a partir de la base de datos (<http://www.candidagenome.org>), mediante un análisis *ClustalW*. Se obtuvieron porcentajes de identidad del 60%, 62,4% y 38,7% respectivamente. (Figura III.1).

De forma preliminar, estos resultados sugieren que en el *contig* 005809 se encuentra la secuencia nucleotídica que, podría codificar la trehalasa ácida de *C. parapsilosis*, por esta razón fue identificada y denominada como *CpATC1* (de Acid Trehalase of *Candida parapsilosis*).

Resultados

C.albicans	MAANSSFFLADNCAPHNQS-----FIQFCIHAAS-----	29
C.tropicalis	MGRKPSSIIPEEEVDEDEEDSKLLFLNLFKSLP-----	34
C.parapsilosis	MDIENNGIYMEN-SSRIKG-----IRRFLKDN-----	26
C.glabrata	MGFKDKILFWKDEVQYRTLAVADQVANRFFHSEFENVYKGDSEVEDADSRPVGLTNETLSH 60	60
	* : . : . : :	
C.albicans	-----KKGRIALMCLANLFLLLSFHLLYARFCSGFYVVPST 67	67
C.tropicalis	-----IKKIWIVMIVFANLFFVVISFQLFYAKFAHGFPGVIPLK 72	72
C.parapsilosis	-----KTYIIAMTIIANFILFYSLHLLNTRFSEAFPFVLPRA 63	63
C.glabrata	SSDFFVLPEERISTRVKIRRONILNTTLILGMLIALVIWTAAILSTNSYFSSSLASASPLF 120	120
	. : : : : . : . : . *	
C.albicans	AR---STNQIFHTNLEQLVNSFE---NKQIFSQKLFSDQAFYDPHDNVVGTTEFPVFNQY 121	121
C.tropicalis	AR---SPEGLHTVDLSKLLDSQE---NKKIFSQMKFSQAFYDDTNDNVVGTTEFTFNQY 126	126
C.parapsilosis	EKY--TLEQTSDSNLGDFVNSFE---NKEIFSQVQFSEHAFYDRKMNVVGTIEYSKYNQF 118	118
C.glabrata	NKEGRVVRPMRESNLGLHADPQTRKSSTLYDLLSDFDNAFYDDENMILGSLAFGEN-TY 179	179
	: . . : * : . . * : . . : : * * * * : * : : :	
C.albicans	QRQPYVANGYIGSRIPNLGQGFYDQLTNSSTANDDLLNGWPLFNKRYSGAFVAGFYDL 181	181
C.tropicalis	QRQPYVANGYIGSRIPNIGQFAYDQLSNSSEANEDDLSNGWPLFNKRYAGAFIAGFYDI 186	186
C.parapsilosis	QKQPYVANGYIGSRIPNLGHTGYDQLTESPDSKDDLYNGWPLFDKRFSGAFIAGFYDL 178	178
C.glabrata	SRQPYVANGYIGSRIPNIGFYALDNLNLYADAPG-ALNNGWPLNRRFAGSFBVDFYSL 238	238
	. : * * * * * : * * : * . . : * * * * : * : * : * * : *	
C.albicans	QKNTTGTNFAELLENGYESVIAAVPQWTALSLSVEILGKKYTLDPSEHEAIGDITNYVQ 241	241
C.tropicalis	QKNTTGTNFPELLENGYESVIAAVPQWTSLSLSVEIDGQVYLDPALDSQDMGGIISNYVQ 246	246
C.parapsilosis	QENTTGNNFPPELLKNGYESVISAIPQWTTKLAIQHGDKRYTLDPAS-PDGVGQITNYVQ 237	237
C.glabrata	QAKLNSTNFPPELDEKGYTTVISSIPEWTDLQFTVDLNG-TNWNFPQS--VLIDDVINYQ 295	295
	* : . . * * * * : * : * * : * : * : * * : . : * : . : * * *	
C.albicans	NMSLSDGIVTQFTWLN-TFDVKYEILAHRENINLGLVNMQVYN-----PGNESVQVIV 294	294
C.tropicalis	NLSLSDGIVTQFTWLN-KLVNKYEVLAHRTNINLGLVDLQISN-----IGNENLELTV 299	299
C.parapsilosis	NMSLSTGIVTQFTWLE-SLDVRYTVLAHRSEINLGLVKVDIKN-----KGNLTVEIDV 290	290
C.glabrata	NLSMKDGVSTNMDWLNGMNIKSEVWAHRKIHSGLITRLEISLNLDALPDEFTELPVTI 355	355
	* : . . * * : * : * : : * : * : * * . * * : . : : :	
C.albicans	SDVLDNFSSQRQLNQISHD--KNGIYVTFHPQGLSIDGAIYSTLSANGQITRE----- 347	347
C.tropicalis	TDSLDFNTSQRQLNDVSTD--DQGISITFSPHLDLYIHGAIYSKLVLDGETREV----- 353	353
C.parapsilosis	IDELNFDTAQRCLLNLIGHD--NSGIYVSFLPDNLDISGAIYSTLHLDSVKRHS----- 343	343
C.glabrata	YDIIDFNTHRTTLYEKGDQEDBNKAIYMIVNPENVPYSNAVVYSTCTIKGTENNFSYPNF 415	415
	* : * : * : * * : . : * . . * : . : * . . : * . . : * . . :	
C.albicans	QTNETVFQVELTIEPHS-CVQVAKYAGIATDLDPPDSFKTADDVLKFARKVSQNKKHD 406	406
C.tropicalis	QTYEKVTQSSKITIGCNS-NIKISKFVGVASSDLQPDQLKTSDDVLQVLAQVAQECHN-- 410	410
C.parapsilosis	-KNKKTNQTSLIRLHAQD-STQFGKTVGIVSTDLDPSKFKNSRDLEFAKKVSQKFY-- 399	399
C.glabrata	TSDDRIARNYMTNLTTEENPKVVIYKYTSVVSSEYNNDEP-NPNVNLKFASNIANTAKG-N 473	473
	. . . : . : . . * . . : : : . . . * : * : * . : . :	
C.albicans	ATQLVNSHRSAWSKIIQDAPLVTFFPDSLLNLGARASIFHLLANTRPNAEAVTG--ALGV 464	464
C.tropicalis	AEQIIDSHKQAWSEVINNGPLVTFPSDPLNLLGARASVIFHLLANTRPDAQVGTG--ALGV 468	468
C.parapsilosis	LDLVIKSHVRAWKELMGKQSTITFPNDPLLDGSKASVIFHLLANTRPDAQGLTG--ALGV 457	457
C.glabrata	YKSLLSNHKRAWYDLYN-DAFIEIPBDSLLEMTARSSFLHLLANTRQYNVSTTRGLPVG 532	532
	: . . * * * . : . : * : * * * : : : * * * * * * * . * . : * * *	
C.albicans	SGLSSDSYGGMVFDWDLWMLNGILPFPADHIKSFINYRVHLHQQAIDNVPRG-YQGAVY 523	523
C.tropicalis	GGLSSDSYAGMVFDADLWMLNGILPFPAPSHAKSLINYRLHTRQQAIVNPEG-YQGAVY 527	527
C.parapsilosis	AGLSSDSYGGMVFDWDFWMFRAILALDPTAKSIVNYRMHTHQQALKNTPQG-YEGAAV 516	516
C.glabrata	GGLSSDSYGGMVFDADVWMAPALLPFFPNIAMNMNYRNATHQQAIVENAQYNPYAVY 592	592
	. * * * * . * * * * : * * . : . : * * * : * * * : * * . . * * * *	
C.albicans	PWTSRFRGNCTGTGPCLDYEHINMAVAMASWQLYISGAA--DDTFLESVAYPIINDAAS 581	581
C.tropicalis	PWTSRFRGNCTATGPCLDYEHINMAVAMAASWQLYISGAA--DDLyletiayPIIYDAAN 585	585
C.parapsilosis	PWTSRFRGNCTATGPCLDYEHINSAIAMAASWQLYISGAV--DDQYLESTYPLISDAAK 574	574
C.glabrata	PWTSGRYANCTSTGPCIDYEHINVDIALASFSIYMNGAEGADEDYLRFTTWPMVKDAV 652	652
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * : * * . : * * : * * *	
C.albicans	FLAEYVVHYNDTLGKYTTKNTLDPDEFANHVNDGAYTNTGIVLVMRWQAIGSILGKQVP 641	641
C.tropicalis	FFSDYVVNFDNSLNKYTTNSLTDPEYANHVNDGAYTNAGIALVMRWQVIGHGLGKQVP 645	645
C.parapsilosis	FYADYVTSYNETIDKFIITSNLTDPEYANHVNDGAYTNAGIALLMWNINDIGDILGKMP 634	634
C.glabrata	FFKAYVK-YNETLGEYETYNLTDPEFANHVNGAFTNAGIKTLKWTADIGTHLGEVD 711	711
	* * * : * : * : * * * * * * * * * * * * : . : * * * * * : :	
C.albicans	KIYHDIETAMFLPTAENTQNITLEYSGMNSSVGIKQADVIMMTYPLENELIDQD----QA 697	697
C.tropicalis	QLFQDIEQNIPLPTANNSQNITLEYSGMNSSVGIKQADVIMMTYPLENELIDDE----QA 701	701
C.parapsilosis	EIYTDISQKMYLPTADNSQNITLEYSGMNSSVGIKQADVILMTPYPLQNSLVDDE----QA 690	690

C.glabrata	PKWMEIADNIHIPRSDS--NITLEYSGMNSSVEIKQADVTLMVYPLG--YINDESILNNA 767
	: :* :.:* :.: ***** ***** :.* ** :.: : *
C.albicans	YINMEFYSMKQVGYGPAMTFPIFSIVASNLAFTGCASQSYLHKAIQPFLRGPFAQFAEQN 757
C.tropicalis	YINMEFYSMKQVSYGPAMTFPIFSVVAANLAFTGCASQSYLQKAIQPFLRGPFAQFSEQN 761
C.parapsilosis	YINMEFYSGKQVSYGPAMTFPIFSIVAANLATSGCASQSYLHKAMQPYLRGPFAQFSEQN 750
C.glabrata	IKDLYYYSERQSASGPAMTYPVFVAAAASLLNHGSSSQSYLYKSVLPYLRSPFAQFSEQS 827
	: : ** :* . ***** :.:* .:* * :.* ** * : : **.* **.* **
C.albicans	NDDYLTNGGTHPAFPFLTAHGGFLQAILQGLTGMRFDYTFENN--KLQRLLKLDPIALPC 815
C.tropicalis	NDNYLTNGGTHPAFPFLTAHGGFLQATLQGLTGLRYDYDIDENG-KLVRIIRLDPIGLPC 820
C.parapsilosis	NDNFKTNGGTHPAYPFLTAHGGFIQAVVNGLTGLRHSYTIIDNG--KIRRSFLDPIALPC 808
C.glabrata	DDNFLTNGLTQPAFPFLTANGGFLQSIILFGLTGLRYSEVTPRTKKISRLKFDKFPVKLPL 887
	:.: ** * :.* **.* **.* : : * ** :.* . * : * * :.* **
C.albicans	LGEVRFDSIKYDNHTLSMAINETHFTIKNKGKTTPN-----ARNYVTILLAER 864
C.tropicalis	LEEGVSFNGIQYDNHTISMSINQTHFTITNKCKTNP-----ANDHITILLAER 869
C.parapsilosis	LGDGVQYSGIHYDNHTISMNITGSTFVIRNEGKTNKR-----ANDYISITIAER 857
C.glabrata	LPGGIAIRNFKYMGQVLDI IIDDNNGTIAHKGDKPIRIKVPNRDILHNRNITSALYSKR 947
	* * : .:.* :.: : * . .* : : . : : : .*
C.albicans	NAMHGK-----YTINDEDEQSFPLFETSESFPDSISECNKAGFFNITGAYGDVVIS 916
C.tropicalis	NPDNGQ-----YVINDGETKSFALFKPDISFPDSISECGQASFYNVTEGAFGDASIS 921
C.parapsilosis	NPGRGT-----YKLDNEEKSFKLYQPSKIFEDSVSEGLATFYNITESAPGDSFL 909
C.glabrata	DDDLSATDDYGYFTLYPNEELVIPLYDTKLNIDGNIAES--KQITNLTAGVPGDVGFS 1005
	: . : : : * : . : : : . : * * . * . *
C.albicans	INDGNTTSWQAKYNDTTGKVLVDL--KSFNRNISSGTFIWGDKPPKRVKSKYSGSS--- 971
C.tropicalis	INDGNTTRWQVKYNDTVGKVIDF--KSFKNISGVTFNWADKPPINVKLSKYSQDQ--- 976
C.parapsilosis	INDGNTTRWQVKYNDTTGKVLIDL--HSIKNITGVVFNWADKPPKVKLLKYMGTK--- 964
C.glabrata	ALDGNNYTHWQPFDKSDNAKLLIDLGFNSTHVIKKGIIILWGQRPKNISLSVLPHSERIE 1065
	**.* * * * :. .*:.* : * : * . : * :.* . : . *
C.albicans	--FTAVTDFFAQ--VDFGNELFNEYK---YANPEGKLNQSDVFEEVYSGDVKISAPFDP 1024
C.tropicalis	--FTSIVDFFAK--VDFGNELYNYSK---YANPEDHIFNQSEVFEEIHSESVTISAPFDN 1029
C.parapsilosis	--FKDVTDFLAK--VDFGNVYKNYR---FANPGEKLLNQSEVFENYSDVVTINAPFSS 1017
C.glabrata	QLFANITDLETSSITKGGSLNQLMGQTQSNVTAEIDDDILALLNWKGGDDLDQLIPYLP 1125
	* :.* : : * . : : . * : : : : . : *
C.albicans	EE--YFQVWVPTR-----HNITEVAVNLQ-----TRFLLI 1052
C.tropicalis	KE--YTQVLPTR-----HNTSIDLNL-----TRFLLI 1057
C.parapsilosis	KE--LEEVIVPVR-----HNTTSWNINLQ-----GRFLLI 1045
C.glabrata	DMHLLQEKFIPIKDYPIKPNQRYKIIIDDDI IKLLPSNTEFTIDYNSIPGGEKRARY 1185
	. : : * * . : . *
C.albicans	EVDEIHNTAIDGDYGGAKLAEVVYF- 1078
C.tropicalis	EVDNIHNTVPIDDYGGAKLAEVVYF- 1083
C.parapsilosis	EVDGIHNTIPIEDDYGGAKLAEVNFF- 1071
C.glabrata	VVLTVHGTYDDDDDLKGTIKEIVLQE 1212
	* :.* :.* ** : * : :

Figura III.1 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CpAtc1p con CaAtc1p de *C. albicans* y sus ortólogos, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. El alineamiento se realizó mediante el programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> Thompson *et al.*, 1994). Debajo de las secuencias se encuentran marcadas con asteriscos, aquellas posiciones que son idénticas en todas ellas, mientras que las sustituciones o reemplazamientos conservativos están indicados con dos puntos.

III.2. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN *CpATC1*.

El análisis de las secuencias nucleotídicas correspondientes al gen *ATC1* puso de manifiesto una única fase de lectura abierta de 3,216 nucleótidos, que codifica para una proteína con una secuencia primaria de 1,039 aminoácidos. En la Figura III.2. se muestra un fragmento de 5,341 nucleótidos con las regiones 5' y 3' adyacentes que contienen el gen *ATC1*. A continuación, se realizó un análisis de las regiones intergénicas aguas arriba y aguas debajo de dicho gen. A estas regiones intergénicas se les atribuye un papel regulador importante, ya que en ellas se encuentran los motivos de inicio y terminación de los transcritos de los genes y además evitan que la expresión de los genes interfiera entre ellos (Williams *et al.*, 2005). La secuencia de la región intergénica que rodea al gen *ATC1* se obtuvo, como ya se ha mencionado anteriormente de la base de datos de *Candida parapsilosis* (www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis).

III.2.1. ESTUDIO DE LA REGIÓN 5' NO CODIFICANTE.

En dicha secuencia (Figura III.2.), se buscaron los elementos reguladores de la transcripción, como son las secuencias promotoras, responsables de la interacción de la ARN polimerasa o las secuencias que determinan el sitio y eficiencia del inicio de la transcripción (Mellor, 1989).

La secuencia TATA se presenta en levaduras, generalmente, entre las posiciones -30 y -300 e interviene en el reconocimiento por el factor de transcripción general TFIIF (Greenblatt, 1991). En algunos genes de levaduras aparecen múltiples secuencias TATA (Guarente, 1984; Ferguson *et al.*, 1986). En la secuencia nucleotídica que contiene el gen *CpATC1* se identificó una posible caja TATA, con la secuencia consenso 5'-TATA-3' en las posiciones -7 (TATA), -12 (TATA), -77 (TATATATA), -103 (TATA) y -725 (TATA) (señalado en verde en la Figura III.2.).

Otro elemento promotor, es la secuencia CAAT, aparece en la región 5' no codificante de muchos genes de levaduras, localizándose concretamente en la región 5' anterior a la caja TATA. En el gen *CpATC1* aparecen varios de estos elementos en posiciones -36 (a partir de la caja TATA) y otras más alejadas (Figura III.2.) Las cajas CAAT se han descrito como elementos implicados en el control de la transcripción en levaduras (Dobson *et al.*, 1982).

En levaduras se ha descrito también que la transcripción comienza normalmente en un elemento CA situado en posiciones -26, -30 hacia el extremo 3' de la caja TATA. El gen *CpATCI* presenta varias de estas secuencias CA (subrayadas en negro y verde en la figura III.2.) en las posiciones -19 (CA), -22 (CA), -28 (CA), -49 (CA), -55 (CA), situadas entre la caja TATA y el teórico sitio de inicio de la traducción (ATG). También se ha encontrado una secuencia CAACAA, típica de genes altamente expresados, en posición -22.

Además de las cajas TATA necesarias para la unión de factores de transcripción, se hallaron secuencias RRYRR (R=purina, Y= pirimidina). Estas secuencias se han relacionado con el inicio efectivo de la transcripción en varios genes de levaduras (Hahn *et al.*, 1985). En la secuencia nucleotídica 5' no codificante de *CpATCI* se han encontrado 15 de estas secuencias (Figura III.2, marcadas en verde).

Por último, se señala una secuencia que podría ser el sitio de unión para el factor transcripcional *MIG1* (subrayado en gris en la Figura III.2.), un represor del gen de levaduras que responde a glucosa.

III.2.2. ESTUDIO DE LA REGIÓN 3' NO CODIFICANTE.

Los elementos situados en la región 3' no codificante de los genes estructurales son importantes para una correcta terminación del transcrito, así como, para su posterior procesamiento y poliadenilación. Los extremos 3' de los RNAm de levaduras, al igual que en mamíferos se forman por digestión y adición de una cola de poli(A). En el caso de las levaduras, las secuencias que dirigen este proceso son degeneradas y redundantes. Se han identificado en la región 3' del gen *CpATCI* una serie de secuencias que podrían funcionar como señales de poliadenilación: AAAT en las posiciones 4363, 4368, 4381, así como cinco motivos más en posición 3' (señalado en morado en la Figura III.2.).

```

1  AATGAATTTGGTACCTTGCATCAGTTGACAACCTTC AACGACAGATATGTA
51  TGAATTTTGGTTG CAAT CTTGTGCAAAAATTTATGTATCATTTCATTCAGCA
101 CAAT TCTATAGGTG AACAAAT CAAT GACAAT AACAACTCAGCTGAAAGCT
151 TGGACCATTCATCTGGTT GATAGCAGGAGC CAAT ACAACATCAGAGTCC
201 CAGTTACGCC T AATGAAATTCGGGG AACAAACGAGTCAGCTCGGTGCGG
251 GGACCACCCCGAAACAGAAGAGGGATTTA CAAT A CAAT TGACCCAACCCCT
301 ATTGC AGTAACCCACTTGCCCGATTAAGGACTTGTTGATA AGTAAACGTT
351 TGGCTTTTATTGAAAAATGTA CTACTACATGTAGTCAAACACAGTGGAATTG
401 CGATTGCCAACATTGCGATTTCGTTTCATT TATA TTTC CAAT GTATTCCG

```

Resultados

451	TAC[CAAT]CCAAGATACGTTTTAGGTTGACTCAAAGAGATTTTGTGAGCC
501	GATTCGCAC[FCGTGGATGGTTATTTTTCTCTCC]CAGCGTGTTCGTGTCT
551	CCCCCCTCCCCACTCATCCTGTGTCGTGGAATTTTGTGTGTGTTATGT
601	AATACGTTTGCAAATCTCCAGATTTTTCTTCAAGCCTCGTGTGTCGTATT
651	AACCAAAATACGACATTGCCTTTTTTTCTTATTGTTGTTGTTTATGTTTTT
701	ACACCAAA[AAATAAAGAGATAAAAACCAAAAAT]TGTCTTCTTCTCACTCC
751	AACTGCCCCCCCCCCAGAAATTACGAGTTCGTACAGATTAATACCTTTG
801	AGTTGCCTAATTTGTGTAACCACAAACTCACACAAGTGTACTACATACTT
851	TACTTTACATTTGCTATTTAATTTTATTGTTTTGTTTTGGGTAATGAAAT
901	CCACCCCAAGAACAGATTTTTTTTTCATGTTTTGCACCGGAATTTCCATA
951	[GTGAACTTTTACTTCGATCTCTCCAACATTCGTTCCCTTGAATTTGCTTT
1001	AACTTTCAACTGACTCCGCTTTACATTTGGCTGATTTTGTGCTATTCCA
1051	[CAAT]CCTTCATA[ATA]TT[ATG]GACATAGAGA[ATAATGG][ATAATA][ATG]GAGA
1101	ATAGTT[CCAGAATCAAAGGTATTAGGAGAT]TGTTCAAAGAC[CAACAAAACG
1151	[ATA]T[ATA]GCCATG[ACTATCATTGCCAATTTCCATCCATTTTTATAGCCT
1201	CCATCTACTAAATACGAGGTTTCAGTGAGGCGTTTTCCATTCGTTTTGCCTC
1251	GAGCTGAGAAATATACATTAGAACAACATCAGATTCAAATCCTGGGGAT
1301	TTTGTTAATAGCTTTGAAAACAAAGAAATCTTTAGTCAAGTACAATTTTC
1351	CGAACATGCATTTTTATGATCGAAAGATGAATGTGGTAGGTACAATTGAGT
1401	ATTTCAAGTATAACCAATTTCAAAAACAACCATATGTTGCTAATGGATAT
1451	ATTTGAAGTAGAATACCCAATTTGGGACACGGGTTTACCTACGACCAACT
1501	AACTGAGTCTCCTGATTTCTAAAAAAGACGACTTGTATAATGGGTGGCCAT
1551	TGTTTGACAAAAGGTTTTCTGGAGCATTTATAGCTGGGTTTTATGACCTT
1601	CAGGAAAACACCACGGGAAACAACTTTCCCTGAACTTTTGAAAAATGGGTA
1651	TGAGAGTGTGATATCAGCAATTCACAAATGGACCACATTTGAAACTAGCAA
1701	TTCAACATGGCGATAAACGATATACATTTGGACCCTGCCTCACCTGATGGA
1751	GTTGGACAGATAACGAATTTATGTCCAGAATATGTCTTTATCAACAGGCAT
1801	TGTAATACTCAATTTACTTTGGTTGGAATCGCTAGACGTTAGGTACACTG
1851	TTCTCGCACATAGATCGGAAATCAACTTGGGGTTGGTTAAGGTGGATATT
1901	AAAAATAAAGGAAATGATACTGTGGAGATTGATGTAATTTGATGAGTTGAA
1951	TTTCGATACAGCACAGAGGTGT[CTG]TTGAAATTTAATTTGGTCATGACAACT
2001	CTGGTATTTATGTGTCATTT[CTG]CCGGATAATTTGGACTACATTTCTGGT
2051	GCGATTTACTCAACGCTTCATCTCGATAGCGTCAAGCGTCATTCAAAAAA
2101	CAAGAAAACGAACCAAACGTCA[CTG]ATACGACTACATGCACAGGATTCCA
2151	CCCAATTTGGAAAAACAGTTGGCATTTGTGTCCACAGATCTTGATCCTTCA
2201	AAGTTCAAAAACTCACGAGATACACTTGAATTTGCCAAAAAGGTTTTCGCA
2251	AAAGTTTGAATACTTAGACTTTGGTGATAAAGTCTCATGTTTCGAGCATGGA
2301	AGGAATTGATGGGGAAACAATCGACGATAACATTTCCAAATGATCCCTTA
2351	CTAGATTTAGGGTCCAAGGCATCAGTTTACCCTTGTAGCCAATACCGG
2401	TCCGACGCCCAGGGTTGACAGGAGCACTTGGTGTGCTGGATTGAGCT
2451	CAGACAGTTATGGTGGTATGGTGTTTTGGGATACCGATTTTTGGATGTTT
2501	AGGGCTATATTGGCGCTCGATCCTACTCATGCCAAAAGTATTGTCAATTA
2551	CCGGATGCATACCCACCAGCAAGCTTTGAAAAACACTCCTCAAGGCATAG
2601	AAGGTGCTGCTTATCCCTGGACAAGCGGAAGATTTGGAATTTGTACGGCA
2651	ACGGGTCCATGTTTGAATTTATGAATATCACATCAACTCAGCCATTGCTAT
2701	GGCGCATGGGAATTGTACATTAGCGGTGCAGTAGATGATCAATATTTGG
2751	AAAGCACGGTCTACCCCTGATCAGTGATGCGGCCAAGTTTTACGCGGAC
2801	TACGTGACAAGTTACAATGAAACAATGACAAGTTTTATCACCAGCAACCT
2851	CACGGACCAGATGAGTATGCCAACCAAGTTGACAATGGAGCATATACAA
2901	ATGCTGCCATAGCTTTACTTATGAACTGGATAAAATGATATTGGTGATATA
2951	TTGGGTATAAAAAATGCCCGAAATTTACACTGACATTTCTCAAAAAGATGTA
3001	CCTCCCCACTGCGGACAATTCACAAAACATTACATTTGGAGTATTCTGGGA
3051	TGAATTCCTCAGTTGGTATCAAGCAAGCAGATGTCGTATTGATGACGTAT
3101	CCTTTGCAGAATAGTTTGGTTGATGATGAGCAAGCCTATATAAACATGGA
3151	GTTCTATTTCAGGAAAGCAAGTGAGCTATGGACCAGCAATGACTTTTTTCAA
3201	TCTTTTCCATTTGTTGCAGCTAATTTGGCCACTAGTGGATGTGCATCACAA
3251	TCGTATTTGCACAAGGCTATGCAACCATATTTGAGGGGACCATTTGCCCA
3301	ATTTTCGGAACAAAATAACGACAACCTTCAAAAACCAATGGCGGTACTCATC
3351	CGGCATACCCATTCTTGACAGCACATGGAGGGTTTTATACAAGCTGTTGTG
3401	AATGGATTAACCTGGGTTAAGACATTTCTTACACCATTGACAATGGTAAGAT
3451	TAGGAGATCATTTGTTTTTGGACCCAATTGCATTTGCCATGCTTGGGTGATG

3501	GAGTTC AATATAGCGGGATTCATTATGATAACCACACGATTTCAATGAAT
3551	ATCACTGGCTCAACTTTTGTGATTCGAAATGAGGGAAAGACAAATAAGAG
3601	GGCAAATGATTACATATCTATAACGATTGCTGATAGAAATCCTGGTCGTG
3651	GAAC TTACAAGTTAAAAGACAATGAAGAGAAATCATTTAAGTTATACCAA
3701	CCCAGCAAGATTTTCGAAGATAGCGTATCCGAATGTGGGTGGCGACATT
3751	TTACAACATCACTGAGAGTGCCCCAGGTGACTCCTCGTTTCTGATCAATG
3801	ATGGAGATAATACCACCAGATGGCAAGTAAAATAATGATACTA CTGGA
3851	AAAGTTTGTGATTGATTTGCACTCGATAAAAAACATAACTGGTGTGTGTT
3901	TAACTGGGCTGACAAACCACCCAAAAAGGTTAAACTT CTG AAGTATATGG
3951	GTACTAAATTC AAGGATGTCAC T GATTTTTTGGCAAAGTTGATTTTGGT
4001	AACTATGTGTATAAAAACTACCGTTTTGCCAACCC TGGGGAAAAGTTGTT
4051	GAATCAGAGTGAAGTATTTGAGAACGTGTACTCGGATGATGTCACGATAA
4101	ATGCACCATTTTCCAGCAAAGAAATGGAAGAAGTTATTGTTCCGTACGG
4151	CATAACACAACATCTTGGAAATCAACTTGCAAGGCAGGTTCCTTTTACT
4201	TGAAGTTGATGGAATACACAACAATACCGATAGAAGATGATTATGGTG
4251	GTGCCAAGCTTGCGGAAGTAAACTTCTTT TAA TAAAAAGGATATAGAGTA
4301	GATTAGATTTAAGACAG ATTAGAGCCCAAAGCAATAAC CATGTAGTACG
4351	TTTTTTCTTTA AAATCAAAT TAATATTCA AAAT GTGCCACGCATCAACT
4401	ATACTTCTACTTTAATACAAAGCCTCTGCCAATTTAATAAGACGCTTGAG
4451	ACCTGTGTGCCAGTCCCAATTCGTCACTATAGCTTGTAGCAATCTCCA
4501	CATTGATGGCATTTCCTCATCAAACCTTTTATCTCCAAC TCGGAACTA
4551	ATTTCTTTCAATGATTCAGTAAGTGGTTTGGAT AAAT CAGCATTGTTCAA
4601	ATGATCAAACA AAAT GTTTATTCTATGTTCCATATCAGCACCATGCTTAG
4651	CAAAC TTTCCGGAATGTTTGGTTTGATTGCTTCCATGACAATGGTCAAG
4701	GAATGT AAAT TGGTTCC AAAT CATCAGCAATGTGCGACCTATCACCTTT
4751	TGGATACTTAGGAGGTT CAGGTGCCGCTTGTGGAACGGTT GCCGCTGGTG
4801	GTGCTCATTCA CTGAAACTGGAGGACGTGCTGGGCCAGTAGGGGTGGC
4851	GCAACTGGCGTAAACGAGGGCTGTGCTGGGGTGCTCAGGGTTATCCAAA
4901	TGGCTTGTGTTGGTGGTGCAGCAGTTCCGAATTTTGTTCCTACTTCAGGGG
4951	CCCCACATGTGGCAATTGAGGTGAGTTATTCTGCATTGCTGATGGTGGT
5001	GGTGGTGCATGGGTTCTTTGGTGGTGAACAGACGGTGTGGTTGTGC
5051	TGCTCC AAAT GCCAATGGAGGAGGTGATGCGAATGGAAC TTTTGTGGCG
5101	CTGGTTCACTTGTGGAGCATAAGGATTCTTCTTGGCTATAGTAGGTGAA
5151	GCAGCAGCTGTTGGTGGCGCACCAAAGTTGGGAAC TCCAGGTTGCGGAGG
5201	TTGCTCAGCCCTGGAGGTGGAGCATACTTGGTGGTTGGAGTAGGTTTTG
5251	GTGATGGCACTTGTGAGTTGGAATTGAGGTTCTAGATGCACTACGGCTG
5301	CTACTCTTGGGTGGTGGTGCAAAACCAGTGGTTGATACAG

Figura III.2 Secuencia nucleotídica de la pauta abierta de lectura del gen *ATCI* de *C. parapsilosis* así como las secuencias 5' y 3' no codificantes. En rojo se señala la secuencia nucleotídica que codifica al gen *ATCI*, el resto de la región no codificante se señala en negro. Las posibles cajas TATA se subrayan en verde. La secuencia CAAT, en región 5' respecto a las cajas TATA, se señalan en un rectángulo. Se señalan los elementos CA entre la caja TATA y el codón de iniciación en los que puede empezar la transcripción además de la secuencia CAACAA, señalada con una flecha roja. En verde se señalan las secuencias RRYRR relacionadas con un inicio efectivo de la transcripción en varios genes de *S. cerevisiae*. El posible sitio de reconocimiento para *MIG1* se subraya en gris. Las posibles señales de poliadenilación en 3' se subrayan en morado. Adicionalmente se señalan en azul los codones CTG que en *Candida sp* se leen como serina en lugar de leucina. También se señalan los oligonucleótidos diseñados para la dirupción del gen *ATCI* subrayados en amarillo.

III.2.3. ESTUDIO DE LA REGIÓN CODIFICANTE.

La composición de bases de la región codificante correspondiente al gen *CpATC1* es la siguiente: adenina (28%), timina (31%), guanina (18%) y citosina (21%). El contenido en A/T representa el 60%, dato que está en consonancia con lo descrito para *C. albicans*, cuyo contenido promedio en A/T es de 65% (Brown *et al.*, 1991).

Grosjean y Fiers en 1982, publicaron un estudio donde se observaba la relación directa entre el uso de codones sinónimos y el grado de expresión de un gen, de manera que genes que estén altamente expresados utilizarán determinados codones sinónimos; sin embargo, genes con bajo nivel de expresión emplearán de una manera aleatoria todos los codones sinónimos. En *Escherichia coli*, en los genes con un alto nivel de expresión se observa una desviación hacia 22 de los 61 tripletes codificantes posibles (Grosjean y Fiers, 1982), mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* la desviación es hacia 25 de los 61 tripletes (Bennetzen y Hall, 1982). Este hecho descrito para *S. cerevisiae* (Sharp *et al.*, 1986), se ha observado también para *C. albicans*, aunque existen diferencias en el uso de codones preferidos por estas dos especies (Lloyd y Sharp, 1992). El gen *ATC1* de *C. parapsilosis* emplea 60 de los 61 codones posibles (Tabla III.1.) Además, se observa una clara tendencia en utilizar preferentemente los codones que terminan en T o A (Tabla III.1. subrayados en verde), tendencia descrita para *C. albicans* (Odds, 1988). Según el código genético universal, el codón CTG es leído como leucina, pero en las especies de *Candida*, con la excepción de *C. glabrata* y *C. krusei*, dicho codón es leído como serina (Butler *et al.*, 2009). En *CpATC1* se encuentran 5 codones CTG en las posiciones 1,973-2,021-2,123-3,846-3,938 (subrayados en azul en la Figura III.2. y Figura III.3.).

aa	Codon	N	%	FR
Ala	GCG	9.00	8.65	0.14
Ala	GCA	24.00	23.08	0.38
Ala	GCT	16.00	15.38	0.25
Ala	GCC	15.00	14.42	0.23
Cys	TGT	5.00	4.81	0.83
Cys	TGC	1.00	0.96	0.17
Asp	GAT	48.00	46.15	0.67
Asp	GAC	24.00	23.08	0.33
Glu	GAG	15.00	14.42	0.34
Glu	GAA	29.00	27.88	0.66
Phe	TTT	42.00	40.38	0.76
Phe	FTT	13.00	12.50	0.24
Gly	GGG	15.00	14.42	0.21
Gly	GGA	26.00	25.00	0.36
Gly	GGT	23.00	22.12	0.32
Gly	GGC	8.00	7.69	0.11
His	CAT	16.00	15.38	0.64
His	CAC	9.00	8.65	0.36
Ile	ATA	22.00	21.15	0.32
Ile	ATT	33.00	31.73	0.49
Ile	ATC	13.00	12.50	0.19
Lys	AAG	28.00	26.92	0.46
Lys	AAA	33.00	31.73	0.54
Leu	TTG	45.00	43.27	0.54
Leu	TTA	12.00	11.54	0.14
Leu	CTA	9.00	8.65	0.11
Leu	CTT	12.00	11.54	0.14
Leu	CTC	6.00	5.77	0.07
Met	ATG	18.00	17.31	1.00
Asn	AAT	44.00	42.31	0.58
Asn	AAC	32.00	30.77	0.42
Pro	CCG	3.00	2.88	0.08
Pro	CCA	16.00	15.38	0.40
Pro	CCT	12.00	11.54	0.30
Pro	CCC	9.00	8.65	0.23
Gln	CAG	9.00	8.65	0.23
Gln	CAA	31.00	29.81	0.78
Arg	AGG	9.00	8.65	0.31
Arg	AGA	7.00	6.73	0.24
Arg	CGG	2.00	1.92	0.07
Arg	CGA	7.00	6.73	0.24
Arg	CGT	4.00	3.85	0.14
Arg	CGC	0.00	0.00	0.00
Ser	AGT	12.00	11.54	0.14
Ser	AGC	13.00	12.50	0.15
Ser	TCG	9.00	8.65	0.11
Ser	TCA	23.00	22.12	0.27
Ser	TCT	12.00	11.54	0.14
Ser	TCC	10.00	9.62	0.12
Ser	CTG*	5.00	4.81	0.06
Thr	ACG	16.00	15.38	0.22
Thr	ACA	23.00	22.12	0.31
Thr	ACT	24.00	23.08	0.32
Thr	ACC	11.00	10.58	0.15
Val	GTA	17.00	16.35	0.29
Val	GTA	10.00	9.62	0.17
Val	GTT	24.00	23.08	0.41
Val	GTC	7.00	6.73	0.12
Trp	TGG	12.00	11.54	1.00
Tyr	TAT	35.00	33.65	0.61
Tyr	TAC	22.00	21.15	0.39
End	TGA**	0.00	0.00	0.00
End	TAG**	0.00	0.00	0.00
End	TAA**	1.00	0.96	1.00

Tabla III.1 Utilización de codones del gen CpATCI. Número de veces que aparece el codón (N), porcentaje de aparición de codones con respecto al total (%), frecuencia relativa del uso de codones (FR), sustitución de leucina por serina con respecto al codón universal (*amarillo), codón stop (**). En verde se representan los codones preferidos por el género *Candida* y en azul, la frecuencia de su uso en el gen CpATCI. El análisis se realizó según el programa www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html.

III.3. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA PROTEÍCA Atc1p.

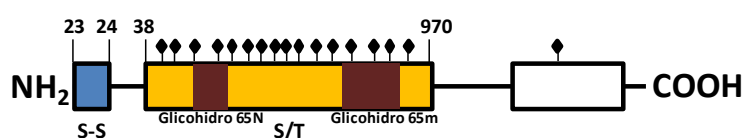
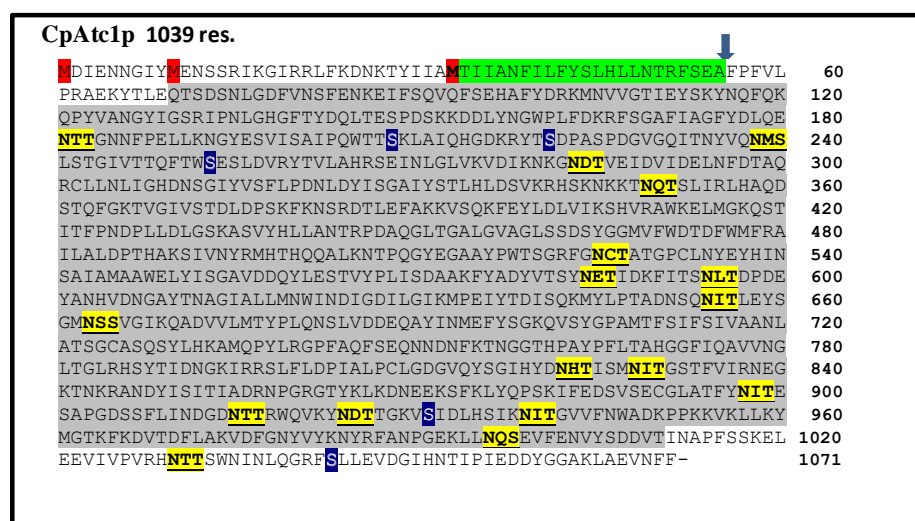
El gen *ATC1* codifica un polipéptido de 1,039 aminoácidos (CpAtc1p), con una masa molecular teórica de 116587,90 Da y un punto isoeléctrico teórico de 5,45, calculados ambos con el programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) (Bjellqvist *et al.*, 1994). En el resto de la memoria y para simplificar, se citará la proteína CpAtc1p como Atc1p. Sólo en caso de una posible confusión con las proteínas homólogas de otras levaduras se empleará CpAtc1p.

La secuencia de aminoácidos de la proteína se muestra en la Figura III.3.A. Hemos considerado, en base a las señales de inicio de la transcripción y de las cajas TATA, que la traducción de la proteína se iniciaría en la tercera metionina (señalada en rojo en la secuencia de la Figura III.3.A.).

Según la predicción del servidor SignalP del CBS (*Center for Biological Sequence Analysis*) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que permite predecir las secuencias más probables que pueden actuar como péptido señal y los sitios de corte del mismo por la peptidasa señal (Nielsen *et al.*, 1997), se ha determinado que en Atc1p existiría un posible punto de corte entre la Ala²³ y la Phe²⁴, que definiría un péptido señal de 23 aminoácidos (señalado en verde en la secuencia de la Figura III.3.A).

Existe una región rica en residuos de serina y treonina que va desde las posiciones 38-970, (señalada en gris en la secuencia) y dieciséis posibles sitios de N-glicosilación, que en las proteínas de origen eucariota tiene lugar en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido menos Asp y Pro (Gavel y Von Heijne 1990; Nilsson y Von Heijne 2000). Esta combinación aparece en las posiciones: (señalados en amarillo en la secuencia Figura III.3.A) 149- (NTT), 206 (NMS), 251 (Asn-Asp-Thr), 317 (NQT), 493 (NCT), 552 (NET), 562 (NLT), 622 (NIT), 631 (NSS), 790 (NHT), 796 (NIT), 865 (NIT), 883 (NTT), 892 (NDT), 907 (NIT), 998 (NTT) (Figura III.2.A). Estos datos se han obtenido comparando la secuencia aminoacídica de Atc1p con la base de datos de familias proteicas y dominios PROSITE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite/>).

A



B

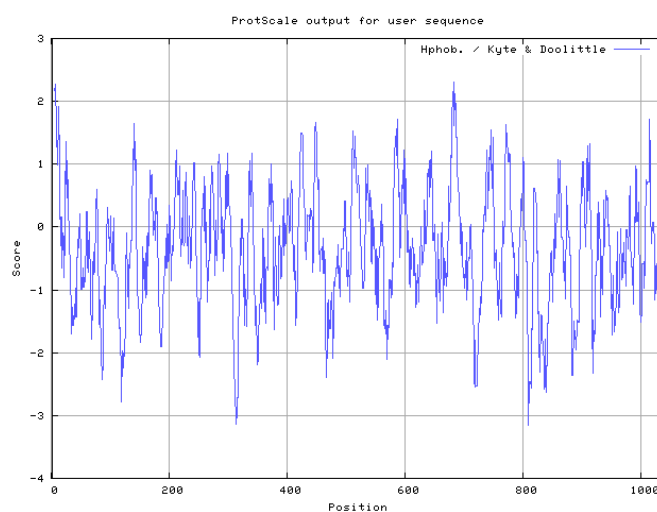


Figura III.3 A) Características de la secuencia proteica Atc1p. Secuencia (arriba) y esquema (debajo) de la proteína Atc1p, en los que se señala el posible péptido señal (en verde en la secuencia) y el sitio probable de corte del péptido señal (↓). También se señala una zona rica en Ser y Thr (subrayado en gris en la secuencia y naranja en el esquema) y potenciales posiciones de N-glicosilación (subrayado en amarillo en la secuencia y puntos negros en el esquema). En la secuencia se señalan en azul las serinas, que para el caso de casi todas las especies de *Candida*, el codón CTG es leído como serina en lugar de leucina. En el esquema se indican las regiones de homología con la familia glicosil hidrolasa de dominio N-terminal (Glicohidro 65N) y con la familia glicosil hidrolasa de dominio catalítico central (glicohidro 65 m). **B) Perfil de hidrofobicidad de la proteína Atc1p.** Obtenido mediante el programa ProtScale Tool (<http://www.expasy.ch/tools/pscale/Hphob.Doolittle.html>) que representa la hidrofobicidad de la secuencia proteica y permite predecir las regiones interiores y exteriores de la proteína usando el método de Kyte y Doolittle. En ordenadas se representa el índice hidrofóbico de cada uno de los aminoácidos señalados en abscisas. Por encima de la línea horizontal quedan los dominios hidrofóbicos y por debajo de la línea quedan los dominios hidrofílicos.

El perfil hidrópatico de la proteína Atc1p, obtenido mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle 1982), muestra una alternancia de dominios hidrofóbicos e hidrofílicos en el extremo aminoterminal, característico de las secuencias señal de las proteínas cuyo destino final en la célula, implica la entrada en el lumen del retículo endoplásmico (Figura III.3.B).

Para la búsqueda de motivos proteínicos en Atc1p se empleó el servidor informático PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), el cual reveló una elevada coincidencia en la zona N-terminal de Atc1p, con la secuencia conservada de la familia glicosil hidrolasa 65 N involucrando a los aminoácidos 87-342. La parte central de la proteína está relacionada con el dominio catalítico de la familia glicosil hidrolasa 65 m (aminoácidos 403-755) (señaladas en marrón en el esquema de la Figura III.3.A). A esta familia de glicosil hidrolasas (α/α)₆ pertenecen, entre otras enzimas, la trehalasa ácida vacuolar y la maltosa fosforilasa de *Lactobacillus brevis* (MPLb). Esta última enzima dimérica (MPLb) está cristalizada y se sabe que cataliza la conversión de maltosa y fosfato inorgánico en β -D-glucosa-1-fosfato y glucosa (Egloff *et al.*, 2001). El dominio central de esta enzima es el que presenta actividad catalítica, se une a un ion fosfato y está espacialmente próximo a un residuo de ácido glutámico muy conservado en secuencias homólogas.

La composición de aminoácidos de Atc1p, se detalla en la Tabla III.2. Como se puede observar, los aminoácidos más representativos son cuatro: la leucina (8,6%), serina (7,6%), treonina (7,1%) y asparagina (6,9%); datos obtenidos con el programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam/>) (Tabla III.2.).

Tabla. III.2. Composición de aminoácidos (aa) de la proteína Atc1p. En rojo se señalan los aminoácidos más representativos.

aa	N°	%	aa	N°	%
Ala (A)	64	6,2	Leu (L)	89	8,6
Arg (R)	29	2,8	Lys (K)	61	5,9
Asn (N)	76	7,3	Met (M)	18	1,7
Asp (D)	72	6,9	Phe (F)	55	5,3
Cys (C)	6	0,6	Pro (P)	40	3,8
Gln (Q)	40	3,8	Ser (S)	79	7,6
Glu (E)	44	4,2	Thr (T)	74	7,1
Gly(G)	72	6,9	Trp (W)	12	1,2
His (H)	25	2,4	Tyr (Y)	57	5,5
Ile (I)	68	6,5	Val (V)	58	5,6

III.4. MODELO DE HOMOLOGÍA DE Atc1p.

Con el objetivo de generar un modelo hipotético de homología para la secuencia Atc1p de *C. parapsilosis*, se usó el servidor informático *Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0* (Kelley y Sternberg, 2009).

Para la generación del modelo se utilizaron como moldes las estructuras cristalizadas de la maltosa fosforilasa de *Lactobacillus brevis* (pdb:1H54) y el módulo de unión a carbohidratos de *Streptococcus pneumoniae* (pdb:2J1R), ya que son los mejores modelos disponibles en la base de datos (www.pdb.org).

Se obtuvo un modelo satisfactorio mediante superposición (con una precisión estimada > 90%) que comprende un centro catalítico activo de la enzima (aminoácidos 400-600) y un módulo accesorio de unión a carbohidratos en la región C-terminal (aminoácidos 854 a 1,039) Figura III.4.A.

El análisis *in silico* de la hipotética estructura tridimensional de Atp1p mediante el servidor SSM (Krissinel y Henrick, 2004) muestra una enzima de plegamiento helicoidal (α/α)₆, típico en la superfamilia de las glucosidasas (GH-L, M-GH y el clan GH-H) (Stam *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2007). Esta estructura se asemeja de manera global a las quitobiosas fosforilasas CH94 (Hidaka *et al.*, 2004), glucoamilasas GH15 (Aleshin *et al.*, 1994) y maltosa fosforilasas GH65 (Egloff *et al.*, 2001). Todas estas enzimas realizan la catálisis mediante la inversión de la configuración anomérica.

La predicción de la estructura tridimensional de Atp1p nos muestra una superposición espacial satisfactoria entre Glu487 (MPLb), Glu570 (Atc1p) y Glu568 (Atp1p) y Asp359 (MPLb), Asp442 (Atc1p) y Asp440 (Atp1p) Figura III.4.B

La alineación estructural proporcionada por el servidor SSM, confirmó que estos aminoácidos esenciales se encuentran en giros topológicamente idénticos. Por otra parte, los aminoácidos Tyr352, Lys592 y Glu425 de la MPLb se superponen con Tyr433, Lys637 y Glu504 en Atp1p, respectivamente, lo que proporciona cadenas laterales que puedan interactuar con los grupos hidroxilo del sustrato. El aminoácido Glu568 también se encuentra rodeado por un grupo de residuos hidrófobos que serían buenos candidatos para la interacción con las partes hidrófobas de la molécula de trehalosa (Leu585, Lys637, Pro647 y Leu648). Mediante el servidor 3DLigand (Wass *et al.*, 2010) se detectó un sitio de unión a Zn en la parte central de la proteína con la participación de los aminoácidos Lys637, Val670, Pro674, Met676, Thr677 y Phe678. Figura III.4.C.

En la región C-terminal de la molécula se identificó un plegamiento en forma de hojas- β que se asemeja a un dominio de unión a carbohidratos como los propuestos por Boraston *et al.*, (2004). Estos módulos de unión a carbohidratos (CBM) están descritos como accesorios no catalíticos de enzimas más grandes dedicadas a la degradación de polisacáridos. Estos CBM se cree que son vitales para la enzima ya que permiten la captación y concentración del sustrato (Bolam *et al.* 1998) y así mismo, en ocasiones, participan en la presentación del sustrato para la catálisis (Sakon *et al.* 1997).

La arquitectura del sitio de unión de Atp1CBM consiste en un entramado altamente conservado, con variaciones de una estructura con ocho hojas- β (Figura III.4.D.). La hoja- β 1 aparece fraccionada y unida mediante una pequeña sección de estructura en hélice- α . Este plegamiento es característico de la familia CBM. La localización espacial de los aminoácidos Trp887, Trp915, Trp1002 en Atp1p coincide

con el sitio de unión característico de los módulos CBM32 previamente descritos (Abbott *et al.*, 2007).

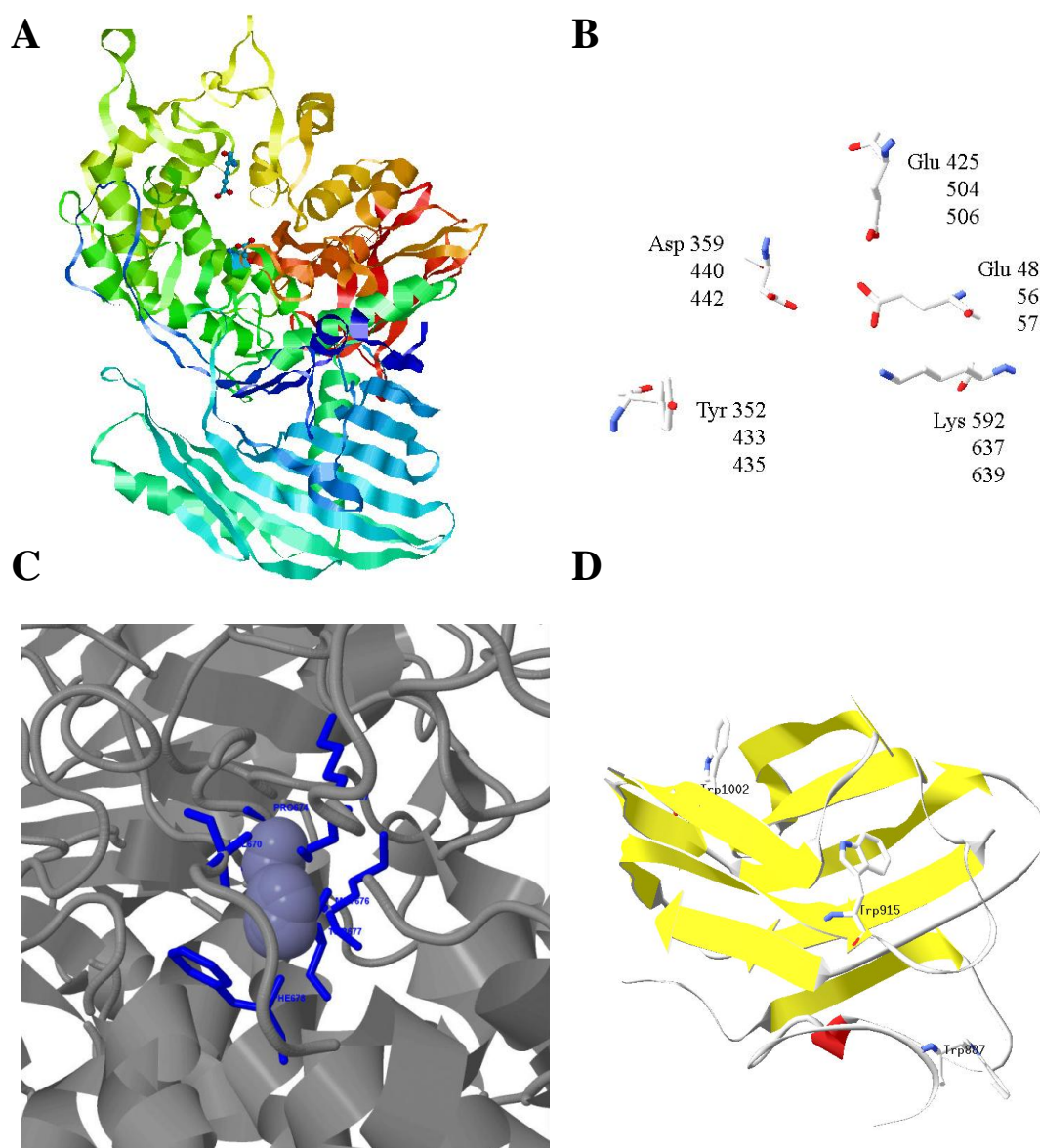


Figura III.4. Representación esquemática de la estructura de Atc1p de *C. parapsilosis*. A) El diagrama de cintas representa: en azul se representa la zona N-terminal y en rojo la zona C-terminal. Los residuos propuestos en el mecanismo de hidrólisis (Asp440 y Glu568) se muestran en la figura en modelo de cintas. La reproducción total de la estructura fue generada con el programa RasMol (Sayle & Milner-White, 1995). B) **Observación de los sitios activos de Atc1p.** La superposición de los sitios activos moleculares más importantes de la maltosa fosforilasa (LbMP) de *L. brevis*, *C. parapsilosis* y *C. albicans*. (se muestran en este orden de arriba a abajo). La figura representa el mejor ajuste entre las tres estructuras. La figura se realizó mediante el programa Swiss Pdb-viewer (Guex & Peitsch, 1997). C) **Visualización en 3D** mediante el programa 3DLigandSite de la estructura de Atc1p con el sitio de unión para el Zn (en azul). D) **Modelo de homología de la CBMatp1p de *C. parapsilosis*.** Los residuos que se proponen para participar en el sitio de unión (Trp887, Trp915 y Trp1002) se indican en la figura que se realizó mediante el programa Swiss Pdb-viewer (Guex & Peitsch, 1997).

III.5. INTERRUPCIÓN DEL GEN *ATC1*.

Para abordar el estudio de la función de este gen en la biología de *C. parapsilosis*, se procedió a la delección del mismo, empleando el sistema de interrupción descrito por Butler *et al.*, (2009) y basado en el sistema diseñado por Reuss y colaboradores (2004).

Este sistema consiste en emplear un casete que contiene el gen marcador *SAT1* (Streptotricin Acetil Transferasa), adaptado para *C. parapsilosis* (Ding y Butler, 2007), que confiere resistencia a antibióticos tipo estreptotricina bajo el promotor constitutivo del gen *ACT1*, y el gen *FLP* (gen que codifica para la proteína Flp o Flipasa) bajo el promotor inducible del gen *MAL1*.

Para realizar la interrupción del gen *ATC1*, partimos de una cepa silvestre de *C. parapsilosis*, procedente de un aislado clínico, cedido por el Dr. F. Odds de la Universidad de Aberdeen y a la que citaremos como Cp, en el resto de la memoria.

III.5.1. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN.

La primera etapa para la interrupción del gen *ATC1* consistió, en la construcción de un plásmido, que contuviera el casete de disrupción flanqueado por las dos secuencias homólogas al gen a interrumpir. Una primera secuencia de un tamaño de 621pb, situada en la zona 5' del casete homóloga a la zona de inicio del gen, la cual, llamaremos fragmento 1 o F1 y otra secuencia en la zona 3' del casete homóloga a la zona 3' del gen, llamada fragmento 2 o F2 de un tamaño de 495 pb. Estas secuencias permitirán la recombinación homóloga en el genoma de *C. parapsilosis*, quedando por tanto, el casete integrado en el *locus* de *ATC1*. (Figura III.5.)

La construcción del casete se realizó en dos etapas, mediante la obtención de amplicones empleando ADN genómico como molde. En el primer paso, se amplificó por PCR un fragmento de 621 pb usando como molde el genoma de la cepa silvestre de *C. parapsilosis* y los oligonucleóticos FCpATC5'-5' (Tabla II.4.), que contiene el sitio de corte para la enzima de restricción *KpnI*, y el oligo RCpATC5'-3' (Tabla II.4.) con sitio de corte para la enzima *ApaI*. El resultado de esta PCR dio lugar al amplicón F1.

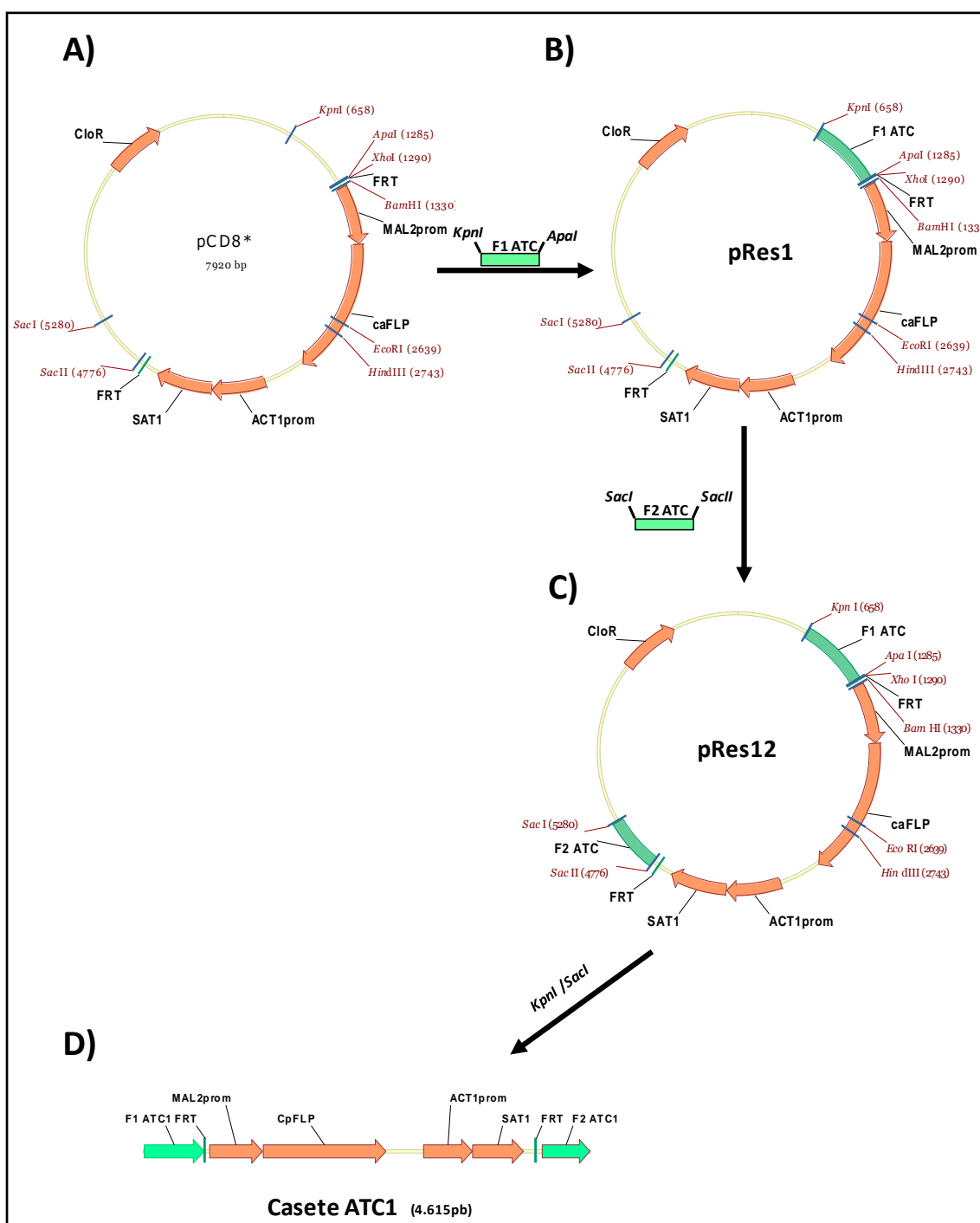


Figura III.5. Diagrama de la construcción del casete de interrupción para el gen *ATC1* utilizando el plásmido pCD8. A) Plásmido pCD8 sin los fragmentos. B) Plásmido con el fragmento 1 (F1) pRes1. C) Plásmido con el fragmento 2 (F2) pRes12. D) Plásmido pRes12, digerido con *KpnI* y *SacI*, enzimas que liberan el casete.

A continuación se digirieron los plásmidos pClonjet-F1 y pCD8, con las mismas enzimas de restricción, *KpnI* y *ApaI* y se purificó el fragmento de 621 pb, correspondiente al amplicón F1 y el plásmido pCD8 lineal. Tras la ligación de los fragmentos F1 y pCD8 lineal, se originó el plásmido al que llamaremos pRes1 (Figura III.5.B.). Se realizó la comprobación de los transformantes de *E. coli* mediante digestión de pRes1 con las mismas enzimas y por PCR en la que se obtuvo un amplicón de 621pb.

Se realizó el mismo procedimiento para el plásmido pClonjet-F2, digestión de ambos plásmidos pClonjet-F2 y pRes1 con las enzimas *SacII* y *SacI*, purificación del fragmento de 495 pb, ligación de los fragmentos purificados y transformación en *E. coli*. El plásmido resultante se denominó pRes12 (Figura III.5.C.). Se comprobó la correcta sucesión de pasos de clonación mediante la liberación del casete de interrupción a partir del pRes12 por digestión con las enzimas *KpnI* y *SacI*, dando lugar a un fragmento de 4,6 Kb (Figura III.5.D.), que se empleó posteriormente para la transformación de *C. parapsilosis*.

III.5.2. OBTENCIÓN DEL MUTANTE HOMOCIGÓTICO PARA EL GEN *ATC1*.

Una vez construido el casete de interrupción, se procedió a transformar la cepa silvestre de *C. parapsilosis* (Cp), tal y como se describe en el Apartado II.5.2 de Materiales y Métodos.

Para la transformación se utilizaron entre 3 y 5 µg del casete lineal (Figura III.5.D.), obtenido mediante digestión con las enzimas *KpnI* y *SacI* del plásmido pRes12 (Figura III.5.C.). Tras la primera transformación, se obtuvo la interrupción del primer alelo, como consecuencia de la recombinación homóloga (Figura III.6.).

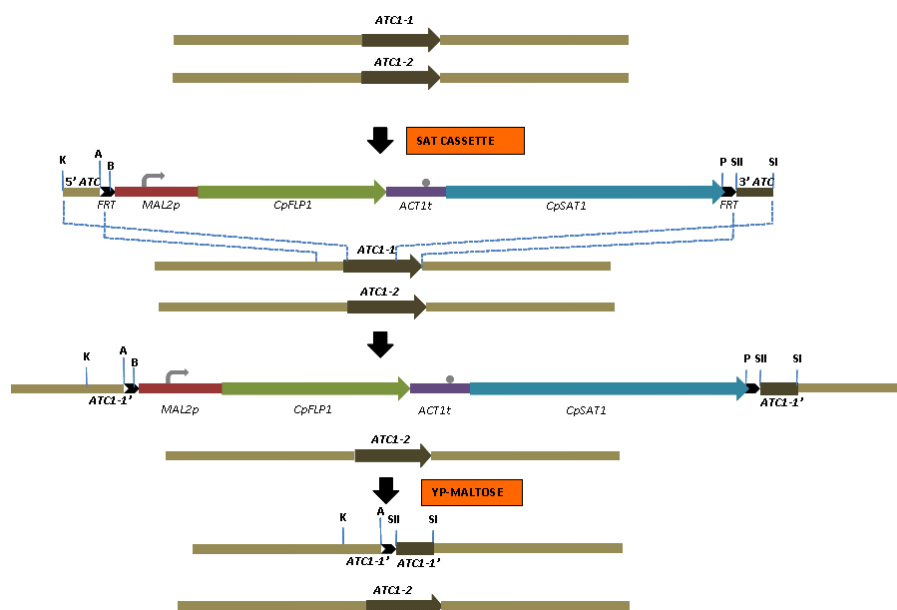


Figura III.6. Esquema de interrupción del primer alelo del gen *ATC1*.

La selección de los transformantes se realizó en medio YPD-NTC200 que contiene una concentración de nurseotricina de 200µg/ml (Figura III.7.A.)

La correcta integración del ADN lineal en el *locus* del gen *ATC1*, se verificó mediante PCR de los transformantes (Materiales y Métodos II.8). Para ello se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos: But 237 y FCpATC5out, que son capaces de producir amplificación, sólo en el caso de que la integración sea correcta, ya que corresponden respectivamente a una secuencia del propio casete ya integrado y a otra secuencia del gen *ATC1* que no se ve alterada por el casete. Los 8 transformantes identificados tenían el patrón esperado, seleccionándose uno, al que se llamó ATC1-1. Posteriormente, dicho transformante se sembró en medio YPM para que se expresara el gen *FLP* que se encuentra en el casete de interrupción ahora integrado en el *locus ATC1* y así, por la acción de las flipasas proceder a la eliminación del casete. Una alícuota del medio YPM, se sembró en placas de YPD conteniendo una concentración de nurseotricina de 10µg/ml en las que pudieron aislarse colonias sensibles a este antibiótico (caracterizadas por tener un tamaño menor) (Figura III.7.B.). Estas colonias corresponden a células con el gen *ATC1* interrumpido, sensibles a la nurseotricina ya que han eliminado el casete de resistencia a dicho antibiótico y por tanto se obtuvo así, el mutante heterocigótico para dicho gen de estudio y al que nombraremos como ATC1-2.

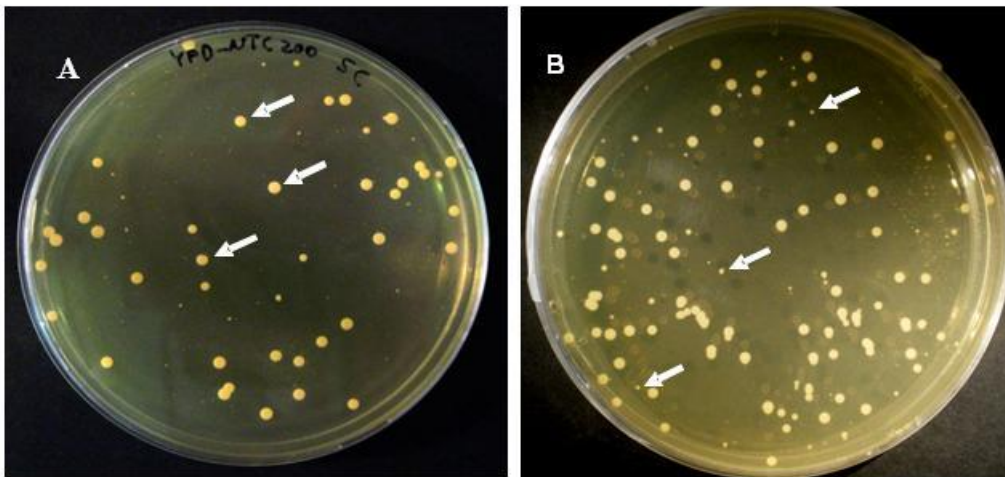


Figura III.7. Fotografía de colonias obtenidas en placas YPD tras el proceso de transformación. A) Con las flechas se señalan las colonias grandes capaces de crecer en YPD con 200 $\mu\text{g/ml}$ de nurseotricina, después del primer paso de transformación; B) En la fotografía se observan colonias de dos tamaños diferentes crecidas en YPD con 10 $\mu\text{g/ml}$ de nurseotricina después del cultivo en YPM, con las flechas se señalan las colonias pequeñas que han sido capaces de eliminar el casete.

A partir de la cepa heterocigótica (ATC1-2) se realizó una segunda transformación con el casete de interrupción para obtener el mutante nulo para el gen *ATC1* (Figura III.8.)

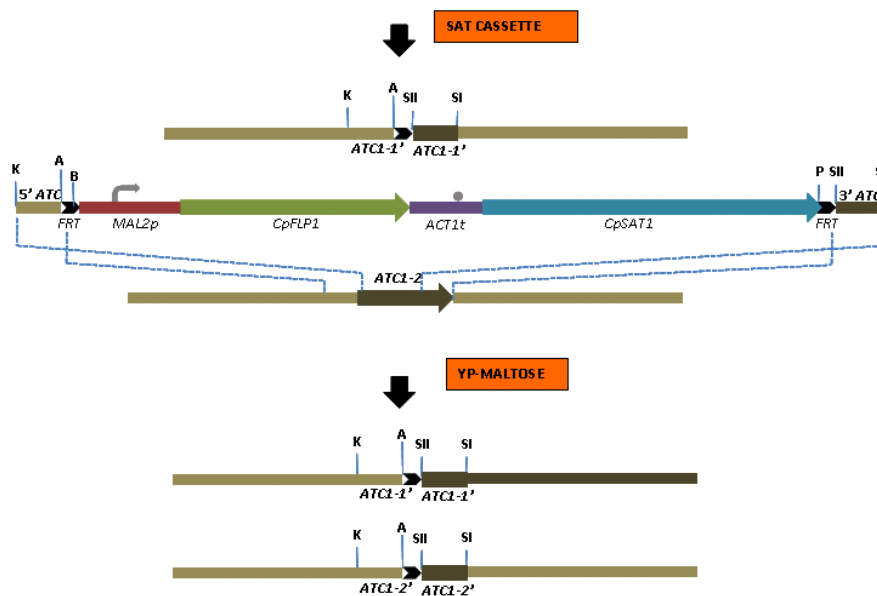


Figura III.8. Esquema de interrupción del segundo alelo del gen *ATC1*.

También se analizaron los transformantes mediante PCR, utilizando los mismos oligonucleótidos citados anteriormente y las colonias que resultaron ser positivas se

cultivaron en medio YPM, posteriormente se plaquearon en placas de YPD con una concentración de nurseotricina de 10µg/ml, las colonias pequeñas que crecieron eran colonias sensibles a nurseotricina y correspondientes a mutantes homocigóticos (ATC1-4).

Se obtuvo ADN genómico de los transformantes seleccionados y se realizó una PCR para comprobar que tuvieran disrupcionado los dos alelos del gen *ATC1*. Los oligonucleótidos que se utilizaron en este caso fueron FCpATC5out y RCpATC 5'-3' (Tabla II.4). La comprobación por PCR conlleva un importante ahorro de tiempo, por lo que la confirmación posterior mediante Southern blot se realizó únicamente a las colonias que previamente habían dado positivo por PCR.

La correcta integración en el *locus* del gen *ATC1* se verificó mediante análisis por Southern blot (Figura III.9.). Para ello se obtuvo ADN genómico de las 5 cepas; silvestre (Cp), silvestre con un alelo disrupcionado y el casete (ATC1-1), mutante heterocigótico (ATC1-2), mutante heterocigótico con el otro alelo disrupcionado con el casete (ATC1-3) y por último el mutante homocigótico (ATC1-4).

Este ADN genómico se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI. Para la hibridación se empleó como sonda el amplicón F1 del gen, marcado con digoxigenina (Apartado II.11.2 Materiales y Métodos). El fragmento esperado para la cepa parental, cuyo esquema se presenta en la Figura III.9.A.1., tenía un tamaño de 8 kb, lo que se correspondía a la banda detectada por Southern blot (Figura III.9.B. Calle 1). El fragmento esperado para la cepa silvestre con un alelo disrupcionado y el casete (ATC1-1), presentaría la misma banda de 8 kb, correspondiente al alelo que permanece intacto y además otra banda de 1,4 kb correspondiente al primer alelo interrumpido (Figura III.9.A.2). De este modo se corroboró que la integración del casete se había producido en uno de los alelos del *locus* correspondiente al gen *ATC1* (Figura III.9.B. calle 2). Posteriormente se eliminó el casete, obteniendo así el mutante heterocigótico para dicho gen (ATC1-2), que presentaría la misma banda de 8 kb correspondiente al alelo intacto y otra banda de aproximadamente 4,6 kb, correspondiente a la eliminación del casete (esquema en Figura III.9.A.3; resultado en Figura III.9.B. Calle 3). El mutante heterocigótico obtenido se utilizó para la disrupción del segundo alelo del gen, el patrón de bandas esperado, no debía contener la banda de 8 kb, perteneciente al gen *ATC1* pero si la de 1,4 KB correspondiente a la del segundo alelo disrupcionado con el casete

Resultados

integrado, además de la banda de 5 kb correspondiente a la del primer alelo disrupcionado sin el casete (Figura III.9.A.4.).

Los resultados obtenidos mediante Southern blot coincidieron con el patrón de bandas esperadas (Figura III.9.B. Calle 4). Posteriormente el casete fue eliminado, obteniendo así el mutante homocigótico (ATC1-4), que presentaría una sola banda de 5 kb (Figura III.9.A.5), correspondiente a los dos alelos disrupcionados y sin el casete, lo que se corresponde a la banda detectada por Southern blot (Figura III.9.B. Calle 5).

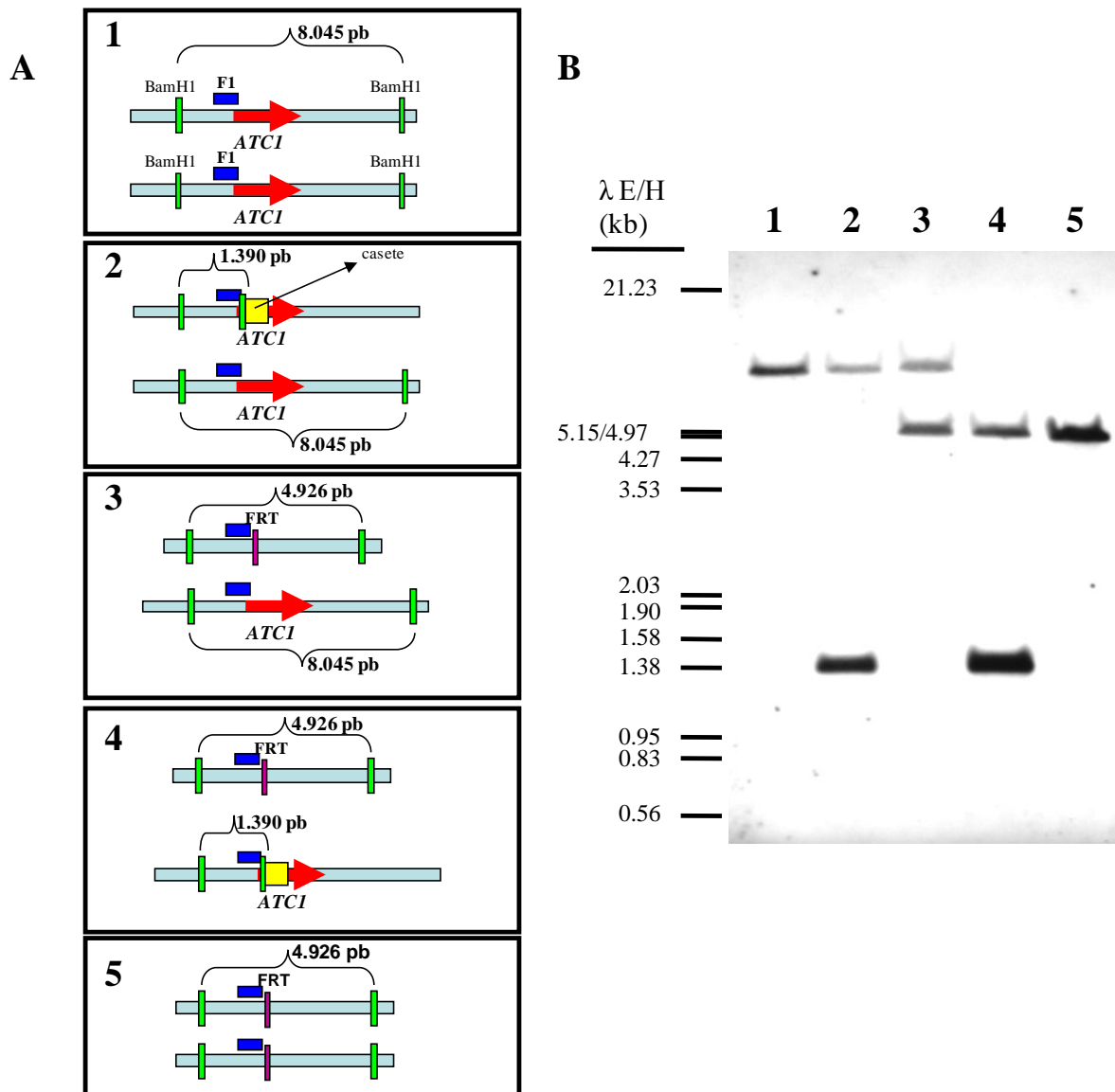


Figura III.9. Verificación de la integración de ADN en el *locus* del gen *ATC1* en las diferentes cepas de *C. parapsilosis*. Esquema de la composición de los fragmentos de digestión del ADN genómico con BamHI (A) y análisis por Southern blot con la sonda F1 del gen *ATC1* (B) de las cepas de *C. parapsilosis*: (Cp) (1), ATC1-1 (2), ATC1-2 (3), ATC1-3 (4) y ATC1-4 (5).

III.6. REINTEGRACIÓN DEL GEN *ATC1* EN EL MUTANTE NULO.

Con el fin de evaluar, si los efectos fenotípicos observados en los estudios posteriores con el mutante homocigótico (*ATC1-4*), eran debidos realmente a la carencia de la proteína *Atc1p* nativa en la célula, se procedió a reintroducir una copia del gen *ATC1* en el mutante nulo. El primer paso para la reintegración fue la amplificación mediante PCR de gen *ATC1*, utilizando como molde ADN genómico de la cepa silvestre de *C. parapsilosis* y empleando los oligonucleótidos FCpATC5'-5' y RCpATC3'-3' (Tabla II.4.). Se obtuvo un amplicón de 3,216 pb de tamaño que se secuenció y subclonó para posteriormente transformar en la cepa mutante carente de dicho gen. Los transformantes se seleccionaron en placas de YNB conteniendo trehalosa como fuente de carbono, permitiendo así, el crecimiento únicamente de las colonias que habían incorporado el gen *ATC1*, actuando en este caso como marcador de selección.

Las transformantes que crecieron se comprobaron mediante PCR, empleando los oligonucleótidos FCpATC5-5 y el RCpATC-central, este último amplifica una secuencia interna del gen *ATC1* (ausente en el mutante *ATC1-4*) (Figura III.10.). Se obtuvieron 3 positivos de las 8 colonias analizadas. De las tres colonias positivas se eligió una para posteriores estudios.

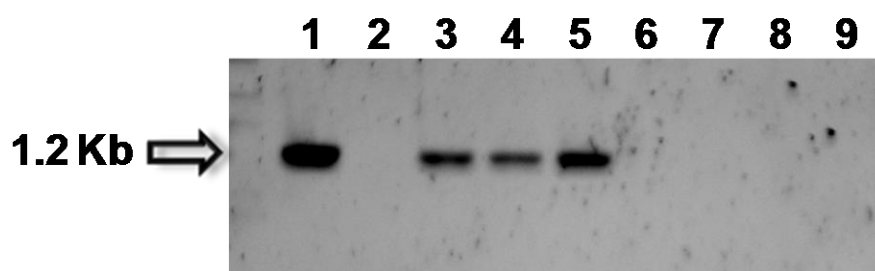


Figura III.10. Análisis de los transformantes por PCR de ADN genómico. La calle 1 corresponde al control positivo, para el cual se utilizó ADN genómico de la cepa silvestre (Cp). Las calles 2-9 corresponden a las 8 colonias transformadas, de las cuales solo tres, fueron positivas (calles 3, 4, 5) usando el par de oligonucleótidos FCpATC5-5 y el oligo RCpATC-central. La banda esperada fue de un tamaño de aproximadamente 1,200 pb.

III.7. INTERRUPCIÓN DEL GEN *NTC1* SOBRE EL FONDO DEL MUTANTE NULO (*atc1/atc1*).

En *C. albicans* ha sido descrito un único gen, *NTC1*, que codifica una proteína con actividad trehalasa neutra, encargada de la hidrólisis de la trehalosa citosólica en dicha levadura (Eck *et al.*, 1997). Hasta el momento no existe evidencia de un mutante doble para ambas enzimas (neutra y ácida), por ello consideramos interesante la delección del gen *NTC1* de *C. parapsilosis* sobre un fondo carente del gen *ATC1* y así abordar desde otra perspectiva, el posible papel de dichas enzimas en el metabolismo de la trehalosa en *C. parapsilosis*.

Una vez obtenido el mutante nulo para el gen *ATC1*, se procedió a un nuevo rastreo en la base de datos del genoma de *C. parapsilosis*, con el objetivo de identificar el gen *NTC1* que codifica para la enzima trehalasa neutra, usando como modelo la secuencia nucleotídica de la trehalasa neutra de *C. albicans* (*CaNTC1*). Como resultado, se identificó en el *contig* 005807, una secuencia nucleotídica, que presentaba una homología del 72% con el gen *NTC1* de *C. albicans*. Dicha secuencia nucleotídica puso de manifiesto una única fase de lectura abierta de 2,712 nucleótidos.

La estrategia seguida para la disrupción del gen *NTC1*, fue la ya descrita por Butler *et al.*, 2009, y que ha sido detallada con anterioridad en esta memoria (Apartado III.5.1).

III.7.1. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN.

Siguiendo el mismo procedimiento empleado para el gen *ATC1*, primeramente se realizó la construcción del casete de disrupción, para ello, se amplificó mediante PCR un fragmento que comprendía una zona anterior al marco abierto de lectura del gen y el inicio del mismo, introduciendo dos secuencias que fueran reconocidas por las enzimas de restricción *KpnI* y *ApaI* en el extremo 5'. Para este primer paso, se utilizó como ADN molde, el genoma de la cepa silvestre *C. parapsilosis* y los oligonucleótidos; FCpNNTC5'-5' que contiene el sitio de restricción para la enzima *KpnI*, y el oligonucleótido RCpNNTC5'-3' con sitio de corte para la enzima *ApaI* (Tabla III.4). El resultado de esta PCR dio lugar a un amplicón de tamaño de 562 pb, al que se le denominó F1 (Figura III.11.A).

En un segundo paso, se amplificó por PCR un fragmento correspondiente a la zona 3' del gen a interrumpir, mediante el empleo del mismo ADN molde y los oligonucleótidos; FCpNTC3'-5' con el sitio de corte para la enzima *SacI* y RCpNTC 3'-3', con sitio de corte para la enzima *SacII* (Tabla III.4.), obteniendo un producto de PCR de 490 pb, al cual, se le denominó F2 (Figura III.11.A.).

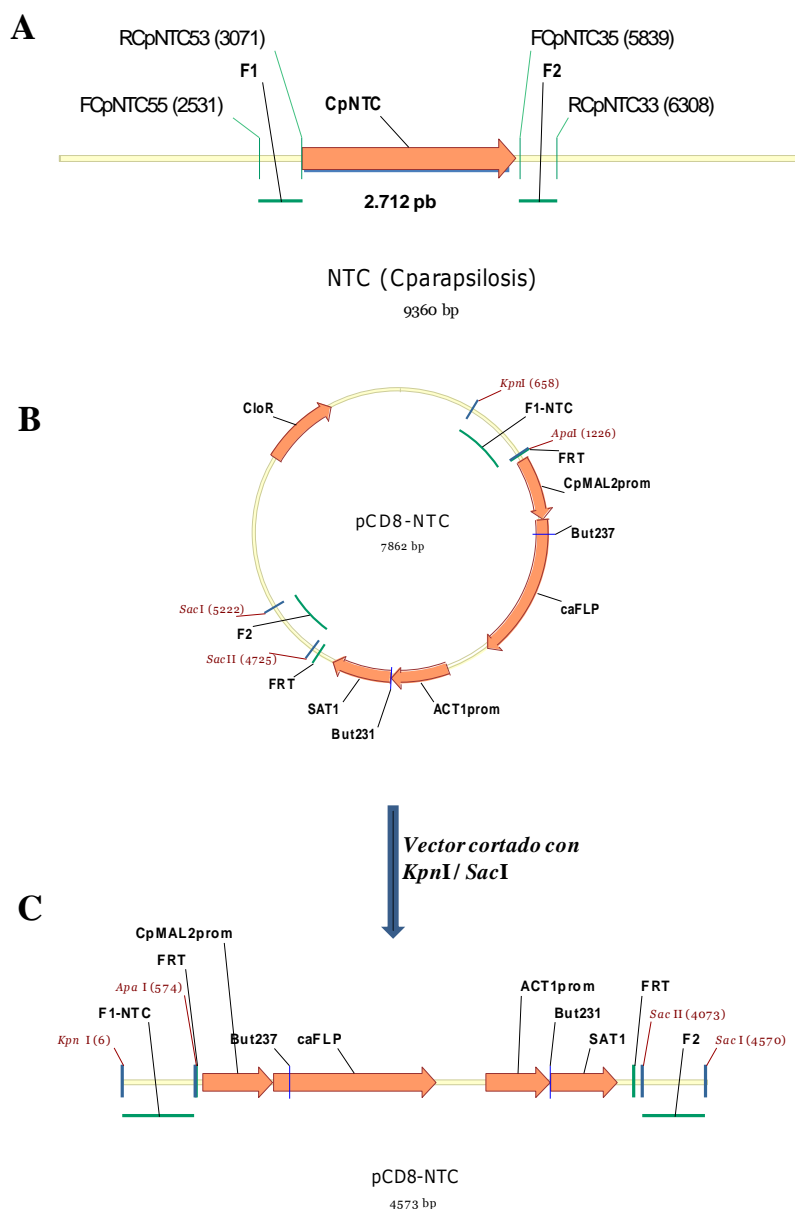


Figura III.11. A) Mapa físico del fragmento que contiene el gen *NTC1* de *C. parapsilosis*. Se señalan los cebadores utilizados para amplificar las distintas zonas representadas como F1 y F2 que corresponden a la zona 5' y 3' del gen *NTC1*. B) Plásmido pCD8 con los fragmentos F1 y F2 integrados. C) Casete de disrupción obtenido de la digestión del plásmido pCD8 con las enzimas *KpnI* y *SacI*.

A continuación, ambos fragmentos se subclonaron cada uno, en el plásmido comercial pCloneJet (Fementas), originando así los plásmidos pClonjet-F1 y pClonjet-F2, posteriormente dichos fragmentos fueron digeridos, ligados y clonados en el vector final pCD8 (Figura III.11.B.), siguiendo la misma estrategia comentada para el gen *ATCI* (Apartado III.4.1.).

Una vez clonado ambos fragmentos: F1 y F2 en el plásmido pCD8, el plásmido resultante fue digerido con las enzimas *KpnI* y *SacII* obteniendo así, el casete de disrupción de 4,5 kb empleado para la posterior disrupción del gen *NTCI* (Figura III.11.C.).

III.7.2. OBTENCIÓN DEL MUTANTE DOBLE PARA EL GEN *NTCI* y *ATCI*.

Una vez construido el casete de interrupción, se procedió a transformar en la cepa mutante carente del gen *ATCI* (ATC1-4), tal y como se describe en el Apartado II.5.2. de Materiales y Métodos. Para dicha transformación, se utilizaron entre 3 y 5 μ g del casete lineal (Figura III.11.C.). La selección de los transformantes que habían incorporado el casete, se llevó a cabo en medio YPD-NTC200, siguiendo el mismo procedimiento que para el gen *ATCI* (III.5.2.). Se analizaron siete transformantes, de los cuales tres parecían haber incorporado el inserto en el *locus* de *NTCI*. La comprobación de la correcta integración del casete en el *locus* *NTCI*, se realizó mediante el análisis de dichos transformantes por PCR, utilizando dos parejas de oligonucleótidos: FSAT5 y RCpNTC3-59, capaces de producir amplificación, sólo en el caso de que la integración sea correcta, ya que corresponden respectivamente a una secuencia del gen *SAT* del propio casete ya integrado y a otra secuencia del gen *NTCI* que no se ve alterada por el casete (Figura III.12.A). Los fragmentos amplificados esperados eran de 1,304pb, solamente tres transformantes tuvieron el patrón esperado, se seleccionó la colonia nº 6, a la que se denominó NATC1-1 (Figura II.12.C).

Posteriormente, dicho transformante se sembró en medio YPM con la finalidad de expresar el gen *FLP* y así por la acción de las flipasas, proceder a la eliminación del casete. A continuación, una alícuota del medio YPM, se sembró en placas de YPD conteniendo una concentración de nurseotricina de 10 μ g/ml, en las que pudieron aislarse colonias sensibles, que corresponderían a células con el gen *NTCI* interrumpido, sensibles a la nurseotricina y por tanto obtendríamos así, el mutante

heterocigótico para dicho gen de estudio y al que nombraremos como NATC1-2. Se seleccionaron dos colonias de las cuales solamente una, había eliminado el casete de nurseotricina. La comprobación de la eliminación del casete se realizó mediante dos PCRs, en una primera, se utilizó la pareja de oligonucleótidos: FSAT5 y RCpNTC3-59, esta PCR resultaría negativa, si efectivamente los transformantes seleccionados, han eliminado el casete, si no fuera así, el resultado sería un amplicón de tamaño 1,304pb. Como control negativo de la PCR (C-) se utilizó ADN genómico de la cepa silvestre de *C. parapsilosis* y como control positivo de la PCR (C+) se utilizó ADN genómico del mutante (NATC1-1). Como se puede observar en la Figura III.12.D, para ambos transformantes nº 8 y nº 9 esta primera PCR fue negativa, lo cual, nos haría sospechar que posiblemente hubieran eliminado el casete, pero para mayor seguridad se realizó otra segunda PCR de comprobación, empleando la pareja de oligonucleótidos FCpNTC5'-5' y RCpNTC 3'-3', los cuales, si el casete se ha eliminado correctamente se obtiene un amplicón de 1,135pb. La PCR de dichos transformantes nº 8 y nº 9 solamente fue positiva para la colonia nº 9, por tanto, obtendríamos así el mutante heterocigótico para el gen *NTC1* (NATC1-2) (Figura III.12.B. y D).

A partir de la cepa heterocigótica (NATC1-2) se realizó una segunda transformación con el casete de disrupción, para así obtener el mutante homocigótico para el gen *NTC1*. Se siguió el mismo procedimiento anterior, los transformantes obtenidos se analizaron mediante dos PCR, utilizando primeramente los cebadores FSAT5 y RCpNTC3-59, y en una segunda PCR los cebadores FCpNTC5'-5' y RCpNTC 3'-3' (Tabla II.4.) y finalmente la colonia que resultó ser positiva y a la que se denominó NATC1-3, se cultivó en YPM a 30°C durante dos días para eliminar el casete. Posteriormente, dicha alicuota se plaqueó en placas de YPD conteniendo una dosis de nurseotricina de 10 µg/ml y se incubaron a 30°C durante 48h. Se seleccionaron 6 colonias pequeñas sensibles a dicho antibiótico y la eliminación correcta del casete se comprobó mediante una RT-PCR.

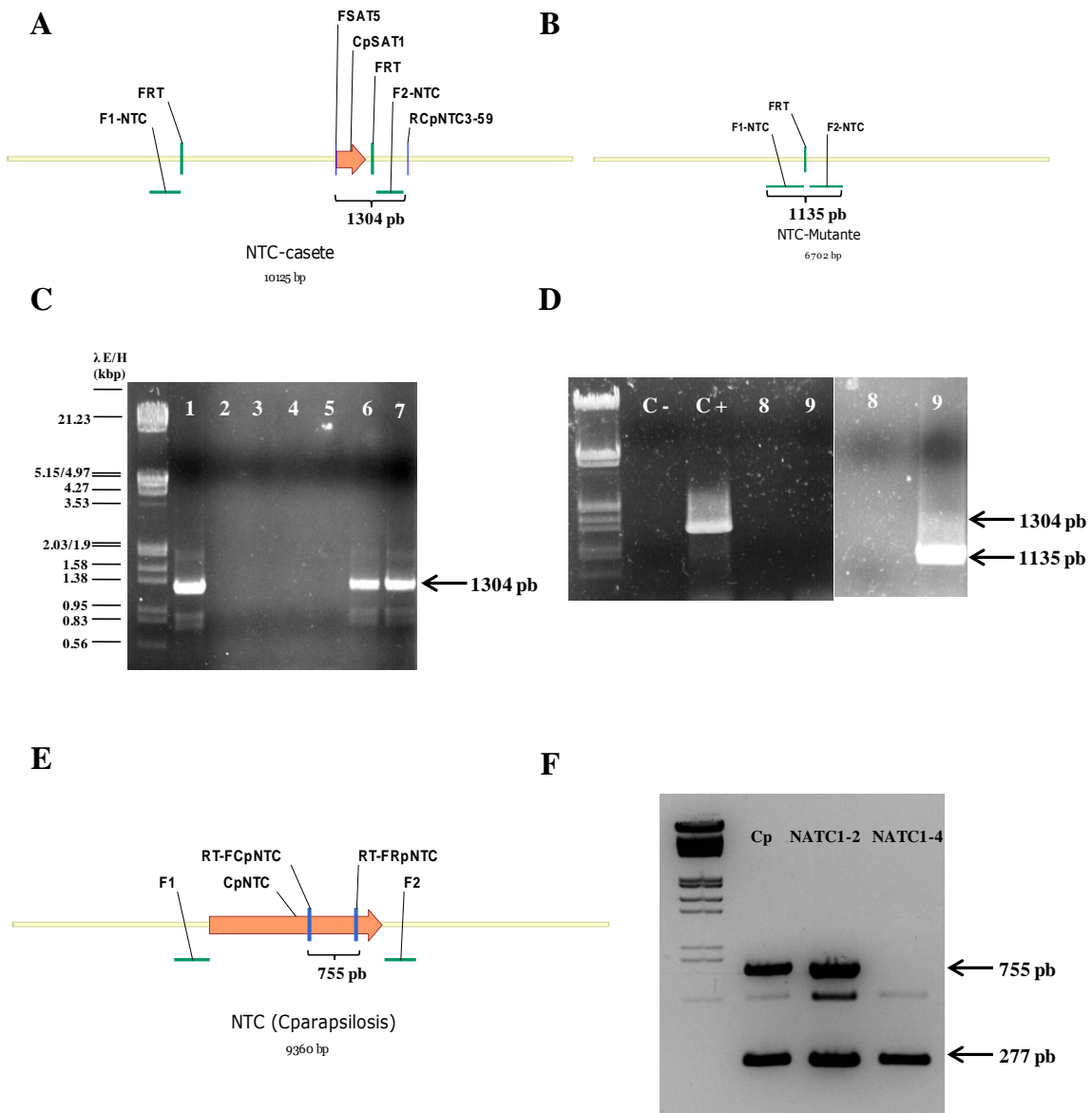


Figura III.12. Comprobación de la interrupción del gen *NTC1*. **A)** Mapa físico del gen *NTC1* conteniendo el casete de nurseotricina. Se señalan los oligonucleótidos (FSAT5 y RCpNTC3-59) utilizados para la comprobación de la integración del casete en el *locus* correspondiente del gen. **B)** Mapa físico una vez disruptado el gen. Se señalan los oligonucleótidos (FCpNTC5'-5' y RCpNTC 3'-3') utilizados para la comprobación de la eliminación del casete. **C)** Comprobación de la interrupción del primer alelo del gen *NTC1* mediante PCR, de los siete transformantes obtenidos. Los oligonucleótidos FSAT5 y RCpNTC3-59 fueron empleados para detectar la correcta integración del casete en el *locus NTC1*, mediante amplificación de una banda de 1,304 pb **D)** Análisis por PCR de la eliminación del casete en la primera ronda de transformación, de los dos transformantes seleccionados. Se realizaron dos PCRs, utilizando en una primera los oligonucleótidos: FSAT5 y RCpNTC3-59, cuyo resultado es un amplicón de 1,304 pb y en otra PCR, los oligonucleótidos: FCpNTC5'-5' y RCpNTC 3'-3' que dan lugar a un amplicón de 1,135 pb **E)** Mapa físico donde se muestra el gen *NTC1* completo y los oligonucleótidos diseñados para la RT-PCR (RT-FCpNTC5 y RT-FCpNTC3). **F)** RT-PCR de los ADnc de las cepas silvestre (Cp), mutante heterocigótico (NATC1-2) y homocigótico (NATC1-4) de *C. parapsilosis*. Se utilizaron los oligonucleótidos: RT-FCpNTC5 y RT-FCpNTC3, originando un amplicón de tamaño 755 pb.

Para la realización de la RT-PCR, primeramente se obtuvo ARN total de los 6 transformantes obtenidos, tal y como se describe en el Apartado II.10 de Materiales y Métodos. Una vez obtenido el ARN total, el ADNc se sintetizó a partir de 6 µg de ARN total obtenido. Este ADNc se cuantificó y 1 µg del mismo se empleó como molde para la reacción de PCR (Apartado II.8.3. de Materiales y Métodos). La RT-PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos: RT-FCpNTC5 y RT-FCpNTC3, ambos cebadores están diseñados de tal manera que amplifican una región corta dentro del gen *NTC1* de un tamaño de 755 pb (Figura III.12.E.). Como control positivo de la extracción del ARN, se utilizó la pareja de oligonucleótidos específicos del gen *RPS0* (ISARPS5C e ISARPS3C), dichos cebadores amplifican únicamente un fragmento de 277 pb en ausencia de contaminación con ADN genómico, pero si existe contaminación por ADNg, aparece una banda de 580pb, esto es debido, a que el gen *RPS0* contiene un intrón lo que nos permite detectar contaminaciones de ADN genómico en el ARN utilizado, en el caso de obtener amplificadas.

Como resultado del análisis de los seis transformantes seleccionados, solamente en uno, no se detectó presencia de ARNm del gen *NTC1*, confirmándonos así, la obtención del mutante nulo para dicho gen y al que nombramos como *ntc1*. Para dicha cepa no se obtuvo ARNm del gen *NTC1*, ya que la célula al carecer del gen *NTC1* fue incapaz de sintetizar la proteína correspondiente, a pesar de que la extracción del ARN total de esta, había sido eficiente, ya que si se encontró ARNm del gen *ISARP* empleado como control (Figura III.12.F.). Adicionalmente, también se obtuvo ARN total de la cepa silvestre (Cp) y del mutante heterocigótico (NATC1-2) y se realizó una RT-PCR para comprobar nuevamente la correcta interrupción del mutante heterocigótico (Figura III.12.F.). Con esta RT-PCR quedó demostrada la correcta disrupción del gen *NTC1* en el mutante nulo (NATC1-4), obteniendo así el mutante doble para ambas trehalasas (ácida y neutra).

El análisis fenotípico del mutante doble no se pudo abordar debido al limitado tiempo, ya que fue obtenido en la parte final experimental de la presente Memoria. Las líneas de trabajo futuro que se nos plantean, serán, las de caracterizar este doble mutante para ambas trehalasas, con la finalidad de completar el estudio de las enzimas con actividad trehalasa y del contenido intracelular de trehalosa y así poder esclarecer la posible función de este disacárido en la fisiología de *C. parapsilosis*.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *ATC1*

III.8. ANÁLISIS DEL CICLO DE CRECIMIENTO EN MEDIOS CON DISTINTAS FUENTES DE CARBONO.

Con objeto de analizar las consecuencias fenotípicas que provoca la ausencia del gen *ATC1* funcional en la fisiología de *C. parapsilosis*, se realizó una cinética de crecimiento en medio rico (YPD) líquido (turbidimetría), para verificar posibles alteraciones del crecimiento poblacional. Este experimento se llevó a cabo partiendo de blastoconidios cultivados en YPD líquido a 30° C, tal y como se describe en el Apartado II.1.1 de Materiales y Métodos. Las muestras fueron recogidas y procesadas; el crecimiento se monitorizó durante un intervalo de 12 horas.

Como se observa en la Figura III.13., no se registraron diferencias significativas entre la absorbancia medida en la cepa silvestre (Cp) y el mutante nulo isogénico (*atc1/atc1*), ambas alcanzaron estado estacionario tras 11h de cultivo. Estos datos indican que la doble interrupción del gen *ATC1* no afecta significativamente el crecimiento celular en medios ricos conteniendo glucosa, siendo dispensable para el crecimiento de *C. parapsilosis* en las condiciones ensayadas (Figura III.13.). La observación por microscopia de contraste de fases de la morfología celular tampoco permitió apreciar ninguna alteración evidente entre las células parentales (Cp) y mutantes (*atc1*).

Para complementar este estudio, se verificó en paralelo si la actividad Atc1p desempeñaba algún papel fisiológico en la utilización de otras fuentes de carbono alternativas a glucosa. A tal fin, las dos cepas se crecieron en medio líquido limitante en nutrientes (YNB) suplementado con los siguientes azúcares al 2%: glucosa, sacarosa, trehalosa y lactosa (Figura III.14.). La utilización de YNB permite asegurar que el crecimiento observado dependerá principalmente de la fuente de carbono suministrada y no será debido a la complejidad nutricional de un medio rico (YPD).

Los dos tipos celulares cultivados en YNB-glucosa, mostraron esencialmente la misma tasa de crecimiento (Figura III.14.A.), datos coincidentes con los expuestos anteriormente (Figura III.13.). Asimismo, en YNB-sacarosa (Figura III.14.B.), tampoco se detectaron diferencias significativas. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando el disacárido utilizado fue trehalosa (Figura III.14.C.). La cepa carente del gen *ATC1* presentó serias limitaciones para crecer en medio YNB-trehalosa; sugiriendo su

Resultados

incapacidad para metabolizar la trehalosa exógena. Por su parte, la cepa parental (Cp) manifestó un crecimiento normal en estas condiciones (Figura III. 14.C.). En cuanto al crecimiento en YNB-lactosa, se puede comprobar que ambas cepas mostraron cierta dificultad para crecer, manifestando el mutante *atc1/atc1* nulo, un crecimiento ligeramente retardado en comparación con la cepa parental (Cp) (Figura III.14.D.). En consecuencia, la doble interrupción del gen *ATC1* no parece alterar el crecimiento celular en medios suplementados con mono y disacáridos, excepto cuando el azúcar escogido es trehalosa y, probablemente, lactosa.

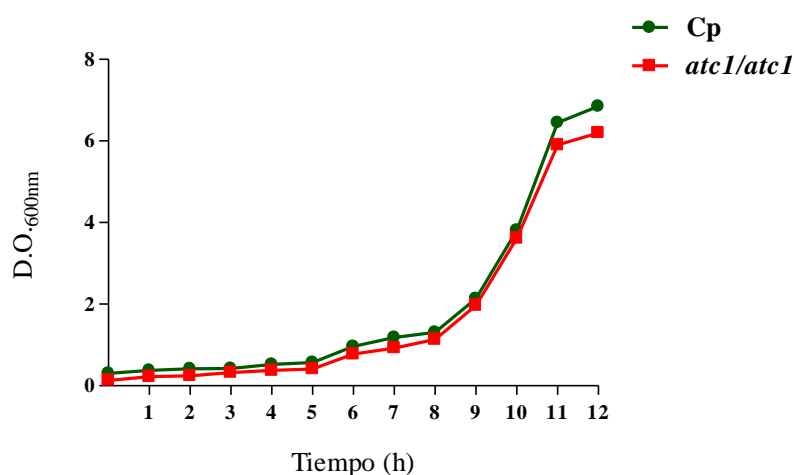


Figura III.13. Curva de crecimiento en medio rico (YPD) de la cepa silvestre (Cp) y el mutante homocigótico isogénico (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis*. Se partió de una $D.O._{600nm} = 0,2$ y las muestras fueron recogidas a intervalos de una hora durante las 12 primeras horas de incubación a 30°C. El ensayo se repitió tres veces con resultados consistentes, se muestran los datos de un experimento significativo.

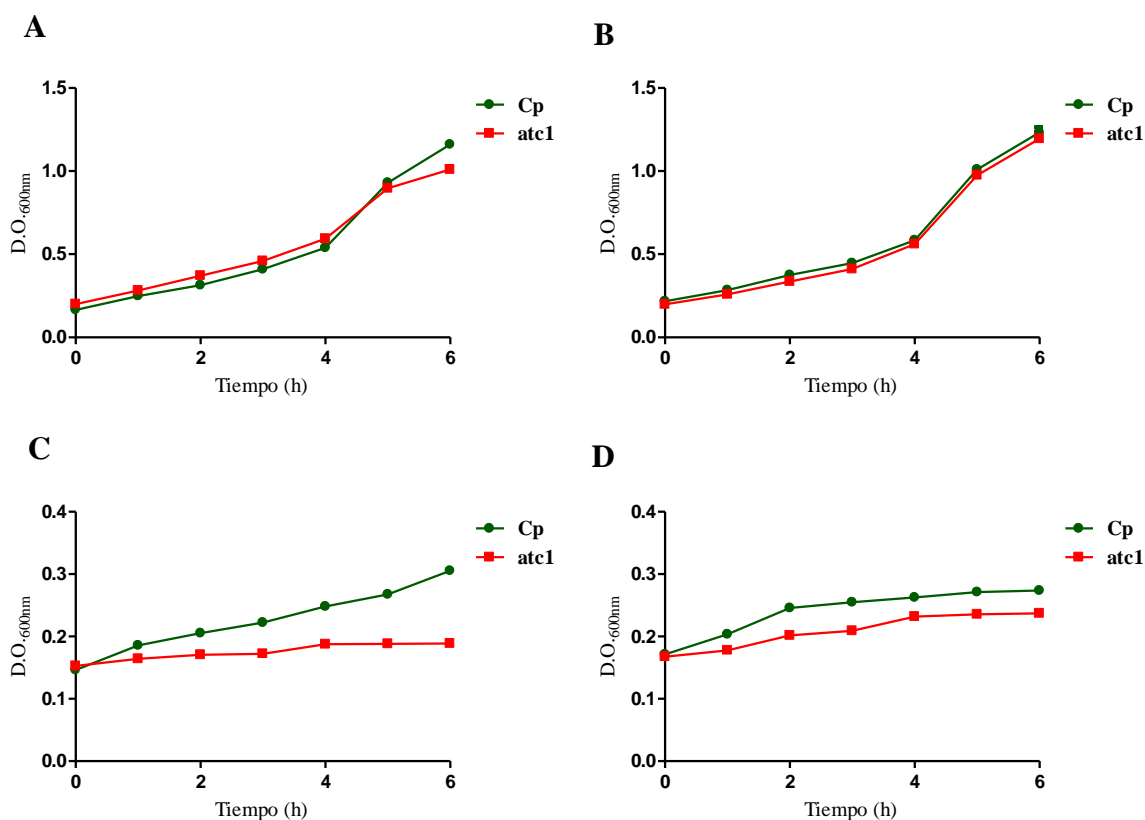


Figura III.14. Curva de crecimiento de la cepa silvestre (Cp) y el mutante homocigótico (*atc1*) de *C. parapsilosis*, en medio mínimo (YNB) con los siguientes azúcares como fuente de carbono: glucosa (A), sacarosa (B), trehalosa (C) y lactosa (D). Las muestras fueron recogidas a intervalos de una hora durante las 6 primeras horas de incubación a 30°C. La densidad óptica inicial del cultivo fue de $D.O._{600nm} \approx 0,15$. El ensayo se repitió tres veces con resultados consistentes, se muestran los datos de un experimento significativo.

III.9. EL MUTANTE NULO NO CRECE SOBRE TREHALOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

En la levadura patógena oportunista *Candida albicans*, la carencia del gen *ATC1* causa incapacidad para utilizar trehalosa exógena, debido a la pérdida de actividad trehalasa ácida, dentro de los niveles de detección del ensayo enzimático (Pedreño *et al.*, 2004). Por ello, quisimos comprobar si la delección del gen ortólogo *ATC1* en la levadura *C. parapsilosis*, considerada como un patógeno emergente, mostraba el mismo tipo de comportamiento respecto a la trehalosa disponible. A tal fin, se empleó el mismo medio de cultivo (YPD) que en los ensayos de *C. albicans*, con objeto de verificar los resultados expuestos en el Apartado III.8.

Resultados

Como muestra la Figura III.15., las siguientes cepas de *C. parapsilosis*: parental (Cp), heterocigótica (*ATC1/atc1*) y homocigótica (*atc1/atc1*), no manifestaron diferencias en su cinética de crecimiento, cuando se crecieron en placas que contenían YNB con glucosa. Sin embargo, cuando se sembraron en el mismo medio mínimo YNB sólido que contenía trehalosa como única fuente de carbono, el crecimiento del mutante nulo (*atc1/atc1*) se vio afectado significativamente, observaciones coincidentes con nuestros resultados previos en *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004).

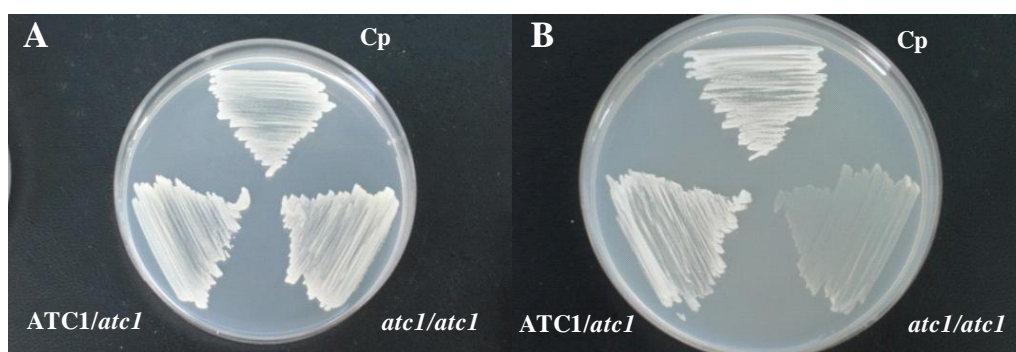


Figura III.15. Determinación del crecimiento de *C. parapsilosis* en función de la fuente de carbono. A) Células de la cepa parental de *C. parapsilosis* (Cp) y de los mutantes heterocigótico (*ATC1/atc1*) y homocigótico (*atc1/atc1*) se sembraron en medio mínimo sólido (YNB) conteniendo glucosa B) y las mismas cepas crecidas en YNB con trehalosa como fuente de carbono. A continuación, se incubaron durante 48h a 30° C y fueron fotografiadas.

Además de esta prueba, se practicó otra comprobación adicional para demostrar que la ausencia de una trehalasa ácida funcional, imposibilita la utilización de trehalosa exógena en *C. parapsilosis*. Para ello, se realizó un ensayo visual de crecimiento mediante detección colorimétrica, empleando el test comercial “Rapid Trehalose Assimilation Broth” (REMEL), que contiene medio YNB (Yeast Nitrogen Base) suplementado con trehalosa al 4% y verde de bromocresol al 8% como indicador del color de pH, que vira a amarillo en condiciones ácidas.

Como se puede observar en la Figura III.16., cuando se inoculó la cepa parental, al cabo de 24 h de incubación a 37°C, se produjo un viraje en el color de azul a amarillo por la acidificación del medio de cultivo, debido al consumo de trehalosa y el consiguiente crecimiento celular. Por el contrario, tras inocular el mutante nulo (*atc1/atc1*), no se observó ningún cambio de color, permaneciendo intacto el azul original, indicativo de crecimiento negativo ante la incapacidad de utilizar trehalosa. Por

tanto, queda confirmado que el fenotipo del mutante homocigótico para el gen *ATC1* en *C. parapsilosis* es idéntico al desarrollado en *C. albicans*.

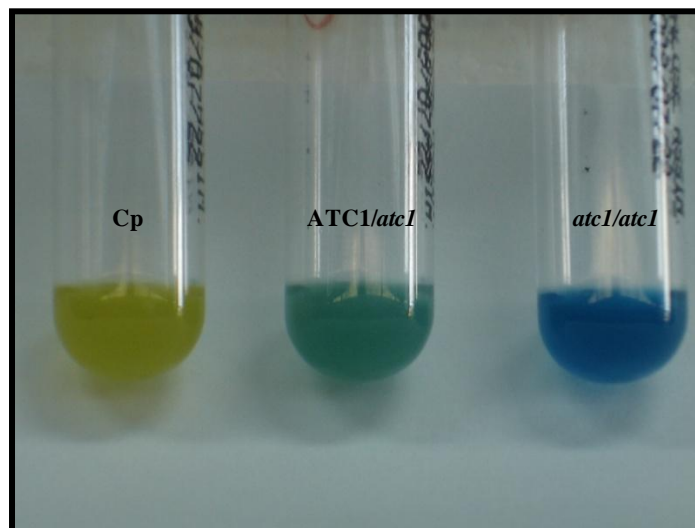


Figura III.16. Determinación colorimétrica de la utilización de trehalosa exógena y crecimiento celular en *C. parapsilosis* mediante viraje del pH. Células de la cepa silvestre y de los mutantes heterocigótico y homocigótico para el gen *CpATC1* fueron sembradas en tubos del ensayo comercial “Rapid Trehalose Assimilation Broth” (REMEL), que contiene medio mínimo YNB con trehalosa (4%) como única fuente de carbono, siendo incubados durante 24 h a 37° C. Se produce un cambio de color de azul a amarillo (pH ácido) cuando ocurre hidrólisis de trehalosa y crecimiento celular (el indicador es verde de bromocresol, al 8%).

III.10. PAPEL FUNCIONAL DEL GEN *ATC1* EN RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO, SALINO Y TÉRMICO.

Las levaduras representan un modelo ideal para el estudio de las respuestas defensivas celulares frente a diversos tipos de estrés nutricional y fisiológico. Trabajos previos de varios grupos, incluido el nuestro, han demostrado que en estas eucariotas inferiores, la acumulación del disacárido trehalosa, desempeña una función defensiva esencial frente a determinadas situaciones de agresión ambiental, caso del estrés oxidativo, el choque térmico, la deshidratación, el ayuno prolongado de nutrientes o la exposición a sustancias tóxicas (Wiemken 1990; Thevelein, 1996; Estruch, 2000; Argüelles, 2000). Por todo ello, propusimos como uno de nuestros objetivos, profundizar en la investigación sobre la posible función de la trehalosa como protector

celular en la levadura *C. parapsilosis*, usando a tal efecto, las cepas previamente obtenidas, con alteración en el gen *ATC1*, implicado en la hidrólisis del disacárido.

Inicialmente, se planteó estudiar si la ausencia de dicho gen podía modificar de forma significativa la resistencia de este patógeno al estrés inducido por diversos tratamientos, puesto que al carecer de actividad trehalasa ácida, el metabolismo de la trehalosa se vería teóricamente afectado.

El análisis de la sensibilidad a estrés oxidativo, térmico y salino en las cepas objeto de estudio, se llevó a cabo en las condiciones previamente establecidas en nuestro laboratorio (Argüelles, 2000; Álvarez-Peral *et al.*, 2002; González-Párraga *et al.*, 2008). En estos experimentos, los cultivos fueron incubados a 30° C en medio YPD líquido y las muestras correspondientes se recogieron en fase exponencial (D.O._{600nm} = 1,0-1,2). Una vez alcanzada la fase exponencial, se practicaron diluciones decimales de cada muestra (desde 10² hasta 10⁶) y se sembraron 5 µl de cada dilución sobre medio sólido YPD conteniendo el agente inductor de estrés. Las condiciones de estrés aplicadas en las placas fueron las siguientes: estrés oxidativo suave y agudo con peróxido de hidrógeno (5 mM y 50 mM H₂O₂), choque osmótico con NaCl 1,2 M y choque térmico (42° C), para este último tratamiento, la placa se dejó durante 1 hora a 42°C, posteriormente, todas las placas fueron incubadas a 30° C durante 48 horas e inmediatamente fotografiadas (Apartado II.15.2. de Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.17. Como se puede comprobar en el ensayo control mantenido a 30°C y, en consonancia con las medidas turbidimétricas realizadas en YPD líquido (Figura III.13.) no parecen existir diferencias significativas en la tasa de crecimiento celular entre ambas cepas, ya que los dos tipos presentan un número similar de macrocolonias. No obstante, cuando se analizó la respuesta (medida como número de viables) frente a los distintos tipos de estrés aplicado, sí se observó una marcada resistencia en el caso del mutante homocigótico (*atc1/atc1*), frente a una exposición oxidativa potencialmente letal (50mM H₂O₂), además de mostrar también una ligera resistencia superior cuando se sometió a choque térmico (42°C) (Figura III.17.).

C. parapsilosis tolera bien concentraciones de H₂O₂ en el intervalo comprendido entre 10 mM y 50 mM, muy similares a las dosis experimentales probadas en

C. albicans (Jamieson *et al.*, 1996; Álvarez-Peral *et al.*, 2002; Alonso-Monge *et al.*, 2003), pero en fuerte contraste con la levadura de gemación *S. cerevisiae*, que ofrece una marcada sensibilidad frente a los agentes oxidantes, comportándose como muy sensible en niveles relativamente suaves de 1-5 mM de H₂O₂ (Pedreño *et al.*, 2002). Esta distinta susceptibilidad podría reflejar tanto el diferente hábitat natural como la distinta actividad biológica ejercida por estas dos levaduras (González-Párraga *et al.*, 2008)

Respecto al choque osmótico con NaCl, se aplicó una concentración de 1,2 M NaCl, ya que las especies de *Candida* más tolerantes crecen sin dificultad hasta un rango de 3-4 M NaCl (Hohmann y Mager, 2003). De acuerdo con los datos presentados en la Figura III.17., este tratamiento no afectó al crecimiento de ninguna de las cepas probadas, ya que el resultado fue muy similar al control.

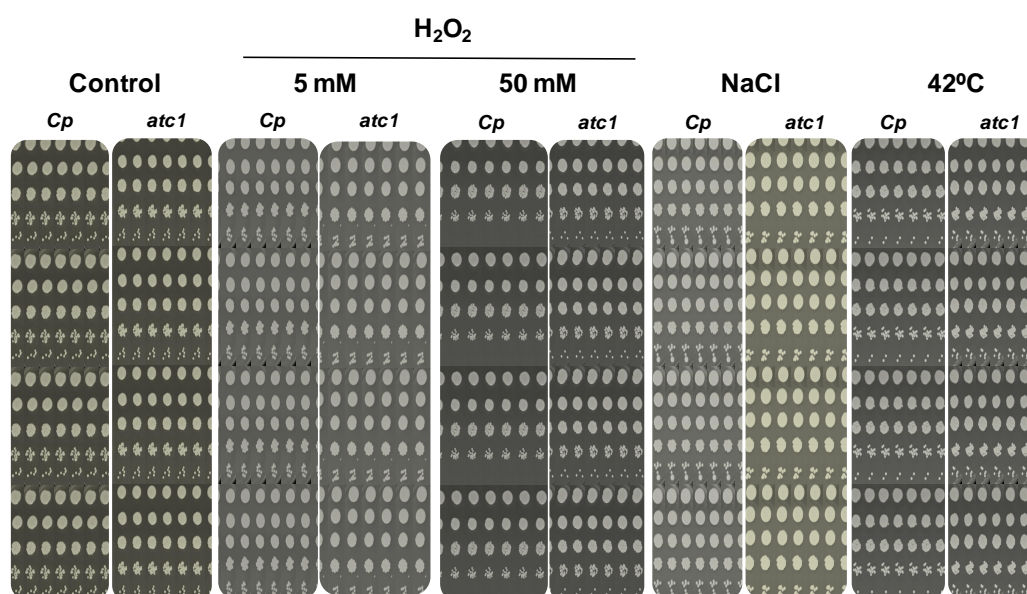


Figura III.17. Análisis de la sensibilidad en placa mostrada por el mutante homocigótico (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis* y la cepa parental (Cp) frente a distintos tratamientos de estrés. A partir de cultivos exponenciales crecidos en YPD; se obtuvieron muestras procesadas como se indica en el Apartado II.15. Se hicieron diluciones decimales y se tomaron 5µl de cada dilución, que fueron sembradas sobre YPD sólido conteniendo el agente estresante. Posteriormente, se incubaron a 30° C durante 48 horas antes de ser fotografiadas.

Cuando se practicó un análisis cuantitativo de la viabilidad celular de cultivos crecidos exponencialmente en medio YPD líquido, se observó que la adición de concentraciones suaves de H₂O₂ (5mM) causó una pérdida moderada de supervivencia,

que fue ligeramente mayor en la cepa parental (Figura III.18). Sin embargo, al exponer muestras equivalentes a una concentración oxidativa severa (50 mM H₂O₂), el grado de viabilidad se vio reducido drásticamente, sobre todo, para el caso de células silvestres. Datos coincidentes con las medidas de sensibilidad en placa (Figura III.17.), donde concentraciones potencialmente letales de peróxido de hidrógeno inducían un nivel inferior de crecimiento colonial, más marcado en el caso de la cepa parental. Por el contrario, la viabilidad obtenida tras exposición a choque osmótico (1,2 M NaCl), no concuerda con los resultados anteriores (Figura III.17.), ya que se produce una disminución considerable de la supervivencia de ambas cepas (Figura III.18.). Por su parte, el estrés térmico (42°C), fue, el que permitió recuperar un mayor porcentaje de viabilidad celular (Figura III.18.). Debemos resaltar que, en todos los casos, el mutante nulo (*atc1/atc1*) siempre fue el que exhibió un nivel más alto de supervivencia, en comparación con su cepa parental (Cp).

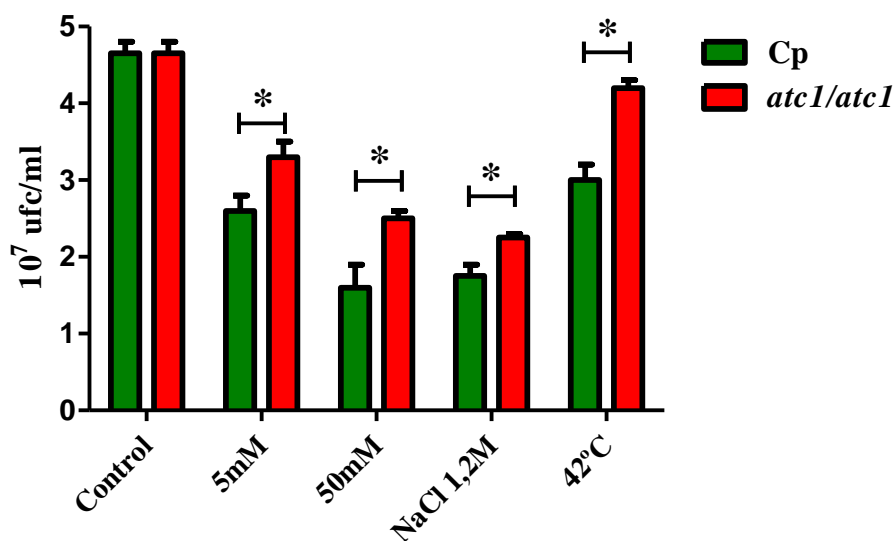


Figura III.18. Determinación del grado de viabilidad celular en medio YPD líquido en respuesta a los siguientes tratamientos: estrés oxidativo por exposición a dos concentraciones de H₂O₂ (5mM y 50mM), estrés salino con NaCl 1,2 M y choque térmico a 42°C, de la cepa parental (Cp) de *C. parapsilosis* y del mutante isogénico (*atc1/atc1*) interrumpido en el gen *ATCI*. Los cultivos se incubaron a 30° C en YPD y se recogieron en fase exponencial (D.O._{600nm} = 1,0-1,2). A continuación se sometieron al estrés indicado durante una hora, manteniendo un control a 30°C sin tratamiento. El experimento fue repetido dos veces por duplicado con resultados consistentes y los valores mostrados corresponden a la media más la desviación estándar obtenida. Las diferencias entre las medias con respecto a ambas cepas fueron significativas a P<0,05 (*), según la aplicación del test t de Student.

III.10.1. CONTENIDO INTRACELULAR DE TREHALOSA, GLICEROL Y D-ARABITOL EN RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO, SALINO Y TÉRMICO.

Simultáneamente a las medidas de viabilidad celular, en los mismos cultivos sometidos a estrés se valoró el contenido endógeno de trehalosa y de los polioles glicerol y D-arabitol, cuya implicación en los mecanismos defensivos de *C. albicans* ha sido previamente sugerida (Kayingo y Wong, 2005; Li *et al.*, 2009). En estos ensayos se siguió el protocolo general empleado para medir la supervivencia celular frente a estrés (Apartado II.20). El contenido de trehalosa endógena se determinó por dos procedimientos independientes: mediante determinación enzimática y mediante análisis por HPLC (Apartado II.19), a fin de correlacionar la validez de ambos métodos. En cambio, el resto de metabolitos (glicerol y D-arabitol) fueron medidos exclusivamente mediante análisis por HPLC.

Los resultados correspondientes a la valoración enzimática de trehalosa endógena se recogen en la Tabla III. 3. El nivel basal del disacárido en fase exponencial fue muy bajo en ambas cepas a 30°C. Sin embargo, cuando muestras idénticas se sometieron a un estrés térmico a 42°C, se produjo un incremento muy significativo en la concentración de la trehalosa endógena (Tabla III.3). Es importante destacar que el mutante nulo (*atc1*) presentó una mayor acumulación del disacárido tras la aplicación del estrés térmico, lo cual, es consistente con su mejor supervivencia en medio líquido (Figura III.18.). Por el contrario, dicho mutante mostró un comportamiento dispar cuando fue sometido a concentraciones tolerables y potencialmente letales de H₂O₂ (Tabla III.3). En este caso, el tipo parental registró una síntesis más elevada de trehalosa endógena, con respecto a las células carentes de la proteína Atc1p.

Tabla III.3. Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a los siguientes tratamientos de estrés: oxidativo (5mM y 50mM H₂O₂), salino (1,2M NaCl) y térmico (42°C), en las cepas parental (Cp) y *atc1/atc1* nulo de *C. parapsilosis*. Los cultivos se crecieron en medio YPD a 30° C y fueron recogidos una vez alcanzada la fase logarítmica de crecimiento (D.O._{600nm}=1,0-1,2). Los tratamientos de estrés fueron aplicados durante 1 hora. Los valores de trehalosa endógena se expresan como nmoles/mg peso húmedo y se indica la desviación estándar de las medidas.

Tratamientos	Trehalosa endógena	
	Cp	<i>atc1/atc1</i>
Control	4,8 ±5	3,3±2,0
5 mM H ₂ O ₂	8,3±4,3	5,9±0,8
50 mM H ₂ O ₂	9,6±5,3	6,2±2,3
NaCl 1,2 M	3,7±0,2	4,1±1,1
42°C	21,6±4,0	24,2±4,8

Como se verá a continuación, estos resultados aparentemente tienen buena correlación con los obtenidos mediante HPLC, en el caso exclusivo del contenido endógeno de trehalosa. Así, en la Figura III.19., se muestran los cromatogramas con los picos de elución correspondientes a trehalosa y los polioles, glicerol y D-arabitol tras las distintas condiciones de estrés aplicadas sobre células de la cepa silvestre, mientras que en la Figura III.20. se muestran los mismos parámetros cromatógraficos para el caso del mutante homocigótico *atc1/atc1*. El tiempo de retención de cada compuesto, así como la concentración correspondiente, fueron calculados en función del área de resolución definida, siendo referidas a una muestra patrón pura de cada compuesto, procesada según el mismo procedimiento (Apartado II. 20). Dichas áreas de los picos han sido extrapoladas y calculadas, quedando representadas en la Figura III.21.

Los datos cromatográficos parecen confirmar que el mutante carente de actividad Atc1p funcional, acumuló un mayor contenido de trehalosa a 42°C respecto a la cepa parental. En cambio, frente a una exposición oxidativa severa (50mM H₂O₂), las células parentales sintetizaron una concentración interna más elevada del disacárido. Por otra parte, la adición de 1,2 M NaCl no produjo ninguna modificación relevante sobre los niveles basales de trehalosa, incluso puede apreciarse una cierta disminución (Figura III.21.A.). Estos resultados también guardan una correlación positiva con los ensayos de sensibilidad en placa y viabilidad celular (Figuras III.17 y III.18).

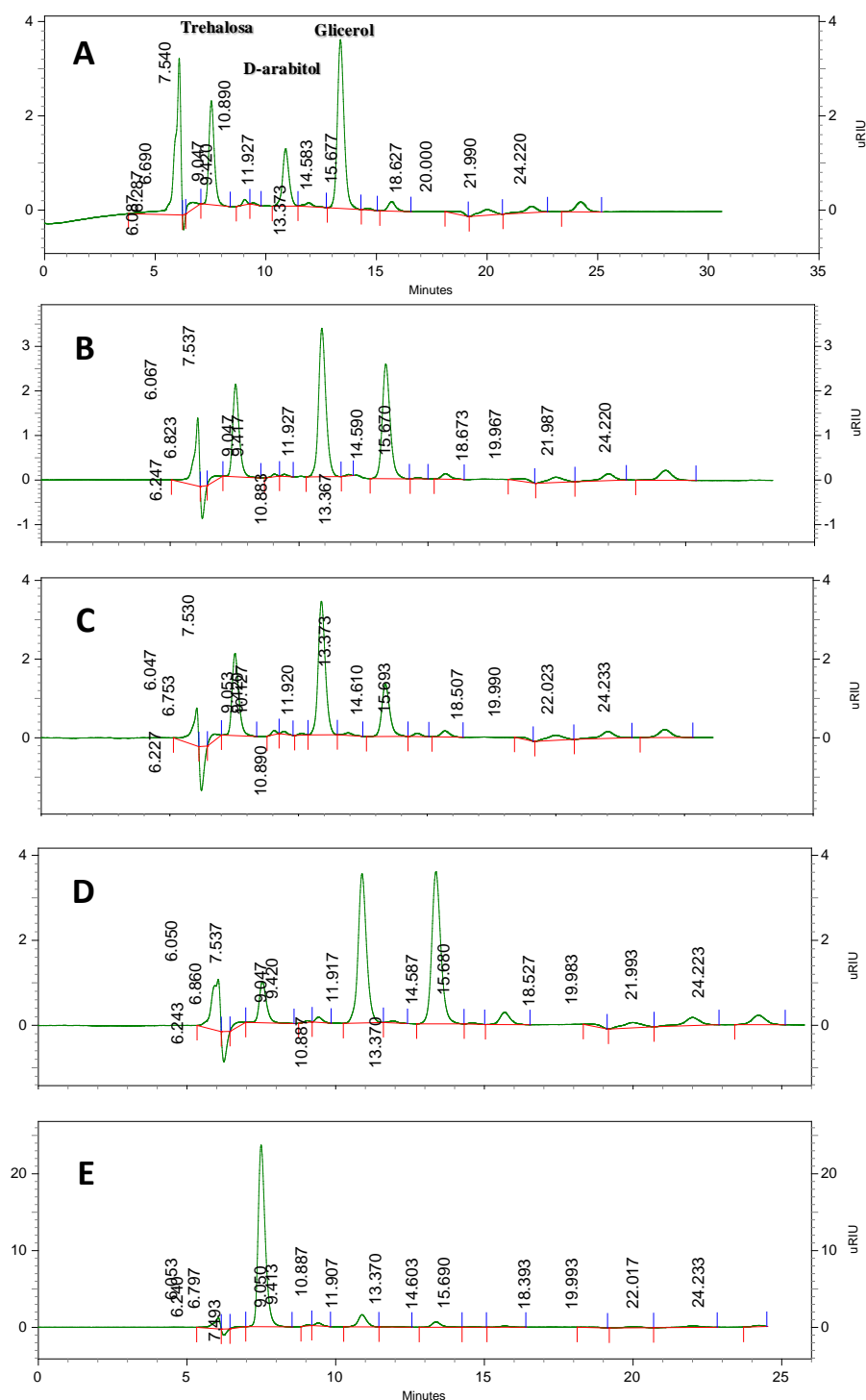


Figura III.19. Análisis cromatográfico (HPLC) del contenido intracelular de trehalosa, glicerol y D-arabitol determinados en la cepa silvestre de *C. parapsilosis* en respuesta a distintos tratamientos de estrés: exposición oxidativa con 5mM (A) y 50mM H₂O₂ (B), choque osmótico/salino (1,2M NaCl) (C) y térmico (42°C) (D). Se representan los diferentes picos de elución (tiempo de retención) de patrones standard en la misma fase móvil, resueltos mediante una columna específica (Bio-Rad HPX-87H), siendo los siguientes: trehalosa endógena (7,480 min), D-arabitol (10,873 min) y glicerol (13,350 min).

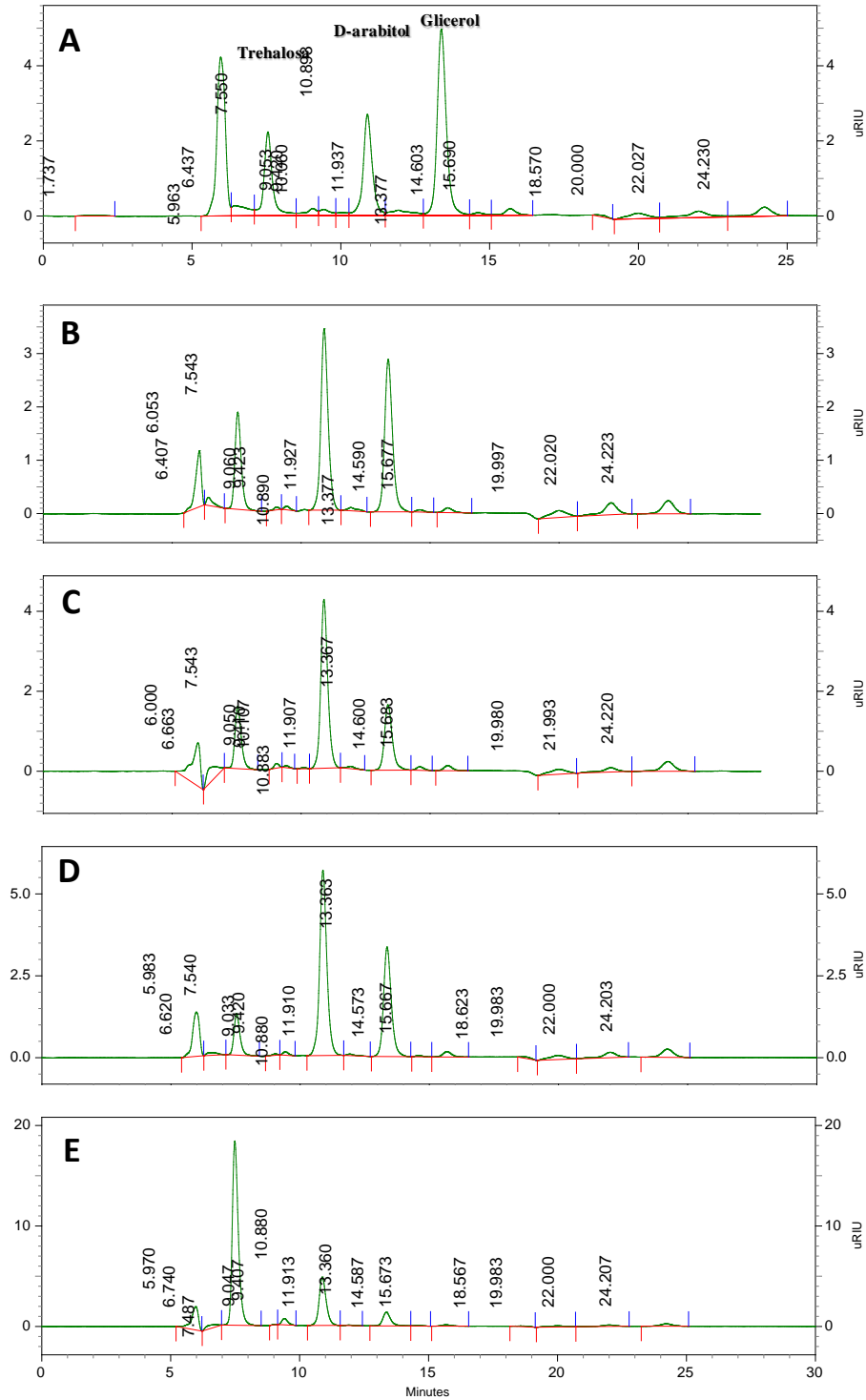


Figura III.20. Representación de las áreas correspondientes a los diferentes picos de elución para trehalosa endógena (7,540 min), glicerol (13,373 min) y D-arabitol (10,890 min.), medidos por HPLC en el mutante nulo (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis* en respuesta a varios tipos de estrés ambiental: estrés oxidativo 5mM (A) y 50mM H₂O₂ (B), salino (1,2M NaCl) (C) y térmico (42°C) (D). Para otros detalles, consultar la Figura III.19.

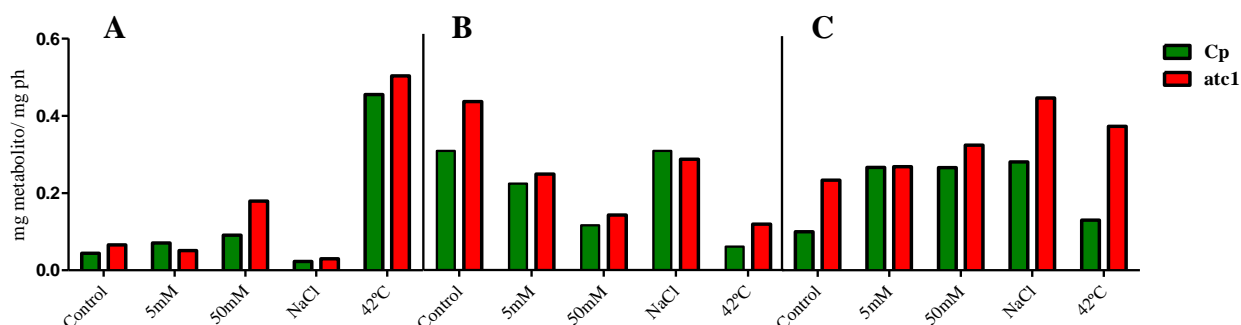


Figura III.21. Determinación cuantitativa del contenido intracelular de trehalosa (A), glicerol (B) y D-arabitol (C) en respuesta a los tratamientos de estrés previamente descritos en las cepas Cp y *atc1/atc1* de *C. parapsilosis*. Los cultivos se crecieron en medio YPD a 30° C y fueron recogidos una vez alcanzada la fase logarítmica de crecimiento ($D.O_{600nm}=1,0-1,2$). Los tratamientos de estrés fueron aplicados durante 1 hora. La determinación cuantitativa se basa en las áreas de resolución de metabolitos por HPLC que se muestra en las Figuras III.19 y III.20 y sigue el protocolo descrito en el Apartado II.20. Los datos se representan como mg metabolito/mg peso húmedo.

Debe ser destacado el elevado nivel basal de glicerol en ausencia de cualquier agresión ambiental (Figura III.21.B.), siendo mayor en el mutante, sin que la aplicación de los distintos agentes estresantes produjera incrementos adicionales; incluso se percibe una disminución notable en respuesta a estrés oxidativo intenso o choque térmico, mientras la pérdida fue mínima en presencia de NaCl (Figura III.21.B.). Como se comentará más adelante (ver Discusión), estas observaciones no concuerdan del todo con las evidencias experimentales similares obtenidas en otras levaduras prototípicas (*C. albicans*, y *S. cerevisiae*). Dichos hongos ascomicetos, sí muestran un elevado contenido de glicerol en respuesta a un intenso estrés oxidativo, térmico y salino (Pahlman *et al.*, 2001).

También se ha valorado el D-arabitol, cuyo papel protector en *C. albicans* ha sido propuesto por Kayingo y Wong, (2005). La cepa silvestre (Cp) incrementó del orden de dos veces la síntesis de este poliol en todos los casos de estrés probado, salvo para el tratamiento térmico a 42°C donde el aumento fue algo menor (Figura III.21.C.). A su vez, en la cepa carente del gen *ATC1*, el contenido interno de D-arabitol se vio incrementado cuando las células fueron expuestas a los distintos agentes estresantes. Merece ser resaltado el comportamiento del mutante *atc1/atc1* nulo frente a estrés térmico (42°C) y choque osmótico (1,2 M NaCl), donde se indujo una pronunciada

síntesis de D-arabitol tanto frente al ensayo control, como a las células parentales sometidas a idéntico desafío (Figura III.21.C.). Los resultados de estrés osmótico/salino son en parte contradictorios con los registrados en *C. albicans*. En este patógeno prevalente, el D-arabitol se sintetiza tras una fuerte adición de agentes oxidantes o subidas de temperatura, pero no en respuesta a estrés osmótico (Kayingo y Wong, 2005).

Simultáneamente, se realizó un experimento paralelo consistente en incubar durante períodos prolongado cultivos de ambos tipos celulares (respectivos controles) hasta alcanzar fase estacionaria tardía, monitorizando en este estadio la acumulación de estos metabolitos protectores mediante el mismo protocolo de HPLC. A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos de dichas muestras estacionarias. Como se puede comprobar en los perfiles de área obtenidos para cada una de las cepas (Figuras III.22 y Figuras III.23., respectivamente) se detectó siempre un mayor pico de acumulación de trehalosa en fase estacionaria, patrón general compartido por otras levaduras (Singer y Lindquist 1998; Argüelles, 2000). Lo mismo ocurre en el caso de D-arabitol, pero en cambio con el glicerol se obtuvo el resultado contrario; observándose como en fase logarítmica se produjo el mayor acumulo intracelular de este polioli.

Por otra parte, no existen diferencias relevantes en el contenido endógeno de trehalosa y D-arabitol entre ambas cepas (Cp y *atc1/atc1*) en fase estacionaria (Figura III.23. A-C). Por el contrario, para el glicerol la cepa silvestre fue la que presentó una acumulación más elevada en fase tardía de crecimiento estacionario (Figura III.23.B.).

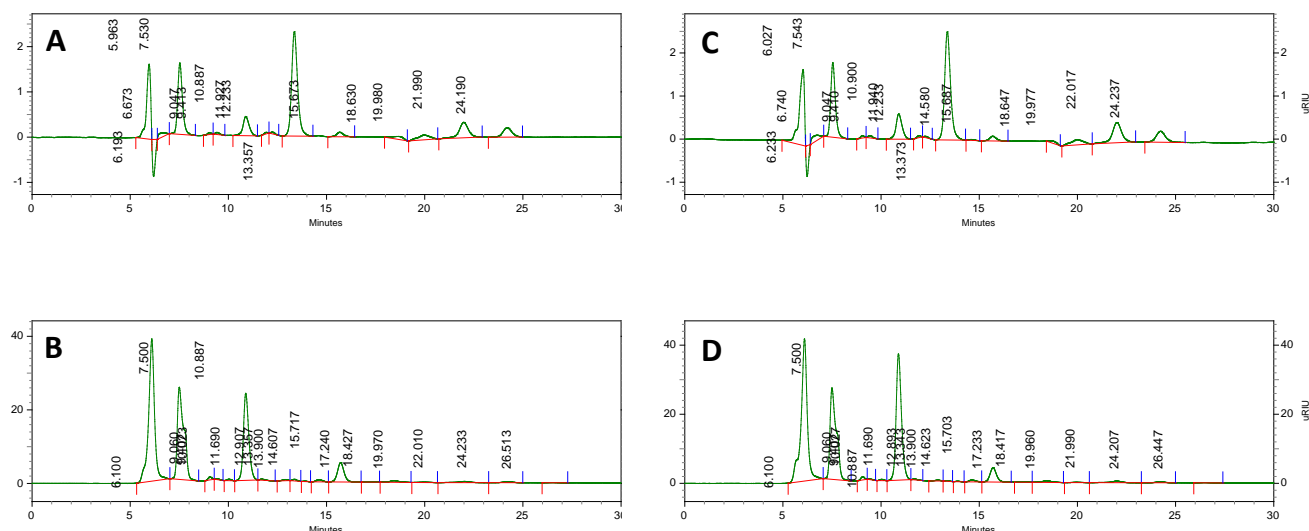


Figura III.22. Representación de los cromatogramas obtenidos por HPLC referentes a la acumulación de trehalosa y de los polioles glicerol y D-arabitol en cultivos recogidos en fase exponencial y estacionaria a 30°C. Los cultivos se crecieron en medio YPD a 30° C y fueron recogidos cuando las células alcanzaron fase logarítmica de crecimiento (D.O._{600nm}=1,0-1,2) y en fase estacionaria (D.O._{600nm}=10-12). Cepa silvestre en fase exponencial **A**) y en fase estacionaria **B**). Cultivos correspondientes al mutante *atc1/atc1* nulo en fase logarítmica **C**) y en estado de reposo **D**).

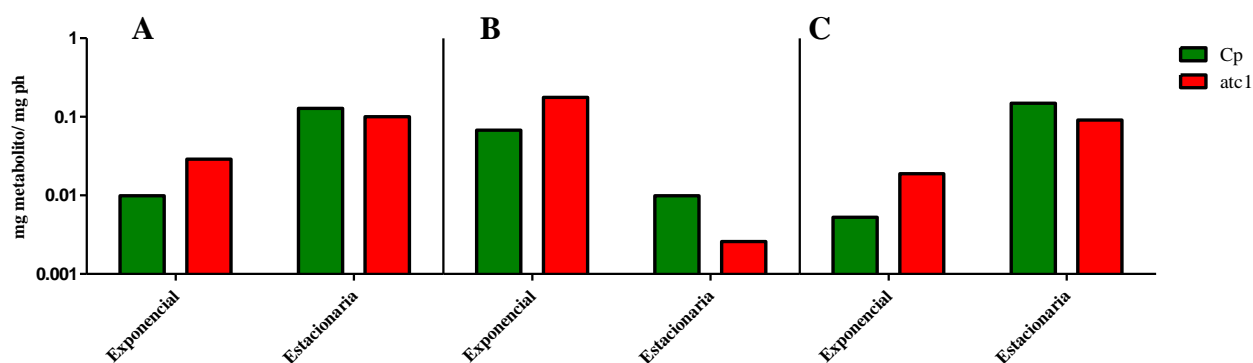


Figura III.23. Contenido intracelular de trehalosa (A), glicerol (B) y D-arabitol (C) en células incubadas hasta fase exponencial y estacionaria de crecimientos, medidos en las cepas Cp y *atc1/atc1* de *C. parapsilosis*. Los datos numéricos han sido calculados a partir de las áreas de elución en columnas de HPLC para trehalosa, glicerol y D-arabitol, correspondientes al experimento que se representa en la Figura III.22. Por ello, se expresan globalmente en mg metabolito/mg peso húmedo.

III.11. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES TREHALASA NEUTRA (Ntc1p) Y ÁCIDA (Atc1p) EN RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO, SALINO Y TÉRMICO.

De forma simultánea, se ha medido en primer lugar la **actividad trehalasa neutra** (Ntc1p) en *C. parapsilosis*, responsable de la hidrólisis fisiológica de trehalosa intracelular en levaduras (Álvarez-Peral *et al.*, 2002, Pedreño *et al.*, 2002; González-Párraga *et al.*, 2003 Sánchez-Fresneda *et al.*, 2009). En todos los casos, el tratamiento oxidativo moderado (5mM H₂O₂) o severo (50mM H₂O₂) aplicado a cultivos logarítmicos, indujo una ligera disminución de la actividad Ntc1p (Tabla III.4.). Estos datos están en consonancia con los obtenidos para diversos fondos genéticos de *C. albicans*, si bien la trehalasa neutra de la cepa CAI.4 resultó ser especialmente sensible a los agentes oxidantes (Conesa, 2005; Pedreño *et al.*, 2006). No obstante, y de modo sorprendente, el estrés térmico (42°C) y el choque osmótico (1,2 M NaCl), promovieron una activación parcial de dicha actividad enzimática para ambas cepas (Tabla III.4).

Tabla III.4. Efecto del estrés oxidativo, salino y térmico sobre las actividades trehalasa neutra (Ntc1p) y trehalasa ácida (Atc1p), en el mutante nulo para el gen *ATC1* y la cepa silvestre isogénica de *C. parapsilosis*. Los cultivos se crecieron en medio YPD a 30° C y fueron recogidos en fase exponencial (D.O._{600nm}=1,0-1,2). Alícuotas idénticas de cada cepa se sometieron durante una hora a estrés oxidativo por adición de 5 y 50mM H₂O₂, estrés osmótico con 1,2 M NaCl y estrés térmico a 42°C, frente a un cultivo control no tratado. Posteriormente fueron procesadas como se indica en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se representan en nmoles glucosa/min/mg proteína y se indica la desviación estándar de las medidas.

Tratamientos	Trehalasa neutra (Ntc1p)		Trehalasa ácida (Atc1p)	
	Cp	<i>atc1/atc1</i>	Cp	<i>atc1/atc1</i>
Control	16,6 ±2,3	14,2 ±2,9	3,1 ±1,6	<0,3
5 mM H₂O₂	17,1 ±2,9	12,1 ±2,9	4,2 ±1,5	<0,3
50 mM H₂O₂	12,4±2,9	9,3 ±1,8	2,9 ±1,4	<0,3
NaCl 1,2 M	20,5 ±4,2	15,6 ±3,7	3,5±2,8	<0,3
42°C	33,7 ±2,8	22,5 ±0,7	3,8±2,5	<0,3

Respecto a la determinación de **actividad trehalasa ácida** (Atc1p) en células pertenecientes a la cepa silvestre (Cp), la aplicación de un estrés oxidativo tolerable (5mM H₂O₂), o de choque osmótico y térmico, provocó una ligera activación de la actividad enzimática respecto al ensayo control (Tabla III.4.). Por el contrario, un estrés oxidativo agudo (50mM H₂O₂), causó una disminución parcial de esta actividad Atc1p. Como cabía esperar, la actividad trehalasa ácida medida en el mutante nulo fue virtualmente indetectable, puesto que los valores obtenidos escapan al límite de resolución del método empleado (Tabla III.4.). Adicionalmente, estas evidencias confirman la correcta doble interrupción del gen *ATC1* en *C. parapsilosis*.

III.12. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS CON FUNCIÓN ANTIOXIDANTE EN RESPUESTA A ESTRÉS.

Los organismos aerobios han desarrollado un complejo sistema defensivo antioxidante, con la finalidad de reparar los daños desencadenados por las denominadas “especies tóxicas del oxígeno” (ROS), consecuencia tanto de su metabolismo oxidativo como de la adición de agentes oxidantes externos (Jamieson 1998; Estruch, 2000). Entre los componentes de este sistema se hallan: (a) Moléculas antioxidantes de tipo no enzimático como los carotenoides, el ascorbato, el glutatión y los tocoferoles. (b) Un conjunto de enzimas con función antioxidante muy bien caracterizada, casi de la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), o las enzimas vinculadas al componente redox glutatión, como la glutatión reductasa (GR) y la glutatión peroxidasa (GPx); además de otras peroxidases, glutarredoxinas y tiorredoxinas (Jamieson *et al.*, 1998; Moradas-Ferreira y Costa 2000; Herrero *et al.*, 2010; González-Párraga *et al.*, 2011). El estudio específico en levaduras patógenas de este grupo de actividades antioxidantes, en respuesta a estrés oxidativo, resulta de gran interés, debido a que en el curso de una infección *in vivo* deben enfrentarse a las formas reactivas del oxígeno (ROS), liberadas durante la ingestión fagocítica por los macrófagos (Murphy, 1991; Seider *et al.*, 2010).

En el presente estudio, hemos investigado el comportamiento de dos de estas enzimas clave: catalasa y glutatión reductasa (GR), con la finalidad de comprobar cuál es el grado de protección antioxidante desarrollado por las cepas de *C. parapsilosis* en respuesta a los desafíos ambientales aplicados. Para ello, empleamos los mismos cultivos utilizados en el Apartado III.10. de la presente Memoria. La descripción del

procedimiento seguido, para determinar dichas actividades enzimáticas se detalla en el Apartado II.18. de Materiales y Métodos.

Inicialmente, se analizaron las posibles variaciones de actividad catalasa frente a las condiciones de estrés previamente definidas. Como se puede comprobar en la Figura III.24., los niveles de catalasa fluctuaron notablemente en función del tratamiento aplicado; mientras la actividad basal de la cepa parental se incrementó tras una exposición oxidativa moderada (5 mM H₂O₂), dicha actividad experimentó una drástica reducción cuando se aplicó una exposición oxidativa más intensa (50 mM H₂O₂), o cuando las células se vieron sometidas a estrés osmótico. Este tipo de respuesta antioxidante específica podría ser provocada por el modo de acción del H₂O₂ sobre las células. En principio, la catalasa actuaría como un marcador sensible a cambios pronunciados en el estado redox citosólico, o indicativos de la aparición súbita de radicales libres (González-Párraga *et al* 2003; Pedreño *et al.*, 2005). Así, tratamientos moderados (5 mM H₂O₂) tienden a favorecer la rápida inducción del estado defensivo antioxidante mediante la rápida activación de la catalasa. Sin embargo, la configuración tridimensional de la molécula nativa se desnaturaliza ante exposiciones más intensas de H₂O₂, quedando afectadas tanto la estructura como la actividad de la enzima, desencadenando una oxidación molecular de la misma en presencia de metales de transición (Stadtman y Oliver, 1991).

Esta misma tendencia se observó con el mutante carente del gen *ATC1*, que presentó una elevada activación de la catalasa tras una exposición oxidativa leve, mientras esta actividad fue disminuyendo conforme se aumentó la concentración del H₂O₂, o con la adición al cultivo del NaCl. Cabe resaltar el alto grado de activación de la catalasa registrado solamente el mutante nulo (*atc1/atc1*). Cuando éste se vio sometido a un estrés térmico de 42°C, dicha actividad enzimática aumentó del orden de tres veces respecto al ensayo control (Figura III.24.). Este resultado, se explica en términos de un mecanismo compensatorio de la célula, que actuaría activando una actividad antioxidante (catalasa) para neutralizar la falta de trehalosa y mejorar el porcentaje de viabilidad celular (Figura III.18.), como ha sido propuesto para el caso de *C. albicans* (González-Párraga *et al.*, 2003).

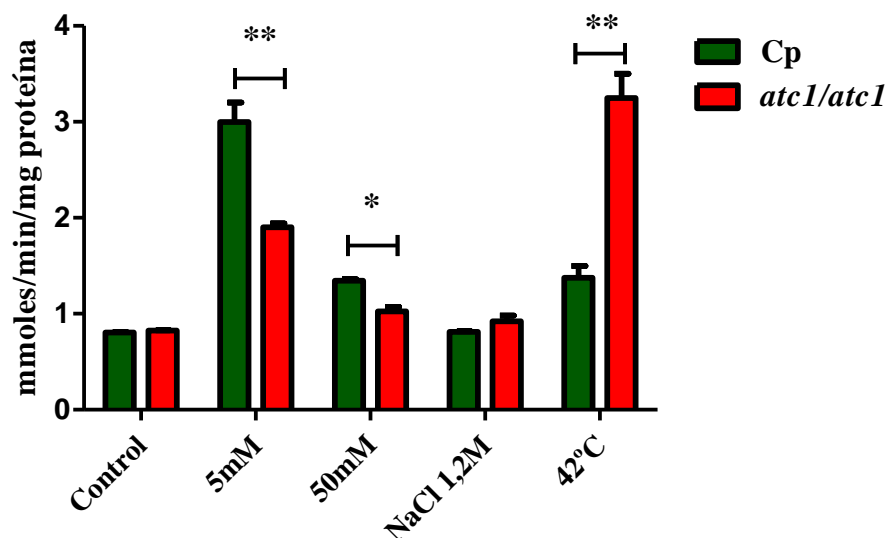


Figura III.24. Efecto del estrés oxidativo, salino y choque térmico sobre los niveles de actividad catalasa en la cepa silvestre (Cp) y el mutante nulo para el gen *ATC1* (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis*. Los cultivos se incubaron en medio YPD a 30° C hasta alcanzar fase exponencial ($D.O_{600nm} = 1,0-1,2$) y después se mantuvieron durante una hora con cada tratamiento específico. La actividad enzimática se midió según el protocolo descrito en el Apartado II.18.1. Las diferencias entre las medias con respecto a ambas cepas fueron significativas a $P < 0,05$ (*) y $P < 0,01$ (**), según la aplicación del test t de Student.

Respecto a la capacidad catalítica de la glutatión reductasa (GR), la misma se indujo significativamente en condiciones de tratamiento oxidativo suave (5 mM H_2O_2) en las dos cepas estudiadas; si bien las células *atc1* registraron una mayor activación de la enzima (Figura III.25.). Por su parte, una exposición oxidativa drástica (50mM H_2O_2) provocó una caída notable de actividad GR en el mutante. Por su parte, la cepa silvestre no mostró incremento alguno, ya que los valores registrados son similares a los detectados en el control basal. La aplicación a los cultivos de NaCl, promovió una ligera activación de la enzima en células parentales, siendo mucho más acusada en las del mutante. Una vez más, quedó constatado que el tratamiento térmico a 42°C, fue el mejor activador de la actividad GR en células carentes del gen *ATC1*.

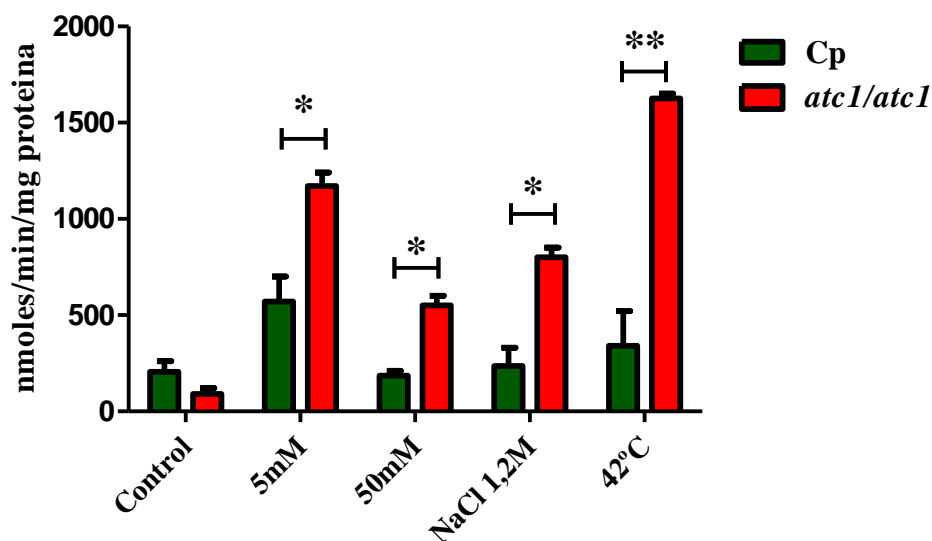


Figura III.25. Cambios en los niveles de actividad glutatión reductasa (GR) en respuesta a exposiciones de estrés oxidativo, salino y choque térmico en las cepas de *C. parapsilosis* (Cp y *atc1/atc1*), objeto de estudio. Los cultivos se incubaron en medio YPD a 30° C hasta alcanzar fase exponencial ($D.O_{600nm} = 1,0-1,2$) y después se mantuvieron durante una hora con cada tratamiento específico. La actividad enzimática se midió según el protocolo descrito en el Apartado II.18.2. Las diferencias entre las medias con respecto a ambas cepas fueron significativas a $P < 0,05$ (*) y $P < 0,01$ (**), según la aplicación del test t de Student.

III.13. ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN DIMÓRFICA EN *C. parapsilosis*.

En hongos patógenos, el proceso de transición morfogénica entre células levaduriformes y estructuras miceliales (hifas y pseudohifas) representa, en esencia, un fenómeno de diferenciación celular producido bien como un mecanismo de infección o colonización de nuevos hábitats, o como respuesta ante señales o factores ambientales externos, tales como la temperatura y el pH, o nutricionales, como la presencia de suero, prolina, N-acetilglucosamina, etc. (Laffey y Butler 2005). El estímulo extracelular se transduce al interior de la célula por medio de diversos y complejos sistemas de transmisión de señales, induciendo una expresión génica diferencial, ocasionando cambios en la regulación del ciclo celular, en el metabolismo o en la conformación de estructuras como la pared celular y el citoesqueleto, cuyo fenotipo aparente es la conversión de la morfología celular (Berman y Sudbery, 2002, Shapiro *et al.*, 2011).

Dicha transición dimórfica es una de las características más importante a investigar en patógenos con alta prevalencia clínica, caso de *C. albicans*, ya que este

proceso está directamente relacionado con su capacidad infectiva (Odds 1994; Lo *et al.*, 1997). A diferencia de *C. albicans*, en el proceso de transición, *C. parapsilosis* no llega a formar hifas verdaderas; de modo que presenta una fase miceliar constituida exclusivamente por pseudohifas (Trofa *et al.*, 2008; Nosek *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se procedió a estudiar la posible implicación del gen *ATC1* en el dimorfismo, utilizando las mismas cepas (parental y mutante (*atc1/atc1*), homocigótico para dicho gen), sometidas a la acción de varias condiciones experimentales y tratamientos, previamente descritos en *C. albicans* como inductores de filamentación, tal y como se detalla a continuación.

III.13.1. INDUCCIÓN DE FILAMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.

Para la realización de este ensayo se utilizaron tres tipos de medios que promueven el desarrollo de hifas: RPMI, YPD suplementado con 10% de suero humano y medio Lee (Elorza *et al.*, 1985; Álvarez-Peral y Argüelles, 2000 González-Párraga *et al.*, 2005).

La formación de tubos germinativos *in vitro* inducida por la adición de suero humano a 37° C en blastoconidios de *C. albicans*, es la primera etapa en la formación de hifas y puede ser un fiel reflejo de la transición levadura → micelio que ocurre en el interior del cuerpo humano, durante el transcurso de una candidiasis sistémica (Sudbery *et al.*, 2004; González-Parraga *et al.*, 2005). En consecuencia, se aplicó esta técnica, adicionando a cultivos de *C. parapsilosis* transferidos a 37° C, suero humano de procedencia clínica, esterilizado mediante filtración (0,45 µm). Este mismo procedimiento ha sido previamente empleado con éxito sobre diversos fondos genéticos de *C. albicans* (Argüelles *et al.*, 1999; Álvarez-Peral y Argüelles, 2000; González-Párraga *et al.*, 2005).

Se partió de cultivos con densidad óptica equivalente para las dos cepas, y se llevo a cabo un seguimiento mediante observación microscópica y recuento con un hemocitómetro (cámara Neubauer) del porcentaje de células que emiten tubos germinativos en un intervalo de 2 horas, tomando muestras a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Tras repetir el ensayo por triplicado, no consiguió ser visualizada la formación de tubos germinativos en ninguna de las condiciones experimentales probadas: ni en medio YPD suplementado con suero, ni utilizando medio RPMI (datos no mostrados),

Resultados

ni tampoco siguiendo la modificación introducida por Elorza *et al.* (1985), consistente en someter cultivos del hongo a un reposo metabólico durante 24 horas y posterior incubación en medio Lee a 37°C (Apartado II.21.1). Sólo con el mero propósito de ilustrar adecuadamente estos experimentos, se recogen observaciones al microscopio óptico procedentes de los dos tipos celulares inducidos en estas condiciones (blatoconidios y pseudohifas), una vez transcurridas 6 y 24 horas de incubación a 37°C en medio Lee (Figura III.26.).

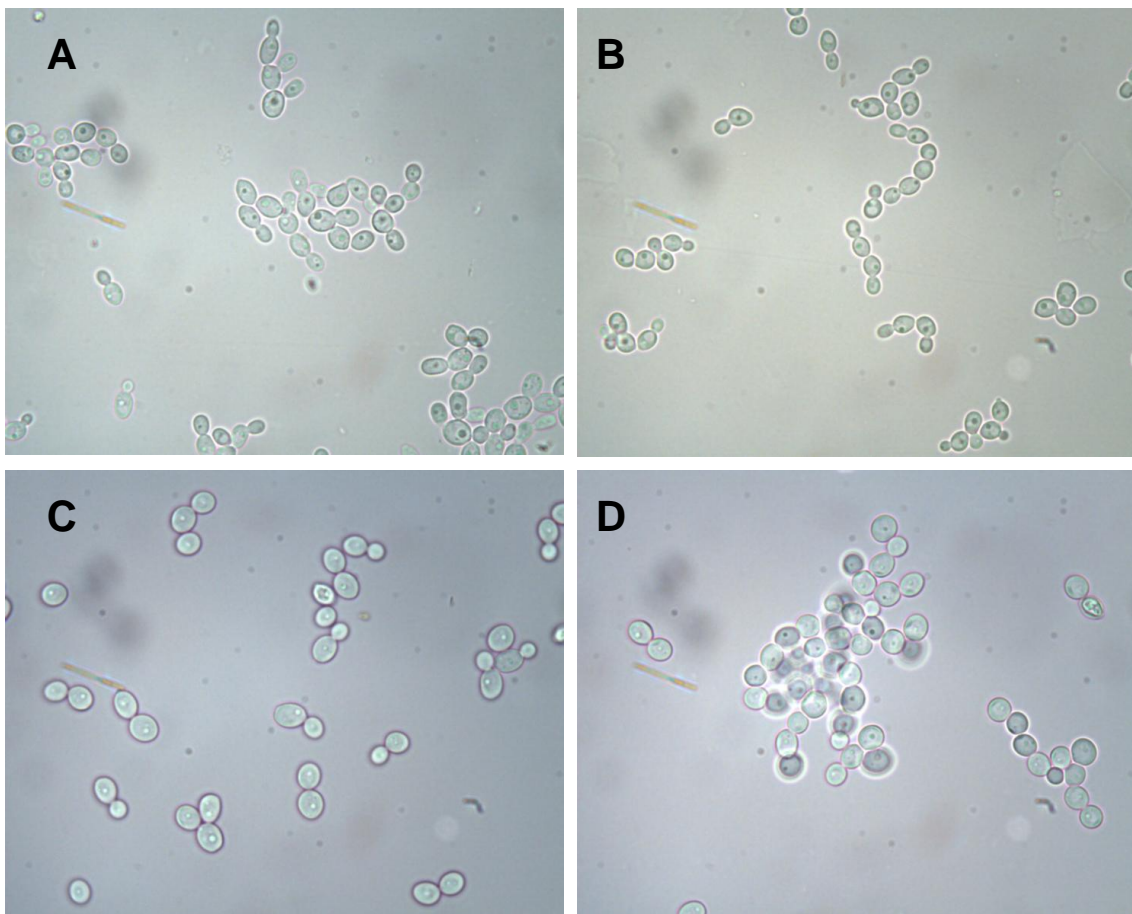


Figura III.26. Micrografías de las cepa silvestre (Cp) de *C. parapsilosis* (A) y el mutante (*atc1/atc1*) (B). Los cultivos se incubaron a 30°C en medio Lee hasta fase estacionaria, fueron sometidos a reposo metabólico y posteriormente incubados a 37°C para inducir conversión dimórfica o se mantuvieron a 30°C para establecer un control de referencia. Las muestras se analizaron por microscopía de contraste de fases (aumento x100). En el panel superior se muestran las imágenes de la cepa parental (A) y el mutante (*atc1/atc1*) (B) tras 6 horas y en panel inferior, tras 24 horas de tratamiento: cepa parental (C) y mutante (D).

III.13.2. MORFOLOGÍA COLONIAL EN PLACA.

Otra aproximación experimental utilizada para examinar la hipotética capacidad de filamentación en *C. parapsilosis*, fue la observación de la morfología colonial en placa, la cual se puede considerar como un reflejo de la morfología celular. Para ello se analizaron las colonias obtenidas al cabo de 7 días de incubación a 37°C en medio Spider (Apartado II.21.2), descrito como un eficaz inductor de la filamentación en *C. albicans* (Liu *et al.*, 1992; Pedreño *et al.*, 2007) y basado en la utilización de una fuente de carbono alternativa, como es el manitol.

Las fotografías que se observan en la Figura III.27, tomadas con una amplificación de 40 y 100 aumentos en este medio Spider, permiten visualizar en detalle la morfología colonial de los dos cultivos. Se comprueba como el aspecto de la superficie exterior de ambas colonias es totalmente liso, sin que en sus bordes aparezca ningún esbozo primigenio de tubo germinativo o estructura filiforme indicativa de filamentación. Por tanto, estos resultados sugieren que la delección de *ATC1* en *C. parapsilosis* no afecta de forma sustancial la morfología externa de las células individuales, ni la morfología colonial desarrollada por un clon de células en división.

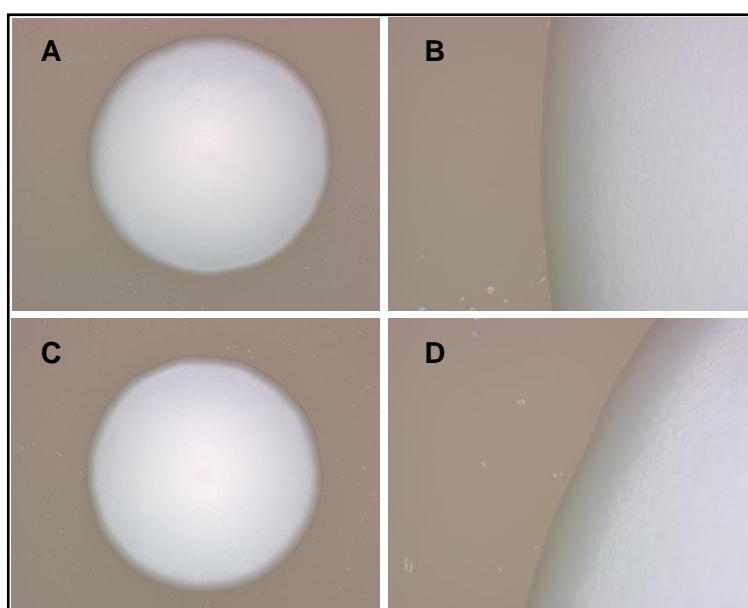


Figura III.27. Análisis de la hipotética variación en la morfología colonial provocada por la doble interrupción del gen *ATC1* en *C. parapsilosis* sobre medio Spider. Se presentan fotografías (40x) de colonias aisladas de la cepa silvestre (Cp) de *C. parapsilosis* (A) y del mutante nulo (*atc1/atc1*) (C), junto con un detalle (100x) de los bordes de las respectivas colonias (B) y (D). Las placas se incubaron durante 7 días a 37°C.

III.14. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD CELULAR FRENTE A DISTINTOS ANTIFUNGICOS.

El conjunto de nuestros estudios fenotípicos sobre la interrupción del gen *ATC1* en *C. parapsilosis* se ha completado con un análisis de la sensibilidad frente a una batería de compuestos antifúngicos de uso clínico común contra *Candida sp.*. Se trata de sustancias con muy diversa estructura química y mecanismo de acción, que interfieren en el metabolismo celular a distintos niveles y podrían revelar la presencia de importantes defectos en funciones o estructuras celulares.

El protocolo experimental fue diseñado según el Patrón Normalizado de Trabajo (PNT) del Centro Nacional de Microbiología del Servicio de Micología (MIC-PT_000017-005), dicho procedimiento se describe más detalladamente en el Apartado II.21 de Materiales y Métodos. La técnica para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antifúngico particular, consiste en la medición por espectrometría de la disminución de la densidad óptica (equivalente al crecimiento del microorganismo) de la suspensión de levaduras, en placas de microdilución que contienen diferentes concentraciones del antifúngico. Como control de calidad para el test de susceptibilidad a los antifúngicos probados, se incluyó una levadura de referencia, procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), cuyas CMIs conocidas y definidas se utilizan como control en los protocolos normalizados de EE.UU, en nuestro caso, se utilizó la cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Es preciso destacar que se aplican diferentes criterios de CMIs según cual sea el antifúngico aplicado. Así, para Anfotericina B, se calculó la CMI-90%, definida como la concentración más baja de antifúngico que permite alcanzar una absorbancia igual o menor al 10% de la medida en el ensayo control de crecimiento (90% de inhibición). En cambio, para la 5-fluorocitosina, los azoles y las equinocandinas, se obtuvo la CMI-50%: la concentración más baja de antifúngico en que la absorbancia es menor o igual al 50% de la absorbancia del control de crecimiento (50% de inhibición).

Como se puede observar en la Tabla III.5. no se observaron diferencias significativas entre los valores de CMIs de las cepas analizadas, ya que todas mostraron aproximadamente el mismo nivel de sensibilidad frente al antifúngico aplicado. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir de modo preliminar que la delección del gen *ATC1* no afecta de forma significativa el grado de susceptibilidad de *C. parapsilosis* frente a los compuestos antifúngicos analizados.

Tabla III.5. Efecto de la doble interrupción del gen *ATC1* sobre la susceptibilidad *in vitro* en *C. parapsilosis* frente a varios antifúngicos de uso clínico habitual. Se han calculado las CMI correspondientes a la cepa silvestre (Cp), el mutante nulo (*atc1/atc1*) y el reintegrante (RE). La lectura se realizó con un espectrofotómetro de ocho canales a una longitud de onda de 530 nm y tras 24 horas de incubación. Para otros detalles, ver Apartado II.22.

Antifúngicos	Rango CMI (µg/ml)	Cp	<i>atc1/atc1</i>	RE
Anfotericina B	0,12-0,5	0,12	0,12	0,12
5-Fluorocitosina	0,12-0,5	0,12	0,12	0,12
Fluconazol	0,5-2	0,50	0,50	0,50
Itraconazol	0,015-0,12	0,015	0,015	0,015
Voriconazol	0,015-0,06	0,015	0,015	0,015
Ravuconazol	0,015-0,03	0,015	0,015	0,015
Posaconazol	0,015-0,03	0,015	0,015	0,015
Caspofungina	0,5-0,2	0,5	0,5	0,5
Micafungina	0,25-1	0,50	0,50	0,50
Anidulafungina	0,25-1	1	1	1

III.15. ESTUDIO DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR DE *C. parapsilosis*.

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la capacidad de adhesión de los microorganismos patógenos a los tejidos y órganos del hospedador. En el caso de *C. parapsilosis*, se ha demostrado que la denominada hidrofobicidad de superficie celular, participa en el proceso de adherencia del hongo a las células epiteliales, así como a materiales plásticos ampliamente utilizados en clínica, como catéteres, sondas y prótesis diversas (Laffey y Butler 2005; Trofa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011).

Debido a que el gen *ATC1* presumiblemente podría codificar una proteína localizada en la superficie externa de la pared celular, como ocurre con *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004), se analizó su posible contribución a la hidrofobicidad mediante

citometría de flujo, cuantificando la tasa de unión a bolas de látex-poliestireno fluorescentes, tal y como se describe en el Apartado II.23.

Alícuotas idénticas de cultivos crecidos en YPD sólido de las tres cepas de *C. parapsilosis* objeto de estudio, se incubaron en ausencia o presencia de bolas de látex-poliestireno fluorescentes con agitación orbital a temperatura ambiente. A diferentes tiempos (0, 15 y 30 minutos), se retiraron y procesaron muestras que fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la intensidad de fluorescencia de las levaduras; intensidad que fue proporcional al número de bolas unidas a las células individuales.

Como se puede apreciar en la Figura III.28.A, el patrón de autofluorescencia registrado para las tres cepas estudiadas resultó ser prácticamente idéntico. En cuanto las levaduras se pusieron en contacto con las bolas, un porcentaje de la población celular apareció inmediatamente (tiempo 0) unida a las mismas, sin que existan diferencias reseñables entre las cepas (Figura III.28.B.). Sin embargo, sí se apreciaron diferencias en la tasa de unión a las bolas de látex transcurridos 15 o 30 minutos de incubación (Figuras III.28.C. y D.), dichas diferencias fueron menores para las dos cepas, homo y heterocigótica, afectadas en la actividad de la proteína Atc1p. A su vez, la cepa silvestre (Cp) posee mayor hidrofobicidad, ya que se une más eficientemente a las bolas, siendo por tanto, mayor la intensidad de fluorescencia detectada. En consecuencia, el gen *ATC1* podría jugar algún papel en la capacidad de adhesión de *C. parapsilosis*, ya que los mutantes: heterocigótico (*ATC1/atc1*) y homocigótico (*atc1/atc1*) son menos hidrofóbicos en comparación con la cepa silvestre, puesto que se unen de manera menos eficiente a las bolas y se detecta una menor fluorescencia (Figuras III.28. C. y D.).

La hidrofobicidad de las levaduras está relacionada con la expresión de glicoproteínas de la superficie externa de la pared celular (Martínez-Esparza *et al.*, 2006; Martínez-Esparza *et al.*, 2011). Para *C. albicans* se ha comprobado que la misma, es proporcional al grado de beta-manosilación de las moléculas de la pared (Masuoka y Hazen, 2004). En este sentido, Lima-Neto *et al.* (2009) han descrito la existencia de una correlación positiva entre la adherencia de *C. albicans* y *C. parapsilosis* a los tejidos del hospedador y la hidrofobicidad, que está en función de la presencia y número de residuos de L-fucosa en los glicoconjugados de la superficie celular.

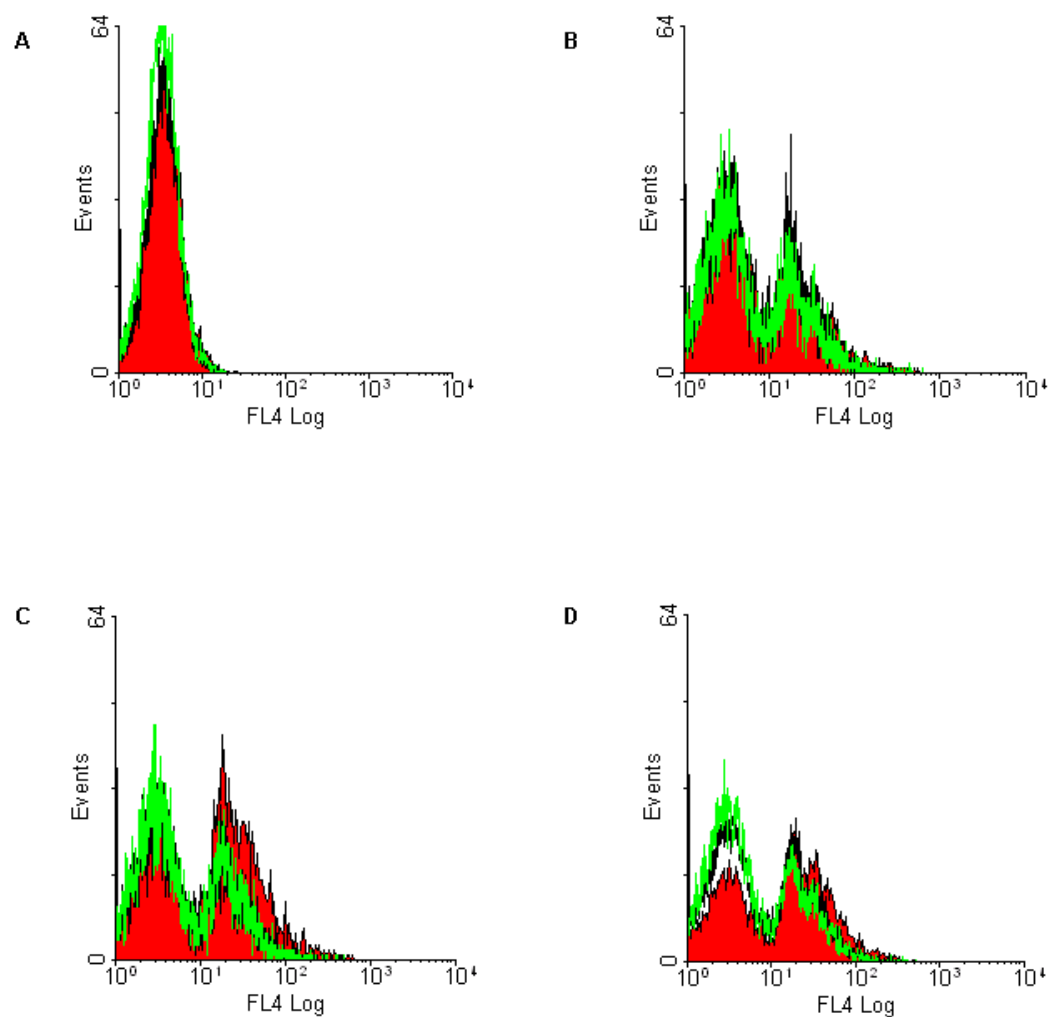


Figura III.28. Análisis de la hidrofobicidad de *C. parapsilosis* en respuesta a la interrupción del gen *ATC1*. Mediante citometría de flujo laminar, se determinó la hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas silvestre (Cp, histograma rojo) y de los mutantes: heterocigótico (*ATC1/atc1*, histograma negro) y homocigótico (*atc1/atc1*, histograma verde) para el gen *ATC1*; como se detalla en Apartado II.23. Las levaduras se crecieron en placas de YPD durante 12 h, se lavaron e incubaron en ausencia (A), o presencia de bolas de látex-poliestireno fluorescentes a un ratio 1:1, a tiempo cero (B), 15 minutos (C), y 30 minutos (D). A continuación, se midió su fluorescencia.

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL GEN *ATC1*
CON EL SISTEMA INMUNITARIO**

III.16. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LISIS MEDIADA POR MACRÓFAGOS HUMANOS.

Para evaluar su implicación en virulencia, se estudió el efecto de la disrupción del gen *ATC1* sobre la supervivencia a lisis mediada por macrófagos. Estas células del sistema inmune innato, son las principales responsables de la eliminación de patógenos fúngicos mediante la fagocitosis y posterior digestión intracelular en los fagolisosomas (Seider *et al.*, 2010). Las líneas celulares monocíticas se emplean frecuentemente en el estudio de la interacción entre los patógenos y los macrófagos debido a su facilidad de expansión celular *in vitro*, su estado de activación definido y la ausencia de variaciones genéticas entre ellas, lo que genera resultados reproducibles. Por todo ello, se emplearon macrófagos procedentes de la línea celular monocítica humana U937 que fueron co-cultivados con las cepas parental (Cp), heterocigótica (*ATC1/atc1*) y homocigótica (*atc1/atc1*) para el gen *ATC1* de *C. parapsilosis*.

La obtención de macrófagos a partir de esta línea celular U937 indiferenciada, se realizó como se indica en el Apartado II.2. de Materiales y Métodos, adicionando al cultivo PMA (10 ng/ml). Tras incubación durante 24 h, se observó un cambio morfológico en la línea celular: las células redondas, aisladas y en suspensión en el medio de cultivo, se convirtieron en células adherentes que formaron agregados celulares, para luego fijarse a la base de la placa de cultivo.

En estos experimentos, se consideró conveniente introducir la cepa silvestre de *C. albicans* SC5314 (Ca), con la que se tiene una amplia experiencia en el laboratorio como referencia interna, con el fin de comparar nuestra levadura con otra especie dentro del mismo género. Como se aprecia en la Figura III.29., la cepa silvestre de *C. parapsilosis* (Cp) presentó una mayor tasa de supervivencia a digestión fagocítica respecto a *C. albicans* (Ca). Respecto a los mutantes de *C. parapsilosis*, la menor viabilidad en respuesta a lisis mediada por macrófagos correspondió al mutante nulo (*atc1*), siendo por tanto, el más sensible a la lisis mediada por macrófagos (Figura III.29.). Los resultados sugieren que el gen *ATC1* está implicado en la virulencia de *C. parapsilosis* y, por tanto, juega un papel importante en su resistencia intracelular frente a los macrófagos.

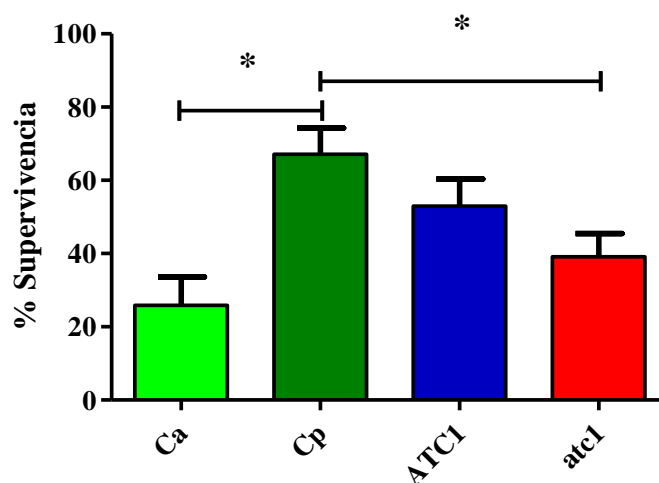


Figura III.29. Tasa de supervivencia de *C. parapsilosis* a la lisis mediada por los macrófagos de la línea celular humana U937. Células de la cepa silvestre (Cp) y de los mutantes heterocigótico (ATC1/*atc1*), homocigótico (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis*; así como de la cepa parental de *C. albicans* (Ca) fueron sembradas en placas de YPD durante 12h. Tras lavado con PBS, se cultivaron con la línea celular humana U937, a un ratio macrófago: levadura de 1:1, a 37° C durante 2h. Tras este tiempo de incubación, se lisaron los macrófagos y las levaduras liberadas se sembraron en placas de medio YPD. La evaluación de la supervivencia se realizó mediante recuento de las unidades formadoras de colonias en las placas a las 48 h de incubación a 30° C. La distinción entre los valores medios obtenidos fueron estadísticamente significativos (* P < 0.05), según el test t de Student. Se representa una media de tres experimentos independientes y los valores mostrados corresponden a la media más la desviación estándar obtenida.

III.17. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DEL GEN *ATC1* DE *C. parapsilosis* EN LA INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN MACRÓFAGOS.

Con el fin de lograr una mejor comprensión de la interacción entre el hongo oportunista, *C. parapsilosis* con su hospedador, y estudiar la implicación del gen *ATC1*, en la producción de citoquinas, se determinó el perfil de las mismas, producidas por los macrófagos como respuesta a la infección por dicha levadura.

Se evaluó la expresión de las citoquinas TNF- α y IL-6, principales citoquinas proinflamatorias, cruciales para una buena respuesta inmune frente a hongos. También se valoró la producción de IL-10, fuerte inhibidor de la activación de los macrófagos y de la respuesta inflamatoria, que es inducida por algunos hongos como *C. albicans* para evadir la respuesta del sistema inmunitario. Todas ellas se cuantificaron mediante la técnica ELISA, tal y como se describe en el Apartado II.25 de Materiales y Métodos, en

los sobrenadantes de cultivo de la línea celular humana U937, tanto a nivel basal, como en respuesta a la infección con las diferentes cepas de *C. parapsilosis*. Igual que en el apartado anterior, se introdujo en el análisis la cepa silvestre de *C. albicans* (Ca).

Como se muestra en la Figura III. 29., la presencia de las diferentes levaduras en co-cultivo con macrófagos, provocó una marcada activación de los mismos, viéndose reflejada en el incremento de la producción de TNF- α e IL-10 (Figura III.30. A. y C.).

Debe resaltarse que los niveles de TNF- α liberados (Figura III.30.A.) manifestaron una diferencia muy notable entre *C. albicans* (Ca) y *C. parapsilosis* (Cp), siendo *C. albicans* la que indujo un mayor incremento para dicha citoquina. Respecto al análisis específico de los mutantes de *C. parapsilosis*, cabe señalar que en presencia del mutante homocigótico (*atc1/atc1*) para el gen *ATC1*, se indujeron los mayores niveles de producción de TNF- α , siendo menores para la cepa heterocigótica y la silvestre (Figura III.30.A.).

Sin embargo, cuando se analizó la citoquina IL-6 (Figura III.30.B.), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones liberadas entre *C. albicans* y el ensayo control, lo que nos indica que *C. albicans* apenas estimula liberación de esta citoquina en estas condiciones de infección. Sin embargo, se observa una tendencia a una menor concentración de IL-6 en presencia de *C. parapsilosis*, aumentando en la cepa interrumpida en un solo alelo del gen *ATC1*.

Por lo que hace referencia a la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, por macrófagos humanos en cultivo, representada en la Figura III.30.C., se observó una tendencia equivalente a la encontrada para TNF- α : *C. albicans* indujo mayor producción de IL-10 que *C. parapsilosis*. En el caso de los mutantes de *C. parapsilosis*, aumentos reseñables en la secreción de esta citoquina se dieron en el mutante nulo para el gen *ATC1*, seguida de la cepa heterocigótica y la silvestre (Figura III.30.C.), lo que parece sugerir la existencia de un efecto dependiente de la dosis génica del gen *ATC1*.

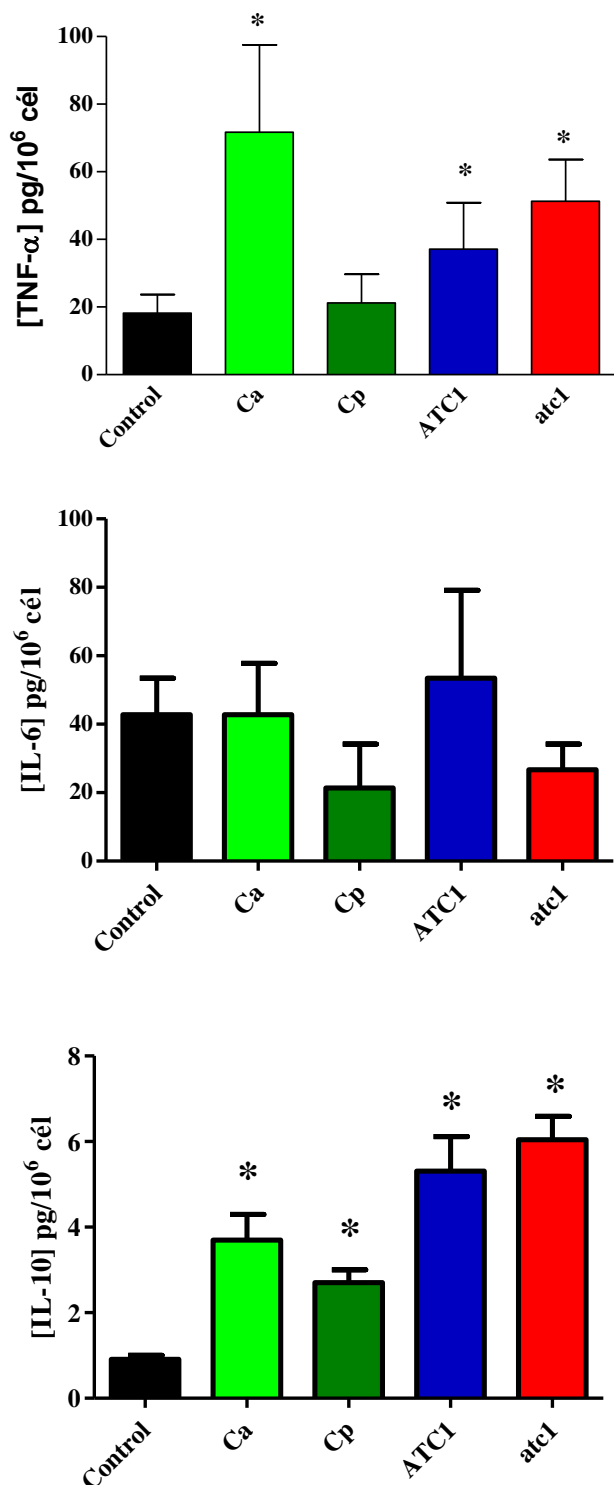


Figura III.30. Nivel de producción extracelular de citoquinas por macrófagos en respuesta a la infección de diferentes cepas de levaduras. Células de la cepa silvestre (Cp) y de los mutantes heterocigótico (*ATC1/atc1*), homocigótico (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis*, así como de la cepa SC5314 de *C. albicans*, (Ca) fueron sembradas en placas de YPD durante 12h. Tras lavado con PBS, se cocultivaron con la línea celular humana U937, a un ratio macrófago: levadura, 1:1, a 37° C durante 2h. La concentración de citoquinas expresada en pg/millón de macrófagos en los sobrenadantes de los cultivos macrófago-levadura fueron determinados mediante ensayos ELISAs comerciales. La distinción entre los valores medios obtenidos fueron estadísticamente significativos (* P < 0.05), según el test t de Student. Se representa una media de tres experimentos independientes y los valores mostrados corresponden a la media más la desviación estándar obtenida.

III.18. DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NITRICO.

El óxido nítrico (NO) es una sustancia microbicida sintetizada en el interior de los fagosomas, por los macrófagos para destruir los microorganismos que han sido fagocitados. Esta reacción esta catalizada por la enzima óxido nítrico-sintetasa (NOS), que combina el oxígeno molecular con el nitrógeno de la L-arginina, para generar el NO.

Procedimos a determinar si las diferencias encontradas en la tasa de supervivencia de los mutantes afectados en el gen *ATC1* (Figura III. 29.), estaban correlacionadas con diferencias en la cantidad de NO que los macrófagos producían en respuesta a la infección. Para ello, medimos la concentración de nitritos en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos incubados durante 2 h. con las cepas silvestre, heterocigótica y homocigótica para dicho gen de *C. parapsilosis*, o con la cepa silvestre de *C. albicans*, empleada como control interno. La relación macrófago: levadura fue de 1:1, el NO se valoró tal y como se describe en el Apartado II. 26 de Materiales y Métodos.

Los datos recogidos en la Figura III.31., a pesar de que las diferencias no son estadísticamente significativas, parecen indicar que la mayor producción de óxido nítrico ocurre cuando los macrófagos se infectan con el mutante nulo de *C. parapsilosis* (*atc1/atc1*), disminuyendo para la cepa heterocigótica (*ATC1/atc1*) y aún más para la parental (Cp). Por el contrario, *C. albicans* (Ca) indujo una mayor producción de NO que *C. parapsilosis* (Figura III.31.). Estos resultados se correlacionan con los relativos a la tasa de supervivencia y la secreción de las citoquinas TNF- α e IL-10, ya que la inducción de una mayor producción de citoquinas (Figura III. 30. A. y C.) y NO (Figura III. 31.) en los macrófagos, coincide con una clara disminución en la tasa de supervivencia de células de *C. parapsilosis* (Cp) a la lisis mediada por los mismos (Figura III. 29.). Por tanto, el mutante nulo para el gen *ATC1*, es menos virulento que su cepa parental ya que, es el más sensible a la lisis mediada por macrófagos, debido a que estimula más eficientemente la liberación de NO y TNF- α e IL-10 por parte de los macrófagos. Cuando comparamos los resultados obtenidos para las cepas silvestres de *C. albicans* y *C. parapsilosis* observamos que *C. albicans* induce mayores niveles de producción de NO (Figura III.31.) y de citoquinas (Figura III.30.), al ser internalizada

por los macrófagos, presentando una menor supervivencia a la lisis mediada por los mismos; mientras que *C. parapsilosis* parece mostrar una mayor resistencia a la digestión fagocítica por macrófagos (Figura III.28). Estos datos indicarían que *C. parapsilosis* es más virulenta que *C. albicans* en modelo de infección *in vitro* con macrófagos humanos.

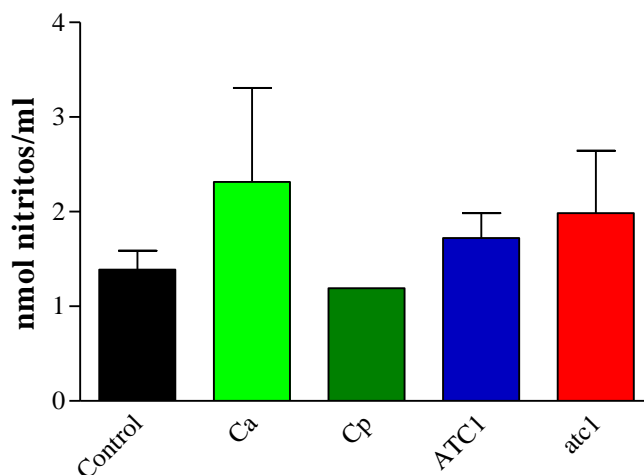


Figura III.31. Determinación del óxido nítrico liberado por los macrófagos en sobrenadantes de cultivo inducido por las diferentes cepas de *Candida sp.* Las células de la cepa silvestre (Cp) y de los mutantes heterocigótico (ATC1/*atc1*) y homocigótico (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis*; así como de *C. albicans* (Ca) fueron sembradas en placas de YPD durante 12h. Tras lavado con PBS, se cultivaron con la línea celular humana U937, a un ratio macrófago: levadura 1:1, a 37° C durante 2h. La concentración de nitritos expresada en nmol/ml en los sobrenadantes de los cultivos macrófago-levadura fueron determinados mediante kit comercial. Se representa una media de tres experimentos independientes y los valores mostrados corresponden a la media más la desviación estándar obtenida.

III.19. ESTUDIO DE LA INVASIVIDAD DE *C. parapsilosis* EN MODELO MURINO.

Los mutantes más sensibles a la lisis mediada por macrófagos, son normalmente menos virulentos en modelos de infección con ratones (Martínez-Esparza *et al.*, 2006; Gácsér *et al.*, 2007), pero la resistencia a la acción fagocítica de los macrófagos no es el único factor determinante de la virulencia en las levaduras. Otras células del sistema inmune, como por ejemplo neutrófilos o células dendríticas, además de la respuesta humoral, juegan un papel importante en la defensa contra las infecciones sistémicas (Seider *et al.*, 2010). Por ello, los experimentos *in vitro* son útiles, ya que permiten la

medida de procesos individuales implicados en las interacciones entre el huésped y el patógeno. No obstante, se necesita abordar una combinación de estudios *in vitro* e *in vivo* para profundizar en la importancia de cada componente individual en el proceso y así poder comprender en conjunto esta compleja interacción.

Con esta premisa, decidimos comprobar como se comportaban los mutantes carentes del gen *ATCI*, cuando el sistema era más complejo, partiendo de la base que dicha levadura presenta una gran invasividad, debido a la capacidad que posee para formar biopelículas (Trofa *et al.*, 2008).

Los modelos de infección murinos son los que más se utilizan, ya que se asemejan al sistema humano. Esta aproximación ha demostrado ser de mucha utilidad en estudios realizados con *C. albicans* que presenta una gran virulencia en modelo murino. Se ha estudiado la contribución a la virulencia de determinadas moléculas empleando mutantes nulos para los genes que los codifican (Pedreño *et al.*, 2007). Sin embargo *C. parapsilosis* no parece ser letal en el modelo murino. El grupo de Nosanchuck ha demostrado la existencia de diferencias en la invasividad de mutantes para la lipasa (Gácsér *et al.*, 2007) y la sintetasa de ácidos grasos (Nguyen *et al.*, 2009) de *C. parapsilosis*, tras inyección intraperitoneal, pero no cuando la inoculación se realizaba de forma intravenosa, no siendo mortal en ninguno de los dos casos.

En primer lugar, se realizó un experimento donde se inyectó intravenosamente la cepa silvestre de *C. parapsilosis* a 6 ratones hembras, con la finalidad de comprobar si nuestro aislado producía la muerte de los ratones. Para ello se empleó un inóculo de $1,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias en un volumen de 150 μ l de PBS que se inyectó en la vena caudal de los ratones. Los resultados obtenidos no se muestran en la memoria, ya que la infección con *C. parapsilosis* en estas condiciones experimentales no fue capaz de producir la muerte de los ratones.

Por ello y en base a la premisa de que *C. parapsilosis* posee una nula o escasa virulencia sobre los ratones, decidimos estudiar la posible implicación del gen *ATCI* en la invasividad, en modelo murino. Para ello, se utilizaron ratones hembras Swiss-immunocompetentes de 6 a 8 semanas de edad y con un peso medio de 26-28 g. (Materiales y Métodos II.27.), donde cada inóculo se inyectó por vía intraperitoneal, con el fin de evaluar la invasividad de las diferentes cepas, termino entendido, como la capacidad de dicha levadura para entrar en el cuerpo y diseminarse por los tejidos, llegando a invadir los diversos órganos; en este caso seleccionamos los riñones del animal. A los tres días de la inyección, los ratones fueron sacrificados y se les extrajeron

los riñones, que se homogeneizaron y, de inmediato, se sembraron distintas diluciones de estos homogeneizados en placas de YPD. Las placas se mantuvieron a 28° C durante 48h y transcurrido ese tiempo se contaron las unidades formadoras de colonias por mg de tejido, para las tres cepas.

Como muestra la Figura III. 32., los mutantes (hetero y homocigóticos para el gen *ATC1*) presentaron una menor capacidad de invasividad, si la comparamos con la cepa parental (Cp). Estos datos además concuerdan con los resultados obtenidos en los estudios de la interacción *in vitro* con macrófagos (Figura III.29.), donde se reflejaba que el mutante nulo (*atc1/atc1*) era el más sensible a la lisis por los mismos.

Aunque el modelo de infección murino *in vivo* deja que desear, puesto que el sistema inmunitario del ratón acabaría eliminando tanto a la cepa silvestre como a los mutantes, los resultados indican que las cepas deficientes en *ATC1* son menos invasivas.

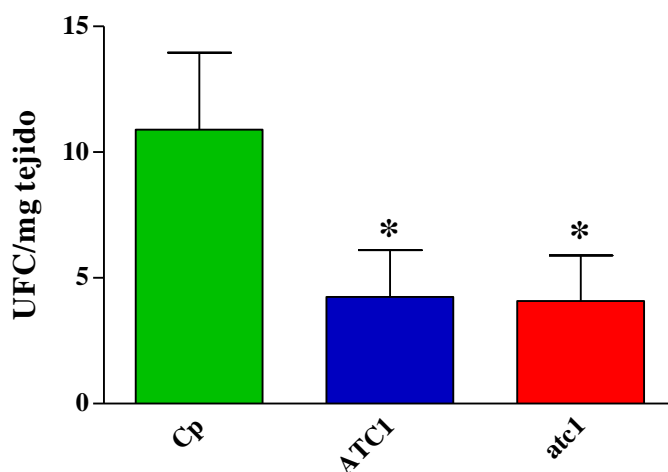


Figura III. 32. Capacidad de colonización de las cepas de levaduras en el riñón de ratón. Las células de la cepa silvestre (Cp) y de los mutantes heterocigótico (*ATC1/atc1*) y homocigótico (*atc1/atc1*) de *C. parapsilosis* fueron sembradas en placas de YPD durante 12h. Tras lavado con PBS, se inyectaron intraperitonealmente en ratones Swiss. A los 3 días se sacrificaron los animales, se extrajeron y homogeneizaron los riñones. Los extractos se sembraron en placas YPD y se contabilizaron las unidades formadoras de colonias por mg de tejido de riñón tras 48h de incubación a 30° C. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. La distinción entre los valores medios obtenidos fueron estadísticamente significativos (* $P < 0.05$), según el test t de Student. Se representa una media de tres experimentos independientes y los valores mostrados corresponden a la media más la desviación estándar obtenida.

III.20. ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE *C. parapsilosis* EN MODELO NO MAMIFERO: *Galleria mellonella*.

Actualmente este modelo se ha propuesto como método de selección y como estudio complementario para la identificación de cepas relevantes en patogenicidad en otras levaduras dentro del género *Candida*, como *C. albicans* (Cotter *et al.*, 2000) y *C. tropicalis* (Mesa-Araujo *et al.*, 2012) y otras levaduras como *Cryptococcus neoformans* (García-Rodas *et al.*, 2011) para posteriormente poder trasladarlas a los modelos de mamíferos (Fuchs *et al.*, 2010).

Los ensayos convencionales *in vivo* para evaluar la patogenicidad relativa de los diferentes aislados de levaduras, se basan en el uso de especies de mamíferos, concretamente el modelo de ratón (Kavanagh *et al.*, 2000). Por ello, quisimos investigar la posibilidad de utilizar, el insecto *Galleria mellonella* como un nuevo modelo no-mamífero para pruebas de patogenicidad *in vivo*, ya que nuestra levadura objeto de estudio, *C. parapsilosis*, según los datos expuestos en el presente trabajo y las fuentes bibliográficas revisadas, en modelo de ratón no fue capaz de producir la muerte, aún incluso aumentando la dosis del inóculo (Arendrup *et al.*, 2002).

Por tanto, nuestro objetivo fue el de estudiar la respuesta entre *G. mellonella* y *C. parapsilosis*, con la finalidad de poder realizar un cribado entre las cepas interrumpidas en el gen *ATCI* y su parental, reproduciendo un nuevo modelo de infección e investigando la respuesta del sistema inmune del insecto durante la infección por este patógeno.

III.20.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO EN ENSAYOS DE VIRULENCIA EN LARVAS DE *G. mellonella*.

Para poder estudiar la respuesta de la infección de nuestro aislado clínico *C. parapsilosis* en larvas de *G. mellonella*, en primer lugar, se procedió a ajustar la dosis del inóculo de levaduras, para posteriormente realizar los ensayos de virulencia con los diferentes mutantes para el gen *ATCI*. Para ello, realizamos un ensayo empleando distintas concentraciones de levaduras (1×10^7 lev/larva; 5×10^6 lev/larva y $2,5 \times 10^6$ lev/larva) pertenecientes a la cepa silvestre de *C. parapsilosis*, tal y como se indica en el Apartado II.28. de Materiales y Métodos. En el ensayo, se emplearon 20 larvas por cepa y condición.

En la Figura III.33. se puede observar como la inoculación de dosis elevadas (1×10^7 lev/larva) para dicha cepa, produce la muerte de las larvas en pocos días (2 días). Por el contrario, la inoculación de dosis menores (5×10^6 lev/larva y $2,5 \times 10^6$ lev/larva) permite la supervivencia de las larvas durante más tiempo. Cabe destacar que la muerte de las larvas es dependiente de la concentración del inóculo empleado. Finalmente, se seleccionó la concentración del inóculo de $2,5 \times 10^6$ lev/larva, ya que nos interesaba que la supervivencia se prolongara hasta un máximo de 7 días y como observamos con esa concentración de inóculo, las larvas sobreviven durante aproximadamente 5 días.

Se aplicó el test estadístico Log-rank (Mantel-Cox), y se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$), para el caso de la cepa silvestre; comparando la concentración de 1×10^7 lev/larva con la de 5×10^6 lev/larva encontramos una $P < 0,001$ (**), y comparando la concentración de 1×10^7 lev/larva con $2,5 \times 10^6$ lev/larva una $P < 0,0001$ (***).

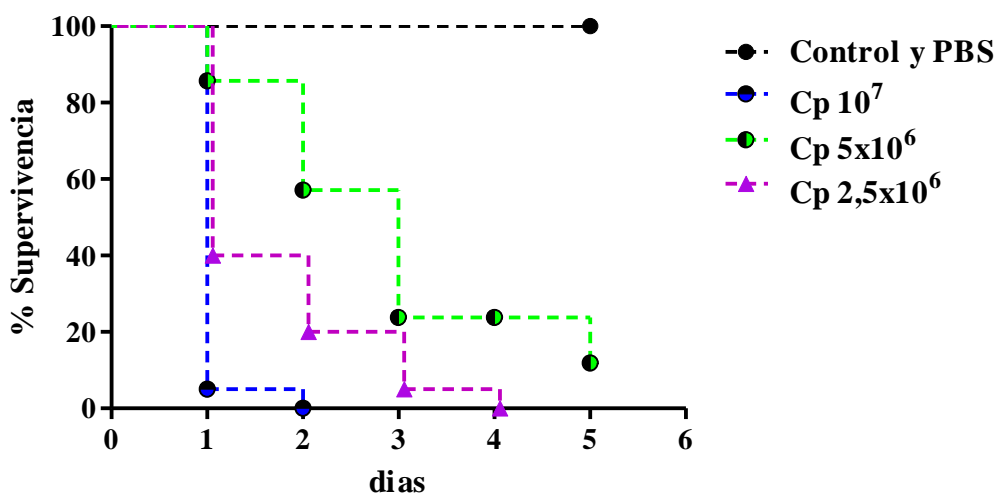


Figura. III.33. Estudio de la virulencia de *C. parapsilosis* en larvas de *Galleria mellonella*. Diferentes dosis (1×10^7 ; 5×10^6 y $2,5 \times 10^6$ lev/larva) de la cepa parental fueron inoculadas a grupos constituidos por 20 larvas. Se incluyeron dos controles: uno que consistió en 10 larvas sin inocular (control) y el otro, consistió en 10 larvas a las cuales se les inoculó PBS (PBS). La representación de la supervivencia se realizó mediante la utilización del gráfico de Kaplan-Meier. El experimento fue repetido tres veces con resultados consistentes y se representan los datos de un experimento significativo.

III.20.2. ENSAYO DE VIRULENCIA.

Una vez estandarizada la concentración del inóculo ($2,5 \times 10^6$ lev/larva), nos propusimos evaluar la capacidad de virulencia de tres cepas: la cepa parental (Cp), el mutante homocigótico para el gen *ATCI* (*atc1/atc1*) y la cepa reintegrante (RE) de *C. parapsilosis*, siguiendo el mismo protocolo establecido en el Apartado II.28. de Materiales y Métodos. Para ello, se utilizaron 20 larvas por cepa y condición como se puede apreciar en la Figura III.34. A-D, a las cuales, se les inocularon en la última propata 10 μ l de la concentración establecida de las respectivas levaduras. Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante un periodo de 5 días y se realizó un seguimiento diario.

En los resultados representados en la Figura III.34.E., podemos observar que transcurridas 24 h. después de la infección en las larvas que fueron inoculadas con la cepa silvestre (Cp) se produjo la muerte del 60% de las mismas, mientras que las larvas inoculadas con la cepa mutante (*atc1/atc1*) y la reintegrante (RE), sólo un 10%.

Esta diferencia la podemos visualizar en las fotografías tomadas a las 24 h. después de la infección (Figura III.34.A-D), donde se observa como las larvas inoculadas con la cepa parental (Figura III.34.B.) enseguida cambian su coloración y adquieren un color oscuro, debido al propio proceso de melanización de la larva, utilizado como mecanismo de defensa contra los patógenos. Se observa, como en el resto de larvas, la proporción de larvas afectadas es menor (Figura III.34.C y D).

La inoculación de las larvas con la cepa silvestre (Cp) produjo la muerte de las mismas a los 4 días posteriores a la infección, pero se decidió seguir un día más el experimento con el fin de establecer diferencias con el resto de cepas (Figura III.34.E.).

Realizando el test estadístico Log-rank (Mantel-Cox) y comparando la cepa silvestre con las otras dos cepas (mutante homocigótico y reintegrante), se observaron diferencias estadísticamente significativas, con una $P < 0.0001$ (***). Se encontró la misma diferencia significativa cuando se comparó la cepa parental con el mutante homocigótico y la misma diferencia significativa entre la cepa parental con el reintegrante (Figura III. 33. E).

Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir, que la cepa que posee el gen *ATCI* interrumpido (*atc1*), es menos virulenta que la cepa parental y por tanto, que la carencia del gen influye significativamente en la patogenicidad de *C. parapsilosis*, en este modelo de infección sistémica. Además estos datos concuerdan con los obtenidos en

Resultados

el modelo murino para cepas de *C. albicans* con el gen *ATC1* disrupticionado (Pedreño *et al.*, 2007).

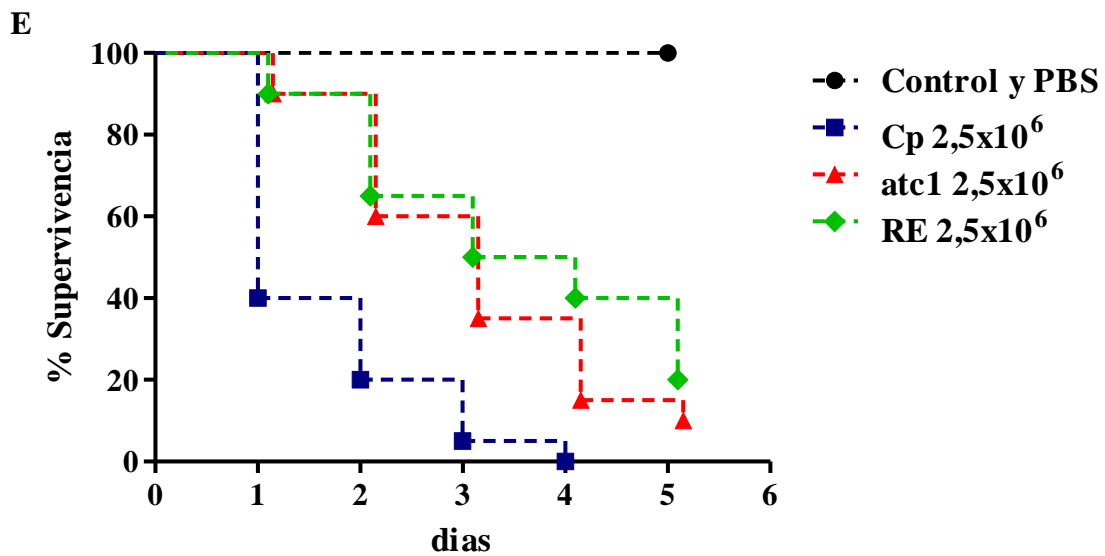
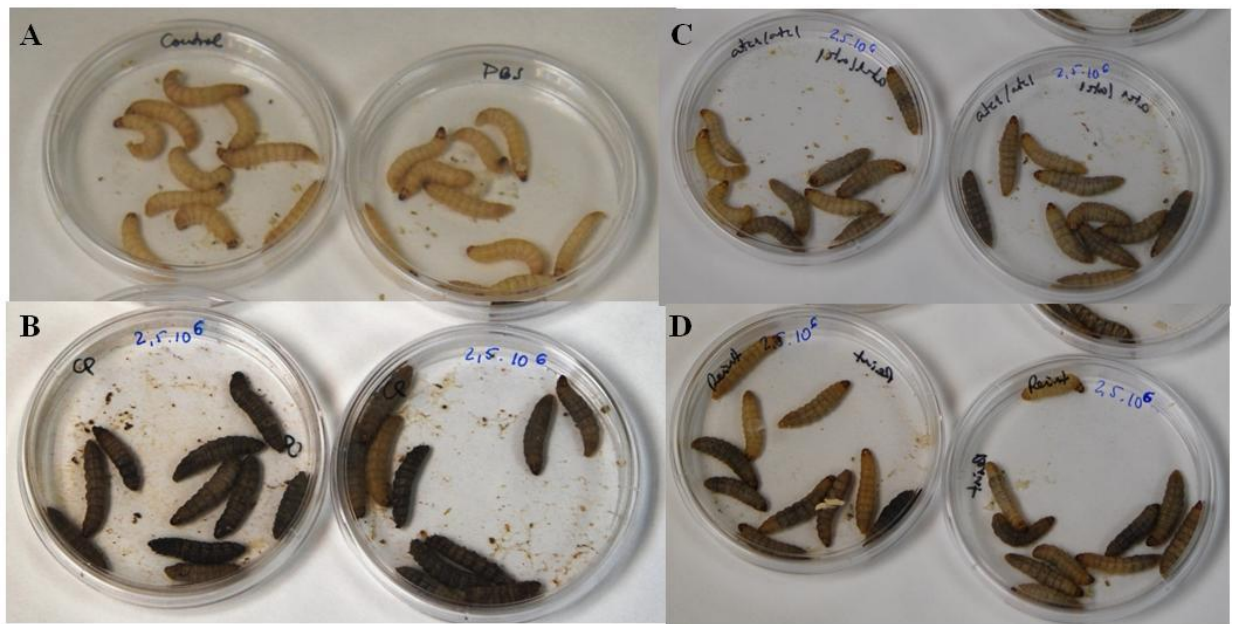


Figura III.34. Estudio de la implicación del gen *ATC1* de *C. parapsilosis* en *Galleria mellonella*. En la parte superior se muestran fotografías de las larvas a las 24 h. posteriores a la infección. Se emplearon 20 larvas por cepa y se incubaron a 37°C en oscuridad y durante 5 días. **A)** Larvas sin inocular (Control) y larvas inoculadas con PBS (PBS). **B)** Larvas inoculadas con la cepa parental (Cp). **C)** Larvas inoculadas con el mutante homocigótico (*atc1/atc1*). **D)** Larvas inoculadas con el mutante reintegrante (RE). **E)** Porcentaje de supervivencia de las larvas. La representación de la supervivencia se realizó mediante la utilización del gráfico de Kaplan-Meier. El experimento fue repetido tres veces con resultados consistentes y se representan los datos de un experimento significativo.

III.21. ESTUDIO DE LA FAGOCITOSIS *IN VIVO* DE *C. parapsilosis* EN *G. mellonella*.

El sistema inmunológico de los insectos responde frente al patógeno invasor, fagocitando y destruyendo la célula extraña. Sin embargo, algunas levaduras, como es el caso de *C. albicans*, poseen mecanismos de escape, como es la formación de filamentos que dificultan la fagocitosis o perforan la célula fagocítica (Fuchs *et al.*, 2010).

Una vez evidenciada la mayor supervivencia encontrada para el mutante nulo *ATC1* y su cepa reintegrante (Figura III.34.), nos planteamos investigar la respuesta de dichos mutantes frente a las células fagocíticas (hemocitos) de las larvas, para descartar que la disminución en la virulencia se debiera a un reconocimiento menos eficiente y a una menor tasa de fagocitosis por las células fagocíticas del hospedador.

Para ello, se realizó un ensayo de fagocitosis *in vivo*, utilizando las tres cepas mencionadas en el apartado anterior. Se establecieron tres grupos de larvas, (cada grupo formado por cuatro larvas), que fueron inoculadas con 10^7 levaduras/larva de la cepa parental (Cp), el mutante nulo (*atc1/atc1*) y el reintegrante (RE), previamente teñidas con blanco de calcofluor e incubadas durante 4 h. a 37°C, en ausencia de luz, tal y como se describe en el Apartado II.29 de Materiales y Métodos. Transcurridas las 4 h. de infección, se analizó mediante microscopia de fluorescencia, la tasa de fagocitosis. Para ello, se contaron un total de 100 hemocitos frente a hemocitos con levaduras en su interior y se calculó el porcentaje de fagocitosis. Cabe destacar, que previamente se realizó un primer experimento incubando las larvas con las levaduras durante un tiempo de infección de 2 h., pero a ese tiempo apenas se visualizó fagocitosis por parte de las células de la larva, por ello se vio oportuno aumentar el tiempo a 4 h., en lugar de 2 como está establecido para otras levaduras, como es el caso de *C. albicans*.

El resultado se puede observar en la Figura III.35.. Todas las cepas fueron fagocitadas en un porcentaje similar (20%-25%), no encontrándose diferencias significativas entre las mismas, según el test t de Student ($P>0.05$).

En la Figura III.36., se muestran las imágenes obtenidas tras la inspección microscópica óptica y de fluorescencia de los hemocitos. Fue necesario teñir las levaduras para evitar interferencias a la hora de visualizarlas en el interior de los fagocitos por microscopia, ya que las células fagocíticas de las larvas poseen muchos orgánulos en su interior que podrían confundirnos a la hora de contabilizar el porcentaje de fagocitosis. Mediante la observación de estas preparaciones, pudimos comprobar una

Resultados

elevada eficiencia de los hemocitos en el proceso de fagocitosis, ya que fueron capaces de endocitar un elevado número de levaduras por célula. Además, las micrografías revelaron que el número de levaduras fagocitadas por los hemocitos fue muy similar para ambas cepas en todos los ensayos realizados.

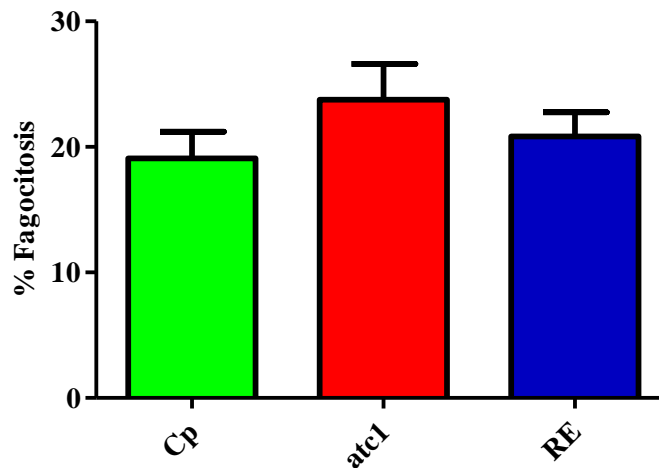


Figura. III.35. Tasa de fagocitosis en *G. mellonella*. Células de la cepa silvestre (Cp), del mutante nulo (*atc1/atc1*) y del reintegrante (RE) marcadas con blanco de calcofluor, fueron inoculadas en las larvas, en una concentración 10^7 lev/larva. Trascorridas 4 h. de la infección a 37°C , se recogió la hemolinfa y se cuantificó mediante microscopia, el porcentaje de fagocitosis. Los datos representan la media y la desviación estándar del porcentaje de fagocitosis de tres experimentos independientes.

Por todo ello, podríamos concluir que las cepas son reconocidas e ingeridas por los fagocitos de manera similar. La disminución en la virulencia mostrada por los mutantes deficientes en el gen *ATC1*, no se debió a una disminución en la tasa de fagocitosis, sino a la ausencia del gen *ATC1*, que podría actuar como un factor de virulencia en *C. parapsilosis*.

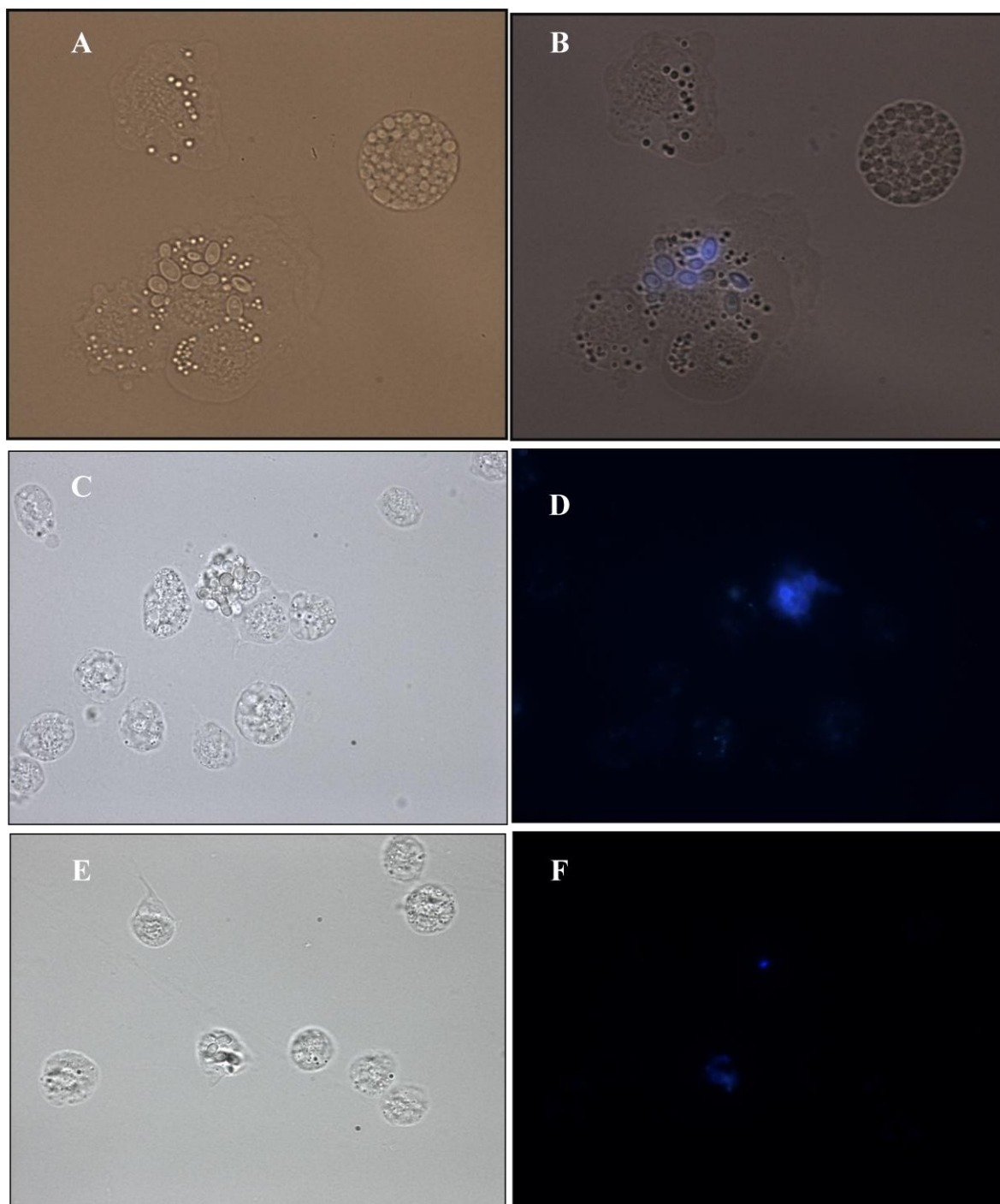


Figura. III.36. Análisis de la capacidad de fagocitosis de los hemocitos de la larva *G. mellonella* mediante observación microscópica óptica y de fluorescencia. Las imágenes de la izquierda (**A**, **C** y **E**), corresponde a micrografías de microscopía óptica de hemocitos que han fagocitado levaduras pertenecientes a la cepa parental (**A**), mutante nulo para el gen *ATCI* (**B**) y reintegrante (**C**). A su derecha las mismas imágenes visualizadas por microscopía de fluorescencia. Micrografías tomadas a 100X.

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

Debido a la relevancia clínica que ha alcanzado *C. parapsilosis* como patógeno emergente en los últimos años, está siendo objeto de estudio por parte de muchos grupos de investigación del todo el mundo. La reciente secuenciación del genoma de *C. parapsilosis* abre una nueva vía de análisis para este microorganismo que, entre otros abordajes experimentales, permitirá el diseño potencial de nuevos antifúngicos más selectivos y eficaces. Sin embargo, a pesar de los avances existen todavía diversos aspectos relacionados con la terapia contra *C. parapsilosis* no resueltos, como es el desarrollo de vacunas preventivas y de antibióticos altamente específicos para todas los problemas clínicos encontrados. La comprensión básica de su fisiología es imprescindible para definir nuevas dianas y aproximaciones al tratamiento de las infecciones y el desarrollo de vacunas encaminadas a generar una respuesta inmunitaria eficaz.

La investigación desarrollada en nuestro laboratorio durante los últimos cinco años, se ha centrado en el estudio de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo trehalosa en levaduras con actividad como patógenos oportunistas contra el hombre y los mamíferos, primero en *C. albicans* y posteriormente en *C. parapsilosis*. Consideramos que la trehalosa representa una diana de gran interés en la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos (Zaragoza *et al.*, 2002), ya que este disacárido no se encuentra en mamíferos (Ishihara *et al.*, 1997). Sin embargo, si se han localizado trehalasas en las microvellosidades de las células del intestino delgado, así como en los túbulos proximales del riñón, aunque todavía no ha sido determinada su función precisa (Elbein *et al.*, 2003). Las proteínas con localización en la superficie externa de las células pueden servir como diana de uso preferente para diseñar nuevas drogas antifúngicas, por ello, en el presente trabajo se ha planteado la clonación y caracterización funcional de la trehalasa ácida de *C. parapsilosis*.

IV. 1. INTERRUPCIÓN DE LOS GENES: *ATCI* Y *NTCI*.

Con la finalidad de identificar la secuencia nucleotídica que codifica para el gen *ATCI* de esta levadura, se realizó inicialmente una búsqueda por comparación de secuencias, sobre la base de datos del genoma de *C. parapsilosis*, utilizando la secuencia ortóloga de *C. albicans*, identificando así el *contig* 005809 con un 67% de homología con el gen *ATCI* de *C. albicans*. Por su parte, la secuencia aminoacídica deducida del mismo, mostró unos porcentajes de identidad del 60%, 62,4% y del 38,7% respectivamente, con las proteínas ortólogas de las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Figura III.1.).

La metodología aplicada resultó ser correcta y el análisis de la secuencia nucleotídica del gen *ATCI*, permitió identificar elementos básicos determinantes del sitio de inicio de la traducción. En la región 5' no codificante del gen *ATCI*, se identificó una posible caja TATA (Ferguson *et al.*, 1986) así como varias secuencias RRYRR (R=purina, Y=pirimidina), relacionadas con el inicio real de la transcripción en levaduras (Hahna *et al.*, 1985). En la secuencia 3' no codificante del gen, se encontraron señales consenso de poliadenilación como AAAT, elementos importantes para una correcta terminación del ARN transcrito, así como para su posterior procesamiento y poliadenilación. La región codificante posee un contenido en A+T del 60,48 % y en ella se observa una ligera tendencia a usar preferentemente los codones que terminan en T o en A. Ambas características están en consonancia con lo descrito para *C. albicans* (Brown *et al.*, 1991) (Figura III.2.).

La secuencia aminoacídica del gen *ATCI*, en un primer análisis *in silico*, reveló que podría codificar una proteína localizada en la superficie celular, con las características propias de este tipo de componentes. La estructura primaria de Atc1p contiene 1,039 aminoácidos, con un peso molecular teórico deducido de su secuencia de 116587,90 Da y un punto isoeléctrico teórico de 5,45. Además la secuencia aminoacídica contiene un péptido señal hidrofóbico en posición N-terminal, dicho péptido lo poseen las proteínas en tránsito dentro de la ruta secretora. Dispone de una región rica en serinas y treoninas típico de las proteínas que se anclan a la membrana plasmática o de aquellas que se secretan al exterior celular y 16 señales potenciales de N-glicosilación. (Como se deduce de la secuencia aminoacídica) (Figura III.3.).

Estos datos coinciden con lo descrito para otros hongos filamentosos y levaduras, caso de *Emericella nidulans* y *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004), donde la actividad Atc1p también se encuentra localizada en la superficie celular, en contraste con las trehalasas ácidas de *S. cerevisiae* y de *C. utilis*, que se localizan en las vacuolas. Esta diferencia probablemente refleja diferentes mecanismos de asimilación de trehalosa exógena entre las levaduras (Argüelles y Gacto, 1988; d'Enfert *et al.*, 1997; Pedreño *et al.*, 2004; Pedreño, 2005; Parrou *et al.*, 2005). En los hongos filamentosos, la hidrólisis de trehalosa parece ser un proceso enzimático extracelular, siendo la glucosa liberada tras la rotura hidrolítica posteriormente transportada al citosol celular (Parrou *et al.*, 2005).

El modelo de homología generado para la proteína Atc1p de *C. parapsilosis* reveló que el dominio central catalítico de dicha enzima coincide con el dominio catalítico de la familia glicosil hidrolasa 65. Además presenta dos residuos catalíticos cruciales Glu₅₇₀ y Asp₄₄₂, residuos presentes en otras trehalasas de las levaduras *E. nidulans*, *S. cerevisiae* y en *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004), que además se superponen perfectamente con los respectivos residuos conservados de la proteína LbMP, utilizada para llevar a cabo la modelización e interpretación estructural de la trehalasa ácida (Figura III.4.).

Con el fin de elucidar el posible papel fisiológico del gen *ATC1* de *C. parapsilosis*, se procedió a su delección, empleando un nuevo sistema de disrupción descrito inicialmente por Reuss y colaboradores (2004), que sustituye al sistema habitual empleado hasta el momento, descrito por Fonzi e Irwin (1993), ya que, este nuevo método ha permitido la obtención de los mutantes sobre un fondo genético parental que no haya sufrido ninguna manipulación genética previa. El gen Cp*ATC1* fue delecionado con relativa facilidad, indicándonos que nos encontrábamos, *a priori*, con un gen no esencial en una cepa silvestre, como se ha descrito para el gen *ATC1* de *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004).

Un aspecto importante e interesante en el futuro sería el estudio fenotípico detallado de los mutantes hete y homocigóticos para ambas trehalasas (ácida y neutra), del que pueden derivarse datos importantes en el esclarecimiento de su función biológica y del metabolismo de la trehalosa, en nuestra levadura objeto de

estudio. Hasta ahora solo podemos confirmar la identificación del gen *NTCI* en el genoma de *C. parapsilosis*, que presumiblemente podría codificar a la enzima trehalasa neutra, al igual que ocurre para la levadura *C. albicans* (Eck et al., 1997).

IV.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *ATCI*.

El gen *ATCI* de *C. parapsilosis* comparte determinadas propiedades con sus correspondientes ortólogos en levaduras: no es esencial para la viabilidad y su ausencia o mutación provoca la imposibilidad de crecer en medios nutritivos que contengan trehalosa como fuente de carbono, tal y como se ha puesto de manifiesto en los Apartados III.8. y III.9.

La incapacidad de metabolizar trehalosa extracelular en los mutantes interrumpidos, sugiere que la actividad Atc1p de *C. parapsilosis* es necesaria para la hidrólisis de la trehalosa presente en ambientes naturales. Estos resultados son equivalentes a los previamente obtenidos para *C. albicans* (Pedreño et al., 2004), así como en otros géneros de levaduras, caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Nwaka et al., 1996) y de *Emericella nidulans* (Alizadeh y Klionsky, 1996). Al igual que ocurre con *C. albicans*, Atc1p podría estar presumiblemente localizada en la pared celular, unida mediante enlaces covalentes. Además contiene secuencias de N-glicosilación y un péptido señal, tal y como se ha descrito en el Apartado III.3. También sería factible que la expresión transcripcional del gen *ATCI* en *C. parapsilosis*, así como la capacidad catalítica de la trehalasa ácida, estén sujetas a control mediante represión catabólica por glucosa, como ocurre con *C. albicans* (Pedreño et al., 2004). Sin embargo, aunque estas hipótesis poseen una base sólida, necesitan ser confirmadas en el laboratorio. Por ello, actualmente se están planteando nuevos experimentos, con el fin de esclarecer dichos planteamientos en *C. parapsilosis*, ya que podrían existir diferencias regulatorias entre ambas especies, como las observadas en el caso de *S. cerevisiae* que, a diferencia de *E. nidulans* y *C. albicans*, la trehalasa ácida homóloga denominada Ath1p se localiza en las vacuolas y no en la pared (Alizadeh y Klionsky, 1996).

Una conclusión relevante del trabajo descrito, viene dada por el posible papel que puede desempeñar la proteína Atc1p en respuesta a distintos tratamientos de

estrés, deducible de las diferencias sutiles en unos casos y notables en otros, pero siempre inequívocas respecto a la sensibilidad mostrada frente a los desafíos aplicados (Apartado III.10.). Consideramos interesante analizar si la ausencia del gen *ATC1* funcional en *C. parapsilosis*, pudiera alterar de forma significativa la resistencia de este patógeno a un ataque oxidativo, salino y térmico, ya que al carecer de actividad trehalasa ácida, el metabolismo de la trehalosa se vería alterado.

Nuestros resultados sugieren que la ausencia de una actividad Atc1p funcional confiere una notable capacidad de resistencia frente a estrés oxidativo y térmico (Figura III.17. y Figura III.18.). Globalmente, también concuerdan con los descritos para *C. albicans*, donde la misma mutación homocigótica para el gen *ATC1* incrementa la resistencia frente a estrés oxidativo, térmico y salino, (Pedreño *et al.*, 2007). Asimismo, en *S. cerevisiae*, el mutante nulo *ATH1* presentó una mayor resistente frente a la deshidratación, congelación o shock por etanol que su cepa parental (Kim *et al.*, 1996).

En conjunto, los resultados expuestos en la presente Memoria acerca del metabolismo de la trehalosa en la levadura *C. parapsilosis*, confirman evidencias previas aportadas por nuestro grupo para el caso de *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004). Por tanto, dicho disacárido, desempeña un papel primordial en *C. parapsilosis* como protector específico de la integridad celular frente a estrés oxidativo severo y frente a choque térmico inducido (Tabla III.3 y Figura III.21.A). Por su parte en *C. parapsilosis*, la presión osmótica parece tener una influencia relativa sobre la biosíntesis de trehalosa en este patógeno, de modo similar a *C. albicans*. (Thevelein, 1996; Argüelles, 2000; Benaroudj *et al.*, 2001; Elbein *et al.*, 2003).

Los hongos patógenos durante su etapa invasiva de proliferación y colonización en un hospedador, deben afrontar una amplia variedad de desafíos ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, estado redox. En consecuencia, es probable que los niveles variables de oxígeno y osmolaridad disponibles en su entorno vivo, puedan causarles un estrés severo. Sin embargo, las células fúngicas están dotadas de un elaborado sistema defensivo que responde apropiadamente a estas oscilaciones bruscas. Uno de estos mecanismos es la capacidad para producir y acumular ciertos solutos protectores de bajo peso

molecular, tales como el glicerol, D-manitol y el D-arabitol. Estos polioles pueden funcionar como osmolitos intracelulares, que además podrían mitigar los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas por los sistemas de defensa del hospedador, y muy dañinas para dichos hongos patógenos (Pahlman *et al.*, 2001).

Existen evidencias de que estos polioles además podrían jugar un papel importante en las interacciones hospedador-patógeno. (Chaturvedi *et al.*, 1996). Nos hemos centrado predominantemente en el estudio del metabolismo del glicerol y del D-arabitol. Sorprendentemente, nuestros resultados no coinciden del todo con lo descrito en otras levaduras, ya que *C. albicans* y *S. cerevisiae* acumulan glicerol en respuesta a estrés oxidativo y térmico intenso (Pahlman *et al.*, 2001). *C. parapsilosis* mostró un comportamiento totalmente contrario, ya que no se produjo acumulo de este polioliol para los diferentes tipos de estrés aplicados (Figura III.21.B). En cambio, si se observó una tendencia similar al valorar el polioliol: D-arabitol, con una marcada acumulación del mismo aunque variable en intensidad, cuando las células fueron sometidas a las agresiones ambientales (Figura III.21.C). Estos datos sí concuerdan con los obtenidos en *C. albicans*; dicha levadura sintetiza D-arabitol tras una fuerte adición de agentes oxidantes y/o subidas pronunciadas de temperatura, (Kayingo y Wong, 2005). Quizás el dato sorprendente, del que por el momento no disponemos de ninguna explicación evidente, sea la acumulación de D-arabitol en respuesta a estrés osmótico, como aparece reflejado en nuestros resultados (Figura III.21.C).

Cuando se analizó el nivel basal de los diferentes metabolitos durante el ciclo de crecimiento de *C. parapsilosis*, se observó como la mayor síntesis tuvo lugar en la fase tardía de crecimiento, en el caso de trehalosa y D-arabitol, mientras que el glicerol mostró una marcada acumulación, cuando las células se encontraban en fase de logarítmica (Figura III.23). Los resultados referentes a la acumulación de la trehalosa endógena en cultivos estacionarios de *C. parapsilosis* coinciden con los descritos para *C. albicans* (Thevelein, 1996; Argüelles, 2000).

En cuanto al comportamiento de las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo (Tabla III.4), la tendencia general apunta a una notable activación de la hidrólisis de trehalosa, siendo el incremento de actividad trehalasa neutra más pronunciado en células sometidas a estrés térmico. Por el contrario, la actividad Ntcp1 experimentó una ligera disminución con el tratamiento oxidativo moderado o

severo, lo cual sugiere que *C. parapsilosis*, igual que ocurre en *C. albicans*, resultó ser sensible a los agentes oxidantes. (Conesa, 2005; Pedreño *et al.*, 2006). Es destacable que la síntesis de trehalosa transcurra en paralelo con una notable activación de la **actividad trehalasa neutra** a 42° C, mientras la molécula se desnaturaliza parcialmente por adición de agentes oxidantes en altas concentraciones (Tabla III.4). Esta aparente paradoja ha sido explicada de forma elegante por el trabajo de Singer y Lindquist (1998), al demostrar que la hidrólisis de trehalosa proporciona la glucosa necesaria para garantizar la plena recuperación de la fisiología celular después de un choque térmico agudo. Por tanto, el conjunto de nuestros datos refuerza el papel protector de la trehalosa como parte de la maquinaria defensiva celular frente a estrés (Benaroudj *et al.*, 2001; Álvarez-Peral *et al.*, 2002; Zaragoza *et al.*, 2003; Pedreño *et al.*, 2007).

Respecto al comportamiento de la enzima trehalasa ácida (Atc1p) en *C. parapsilosis* durante la respuesta a estrés (Tabla III.4), los resultados obtenidos ponen de manifiesto una ligera activación enzimática frente a un choque oxidativo suave, además de antes exposiciones osmóticas y térmicas. Por el contrario, se registró una disminución de actividad Atc1p frente a estrés oxidativo agudo, posiblemente debido al daño oxidativo sufrido por la configuración nativa de la proteína. La tendencia general de las de ambas trehalasas en respuesta a estrés en *C. parapsilosis* también coincide con los datos establecidos para *C. albicans*, apuntando al desempeño de funciones similares en ambas especies (Pedreño *et al.*, 2004; 2007).

Además de la acumulación intracelular de varios metabolitos y solutos compatibles, las levaduras responden frente a las agresiones ambientales externas mediante la inducción de un conjunto de actividades enzimáticas detoxificantes (González-Párraga *et al.*, 2003). Ambos tipos de sistemas defensivos ofrecen una evidente función protectora de la integridad celular (Álvarez-Peral *et al.*, 2002; González-Párraga *et al.*, 2005).

En primer lugar se analizó la catalasa, se ha visto que esta enzima juega un importante papel en *C. albicans* como actividad antioxidante, imprescindible para la célula a la hora de responder ante situaciones de estrés oxidativo intenso (González-

Párraga *et al.*, 2003; Pedreño *et al.* 2007). En este sentido quisimos comprobar si en nuestra levadura, *C. parapsilosis*, esta actividad enzimática presentaba el mismo patrón de actuación. Tanto la cepa parental como el mutante nulo (*atc1/atc1*) ofrecieron un comportamiento similar (Figura III.24), ya que inicialmente la catalasa incrementó tras la aplicación de un choque oxidativo leve (5mM H₂O₂). Por el contrario, dicha actividad se vio reducida cuando el estrés oxidativo fue mas intenso (50 mM H₂O₂) o ante un estrés osmótico. Este tipo de respuesta antioxidante específica podría ser provocada por el modo de acción del H₂O₂ sobre las células. En principio, la catalasa actuaría como un marcador sensible a cambios pronunciados en el estado redox intracelular, o indicativos de la presencia súbita de radicales libres (González-Párraga *et al* 2003; Pedreño *et al.*, 2005). Así, tratamientos moderados (5 mM H₂O₂) tienden a favorecer la rápida inducción del estado defensivo antioxidante mediante la rápida activación de la catalasa. Sin embargo, la configuración tridimensional de la molécula nativa se desnaturaliza ante exposiciones más severas de H₂O₂, quedando afectadas tanto la estructura como la actividad de la enzima, desencadenando una oxidación molecular de la misma en presencia de metales de transición (Stadtman y Oliver, 1991).

Por otra parte, merece ser destacado el comportamiento del mutante nulo para el gen *ATC1*, que presentó una elevada activación de la catalasa al aplicar una subida térmica hasta 42°C (Figura III.24). Una posible explicación sería la inducción de un mecanismo compensatorio por parte de la célula, contrarrestando la ausencia de trehalosa intracelular mediante el incremento de actividad catalasa. Este mecanismo ha sido propuesto para *C. albicans* (González-Párraga *et al.*, 2003; 2008), además de un posible función cooperativa de protección *in vivo*, con objeto de aumentar la resistencia del patógeno frente a la lisis fagocítica por macrófagos (Martínez-Esparza *et al.*, 2007; 2009).

Numerosas evidencias experimentales se inclinan en favor de este modelo de compensación metabólica, entre la acumulación intracelular de trehalosa y la inducción de enzimas antioxidantes, como parte de un mismo sistema defensivo único: la denominada “respuesta general a estrés”, capaz de ser inducido en distinto grado dependiendo de cada tratamiento agresivo específico (González-Párraga *et al.*, 2008). Así, cuando se analizó el efecto del H₂O₂ sobre la actividad de enzimas

antioxidantes en el mutante *tps1Δ/tps1Δ*, (incapaz de sintetizar trehalosa) (Zaragoza *et al.*, 1998), se observó que estas células sin trehalosa estaban dotadas de un nivel constitutivo más elevado de actividad catalasa, hasta 3-4 veces superior al observado en el tipo parental, (González-Párraga *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha propuesto que la trehalosa podría actuar *in vivo* sinérgicamente con la familia de proteínas llamadas “**Heat Shock Proteins**” (HSPs) en la resistencia a choque térmico, y junto con las enzimas antioxidantes confiriendo protección frente a las especies de oxígeno activado (Craig *et al.*, 1993; Piper, 1993; Benaroudj *et al.*, 2001; Franca *et al.*, 2007). La trehalosa funcionaría como un “secuestrador efectivo de radicales libres”, de forma similar a la galactosa y el manitol, que son secuestradores de $\cdot\text{OH}$ *in vitro* (Tauber y Babior, 1977; Litchfield y Wells, 1978). No ocurre lo mismo con la sacarosa, a pesar de ser, como la trehalosa, un disacárido no reductor. La sacarosa no es capaz de conferir protección a las células de *S. cerevisiae* frente a una exposición con H_2O_2 . Se ha propuesto que dicha diferencia podría obedecer a la incapacidad de la sacarosa para ser transportada por las células, ya que es degradada a glucosa por la invertasa externa; o a la menor capacidad de este azúcar para secuestrar especies de oxígeno activas (Eleuterio *et al.*, 1993; Jamieson 1998; Benaroudj *et al.*, 2001).

Respecto a la otra actividad antioxidante valorada, la glutatión reductasa (GR), los resultados obtenidos (Figura III.25), revelaron una mayor actividad glutatión reductasa basal en el mutante carente de actividad Atc1p, que en la cepa parental, este hecho se correlaciona con la mayor resistencia presentada por las células carentes del gen *ATC1* al estrés oxidativo, lo mismo que ocurría en *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2007). Por lo general, esta enzima sigue el mismo patrón de actividad que el discutido para la catalasa.

Debido a que el gen *ATC1* de *C. parapsilosis*, codifica presumiblemente una proteína de superficie celular y que la trehalasa ácida esta implicada en el metabolismo de la trehalosa exógena, se analizó el mecanismos de cambio dimórfico, siguiendo los protocolos establecidos para su inducción (Apartado III. 13) y poder determinar si la mutación de este gen podía afectar y de que manera, la conversión levadura-hifa. Como ya se ha comentado en la Introducción, una de las

características diferenciales entre *C. albicans* y *C. parapsilosis*, es que esta última no presenta la morfología de hifas verdaderas (Trofa *et al.*, 2008; Silva *et al.* 2011). Los datos obtenidos apuntan a que el gen *ATC1* de *C. parapsilosis* no tiene, en principio, una implicación en el programa morfogénico de dicha levadura. A su vez, los ensayos de sensibilidad frente a varios antifúngicos, no han permitido observar ninguna diferencia relevante entre el mutante carente del gen *ATC1* y la cepa silvestre. Por tanto, el gen *ATC1* no parece intervenir en la posible resistencia de *C. parapsilosis* frente a estos compuestos (Tabla III.5.).

Las alteraciones estructurales en la pared celular de levaduras, afectan a la capacidad de reconocimiento y adhesión por parte de las células del hospedador. (Gow *et al.*, 2002; Bates *et al.*, 2006). De acuerdo con nuestros resultados, la interrupción del gen *ATC1*, probablemente estaría afectando bien la composición química o la exposición normal de moléculas de la superficie exterior de la levadura, o ambos procesos a la vez; ocasionando así, una perturbación en la arquitectura de la pared que conlleva una importante disminución de la hidrofobicidad de *C. parapsilosis* y podría por tanto alterar su capacidad de adhesión a los tejidos del hospedador. De hecho, el mutante *tps2/tps2*, que acumula trehalosa-6-fosfato, por ser deficiente en la actividad trehalosa fosfatasa, muestra importantes alteraciones en la superficie celular externa respecto a su cepa parental CAI-4 (Zaragoza *et al.*, 2002).

Por ello, uno de nuestros objetivos futuros, será la determinación cuantitativa y cualitativa del contenido de manano y glucano de la pared celular; estas moléculas son candidatos involucrados en la hidrofobicidad de *C. parapsilosis* (Mille *et al.*, 2008; Martínez-Esparza *et al.*, 2009). Los mutantes homo y heterocigóticos deficientes en el gen *ATC1*, constituyen una herramienta magnífica para intentar explicar la reducción de hidrofobicidad registrada en las observaciones citométricas.

Además en experimentos futuros también se evaluará la hidrofobicidad empleando una cinética a tiempos largos, ya que estas diferencias observadas, no se correlacionaron con la tasa de fagocitosis observada por las células fagocíticas de la larva *G. mellonella*, no encontrándose diferencias en el porcentaje de fagocitosis a tiempos largos (4h) (Figura III.35.).

IV.3. ESTUDIO DE LA INTERACIÓN DEL GEN *ATCI* CON EL SISTEMA INMUNITARIO.

Para establecer el papel del gen *ATCI* como posible determinante de virulencia, es necesario demostrar que el mutante nulo para dicho gen, debe ser incapaz de producir infección en un modelo experimental adecuado o, al menos, manifestar una drástica reducción de la virulencia. Seguimos un protocolo de virulencia establecido para el modelo experimental no mamífero: *Galleria mellonella* (lepidóptero), en el cual se comprobó, como el gen estaba implicado en virulencia, ya que la mutación en el mismo disminuía la virulencia (Apartado III.20). Sin embargo, no ocurrió lo mismo en modelo murino donde tuvimos que definir un protocolo de invasividad para evaluar la capacidad de colonización de las cepas de *C. parapsilosis*, cuantificando la carga fúngica en el riñón del ratón, estimada por las unidades formadoras de colonias en el mismo, para estimar el grado de invasión o destrucción de diferentes células, tejidos u órganos. En nuestro caso, el análisis de los estudios de patogenicidad, indicaron una disminución de la invasividad de las cepas mutantes ensayadas respecto a la cepa silvestre. En consecuencia y de modo muy preliminar, podemos concluir que la delección del gen *ATCI* no conlleva una notable reducción de la invasividad en *C. parapsilosis*.

Finalmente, analizando en conjunto nuestro trabajo, proponemos que la trehalasa ácida de *C. parapsilosis* codificada por el gen *ATCI* debe cumplir alguna función en virulencia, ya que la supresión total del gen, activa de una manera más eficiente las defensas del hospedador, induciendo la producción de una mayor concentración de citoquinas y sustancias microbicidas como el NO por macrófagos humanos (Figuras III.30. y III.31.) y conlleva una disminución en la capacidad de supervivencia a la lisis mediada por macrófagos humanos (Figura III.29.), de la invasividad en el modelo murino (Figura III.32.) y la virulencia en el modelo de *G. mellonella* (Figura III.34.). Estos datos refuerzan la importancia del estudio de la trehalosa y de las enzimas implicadas en su metabolismo, como una posible diana terapéutica en el control de las infecciones sistémicas causadas por *C. parapsilosis*.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. El rastreo de una base de datos con el genoma de *Candida parapsilosis*, utilizando la trehalasa ácida de *C. albicans* como modelo, ha permitido identificar el *contig* 005809, cuyo producto génico tiene una elevada homología con la secuencia IPF19760/CA2574 de *Candida albicans*.
2. El nuevo gen identificado como CpATC1, codifica una proteína de 1,039 aminoácidos que posee una secuencia predecible de péptido señal en la región N-terminal y 16 sitios potenciales de N-glicosilación; lo que sugiere la localización de dicha proteína (Atc1p) en la superficie celular.
3. El mutante homocigótico (*atc1/atc1*) es incapaz de crecer sobre trehalosa como fuente de carbono. Por tanto, en *C. parapsilosis* la proteína Atc1p debe estar involucrada en la hidrólisis de trehalosa exógena.
4. La ausencia del gen *ATC1* funcional, confiere a *C. parapsilosis* una mayor capacidad de resistencia frente a estrés oxidativo, térmico y salino *in vitro*.
5. La doble interrupción del gen *ATC1* incrementa la producción de óxido nítrico y de las citoquinas TNF- α e IL-10 en macrófagos humanos y conlleva una disminución en la capacidad de supervivencia a la lisis mediada por los mismos.
6. Los mutantes deficientes en el gen *ATC1* presentan una menor invasividad en modelo murino y una virulencia disminuida en el modelo de *Galleria mellonella*. En consecuencia, se propone que el gen *ATC1* cumple alguna función en la interacción de *C. parapsilosis* con el sistema inmunitario del hospedador: Igualmente, podría actuar como un posible factor de virulencia de este patógeno emergente.
7. Se ha obtenido el doble mutante *ntc1/ntc1/atc1/atc1*, carente de las dos actividades trehalasas de *C. parapsilosis*. Aunque su caracterización funcional está pendiente, podemos afirmar que se trata de un gen no esencial en esta levadura; puesto que su interrupción no causa letalidad.

VI. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN.

Tabla I.1. Primeras referencias históricas referentes a la procedencia y nomenclatura de <i>Candida parapsilosis</i> .	3
Tabla I.2. Asimilación de azúcares por <i>C. parapsilosis</i> .	6
Tabla I.3. Características epidemiológicas y principales manifestaciones clínicas de <i>C. parapsilosis</i> en relación con otras especies de <i>Candida</i> .	9
Tabla I.4. Principales antibióticos con actividad antifúngica empleados para el tratamiento de las micosis invasivas.	15
Tabla I.5. Principales aplicaciones biotecnológicas del disacárido no reductor trehalosa (α -D-glucopiranosil 1,1 α -D-glucopiranosido).	24
Tabla I.6. Características principales y funciones de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10.	37
Figura I.1. Diferencias morfológicas coloniales obtenidas a partir de un aislado clínico de <i>C. parapsilosis</i> .	4
Figura I.2. Micrografías correspondientes a los distintos tipos morfológicos presentes en <i>C. parapsilosis</i> .	5
Figura I.3. Representación gráfica del número de candidemias anuales diagnosticadas en Brasil.	7
Figura I.4. Gráfico mostrando a nivel de España el porcentaje de aislamientos clínicos de micosis infectivas causadas por las distintas especies del género <i>Candida</i> .	7
Figura I.5. Micrografía electrónica de barrido mostrando la adhesión <i>in vitro</i> de <i>C. parapsilosis</i> sobre la superficie de la uña humana.	11
Figura I.6. Esquema representativo conteniendo los elementos principales identificados en las rutas de transducción de señales mediadas por MAP quinasa (MAPK) en <i>C. albicans</i> .	18
Figura I.7. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular.	20
Figura I.8. Estructura molecular de los diferentes solutos protectores de estrés.	22
Figura I.9. Respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.	29
Figura I.10. Diagrama representativo de la organización estructural que adoptan los distintos componentes de la pared celular de <i>Candida albicans</i> .	32

Figura I.11. Receptores implicados en la interacción entre los diferentes componentes de la superficie de <i>C. albicans</i> y las células del hospedador.	34
Figura I.12. Esquema de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en el interior de una célula fagocítica.	36

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

Tabla II.1. Relación de cepas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. albicans</i> utilizadas en la presente Memoria: genotipo y procedencia.	39
Tabla II.2. Medios de cultivos utilizados para el cultivos y análisis fenotípico de <i>C. parapsilosis</i> y sus respectivos mutantes.	40
Tabla II.3. Plásmidos utilizados en este trabajo.	44
Tabla II.4. Cebadores empleados en este trabajo.	49
Tabla II.5. Antifúngicos ensayados e intervalos de CMI de dos especies control de <i>Candida</i> .	68
Figura II.1. Gráfica patrón para la valoración de glucosa con el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa.	63
Figura II.2. Representación gráfica de las áreas correspondientes a los diferentes picos de elución para los patrones de trehalosa endógena, glicerol y D-arabitol, determinados por HPLC.	65
Figura II. 3. Selección de la población de levaduras (R2) por criterios de tamaño y granularidad mediante citometría de flujo.	69
Figura II.4. Recta de calibrado para TNF- α .	72
Figura II.5. Recta de calibrado de los nitritos.	73
Figura II.6. Método de manipulación de la larva <i>Galleria mellonella</i> .	75
Figura II.7. Examen periódico del nivel de supervivencia registrado en larvas del Lepidóptero <i>Galleria mellonella</i> .	76
Figura II.8. Sistema celular de defensa de la larva <i>Galleria mellonella</i> .	77

III. RESULTADOS.

Tabla III.1. Utilización de codones del gen CpATC1.	89
Tabla III.2. Composición de aminoácidos de la proteína Atc1p.	93

Tabla III.3. Contenido intracelular de trehalosa en respuesta a los diferentes tratamientos de estrés, en las cepas parental (Cp) y <i>atc1/atc1</i> nulo de <i>C. parapsilosis</i> .	120
Tabla III.4. Efecto del estrés oxidativo, salino y térmico sobre las actividades trehalasa neutra (Ntc1p) y trehalasa ácida (Atc1p), en el mutante nulo para el gen <i>ATC1</i> y la cepa silvestre isogénica de <i>C. parapsilosis</i> .	126
Tabla III.5. Efecto de la doble interrupción del gen <i>ATC1</i> sobre la susceptibilidad <i>in vitro</i> en <i>C. parapsilosis</i> frente a varios antifúngicos.	135
Figura III.1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de CpAtc1p de <i>C. albicans</i> y sus ortólogos, <i>C. tropicalis</i> y <i>C. glabrata</i>	82
Figura III.2. Secuencia nucleotídica de la pauta abierta de lectura del gen <i>ATC1</i> de <i>C. parapsilosis</i> .	85
Figura III.3. Características de la secuencia proteica Atc1p.	91
Figura III.4. Representación esquemática de la estructura de Atc1p de <i>C. parapsilosis</i> .	95
Figura III.5. Diagrama de la construcción del casete de interrupción para el gen <i>ATC1</i> utilizando el plásmido pCD8.	97
Figura III.6. Esquema de disrupción del primer alelo del gen <i>ATC1</i> .	99
Figura III.7. Fotografía de colonias obtenidas en placas YPD tras el proceso de transformación.	100
Figura III. 8. Esquema de disrupción del segundo alelo del gen <i>ATC1</i> .	100
Figura III.9. Verificación de la integración de ADN en el <i>locus</i> del gen <i>ATC1</i> en las diferentes cepas de <i>C. parapsilosis</i> .	102
Figura III.10. Análisis de los transformantes por PCR de ADN genómico.	103
Figura III.11. Mapa físico del fragmento que contiene el gen <i>NTC1</i> de <i>C. parapsilosis</i> .	105
Figura III.12. Comprobación de la disrupción del gen <i>NTC1</i> .	108
Figura III.13. Curva de crecimiento en medio rico (YPD) de la cepa silvestre (Cp) y el mutante homocigótico isogénico de <i>C. parapsilosis</i> .	112
Figura III.14. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre (Cp) y el mutante homocigótico de <i>C. parapsilosis</i> , en medio (YNB) con los siguientes azúcares como fuente de carbono: glucosa, sacarosa y lactosa.	113

Figura III.15. Determinación del crecimiento de <i>C. parapsilosis</i> en función de la fuente de carbono.	114
Figura III.16. Determinación colorimétrica de la utilización de trehalosa exógena y crecimiento celular en <i>C. parapsilosis</i> mediante viraje del pH.	115
Figura III.17. Análisis de la sensibilidad en placa mostrada por el mutante homocigótico de <i>C. parapsilosis</i> y de la cepa parental (Cp) frente a los distintos tratamientos de estrés.	117
Figura III.18. Determinación del grado de viabilidad celular en medio YPD líquido en respuesta a los diferentes tratamientos de estrés aplicados.	118
Figura III.19. Análisis cromatográfico (HPLC) del contenido intracelular de trehalosa, glicerol y D-arabitol determinados en la cepa silvestre de <i>C. parapsilosis</i> en respuesta a distintos tratamientos de estrés.	121
Figura III.20. Representación de las áreas correspondientes a los diferentes picos de elución para la trehalosa endógena, glicerol y D-arabitol.	122
Figura III.21. Determinación cuantitativa del contenido intracelular de trehalosa, glicerol y D-arabitol en respuesta a los tratamientos de estrés previamente descritos en las cepas Cp y <i>atc1/atc1</i> de <i>C. parapsilosis</i> .	123
Figura III.22. Representación de los cromatogramas obtenidos por HPLC referentes a la acumulación de trehalosa, glicerol y D-arabitol en cultivos recogidos en fase exponencial y estacionaria a 30°C.	125
Figura III.23. Contenido intracelular de trehalosa, glicerol y D-arabitol en células incubadas hasta fase exponencial y estacionaria de crecimientos, medidos en las cepas Cp y <i>atc1/atc1</i> de <i>C. parapsilosis</i> .	125
Figura III.24. Efecto del estrés oxidativo, salino y choque térmico sobre los niveles de actividad catalasa.	129
Figura III.25. Cambios en los niveles de actividad glutatión reductasa en respuesta a exposiciones de estrés oxidativo, salino y choque térmico en las cepas de <i>C. parapsilosis</i> (Cp y <i>atc1/atc1</i>).	130
Figura III.26. Micrografías de la cepa silvestre (Cp) de <i>C. parapsilosis</i> y el mutante (<i>atc1/atc1</i>).	132
Figura III.27. Análisis de la hipotética variación en la morfología colonial provocada por la doble interrupción del gen <i>ATC1</i> en <i>C. parapsilosis</i> sobre medio Spider.	133

Figura III.28. Análisis de la hidrofobicidad de <i>C. parapsilosis</i> en respuesta a la interrupción del gen <i>ATC1</i> .	137
Figura III.29. Tasa de supervivencia de <i>C. parapsilosis</i> a la lisis mediada por los macrófagos de la línea celular humana U937.	140
Figura III.30. Nivel de producción extracelular de citoquinas por macrófagos en respuesta a la infección de diferentes cepas de levaduras.	142
Figura III.31. Determinación del óxido nítrico liberado por los macrófagos en sobrenadantes de cultivo inducido por las diferentes cepas de <i>Candida sp.</i>	144
Figura III. 32. Capacidad de colonización de las cepas de levaduras en el riñón de ratón.	146
Figura III.33. Estudio de la virulencia de <i>C. parapsilosis</i> en larvas de <i>Galleria mellonella</i> .	148
Figura III.34. Estudio de la implicación del gen <i>ATC1</i> de <i>C. parapsilosis</i> en <i>Galleria mellonella</i> .	150
Figura. III.35. Tasa de fagocitosis en <i>G. mellonella</i> .	152
Figura. III.36. Análisis de la capacidad de fagocitosis de los hemocitos de la larva <i>G. mellonella</i> mediante observación microscópica óptica y de fluorescencia.	153

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFIA.

Abbas, A.K. y Lichtman, A.H. 2009. *Inmunología celular y molecular*. 6º Edición. Elsevier S. A. Madrid, España.

Abbott, D.W., Hrynuik, S. y Boraston, A.B. 2007. Identification and characterization of a novel periplasmic polygalacturonic acid binding protein from *Yersinia enterocolitica*. *J. Mol. Biol.* **367**: 1023-33.

Alani, E., Cao, L. y Kleckner, N. 1987. A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics*. **116**: 541-545.

Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Monzón, A., Mellado, E. y Rodríguez-Tudela, J.L. 2008. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 805-9.

Aleshin, A.E., Hoffman, C., Firsov, L.M. y Honzatko, R.B. 1994. Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100. *J. Mol. Biol.* **238**: 575-91.

Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Weiss, D.S., Godowski, P. y Zychlinski, A. 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-Like receptor-2. *EMBO J.* **19**: 3325-3336.

Almirante, B., Rodríguez, D., Park, B.J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A.M., Almela, M., Mensa, J., Sanchez, F., Ayats, J., Gimenez, M., Saballs, P., Fridkin, S.K., Morgan, J., Rodríguez-Tudela, J.L., Warnock, D.W. y Pahissa, A. 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin. Microb.* **43**: 1829-35.

Almirante, B., Rodríguez, D., Cuenca-Estrella, M., Almela, M., Sánchez, F., Ayats, J., Alonso-Tarres, C., Rodríguez-Tudela, J.L. y Pahissa, A. 2006. Epidemiology, risk factors, y prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1681-1685.

Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Plá, J., Sánchez, M. y Nombela, C. 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*. **181**: 3058-68.

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

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

Álvarez-Peral, F.J. y Argüelles, J.C. 2000. Changes in external trehalase activity during human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*. *Research in Microbiology*. **151**: 837-843.

Álvarez-Peral, F.J., Zaragoza, O., Pedreño, Y. y Argüelles, J.C. 2002. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by H₂O₂ and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology*. **148**: 2599-2606.

Arana, D. 2008. Implicación de las rutas mediadas por quinasas de tipo MAP en la interacción de *Candida albicans* con células del sistema inmunitario. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Complutense de Madrid.

Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., y Plá, J. 2005. The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology*. **151**: 1033-1049.

Argüelles, J.C. 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* **174**: 217-224.

Argüelles, J.C. y Gacto, M. 1988. Differential location of regulatory and non regulatory trehalases in *Candida utilis* cells. *Antonie van Leeuwenhoek*. **54**: 555-565.

Argüelles, J.C., Mbonyi, K., Van Aelst, L., Vanhalewyn, M., Jans, A.W.H. y Thevelein, J.M. 1990. Absence of glucose-induced CAMP signaling in the *Saccharomyces cerevisiae* mutants *cat1* and *cat3* which are deficient in the repression of glucose-repressible proteins. *Arch. Microbiol.* **154**: 199-205.

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

Ashford, B. 1928. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* **8**: 507-538.

Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Thevelein, J.M. e Iturriaga, G. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* **136**: 3649-59.

Barns, S.M., Lane, D.J., Sogin, M.L., Bibeau, C. y Weisburg, W.G. 1991. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* **173**: 2250-5.

Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., Sternberg, M.J. 2001. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins*. **5**: 39-46.

Bates, S., MacCallum, D.M., Bertram, G., Munro, C.A., Hughes, H.B., Buurman, E.T. et al. 2005. *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J. Biol. Chem.* **280**: 23408-23415.

Benaroudj, N., Lee, D.H. y Golberg, A.L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular protein from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **276**: 24261-24267.

Berlett, B.S. y Standtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 20313-20316.

Blankenship, J.R., y Mitchell, A.P. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 588–594.

Bolam, D.N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P. y Gilbert, H.J. 1998. *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J.* **331**: 775-81.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J. y Davies, G.J. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J.* **382**: 769-81.

Brockerhoff, H. 1974. Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes. *Lipids.* **9**: 645–650.

Brown, G.D., Gordon, S. 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* **19**: 311-5.

Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F. y Dubreucq, E. 2004. High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **111**: 41–50.

Brunelli, L., Crow, J.P. y Beckman, J.S. 1995. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**: 327-334.

Brumfiel, G. 2004. Just add water. *Nature.* **428**: 14-15.

Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S et al. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* **459**: 657-62.

Calderone, R.A. 1993. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends. Microbiol.* **1**: 55-58.

Calderone, R.A. y Brown, P.C. 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **55**: 1-20.

Carruba, G., Pontieri, E., De Bernardis, F., Martino, P. y Cassone, A. 1991. DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 916–922.

Cassone, A. 2008 Fungal vaccines: real progress from real challenges. *Lancet Infect Dis.* **8**: 114-24.

Cateau, E., Rodier, M.H. y Imbert, C. 2008. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 153-5.

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

Chaturvedi, V., Wong, B. y Newman, S.L. 1996. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *J. Immunol.* **156**: 3836–3840.

Cheetham, J., Smith, D.A., da Silva Dantas, A., Doris, K.S., Patterson, M.J., Bruce, C.R. y Quinn, J. 2007. A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* **18**: 4603-14.

Chen, J., Chen, J., Lane, S., y Liu, H. 2002. A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **46**: 1335-1344.

Colaço, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. y Roser, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology.* **10**: 1007-11.

Collina, A.R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P. y Repentigny, L. 1996. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect. Immun.* **64**: 4514-4519.

Colling, L., Carter, R.N., Essmann, M. y Larsen, B. 2005. Evaluation of relative yeast cell surface hydrophobicity measured by flow cytometry. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **13**: 43-48.

Colombo, A.L., Ngai, A.L., Bourque, M., Bradshaw, S.K., Strohmaier, K.M. y Taylor, A.F. 2010. Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common nonalbicans *Candida* species: review of the caspofungin database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 1864-71.

Colombo, A.L., Nucci, M., Park, B.J., Nouér, S.A., Arthington-Skaggs, B., da Matta, D.A., Warnock, D. y Morgan, J. 2006. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2816–2823.

Crowe, J.H., Crowe, L.M. y Chapman, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. *Science* **223**: 701-703.

Cutler, J.E. 2001. N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **1**: 75-86.

- De Toro, M., Torres, M.J., Maite, R. y Aznar, J.** 2011. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 418-24.
- Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M. y Barroso, J.B.** 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* **53**: 1255-1272.
- Destruelle, M., Holzer, H. y Klionsky, D. J.** 1995. Isolation and characterization of a novel yeast gene, ATH1, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast.* **11**: 1015-1025.
- De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. y Wiemken, A.** 1993. Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.* **212**: 315-23.
- Ding, C., y Butler, G.** 2007. Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for *BCR1* in biofilm formation. *Eukaryot. Cell* **6**: 1310–1319.
- Douglas, C.M.** 2001. Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **39**: 55-66.
- Douglas, L.J.** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**: 30–36.
- Dromer, F., Bernede-Bauduin, C., Guillemot, D. y Lortholary, O.** 2008. French Cryptococcosis Study Group. Major role for amphotericin B–flucytosine combination in severe cryptococcosis. *PLoS One.* **3**: 2870.
- d'Enfert, C., Fontaine, T.** 1997. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* treA gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiol.* **24**: 203-16.
- Elbein, A.D.** 1967. Carbohydrate metabolism in *Streptomyces hygrosopicus*. I. Enzymatic synthesis of trehalose phosphate from guanosine diphosphate D-glucose-14C. *J. Biol. Chem.* **242**: 403-6.
- Enjalbert, B., Smith, D.A., Cornell, M.J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A.J. y Quinn, J.** 2006. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 2006. **17**: 1018-32.
- Eppink, M.H., Boeren, S.A., Vervoort, J. y van Berkel, W.J.** 1997. Purification and properties of 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase (decarboxylating), a novel Xavin adenine dinucleotide-dependent monooxygenase from *Candida parapsilosis* CBS604. *J. Bacteriol.* **179**: 6680–6687.

Eppink, M.H., Cammaart, E., Van Wassenaar, D., Middelhoven, W.J. y van Berkel, W.J. 2000. Purification and properties of hydroquinone hydroxylase, a FAD-dependent monooxygenase involved in the catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* CBS604. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6832–6840.

Ernst, J.F. y Prill, S.K. 2001. O-glycosylation. *Med Mycol.* **1**: 67-74.

Eroglu, A. Russo, M.J., Biegansky, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H. y Toner, M. 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnol.* **18**: 163-167.

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

Evans, C.H. 2000. Cytokines: molecular keys to homeostasis, development, and pathophysiology. *Histo. histopathol.* **53**: 199-205.

Ferguson, J., Ho, J.Y., Peterson, T.A. y Reed, S.J. 1986. Nucleotide sequence of the yeast cell division cycle started genes *CDC28*, *CDC36* and *CDC 39*, and a structural analysis of the predicted products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **14**: 6681-6697.

Fernandao, P.H., Panagoda, G.J. y Samaranayake, L.P. 1999. The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human bucal epithelial cells. *APMIS* **107**: 1034–1042.

Fleet, G.H. 1991. Cell walls. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. *The yeasts*, vol **4**. Academic Press, Inc., New York, 199-277.

Fortún, J. 2011. Antifungal therapy update: new drugs and medical uses. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **5**: 38-44.

François, J. y Parrou, J.L. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 125-45.

Frohner, I.E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O. y Kuchler, K. 2009. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol. Microbiol.* **71**: 240-52.

Fuchs, B.B. y Mylonakis, E. 2009. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell.* **8**: 1616-25.

Fundyga, R.E., Kuykendall, R.J., Lee-Yang, W. y Lott, T.J. 2004. Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect. Genet. Evol.* **4**: 37–43.

Gacser, A., Stehr, F., Kroger, C., Kredics, L., Schafer, W. y Nosanchuk, J.D. 2007. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **75**: 4710–4718.

- Gacser, A., Trofa, D., Schafer, W. y Nosanchuk, J.D.** 2007. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J. Clin. Investig.* **117**: 3049–3058.
- Gancedo, C. y Flores, C.L.** 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research.* **4**: 351-359.
- Garcia-Effron, G., Katiyar, S.K., Park, S., Edlind, T.D. y Perlin, D.S.** 2008. A naturally-occurring Fks1p proline-to-alanine amino acid change in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2305-2312.
- García-Martínez, J.M., Valentín-Gómez, E., Pemán, J., Cantón, E., Gómez-García, M. y Del Castillo-Agudo, L.** 2010. Identification of pathogenic yeast species by polymerase chain reaction amplification of the *RPS0* gene intron fragment. *J. Appl. Microbiol.* **108**: 1917-1927.
- Gasch, A.P.** 2007. Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast.* **24**: 961-76.
- Ghannoum, M.A.** 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 122–143.
- Gibson, R.P., Gloster, T.M., Roberts, S., Warren, R.A., Storch de Gracia, I., García, A., Chiara, J.L. y Davies, G.J.** 2007. Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **46**: 4115-9.
- González-Párraga, P., Alonso-Monge, R., Plá, J. y Argüelles, J.C.** 2010. Adaptive tolerance to oxidative stress and the induction of antioxidant enzymatic activities in *Candida albicans* are independent of the Hog1 and Cap1-mediated pathways. *FEMS Yeast Res.* **10**: 747-56.
- González-Párraga P., Hernández J.A. y Argüelles, J.C.** 2003. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast.* **20**: 1161-1169.
- González-Párraga, P., Sánchez-Fresneda, R., Martínez-Esparza, M., y Argüelles, J.C.** 2008. Stress responses in yeasts: what rules apply?. *Arch. Microbiol.* **189**: 293-6.
- Greenblatt, J.** 1991. Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell.* **66**: 1067-1070.
- Guarente, L.** 1984. Yeast promoters: positive and negative elements. *Cell.* **36**: 799-800.
- Guillum, A.M., Tsay, E.Y. y Kirsch, D.R.** 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol Gen Genet.* **198**: 179-182.

- Guinea, J., Peláez, T., Recio, S., Torres-Narbona, M. y Bouza, E.** 2008. In vitro antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and fluconazole against 1,007 isolates of zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1396-400.
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J. y Levine, F.** 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnol.* **18**: 168-171.
- Guex, N. y Peitsch, M.C.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* **18**: 2714-2723.
- Hahn, S., Hoar, E.T. y Guarente, L.** 1985. Each of three "TATA elements" specifies a subset of the transcription initiation sites at the *CYC-1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8562-8566.
- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: Glover D. M, ed. DNA cloning: a practical approach. Oxford, IRL Press, **109**.
- Haüßler, S.** 2004. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **6**: 546-551.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G. y Schaper, F.** 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* **374**: 1-20.
- Hidaka, M., Honda, Y., Kitaoka, M., Nirasawa, S., Hayashi, K., Wakagi, T., Shoun, H. y Fushinobu, S.** 2004. Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has a clan GH-L-like (alpha/alpha)(6) barrel fold. *Structure.* **12**: 937-47.
- Herrero, E., Bellí, G. y Casa, C.** 2010. Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**: 659-68.
- Higashiyama, T.** 2002. Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* **74**: 1263-1269.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. y Ezekowitz, R.A.** 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* **284**: 1313-8.
- Hostetter, M.K.** 1994. Adhesines and ligands involved in the interaction of *Candida albicans* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 29-42.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M., Boller, T. y Wiemken, A.** 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur. J. Biochem.* **219**: 187-193.

- Hottiger, T., Boller, T. y Wiemken, A.** 1987. Rapid changes of heat and dessication tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* **220**: 113-115.
- Hruskova-Heidingsfeldova, O., Dostal, J., Majer, F., Havlikova, J., Hradilek, M. y Pichova, I.** 2009. Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol. Chem.* **390**: 259–268.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. y Schafer, W.** 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* **174**: 362–374.
- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P.A., Poulain, D. y Jouault, T.** 2003. *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeast through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**: 13086-13093.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E. Jr, Nozawa, Y. y Ghannoum, M.A.** 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* **63**: 1993-1998.
- Ikner, A., Shiozaki, K.** 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* **569**: 13-27.
- Iwaya-Inoue, M. y Takata, M.** 2001. Trehalose plus chloramphenicol prolong the base life of tulip flowers. *HortScience.* **36**: 946-950.
- Jamieson, D.J.** 1998. Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **14**: 1511-1527.
- James, S.A., Collins, M.D. y Roberts, I.N.** 1994. The genetic relationship of *Lodderomyces elongisporus* to other ascomycete yeast species as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 308–311.
- Janeway, C.A. Jr.** 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today.* **13**: 11-16.
- Janeway, C.A. Jr. y Medzhitov, R.** 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* **20**: 197-216.
- Jorge, J.A., Polizeli, L.T., Thevelein, J.M. y Terenzi, H.F.** 1997. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 165-171.
- Jouault, T., Sarazin, A., Martinez-Esparza, M., Fradin, C., Sendid, B. y Poulain, D.** 2009. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol.* **11**: 1007-15.

- Kataoka, M., Delacruz-Hidalgo, A.R., Akond, M.A., Sakuradani, E., Kita, K. y Shimizu, S.** 2004. Gene cloning and overexpression of two conjugated polyketone reductases, novel aldo-keto reductase family enzymes, of *Candida parapsilosis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **64**: 359–366.
- Katsuno, M., Adachi, H. y Sobue, G.** 2004. Sweet relief for Huntington disease. Nature Medicine. **10**: 123-124.
- Kelley, L.A. y Sternberg, M.J.E.** 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. Nature Protocols. **4**: 363-371.
- Kidd, G. y Devorak, J.** 1994. Trehalosa is a sweet target for agbiotech. Bio/technology. **12**: 1328-1329.
- Kim, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravink, A. y Klionsky, D.J.** 1996. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1563-9.
- Klis, F.M., de Groot, P. y Hellingwerf, K.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. Med. Mycol. **39**: 1-8.
- Kopp, M., Nwaka, S. y Holzer, H.** 1993. Corrected sequence of the yeast neutral trehalase-encoding gene (*NTH1*): biological implications. Gene. **150**: 403-4.
- Krissinel, E. y Henrick, K.** 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. Acta Cryst. **60**: 2256-2268.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K. y Ghannoum, M.A.** 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect. Immun. **70**: 878–888.
- Kumamoto, C.A.** 2005. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **102**: 5576-5581.
- Laffey, S.F. y Butler, G.** 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. Microbiology. **151**: 1073-81.
- Latgé, J.P. y Calderone, R.** 2002. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. Curr. Opin. Microbiol. **5**: 335-358.
- Lee, K.L., Buckley, H.R. y Campbell, C.** 1975. An aminoacid liquid synthetic medium for the development of the mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. Sabouradia. **13**: 148-153.
- Lee, J.K., Koo, B.S. y Kim, S.Y.** 2003. Cloning and characterization of the *xy11* gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 6179–6188.

- Leyman, B., Avonce, N., Ramon, M., Van Dijck, P., Thevelein, J.M. e Iturriaga, G.** 2004. New selection marker for plant transformation, pp. 385-396. In: *Methods in Molecular Biology* Vol. 267. Humana Press Inc. Totowa, N. J. Usa.
- Letonturier, P.H.** 1981. "Manual de inmunológica general" Masson. Barcelona – Méjico.
- Lillie, S.H. y Pringle, J.R.** 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitations. *J. Bacteriol.* **143**: 1384-1394.
- Lima-Neto, R.G., Beltrão, E.I., Oliveira, P.C. y Neves, R.P.** 2009. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses.* **54**: 23-9.
- Lin, D., Wu, L.C., Rinaldi, M.G. y Lehmann, P.F.** 1995. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1815–1821.
- Liu, H., Kohler, J. y Fink, G.R.** 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science.* **266**: 1723-1726.
- Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. y Fink, G.R.** 1997. Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell.* **90**: 939-949.
- Lockhart, S.R., Messer, S.A., Pfaller, M.A. y Diekema, D.J.** 2008. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 374–376.
- Logue, M.E., Wong, S., Wolfe, K.H. y Butler, G.** 2005. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTLa1 allele at its mating type locus. *Eukaryot. Cell.* **4**: 1009–1017.
- Londesborough, J. y Varimo, K.** 1984. Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.* **219**: 511-518.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mansour, M.K. y Levitz, S.M.** 2002. Interactions of fungi with phagocytes. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 359-365.
- Martínez-Esparza, M., Sarazin, A., Poulain, D. y Jouault, T.** 2009. A method for examining glycans surface expression of yeasts by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **470**: 85-94.
- Masuoka, J. y Hazen, K.C.** 2004. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. *Infect. Immun.* **72**: 6230-6.
- Mellor, J.** 1989. The activation and initiation of transcription by the promoters *accharomyces cerevisiae*. J. Mellor (ed), *Molecular and Cell Biology of Yeast.*

- Messer, S.A., Jones, R.N. y Fritsche, T.R. 2006. International surveillance of *Candida spp.* and *Aspergillus spp.*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1782–1787.
- Middelhoven, W.J., Coenen, A., Kraakman, B. y Sollewijn Gelpke, M.D. 1992. Degradation of some phenols and hydroxybenzoates by the imperfect ascomycetous yeasts *Candida parapsilosis* and *Arxula adenivorans*: evidence for an operative gentisate pathway. *Antonie van Leeuwenhoek.* **62**: 181–187.
- Mille, C., Bobrowicz, P., Trinel, P.A., Li, H., Maes, E., Guerardel, Y., Fradin, C., Martínez-Esparza, M., Davidson, R.C., Janbon, G., Poulain, D. y Wildt, S. 2008. Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **283**: 9724–36.
- Missall, T.A., Lodge, J.K. y McEwen, J.E. 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell* **3**: 835–846.
- Mittenbühler, K. y Holzer, H. 1991. Characterization of different forms of yeast acid trehalasa in the secretory pathway. *Arch. Microbiol.* **155**: 217–220.
- Molero, G., Díez-Orejas, R., Navarro, F., Monteoliva, L., Plá, J., Gil, C., Sánchez-Perez, M. y Nombela, C. 1998. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int. Microbiol.* **1**: 95–106.
- Monod, M., Togni, G., Hube, B. y Sanglard, D. 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* **13**: 357–368.
- Nakase, T., Komagata, K. y Fukazawa, Y. 1979. A comparative taxonomic study on two forms of *Candida parapsilosis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**: 375–386.
- Nathan, C. y Shiloh, M.U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 8841–8848.
- Navarro-García, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Plá, J., Sentandreu, R. y Nombela, C. 1998. A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiol.* **144**: 411–424.
- Navarro-García, F., Eisman, B., Fiuza, S.M., Nombela, C. y Plá, J. 2005. The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiol.* **151**: 2737–2749.
- Navarro-García, F., Sanchez, M., Plá, J. y Nombela, C. 1995. Functional characterization of the MKC1 gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol. Cell Biol.* **15**: 2197–2206.
- Netea, M.G., Van Der Graaf, C.A., Vonk, A.G., Verschueren, I., Van Der Meer, J.W. y Kullberg, B.J. 2002. The roll of toll-like (tlr) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* **15**: 1483–1489.

- Nie, Y., Xu, Y., Yang, M. y Mu, X.Q.** 2007. A novel NADH-dependent carbonyl reductase with unusual stereoselectivity for (R)-specific reduction from an (S)-1-phenyl-1, 2-ethanediol-producing microorganism: purification and characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**: 555–562.
- Nobile, C.J., y Mitchell, A.P.** 2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr. Biol.* **15**: 1150–1155.
- Nobile, C.J., Andes, D.R., Nett, J.E., Smith, F.J., Yue, F., Phan, Q.T., Edwards, J.E., Filler, S.G. y Mitchell, A.P.** 2006. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog.* **2**: 63.
- Nosek, J., Dinouel, N., Kovac, L. y Fukuhara, H.** 1995. Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 61–72.
- Nwaka, S., Mechler, B. y Holzer, H.** 1996. Deletion of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett.* **386**: 235-238.
- Nwaka, S. y Holzer, H.** 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **58**: 199-224.
- Oliveira, M.T., Specian, A.F., Andrade, C.G., França, E.J., Furlaneto-Maia, L. y Furlaneto, M.C.** 2010. Interaction of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning electron microscopy analysis. *Micron.* **41**: 604-608.
- Pachl, J., Svoboda, P., Jacobs, F., Vandewoude, K., Van der Hoven, B. y Spronk, P.** 2006. Mycograb Invasive Candidiasis Study Group. A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin. Infect Dis.* **42**: 1404-13.
- Panek, A.C., Araujo, P.S., Neto, V.M. y Panek, A.D.** 1987. Regulation of the trehalose-6-phosphate synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **11**: 459-465.
- Panizo, M.M., Vera, R., Flores, Y., Montes, W. y González, G.** 2005. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **25**: 2.
- Parrou, J.L., Jules, M., Beltran, G. y François, J.** 2005. Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function. *FEMS Yeast Res.* **5**: 503-11.
- Pasqualotto, A.C., Thiele, K.O. y Goldani, L.Z.** 2010. Novel triazole antifungal drugs: focus on isavuconazole, ravuconazole and albaconazole. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **11**: 165-74.
- Pedreño, Y.** 2005. Clonación y caracterización funcional del gen *ATC1* que codifica la trehalasa ácida de *Candida albicans*. Tesis de Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.

- Pedreño, Y., González-Párraga, P., Conesa, S., Martínez-Esparza, M., Aguinaga, A., Hernández, J.A. y Argüelles, J.C.** 2006. The cellular resistance against oxidative stress (H₂O₂) is independent of neutral trehalase (Ntc1p) activity in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **6**: 57-62.
- Pedreño, Y., González-Párraga, P., Martínez-Esparza, M., Sentandreu, R., Valentin, E., y Argüelles, J.C.** 2007. Disruption of the *Candida albicans* *ATC1* gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiology.* **153**: 1372-81.
- Pedreño, Y., Maicas, S., Argüelles, J.C., Sentandreu, R. y Valentin, E.** 2004. The *ATC1* gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **39**: 40852-40860.
- Pemán, J., Cantón, E., Orero, A., Viudes, A., Frasset, J. y Gobernado, M.** 2002. Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. *Rev. Iberoam. Micol.* **19**: 30-35.
- Pemán, J. y Salavert, M.** 2012. General epidemiology of invasive fungal disease. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **30**: 90-8.
- Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Messer, S.A., Tendolkar, S. y Diekema, D.J.** 2005. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida spp.*, including 315 isolates resistant to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5425–5427.
- Pfaller, M.A. y Diekema, D.J.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 133-163.
- Pfaller, M.A. y Diekema, D.J.** 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**: 1-53.
- Pichova, I., Pavlickova, L., Dostal, J., Dolejsi, E., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Weber, J., Ruml, T. y Soucek, M.** 2001. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2669–2677.
- Poulain, D. y Jouault, T.** 2004. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 1-8.
- Prill, S.K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schroppel, K. y Ernst, J.F.** 2005. PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol. Microbiol.* **55**: 546-560.
- Ramage, G., Martinez, J.P. y López-Ribot, J.L.** 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* **6**: 979–986.
- Rashid, M.H., Rajanna, C., Zhang, D., Pasquale, V., Magder, L.S., Ali, A., Dumontet, S. y Karaolis, D.K.R.** 2004. Role of exopolysaccharide, the rugose phenotype and *VpsR* in the pathogenesis of epidemic *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 105–113.

- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R. y Morschhäuser, J.** 2004. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*. **341**: 119-27.
- Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A. y Kurimoto, M.** 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* **40**: 871-98.
- Rodaki, A., Bohovych, I.M., Enjalbert, B., Young, T., Odds, F.C., Gow, N.A. y Brown, A.J.** 2009. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* **20**: 4845-55.
- Román, E., Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R. y Plá, J.** 2007. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol.* **15**: 181-190.
- Romani, L.** 2004. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 1-23.
- Roser, B. y Colaço, C.** 1993. A sweeter way to fresher food. *New Scientist.* **138**: 25-28.
- Rossignol, T., Ding, C., Guida, A., d'Enfert, C., Higgins, D.G. y Butler, G.** 2009. Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell.* **8**: 550-559.
- Rouabhia, M., Schaller, M., Corbucci, C., Vecchiarelli, A., Prill, S.K., Giasson, L. et al.** 2005. Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect Immun.* **73**: 4571-4580.
- Ruiz-Herrera, J.** 1992. Fungal cell wall, structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentin, E. y Sentandreu, R.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* **6**: 14-29.
- Rycovska, A., Valach, M., Tomaska, L., Bolotin-Fukuhara, M. y Nosek, J.** 2004. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology.* **150**: 1571-1580.
- Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J.D. y Patterson, J.E.** 2001. Risk factors for *Candida species* colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr. Infect. Dis.* **20**: 1119-24.
- Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D.B. y Karplus, P.A.** 1997. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 810-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. y Russell, D.W.** 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring harbor Laboratory Press.

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

Sánchez-Fresneda, R., Guirao-Abad, J.P., Argüelles, A., González-Párraga, P., Valentín, E. y Argüelles, J.C. 2012. Specific stress-induced storage of trehalose, glycerol and d-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

San Miguel, P.F. y Argüelles, J.C. 1994. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1200**: 155-160.

Sato, K., Yang, X.L., Yudate, T., Chung, J.S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R.P., Underhill, D., Cruz, P.D. Jr. y Ariizumi, K. 2006. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J. Biol. Chem.* **281**: 38854-66.

Sayle, R. y Milner-White, E.J. 1995. Trends in Biochemical Sciences (TIBS), RasMol: Biomolecular graphics for all. Vol. 20, No. 9, p. 374.

Scherer, S. y Stevens, D.A. 1987. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 675-9.

Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B. 1986. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K., Suh, S.P. y Ryang, D.W. 2002. Biofilm production by isolates of *Candida species* recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1244-1248.

Silljé, H.H., Paalman, J.W., ter Schure, E.G., Olsthoorn, S.Q., Verkleij, A.J., Boonstra, J. y Verrips, C.T. 1999. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 396-400.

Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D. y Azeredo, J. 2009. Biofilms of non-*Candida albicans Candida species*: quantification, structure and matrix composition. *Med. Mycol.* **10**: 1080.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W. y Azeredo, J. 2011. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 288-305.

Singer, M.A. y Lindquist, S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vivo and in vitro. *Mol. Cell.* **1**: 639-648.

- Singer, M.A. y Lindquist, S.** 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**: 460-468.
- Smith, D.A., Nicholls, S., Morgan, B.A., Brownj, A.J. y Quinn, J.** 2004. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 4179-90.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**: 503-517.
- Stam, M.R., Blanc, E., Coutinho, P.M. y Henrissat, B.** 2005. Evolutionary and mechanistic relationships between glycosidases acting on alpha- and beta-bonds. *Carbohydr. Res.* **340**: 2728-34.
- Storz, G., Christman, M.F., Sies, H. y Ames, B.N.** 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to AND in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* **84**: 8917-8921.
- Sudbery, P., Gow, N. y Berman, J.** 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**: 317-24.
- Suh, S.O., Nguyen, N.H. y Blackwell, M.** 2008. Yeasts isolated from plantas-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *FEMS Yeast Rev.* **8**: 88-102.
- Sullivan, D.J., Henman, M.C., Moran, G.P., O'Neill, L.C., Bennett, D.E, Shanley, D.B. y Coleman, D.C.** 1996. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* **44**: 399-408.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C. y Odds, F.C.** 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 284-292.
- Tavanti, A., Hensgens, L.A., Mogavero, S., Majoros, L., Senesi, S. y Campa, M.** 2010. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol.* **10**: 203.
- Thevelein, J.M.** 1988. Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions. *Exp. Mycol.* **12**: 1-12.
- Thevelein, J.M.** 1996. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: Brambl, R., Marzluf, G.A. (Eds). *The Mycota* **3**: 395-414.
- Toledano, M., Delaunay-Moisan, A., Outten, C.E. y Igarria, A.** 2012. Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. *Antioxid Redox Signal.*
- Trofa, D., Gacser, A. y Nosanchuk, J.D.** 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**: 606-625.

Valentín, E., Mormeneo, S. y Sentandreu, R. 2000. The cell surface of *Candida albicans* during morphogenesis. *Contrib. in Microbiol.* **5**: 138-50.

Van Asbeck, E.C., Clemons, K.V. y Stevens, D.A. 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit. Rev. Microbiol.* **35**: 283-309.

Vaysse, L., Dubreucq, E., Pirat, J.L., Galzy, P. 1997. Fatty hydroxamic acid biosynthesis in aqueous medium in the presence of the lipase-acyltransferase from *Candida parapsilosis*. *J. Biotechnol.* **53**: 41-46.

Vercher, M.P., García-Martínez, J.M., Cantón, E., Pemán, J., Gómez-García, M., Valentín-Gómez, E. y Del Castillo-Agudo, L. 2011. Differentiation of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* by specific PCR amplification of the *RPS0* intron. *Int. J. Med. Microbiol.* **30**: 531-535.

Verweij, P.E., Mellado, E., y Melchers, W.J. 2007. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* **356**: 1481-3.

Warn, P.A., Sharp, A., Morrissey, G. y Denning, D.W. 2010. Activity of aminocandin (IP960; HMR3270) compared with amphotericin B, itraconazole, caspofungin and micafungin in neutropenic murine models of disseminated infection caused by itraconazole susceptible and resistant strains of *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35**: 146-51.

Wass, M.N., Kelley, L.A. y Sternberg, M.J. 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic acids research* **38** (Web Server issue): W469-73.

Weems, J.J., Jr. 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 756-766.

Weisburd, S. 1988. Death-defying dehydration. *Science News.* **133**: 107-110.

Wiemken, A. 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Leeuwenhoek.* **58**: 209-217.

Whiteway, M., Dignard, D. y Thomas, D.Y. 1992. Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 9410-9414.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P. y Edmond, M.B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 309-317.

Wysong, D.R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W. y Diamond, R.D. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.* **66**: 1953-1961.

Xu, J.R. 2000. Map kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 137-52.