



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

La Biosíntesis de Trehalosa como Potencial Diana
Antifúngica en *Candida albicans*.

Dña. Vanessa I. Pujante Montoya
2019

AGRADECIMIENTOS

Al fin llegó el día que terminé este trabajo y puedo dar las gracias a todos los que me ayudaron.

En primer lugar dar las gracias a mi tutor, **Dr. Victoriano F. Mulero** por aceptarme como alumna de doctorado, apoyarme, guiarme con sus consejos y no permitir que se me olvide nada. A mi director de Tesis, **Dr. Juan Carlos Argüelles**, por darme la oportunidad de trabajar en sus proyectos y por haberme enseñado en que consiste la realización de un trabajo como éste.

Mis codirectores en este trabajo se merecen un ¡GRACIAS!. El **Dr. José Pedro Guirao** por su labor incluso desde la distancia; por su inagotable apoyo y comprensión para mostrarme lo que no veía claro, por sus palabras de aliento que me hacían recobrar la fuerza y encontrar algo de paz; y la **Dra. Ruth Sánchez-Fresneda** por su dirección a corta distancia, su gran paciencia en los días en los que yo perdía la mía, y por sus palabras de ánimo para alentarme a seguir. Encontré en vosotros primero maestros y después grandes amigos. Gracias a mis compañeras de laboratorio, **Estela Iris Agüera** y **M^a Luz Muñoz**, por vuestro apoyo y vuestras palabras de ánimo. Con semejante elenco, va uno bien a trabajar.

Gracias **Dr. Daniel González**, por ayudarme con ese ensayo tan complicado y desconocido para mí, haces que parezca fácil ¡eres un “crack”! y además eres un buen compañero “interdepartamental”. Gracias **Dra. Miriam Sánchez** por leerme este trabajo y por tus ideas. A la que fue mi compañera de clase y ahora mi compañera de “doctorado” **Amaia Talavera**, gracias por todas las cosas que me has enseñado que eran totalmente desconocidas para mí. Gracias a los tres por ayudar a inspirarme en nuestros ratos de charlas y debates. Agradecer a **Dra. M^a Luisa Cayuela**, por tener siempre un rato para mí, una palabra de apoyo, y prestarme su experiencia y su punto de vista en los ámbitos que desconozco.

A mis vecinos del departamento **José, Jerónima, Alejandro, Teresa, Beatriz, Elisa, Curro** y **Armando** que siempre estáis dispuestos a ofrecer una ayuda cuando los aparatos no colaboran, abiertos a sugerencias, a compartir unos aperitivos y a ofrecer una sonrisa en cada cruce por el pasillo.

Agradecida a mi familia: a mis padres, **José Luis Pujante Vera** y **M^a Remedios Montoya Bravo**, y a mi hermano **José Luis Pujante Montoya** simplemente por estar ahí, por ser mi apoyo para levantarme cuando me he caído y empujarme a perseguir mis sueños. A mi **Nala**, por su compañía y su calor cuando he estado enferma o incapacitada, y a mi **Neng**, por todo el amor que me dio cuando aún estaba conmigo. Gracias de corazón.

A mis amigas, **Ana M^a Pagán, Verónica Tomás** y **Lola Mendoza** por dejarme formar parte de vuestras vidas y formar parte de la mía. Sin vosotras, no habría podido

llegar tan lejos. **Deborah Bohor**, gracias, porque a pesar de la distancia, siempre estás ahí para apoyarme y escucharme cuando hace falta.

Gracias a las amigas que se han leído este trabajo **Isabel Cerón, Irene Almodóvar y Dra. Patricia Esteve** por sus aportaciones e ideas.

Gracias a mis maestros de danza **Emilia Riquelme, Yunik Vaimatapako y Maite López**, que me ayudaron a conocerme mejor, reconectar conmigo misma y a sacar fuerzas a través de la danza cuando me sentía perdida y agotada; y gracias a todas mis compañeras de danza tahitiana (**Alicia, Irene, Fina, Cris, Ana, Pili, Loli, Noelia**) y de tribal, (**Beatriz, Isabel, Sonia, Adriana, Inma, M Cruz, Raquel, Michiko, Carolina y Noelia**) porque con su apoyo nos hemos convertido en parte de una misma familia “danzante”.

Me faltan palabras para poder decir lo **agradecida, afortunada y orgullosa** que estoy de toda la gente que me rodea y que de una manera u otra ha contribuido a la realización de este trabajo. Espero poder seguir teniéndolos a todos en mi vida. Soy afortunada de haberme cruzado con vosotros y da igual lo que el destino que me depare, podré afrontarlo con vosotros a mi lado.

Gracias a los miembros del tribunal por tomarse el tiempo necesario para leer ésta tesis, y valorar la misma.

Y con la finalización de este proyecto se cierra un viaje complicado que me ha enseñado más de quién soy, qué quiero y cómo debo enfrentar los proyectos que se pongan a mi alcance.

Vanessa I. Pujante Montoya

感謝

18 de Marzo de 2019

A mi familia

“La ciencia no es sólo una disciplina de razón, sino también de romance y pasión.” Stephen Hawking

LISTA DE ABREVIATURAS

5FC	5-fluorocitosina
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AmB	Anfotericina B
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Adenosín trifosfato
BPK	Tampón fosfato potásico
CC	Control de crecimiento
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DHF	Dihidrofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPI	Glicosidil fosfatidil inositol
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IP	Yoduro de propidio
Ki	Constante de inhibición
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
MF	Micafungina
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
•OH	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Ión peroxinitrito
PBS	Tampón fosfato salino
RhD	Rodamina
ROS	Especies de oxígeno reactivo
T6P	Trehalosa-6-fosfato
TCR	Receptores de células T
Tps1p	Trehalosa-6P-sintetasa
Tps2p	Trehalosa-6P-fosfatasa
UDP	Uridina difosfato
UFC	Unidades formadoras de colonias
Ura-/+	Auxótrofo/Protótrofo para uracilo
YPD	Extracto de levadura, peptona y glucosa

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
HISTORIA E IMPORTANCIA CLÍNICA DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	1
BIOLOGÍA GENERAL DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	2
PRINCIPALES FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA EN <i>CANDIDA SP.</i>	4
EPIDEMIOLOGÍA DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	11
ASPECTOS RELATIVOS AL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR <i>CANDIDA ALBICANS</i>	17
PRINCIPALES ANTIFÚNGICOS CON APLICACIÓN CLÍNICA.....	19
LA TREHALOSA: UTILIZACIÓN DE ESTE DISACÁRIDO COMO DIANA TERAPÉUTICA CONTRA <i>CANDIDA ALBICANS</i>	27
SÍNTESIS DE TREHALOSA	28
HIDRÓLISIS DE TREHALOSA.....	30
DISTINTAS APLICACIONES DE LA TREHALOSA.....	32
<u>INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA</u>	32
<u>USOS TERAPÉUTICOS</u>	33
<u>OTROS USOS COMERCIALES</u>	34
<u>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</u>	36
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	38
MATERIALES	38
CEPAS DE <i>C. ALBICANS</i> UTILIZADAS EN ESTA MEMORIA.....	38
MEDIOS DE CULTIVO	39
MÉTODOS	41
MEDIDA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	41
<u>Turbidimetría</u>	41
<u>Peso húmedo</u>	41
<u>Recuentos celulares</u>	41
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMIS).....	42
VIABILIDAD Y SENSIBILIDAD EN EL TRATAMIENTO CON AGENTES ESTRESANTES.....	43
<u>Ensayo de viabilidad</u>	43
<u>Formación de macrocolonias: ensayo de sensibilidad en medio sólido</u>	44
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....	44
DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE PROTEÍNA.....	45
VALORACIÓN ANALÍTICA DE GLUCOSA: MÉTODO DE GLUCOSA-OXIDASA-PEROXIDASA	46
DETERMINACIÓN DE TREHALOSA ENDÓGENA.	48
ENSAYOS ENZIMÁTICOS	49
Catalasa.....	49
Superóxido dismutasa (SOD).....	50
Glutatió reductasa (GR).....	52
DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.	53
<u>Determinación global de la producción de radicales libres de oxígeno (ROS)</u>	53
<u>Determinación del potencial de membrana</u>	54
DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR CON IODURO DE PROPIDIO (IP).....	55
FORMACIÓN DE BIOFILMS O BIOPELÍCULAS.....	55
Valoración colorimétrica con XTT	56
EXTRACCIÓN DE GRASAS	56
Metilación del extracto lipídico	57

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS, ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS.	57
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	59
<u>CAPÍTULO I.....</u>	59
ACCIÓN ANTIFÚNGICA DE MICALFÚNGINA (MF) Y ANFOTERICINA (AMB) SOBRE LOS MUTANTES DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ALTERADOS EN EL METABOLISMO DE LA TREHALOSA.....	59
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) PARA AMB Y MF.....	59
VIABILIDAD CELULAR EN MEDIO LÍQUIDO	60
VIABILIDAD CELULAR EN MEDIO LÍQUIDO DE LOS MUTANTES CAI-4 Y <i>TPS1Δ</i>	62
CRECIMIENTO COLONIAL EN MEDIO SÓLIDO.	63
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)	64
DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	67
ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ANTIFÚNGICOS.....	69
ACTIVIDAD CATALASA (CAT) Y SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).....	70
GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)	72
SÍNTESIS DE TREHALOSA ENDÓGENA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO.....	73
ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	75
EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LOS BIOFILMS (O BIOPELÍCULAS).	77
<u>CAPÍTULO II.....</u>	82
ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL FLUCONAZOL SOBRE LOS MUTANTES <i>CANDIDA ALBICANS</i> DEFICIENTES EN LA SÍNTESIS DE TREHALOSA.	82
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL FLUCONAZOL.....	83
CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO PARA FLZ.....	85
VIABILIDAD CELULAR EN MEDIO LÍQUIDO DE SC5314, <i>TPS1Δ</i> Y <i>TPS2Δ</i>	89
CRECIMIENTO COLONIAL EN MEDIO SÓLIDO	90
ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE ROS INTRACELULAR	91
MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	93
NIVELES DE ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN RESPUESTA AL FLUCONAZOL	95
Catalasa (CAT).....	96
Superóxido dismutasa (SOD).....	97
EFFECTO DEL FLUCONAZOL SOBRE LA MORFOLOGÍA DE <i>C. ALBICANS</i>	99
EFFECTO DEL FLUCONAZOL SOBRE EL CONTENIDO DE TREHALOSA ENDÓGENA	101
EFFECTO DEL FLUCONAZOL SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS.....	102
<u>CAPÍTULO III.....</u>	107
ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS: PÉRFIL LIPÍDICO, ANÁLISIS DEL EFFECTO PARADÓJICO Y POSIBLE ACCIÓN SINÉRGICA SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS EN <i>CANDIDA ALBICANS</i>	107
PERFIL LIPÍDICO DE LA CEPA PARENTAL Y LOS MUTANTES DE <i>C. ALBICANS</i>	109
EFFECTO DEL FLUCONAZOL SOBRE EL MUTANTE <i>TPS2Δ</i> DE <i>C. ALBICANS</i>	119
EFFECTO COMBINADO DEL FLUCONAZOL CON OTROS ANTIFÚNGICOS SOBRE CÉLULAS PLANCTÓNICAS DE <i>TPS2Δ</i>	121
ACTIVIDAD METABÓLICA BASAL DURANTE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS EN <i>C. ALBICANS</i>	125
EFFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANTIFÚNGICOS Y DIFERENTES COMPUESTOS NATURALES SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN <i>C. ALBICANS</i>	126
<u>DISCUSIÓN GENERAL.....</u>	130
<u>CONCLUSIONES.....</u>	138
<u>RESUMEN.....</u>	141

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Historia e importancia clínica del género *Candida*

La Microbiología clínica desde sus comienzos ha tenido como principal objeto de estudio a las bacterias, por lo que el examen de los hongos (incluyendo las levaduras), quedó en un segundo plano, aunque sus “efectos” en las transformaciones de la materia con la obtención de productos derivados de valor alimenticio, como el pan, la cerveza o el vino, eran conocidos desde la antigüedad. Por otra parte, ciertas patologías antiguas se han ido documentando y hoy en día se pueden atribuir a levaduras. De hecho, fue Hipócrates, en el siglo V a. C., quien describió por primera vez una infección bucal, equiparable al “muget” o candidiasis oral, sin que acertara con la etiología ante la imposibilidad de observar las formas de vida microscópica. No sería hasta veinte siglos después cuando se descubriría la verdadera causa (1).

En 1839, células de *Candida sp.* fueron observadas por Langenbeck, en forma de placas blanquecinas y abscesos en mucosas y órganos de cadáveres. Gruby consiguió su aislamiento y cultivo sobre rodajas de patatas en 1842, pero sería Robin, quién en 1853 le dio el nombre inicial de *Oidium albicans* y describió de forma clara su biología (1). La especie fue definida como *Candida albicans* por la micóloga holandesa Christine Marie Berkhout en 1923, durante el desarrollo y publicación de su tesis doctoral. Además de su nomenclatura, Berkhout propuso una nueva clasificación del género, que fue aceptada en el 3^{er} Congreso Internacional de Microbiología, celebrado en Nueva York en 1939.

El escenario ha cambiado drásticamente en las tres últimas décadas, registrándose un aumento sin precedentes en la morbilidad y mortalidad causada por infecciones fúngicas, que suelen tener carácter superficial entre la población sana. Sin embargo, las micosis septicémicas son muy graves entre los pacientes que sufren algún tipo de inmunodepresión, incluyendo los pacientes de SIDA, ancianos y neonatos, o aquellos que sufren enfermedades crónicas,

terapias prolongados de antibióticos, o los sometidos a implantes médicos y hospitalización prolongada (2-5). En la actualidad, *Candida albicans* sigue siendo el hongo patógeno de mayor prevalencia en humanos. Sin embargo, otras especies de *Candida*, consideradas clásicamente como "no-*C. albicans*", como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicales* y *C. krusei*, son aisladas con frecuencia creciente como agentes responsables de brotes micóticos en centros sanitarios (5-7).

El cuadro patológico denominado "candidiasis", representa la cuarta causa de infecciones nosocomiales transmitidas a través del torrente sanguíneo en hospitales, siendo considerado como un problema persistente de salud pública (3,5,8). Una complicación adicional proviene de las dificultades de tratamiento. Aunque en los últimos años se han mejorado los protocolos de diagnóstico y han aumentado los antifúngicos disponibles, disponer de una terapia eficaz es un problema muy grave (3,5), ya que el arsenal de antibióticos contra hongos sigue siendo limitado y se detectan cada vez más cepas fúngicas resistentes a los antifúngicos convencionales (9).

Biología general de *Candida albicans*

El género *Candida* pertenece al reino de los hongos o reino "Fungi". *C. albicans* es una levadura oportunista tradicionalmente encuadrada entre los Deuteromicetos, hongos imperfectos por carecer de un verdadero ciclo de reproducción sexual. Sin embargo, desde que Berkhout propusiera la nueva clasificación taxonómica, se ha redefinido como un hemiascomiceto dentro del orden Saccharomycetales, perteneciendo a la familia Saccharomycetaceae (Fig. 1.1). *C. albicans* está muy relacionada con la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, aunque ambas especies divergen en más de 900 millones de años, un grado de divergencia similar a la que ocurre entre los humanos y los peces (10).

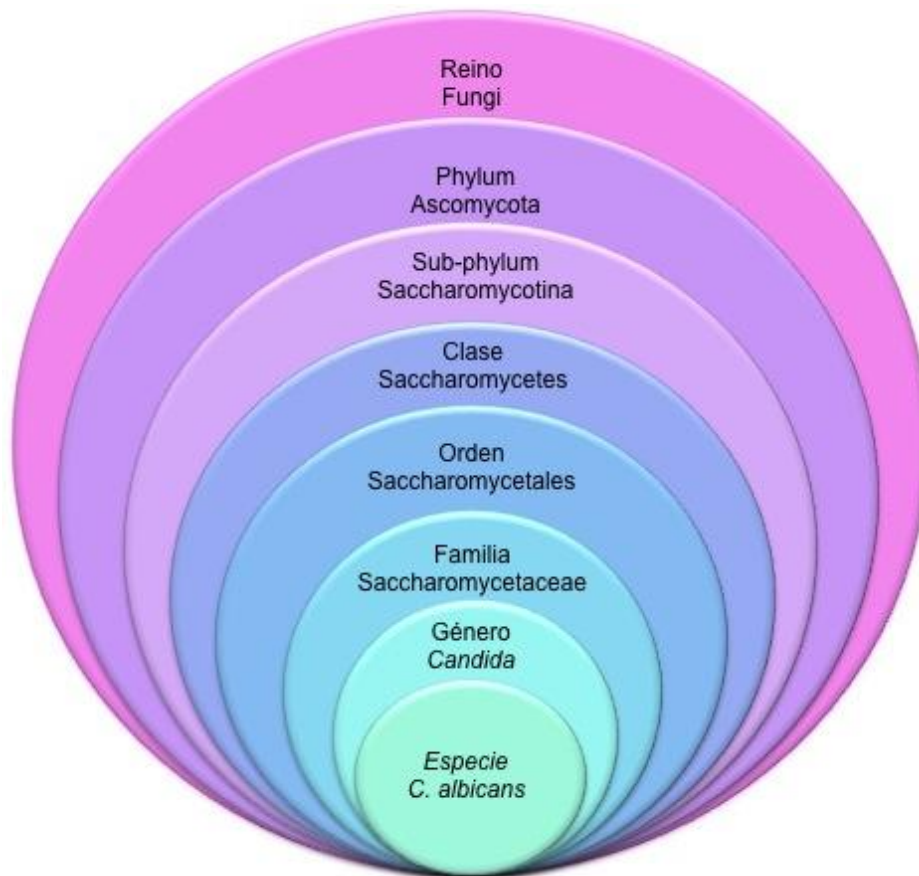


Figura 1.1 Posición taxonómica de *Candida albicans*.

La especie incluye células mesófilas (crece bien entre 25-42°C, siendo su temperatura óptima 37°C), de forma ovoide, cilíndrica o alargada. En medios comunes forma colonias blancas o ligeramente ocreas debido a pigmentos carotenoides (11,12), desprendiendo un característico olor a levaduras en fermentación. La textura de las colonias varía según la especie que las forme pudiendo tener un aspecto suave y brillante o arrugada y sin brillo (12). *C. albicans* emplea el glucógeno como principal reserva, pudiendo también sintetizar trehalosa (13). Puede fermentar glucosa, maltosa, galactosa y otros monosacáridos, produciendo ácido y gas. En cambio, no fermenta sacarosa y sólo genera ácido, un rasgo de distinción con otras especies del género *Candida* (11).

Considerado como un diploide permanente, estudios recientes revelan la existencia en *C. albicans* de estadios parasexuales, que posibilitan conjugaciones

atípicas, pérdida de cromosomas o rápidas transiciones diploide-tetraploide (10). Algunos de estos cambios son de naturaleza epigenética, inducibles por el medio ambiente, y son importantes en la formación y desarrollo de biofilms.

La mayoría de las especies del género de *Candida*, al ser saprofitas, pueden vivir formando parte de la flora cutánea, pero *C. albicans* aunque también forma parte de la microbiota comensal presente en la piel y las mucosas, bajo ciertas condiciones puede activar su ciclo infeccioso, convirtiéndose en el patógeno de mayor prevalencia en humanos (2,3). Sin reservorio ambiental conocido, muchas especies de *Candida* se pueden localizar en alimentos u objetos inanimados (como utensilios clínicos, prótesis y catéteres), donde crecen en forma de levadura y sólo un 10% causan infecciones superficiales, crónicas o sistémicas, adoptando la forma de hifa (invasiva). Ambas morfologías presentan importantes diferencias tanto estructurales, en los componentes de la superficie celular, como metabólicas y fisiológicas (12,14–18).

La incorporación de *C. albicans* a la microflora del ser humano tiene lugar mediante transmisión materno-fetal durante o inmediatamente después del nacimiento (19). Puede permanecer como un comensal asintomático y así podemos encontrarla en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina, suponiendo del 50 al 80% de la microbiota. El desarrollo de procesos patológicos abarca desde infecciones superficiales, de buen pronóstico, hasta cuadros sistémicos potencialmente mortales, siendo el estado inmunodepresivo del paciente y su capacidad de respuesta el factor determinante de la gravedad. De hecho, algunos estudios sugieren que el desarrollo de una infección productiva, es el resultado de la interacción entre el agente virulento, la respuesta inmunitaria del paciente y otros miembros de la microbiota (19).

Principales factores que contribuyen a la virulencia en *Candida sp.*

Los principales factores de virulencia que median la infección de *C. albicans* y la ulterior colonización del cuerpo humano son:

- **Formación de biofilms (=biopelículas).** Uno de los procesos más importantes en cuanto a la virulencia de *C. albicans* es la formación de biopelículas (20). Se trata de un mecanismo complejo consistente en varios pasos (Fig 1.2), modulado por múltiples genes (21,22):
 - adherencia,
 - formación de hifas,
 - producción de la matriz extracelular
 - dispersión.

Los biofilms son estructuras complejas que engloban un grupo de levaduras, embebidas dentro de una matriz extracelular, producida por ellas mismas, rica en carbohidratos y proteínas, que las protege del sistema inmunitario, de los tratamientos antifúngicos y contribuye a mejorar su competitividad frente a células plantónicas de vida libre ya que una vez formado el biofilm, éste actúa como una fuente constante de células que se diseminan por el torrente sanguíneo de forma que se producen y mantienen infecciones sistémicas (23).

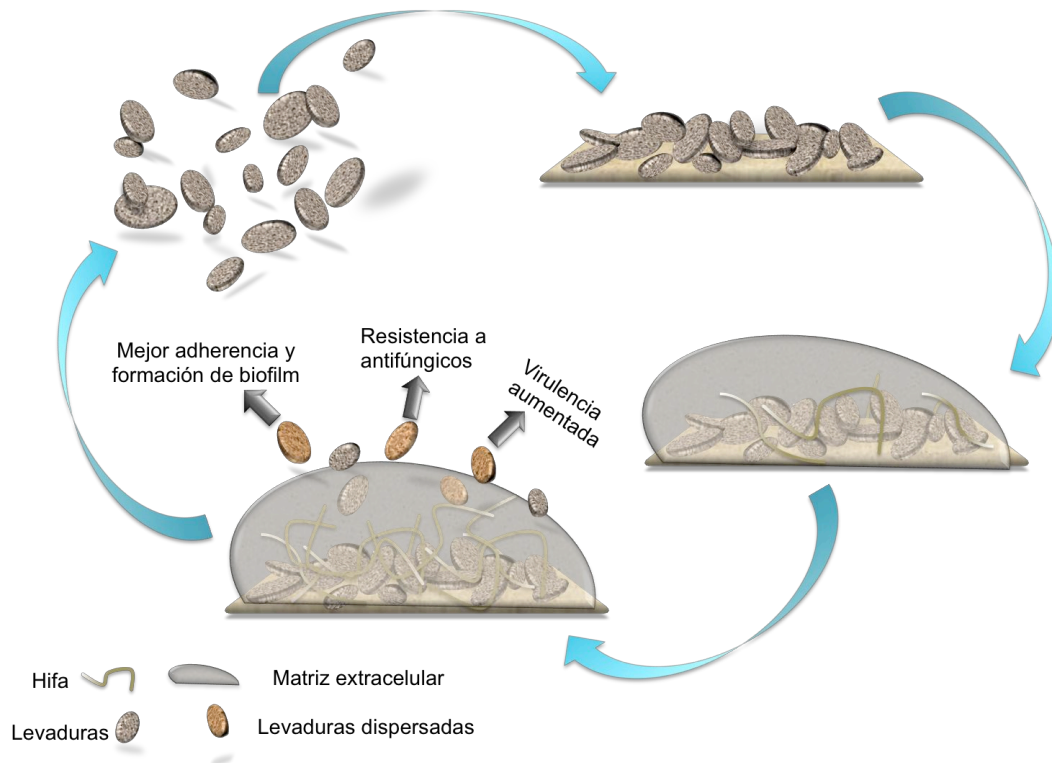


Figura 1.2. Esquema general sobre la formación de biofilms. La imagen ha sido adaptada a partir de Daraksham *et al.*, 2018 (23).

- **Adhesión celular:** Es la primera etapa, que implica el reconocimiento y posterior unión de *C. albicans* a las células y superficies del hospedador. Intervienen varios factores para que se produzca la filiación específica entre la levadura y el hospedador (o el material inerte):
 - Interacciones físico-químicas como la hidrofobicidad. La hidrofobicidad es crucial y está mediada por el tubo germinativo y ciertas proteínas (como Csh1p) que favorecen la fijación a la matriz extracelular y a los plásticos. Algunas proteínas responsables de la hidrofobicidad son también moléculas de reconocimiento que interactúan con glicoproteínas del receptor (lo que favorece la adhesión).
 - Adhesinas (proteínas presentes en blastoconidios e hifas). Son un grupo de proteínas de la familia de genes ALS (Agglutinin-like Sequence) responsables de la unión específica (24).
 - Polisacáridos, lipoproteínas, lípidos y fimbrias. (14,20).

- **Pared celular.** Además de aportar rigidez y dar forma a la células tiene varias funciones importantes como (25,26):
 - Proteger contra el estrés físico y/o químico
 - Servir de anclaje a las manoproteínas que se encuentran en la parte exterior.
 - Está comprometida en la patogenicidad de la levadura ya que sirve como anclaje a la célula huésped y contiene antígenos.

Básicamente la pared está formada por proteínas y carbohidratos dispuestos en agregados (25,27,28). Constituye aproximadamente el 30% del peso seco de la célula y está constituida por varias capas.

- Estructura interna: formado por quitina y β -1,3-glucano.
- Estructura externa: formada por mananos, proteínas y ácidos siálicos.

Ambas capas permanecen unidas por una malla de β -1,6-glucano. El conjunto aporta rigidez y flexibilidad a la levadura, que le permite crecer y soportar diversos tipos de estrés físico y ambiental. Los ácidos siálicos aportan carga negativa a la célula, favoreciendo una mayor adherencia (27,29).

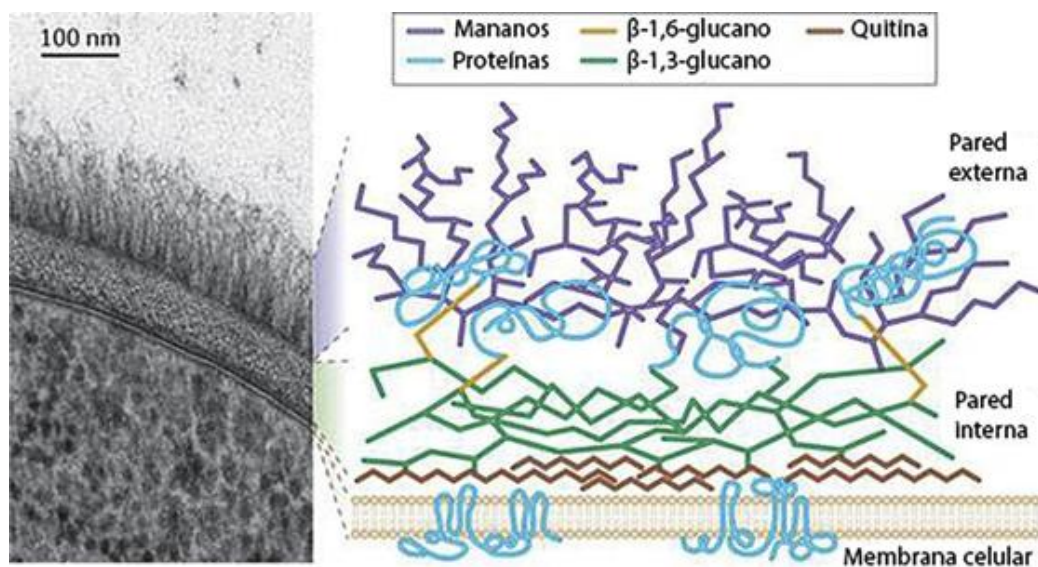


Figura 1.3. Representación de la organización de la pared de *C. albicans* y micrografía electrónica mostrando una estructura estratificada. El esquema se ha elaborado según la adaptación de Gow *et al.*, 2012 (25).

- **Polimorfismo:** La disposición a cambiar de morfología de este patógeno oportunista está relacionada con su capacidad para invadir el cuerpo humano y provocar cuadros patológicos (30). Morfológicamente *C. albicans* presenta una gran variedad de formaciones celulares, cuya predominancia varía según las condiciones ambientales (31) (Fig 1.4):
 - *Blastoconidios*, también llamadas blastosporas. Su tamaño oscila entre 2-4 μm de diámetro y tienen una forma elipsoidal u ovoidea (Fig 1.4 flechas azules).
 - *Pseudohifas*, formadas por células hijas unidas a la célula madre quedando una formación de células ovoides separadas con septos de forma que no hay comunicación citoplasmática entre las células (Fig. 1.4, flechas verdes).
 - *Hifas*. Su apariencia es fina y alargada. Presentan septos que sirven para comunicar los diferentes espacios citoplásmicos. El conjunto que forman las hifas se llama *micelio* (Fig 1.4 flechas rosas).
 - *Clamidiosporas*. Son las formas de resistencia producidas por algunas levaduras oportunistas. Se caracterizan por su gruesa pared y su alto contenido en carbohidratos y lípidos.. Suelen surgir cuando se alcanza el estadio estacionario y permanecen en estado de latencia durante periodos prolongados.

Aunque todas estas morfologías pueden encontrarse durante un proceso infeccioso *in vivo*, la más común es la morfología filamentosa. De hecho, la filamentación es inducida como consecuencia de ciertos parámetros ambientales, tales como la temperatura o el pH, que desencadenan cambios en la estructura y en la organización de la pared celular (14,32,33). Sin embargo, la relación entre la infección productiva y la filamentación no se considera un factor absoluto (34). En realidad y desde un punto de vista clínico, el cambio dimórfico es el opuesto; es decir, las formas filamentosas del ambiente, se convierten en células

levaduriformes dentro del organismos infectado, principalmente por efecto de la temperatura corporal (37°C).

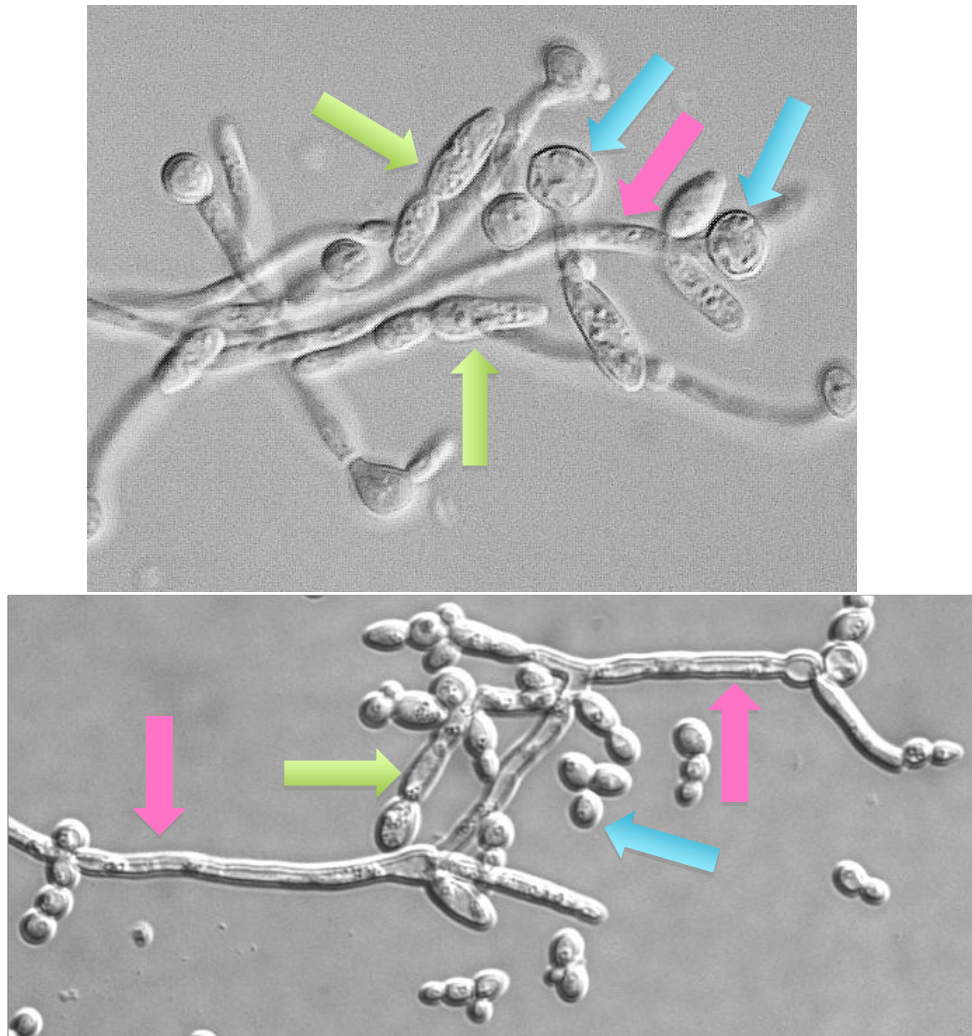


Figura 1.4. Morfologías habituales de *C. albicans*. Las blastosporas (o blastoconidios) corresponden a las células levaduriformes y están marcadas con una flecha azul; las pseudohifas están señalizadas con flechas verdes y las flechas rosas indican las hifas.

- **Factores diversos:** Además de los componentes ya referidos, hay otros elementos que contribuyen al poder invasivo de *C. albicans*. Entre otros, cabe destacar su capacidad para modular al sistema inmune de humanos y evitar la acción de la fagocitosis, ya que posee proteínas similares a las integrinas del complemento (14). Igualmente, dispone de mecanismos capaces de estimular la inmunosupresión (35). Por último, se debe mencionar un factor que permite a *C. albicans* neutralizar algunas acciones protectoras del sistema inmune, y que son objeto de estudio en

este trabajo, como las actividades detoxificantes, caso de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa y las proteínas de respuesta a choque térmico (36).

No obstante, para que se produzca una infección productiva, además de factores de virulencia del patógeno, deben intervenir otros componentes específicos del hospedador, junto a causas ambientales. Respecto del hospedador se reconocen tres factores esenciales que le predisponen para sufrir la infección por este patógeno oportunista:

- **Fisiológicos:** la infección local suele ser más recurrente en el caso de las mujeres debido a su fisionomía (37). También podría estar relacionado con los cambios hormonales que sufren las mujeres, de ahí que se presente de forma cíclica con los ciclos hormonales e incluso que sea frecuente en el embarazo ya que el ambiente rico en estrógenos aumenta el contenido de glucógeno lo que mejoraría la adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales vaginales (38).
- **Genéticos:** existen familias en la que hay una tendencia hereditaria a padecer candidiasis familiar o candidiasis mucocutánea crónica. Algunos de los genes que juegan un papel principal en el proceso han sido identificados y secuenciados (web: ivami.com/es/pruebas-geneticas-mutaciones-de-genes-humanos. Enfermedades neoplasias y farmacogenetica 2551-pruebas-geneticas-candidiasis familiar).
- **Adquiridos:** Las personas inmunodeprimidas, como los pacientes de VIH o los sometidos a trasplantes y terapia prolongada con antibióticos de amplio espectro, son más susceptibles de este tipo de infecciones (39,40). Otros grupos de riesgo de padecer candidiasis son los recién nacidos y ancianos, las personas obesas, los diabéticos, y los enfermos crónicos o los considerados como "grandes quemados".

Por otra parte, entre los factores ambientales, debemos mencionar: la humedad y la temperatura y, otros factores más aleatorios como la maceración crónica (comisuras de los ancianos, prótesis dentales, catéteres, marcapasos...). Como tratamiento preventivo recomendable frente a las candidiasis superficiales, se aconseja mantener una buena higiene corporal, así como el uso de ropa de algodón que no sea muy ceñida, mantener la integridad de la piel, usar colutorios con flúor, o ingerir probióticos y otros derivados lácteos para favorecer la acidez de la flora vaginal. Por otra parte, el uso de anticonceptivos también altera el equilibrio de la microbiota vaginal y predispone a contraer infecciones fúngicas, predominando las candidiasis.

Epidemiología de *Candida albicans*

Las especies del género *Candida* forman parte del microbioma natural del hombre (41). *Candida albicans* es la especie infecciosa predominante, aunque el género *Candida* incluye otro grupo de levaduras oportunistas que produce infecciones en el ser humano. Estas últimas son consideradas bajo la denominación genérica de "no-albicans" y su incidencia clínica en patologías hospitalarias y de la comunidad, ha aumentado en las últimas décadas. Entre ellas se incluyen especies tradicionalmente catalogadas como inocuas. Las siguientes especies son las de mayor prevalencia entre este último grupo: *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa* y *C. tropicalis*. Cada especie requiere de distintos componentes para colonizar nichos específicos y producir una infección en el cuerpo humano, como por ejemplo la fuente de carbono. Mientras *C. albicans* requiere altas concentraciones de glucosa o fructosa como las presentes en la sangre (42), *C. glabrata* prefiere utilizar lactato, por ello suele colonizar el tracto digestivo (43,44).

Antes de proseguir, conviene introducir una precisión terminológica referente a las infecciones oportunistas desencadenadas por levaduras del género *Candida*.

Candidiasis y candidemia son dos conceptos clínicos que, con frecuencia, se utilizan de forma conjunta, aunque es posible establecer diferencias.

- **Candidiasis:** se refiere a una infección de carácter superficial, que afecta principalmente a la piel y las mucosas y se localiza preferentemente en:
 - Tracto vaginal
 - Cavidad oral (muguet)
 - Tracto gastrointestinal
 - Dermis y regiones subcutáneas.

- **Candidemia:** cuando el huésped está muy debilitado, este patógeno oportunista es capaz de proliferar y diseminarse a través del torrente sanguíneo (45), colonizando órganos profundos y produciendo cuadros graves, como endocarditis y meningitis (46). Por tanto, las candidemias tendrían un carácter más sistémico e invasivo. No obstante, es común hablar de candidiasis superficiales y sistémicas o septicémicas.

Las candidemias producen una alta tasa de morbilidad en centros hospitalarios y, por tanto, un gran incremento en el gasto sanitario debido a largas convalecencias en todo el mundo. Las infecciones sistémicas por *Candida* suponen riesgo vital y están considerada como la cuarta causa de muerte en hospitales por infecciones nosocomiales en Estados Unidos. En el caso de *C. albicans*, la tasa de mortalidad supera el 50% (47) y actualmente continua siendo la responsable de la gran mayoría de infecciones fúngicas en personas hospitalizadas (5).

Un estudio multicéntrico que recoge datos referidos a las infecciones producidas por *Candida* se recoge en la Tabla 1.1. Para más información, se recomienda consultar las siguientes referencias: (15,16,48,49) .

Tabla 1.1. Distribución de infecciones causadas por especies de *Candida* en un estudio multicéntrico global realizado de modo coordinado entre varios laboratorios y hospitales (los valores se expresan como porcentaje).

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

La transformación de un organismos inocuo en un patógeno virulento es un proceso complejo, todavía no del todo comprendido (19). *C. albicans* vive como un comensal en la piel y la cavidad oral del 75% de la población sana, pero primordialmente los pacientes inmunocomprometidos pueden sufrir infecciones sistémicas recurrentes. Este tipo de infecciones igual que los episodios vulvovaginales que padecen aproximadamente el 75% de las mujeres al menos una vez en su vida, son superficiales y generalmente no letales. Sin embargo, las candidiasis sistémicas pueden tener carácter mortal, incluso pese a la aplicación de terapia antifúngica (47). Aunque algunos de los principales factores de virulencia son conocidos y han sido resumidos previamente anteriormente, es preciso profundizar en los mecanismos de resistencia, cuya incidencia va en aumento, e investigar una terapia dirigida, basada en el principio de toxicidad selectiva, con máximos daños al patógeno y mínimos efectos sobre las células del hospedador.

Tabla 1.2. Análisis comparativo de la tasa de incidencia clínica y la distribución global de *Candida* en algunos países de Europa y varios estados de Estados Unidos (50).

	Países	Incidencia
Europa	Noruega, Finlandia, Suecia	3/100.000 habit.
	Dinamarca	8,6/100.000 habit.
	Suiza, Reino Unido, Italia, España	1,2–8,1/100.000 habit.
USA	Iowa, San Francisco, Atlanta, Connecticut	6–14/100.000 habit.
	Baltimore	26,2/100.000 habit.

La tasa de incidencia global de *Candida* presenta importantes variaciones según las regiones geográficas estudiadas (Tabla 1.1; (50)). A su vez, el reparto de las infecciones causadas por las especies patógenas de *Candida* en Europa y Estados Unidos es muy similar, siendo siempre *C. albicans* la predominante, seguida de *C. glabrata* (Fig. 1.5) (15,51), mientras en Australia *C. parapsilosis* tiene una ligera supremacía sobre *C. glabrata*. Sin embargo, en Latinoamérica y en ciertos lugares de Asia, como India o Pakistán, la distribución cambia por completo, siendo *C. tropicalis* la especie más abundante, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y en cuarto lugar *C. albicans* (51).

En un reciente estudio sobre la zona de Kuwait, *C. albicans* fue descrita como la especie dominante junto con *C. parapsilosis* (32% cada una) seguidas de *C. tropicalis* (20%) y *C. glabrata* (13%), dándose episodios aislados debidos a otras especies de *Candida sp.* menos comunes como, *C. dubliniensis*, *C. famata* y *C. auris* (52), si bien esta última está siendo documentada como un patógeno emergente de gran incidencia clínica. Por tanto, determinados atributos geográficos y ambientales desempeñan un papel primordial, inherente a la especie de *Candida* dominante en una región determinada.

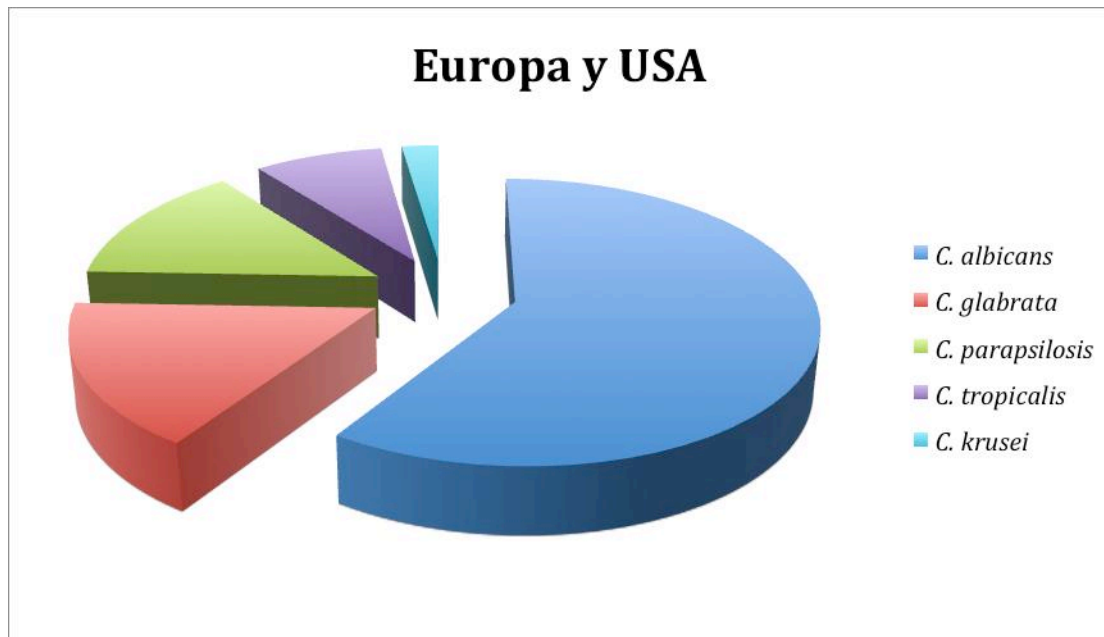


Figura 1.5. Distribución de las especies de *Candida* en Europa y Estados Unidos (Porcentaje) según Ramos *et al.*, 2016 (53) .

Por lo que respecta a España, un estudio realizado por FUNGEMYCA en los años 2009-2010 entre 43 hospitales de todo el estado, sobre pacientes afectados de fungemia, dio como resultado que *C. albicans* fue la especie aislada con más frecuencia, por detrás se encontró *C. parapsilosis* como la especie "no albicans" más común, a diferencia de otros países europeos dónde este lugar pertenece a *C. glabrata* (16).

Desde la década de 1990, se está produciendo una tendencia creciente de las candidemias en Europa, por lo que es importante aislar e identificar la cepa responsable de cada brote y conocer sus mecanismos de virulencia. Además, es frecuente encontrar situaciones clínicas donde no hay un solo microorganismo invasor del paciente, sino cuadros de infecciones múltiples. Esta situación también sucede con *Candida* sp., en la denominada "candidemia mixta". Según un estudio del proyecto CANDIPOP en diferentes hospitales españoles entre Abril de 2010 y Mayo de 2011, la mortalidad atribuible a candidemias mixtas durante la primera semana de admisión en hospitales es muy alto, aunque es un hecho infrecuente. La infección más común por el género *Candida* sp. se produce en pacientes enfermos de sida y en aquellos que han sufrido quemaduras, estando asociados en ambos casos a un incremento de la mortalidad (53). En ese mismo

estudio, se determinó que los casos de candidemia debidos a *C. glabrata* eran relativamente escasos, mientras los causados por *C. parapsilosis* eran más numerosos (Figura 1.6), al contrario de lo que ocurre en otros países de Europa, lo que apoya los resultados de los estudios previos comentados anteriormente (Figura 1.5).

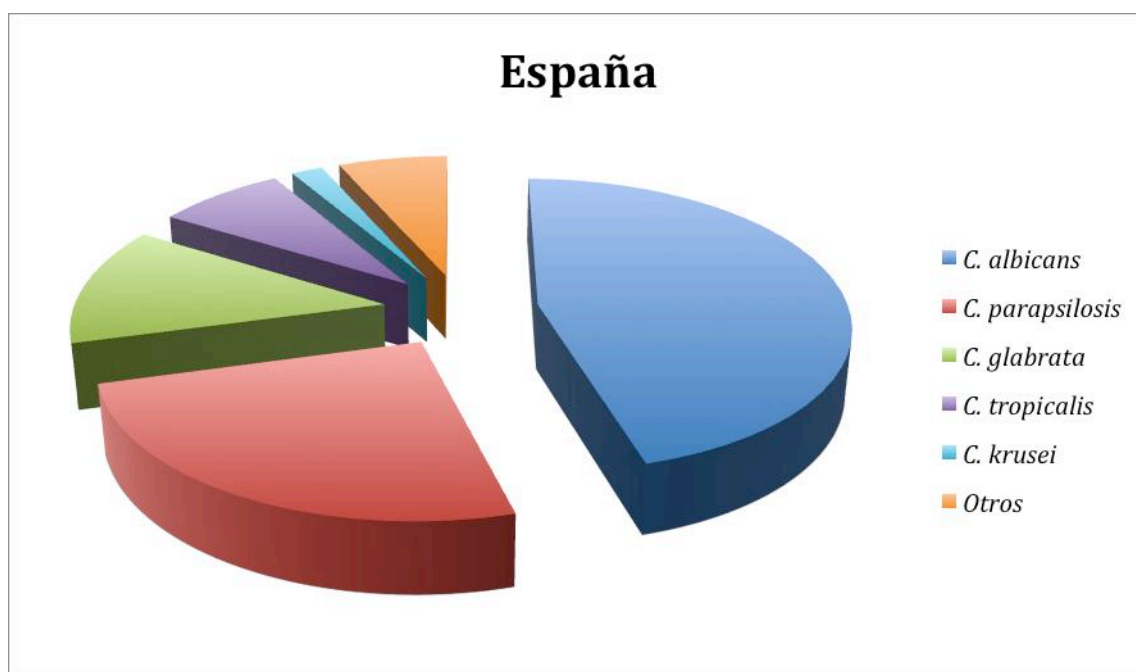


Figura 1.6. Incidencia clínica de las especies de *Candida sp.* en España, según estudio multicéntrico de CANDIPOP en distintos hospitales. El estudio fue realizado entre Abril de 2010 y Mayo 2011 (53).

La proporción de enfermos con candidemias mixtas o múltiples con respecto al total de candidemias registradas es del 1,9%, si bien no siempre están correctamente diagnosticadas. Así, *C. albicans* suele ser diagnosticada con alta frecuencia en candidemias mixtas junto a *C. glabrata*, hecho que dificulta la administración correcta de medicación, debido a la resistencia intrínseca de *C. glabrata* a ciertos antifúngicos como el Fluconazol. Un estudio ha concluido que un diagnóstico de candidemia mixta es indicador de un cierto riesgo de mortalidad (53). Estas evidencias refuerzan la idea de disponer de nuevos compuestos antifúngicos más seguros y eficaces, así como diseñar estrategias de investigación sobre rutas metabólicas comunes al género *Candida*, pero con escasa o nula presencia en el ser humano que permitan poder desarrollar una quimioterapia más adecuada.

Aspectos relativos al diagnóstico y el tratamiento de las infecciones causadas por *Candida albicans*

De modo general, la quimioterapia antifúngica ha estado comparativamente menos desarrollada que su equivalente antibacteriana. Este panorama ha cambiado en las últimas décadas a causa del notable aumento en la morbilidad y mortalidad provocado por las micosis septicémicas invasivas. En consecuencia, se han producido avances en los protocolos de diagnóstico, la profilaxis y el control terapéutico de los hongos patógenos (2,3). Sin embargo, aún quedan problemas esenciales por resolver, como el caso del aislamiento creciente de especies fúngicas responsables de brotes nosocomiales, consideradas tradicionalmente como no patógenas (54), o el aumento de cepas resistentes a los antifúngicos de uso clínico habitual. Estas circunstancias, junto al limitado arsenal disponible de antibióticos y sus importantes efectos secundarios debido a su baja toxicidad selectiva, complica mucho su efectividad clínica (55). *C. albicans*, la levadura de mayor prevalencia en humanos, es un ejemplo de lo difícil que resulta combatir a los hongos patógenos con las terapias disponibles hoy en día.

Otro aspecto esencial a considerar, consiste en que las infecciones fúngicas suelen ser procesos secundarios en pacientes afectados de una patología de base, que es preciso diagnosticar y tratar previamente (55,56). Además, el cuadro sintomático de las micosis es relativamente inespecífico. Así, la sintomatología general de las candidiasis superficiales es común a otras dermatomicosis, de buen pronóstico salvo complicaciones. Consiste en: piel enrojecida y ligeramente edematosa, prurito intenso (picor) y episodios de quemazón y dolor localizado. A menudo, no requiere prescripción antibiótica (56).

Por el contrario, los síntomas referidos a casos de candidiasis sistémica (candidemia) son más agresivos y dañinos para el organismo. Estos incluyen en distinto grado: alergias excesivas, trastornos vaginales recurrentes, depresión, cansancio extremo, migrañas, irritabilidad, pérdida transitoria de memoria,

formación de gas e hinchazón abdominal. También se han descrito episodios de diarrea o estreñimiento, alteraciones del síndrome premenstrual, dolores en oídos y articulaciones, así como otros síntomas más difusos. Un esquema de las distintas patologías producidas por *C. albicans* y su localización corporal, se presenta en la Figura 1.7. En estos casos siempre requieren tratamiento farmacológico, aunque éste puede no tener ningún efecto curativo.

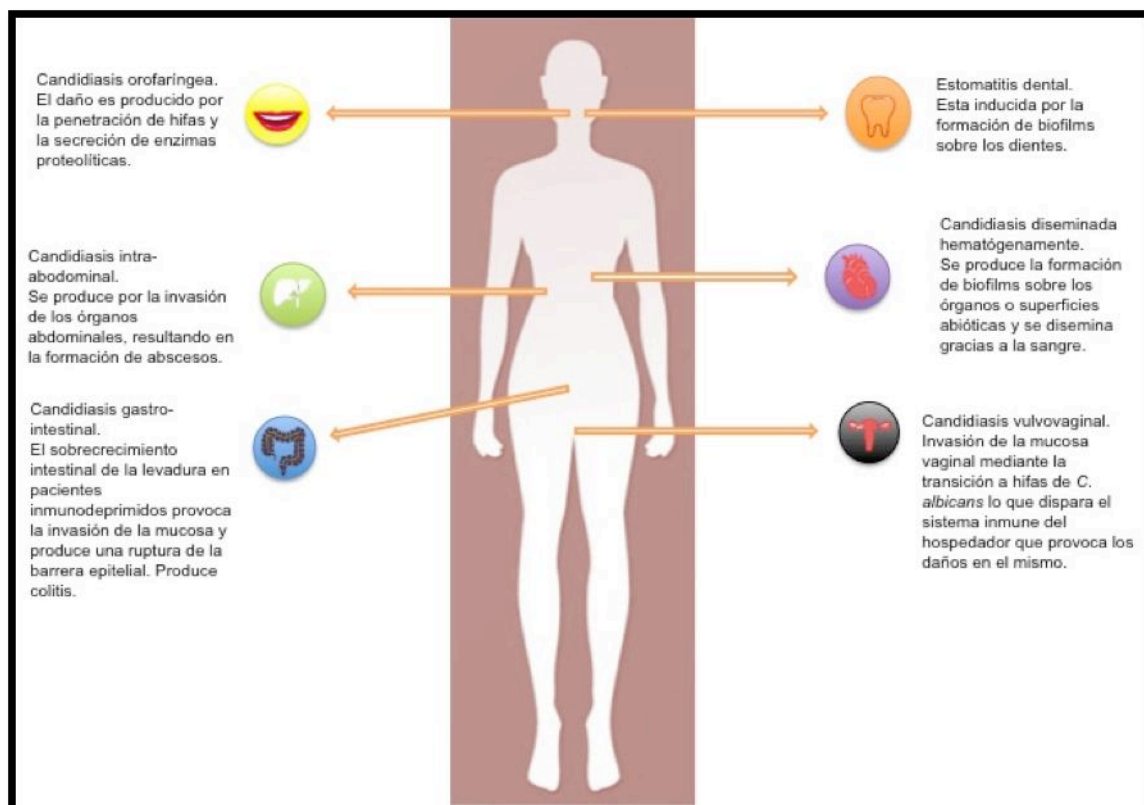


Figura 1.7. Ilustración mostrando las diferentes patologías y áreas corporales de infección que puede producir *C. albicans* sobre el cuerpo humano. Dibujo adaptado a partir de Jabra-Rizk *et al.*, 2016 (19).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es necesario encontrar nuevos compuestos con actividad fungicida más potentes y seguros, así como diseñar estrategias para localizar dianas susceptibles, exclusivas de los hongos patógenos, causando mínimos efectos secundarios al hospedador humano. Una de las posibles dianas terapéuticas nuevas, y que en este trabajo, proponemos y apoyamos, podría estar en la ruta metabólica implicada en la biosíntesis del disacárido no reductor,

trehalosa, ya que esta vía no es operativa en mamíferos (57), posibilitando que se cumpla el principio de toxicidad selectiva en la búsqueda de nuevos fármacos.

Principales antifúngicos con aplicación clínica

Un diagnóstico correcto y temprano resulta esencial como paso previo a la prescripción de aquellos antifúngicos que garanticen un tratamiento eficaz y sirvan para reducir la morbilidad y mortalidad por un patógeno fúngico concreto (5,58). En este sentido, es preciso tener en cuenta que el mecanismo fundamental de acción de los antifúngicos puede ser de dos tipos:

- **Acción fungistática:** el compuesto impide el crecimiento celular y la expansión del patógeno por el interior del cuerpo, de tal forma que el sistema inmunológico se encarga de erradicar la infección. Sin embargo, no causa la mortalidad del patógeno.
- **Acción fungicida:** El propio medicamento es letal para el hongo infeccioso, provocando la pérdida irreversible de la capacidad infecciosa de las células y, por tanto, deteniendo la infección. Este efecto puede ir acompañado o no de lisis celular.

Hay que tener en cuenta que ambos efectos, fungistático y fungicida, no son excluyentes, pueden darse para un mismo compuesto, dependiendo naturaleza química, concentración o vía de inoculación del mismo. De hecho, algunos antibióticos actuarán como fungistáticos a bajas concentraciones y fungicidas a altas dosis (59,60). En la actualidad, se dispone de tres familias principales de antifúngicos usados habitualmente en clínica:

i. Polienos

Son moléculas naturales sintetizadas por *Streptomyces nodosus*, con fuerte carácter anfipático debido una región hidrofílica y otra hidrófoba (Fig. 1.8).

La molécula contiene un anillo macrólido cerrado por una lactona. Incluye además la micosamina, un aminoazúcar unido al carbono 19 en la región hidrofílica del anillo macrólido y un grupo carboxilo unido al carbono 16. Esta organización le confiere su carácter anfipático (Fig. 1.8). Los polienos son un grupo muy utilizado contra la mayoría de las micosis porque poseen una elevada actividad antifúngica y un amplio espectro de actividad contra los hongos de mayor prevalencia. Dentro de ellos, los más utilizados son la anfotericina B (AmB) y la nistatina. (60,61).

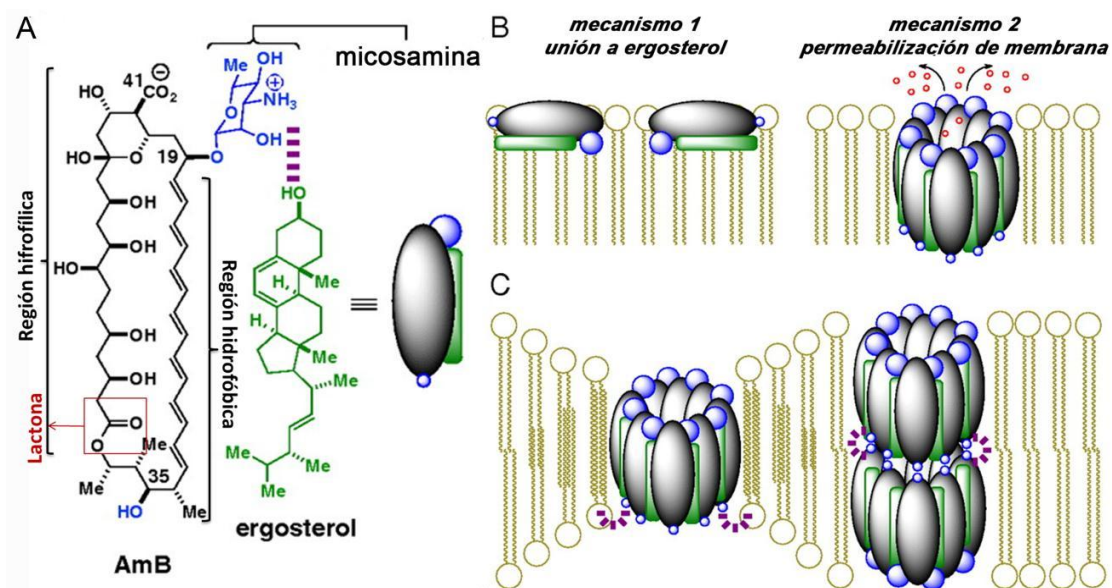


Figura 1.8. Estructura química (A) y mecanismos de acción (B y C) del principal polieno usado en clínica, la anfotericina B. Imagen adaptada de Gray *et al.*, 2012 (62), según las modificaciones realizadas por Guirao-Abad, 2016 (63).

El mecanismo de acción de lo polienos consiste en su unión al ergosterol, un lípido esencial de la membrana plasmática en hongos, equivalente al colesterol de animales. La permeabilidad de la membrana se ve alterada con la subsiguiente formación de poros y pérdida de agua y electrolitos esenciales, provocando una descompensación osmótica que lleva a la muerte celular.

La toxicidad causada por la AmB se debe a la región hidrofóbica, responsable de la unión al ergosterol, perteneciente a la misma familia de lípidos que el colesterol. Por tanto también tiene afinidad por el colesterol de las células animales, ocasionando efectos secundarios como nefrotoxicidad y hepatotoxicidad (64). Hay que resaltar, que a pesar de su aplicación clínica

desde la década de 1950, la resistencia de los hongos frente a AmB es muy rara (61,65,66). Para disminuir los efectos secundarios en el ser humano, se han diseñado distintas variaciones de la AmB, siendo la más efectiva la formulación liposomal, ya que tiene menor nefrotoxicidad y mantiene su carácter antifúngico, aunque se debe inyectar por vía intravenosa (60,64).

ii. Equinocandinas

Con una estructura compleja formada por un núcleo hexapeptídico y una cadena lateral acil lipídica, este grupo de antifúngicos son de naturaleza semisintética, siendo producidos por diferentes microorganismos y modificados de forma posterior (Fig. 1.9) (7,67,68).

Su acción se basa en la inhibición no competitiva de la síntesis de pared fúngica, teniendo menos efectos adversos sobre el paciente (66,69). Actúan como fungistáticos ya que las levaduras no pueden renovar su pared, pero a altas concentraciones son fungicidas y pueden producir lisis celular (60,67) (Fig. 1.10). Las equinocandinas más destacadas son: Micafungina, Caspofungina y Anidulafungina. Mantienen el núcleo lipofílico central y se diferencian principalmente en la cola hidrofóbica, pero aún es insuficiente la información disponible sobre su acción farmacológica, aunque están aumentando los casos de resistencia (7).

En este estudio, se ha utilizado la Micafungina (MF) (Fig. 1.9), caracterizada por la presencia de un complejo aromático en su cadena lateral que le aporta su carácter antifúngico, ya que inhibe de forma no competitiva la actividad β -1,3-glucano sintasa, intercalándose en la membrana (67,69). Además, con respecto al resto de equinocandinas, tiene menos toxicidad para el ser humano (64,70), aunque por su tendencia de unirse a proteínas del suero, pierde parte de su actividad antifúngica (70).

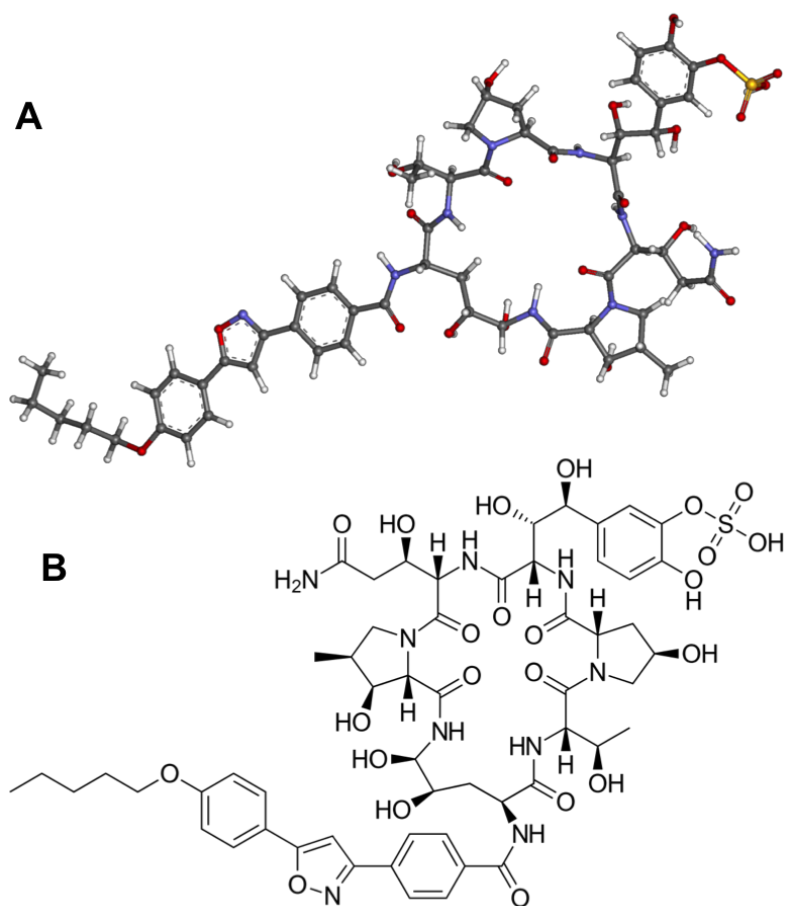


Figura 1.9. Estructura molecular de la Micafungina (MF). Está, conformada por un núcleo lipofílico central y una cola hidrofóbica. (A) Modelo de la molécula tridimensional (ChemSpider. ID21106351). (B) Fórmula y estructura de la micanfungina (Wikipedia).

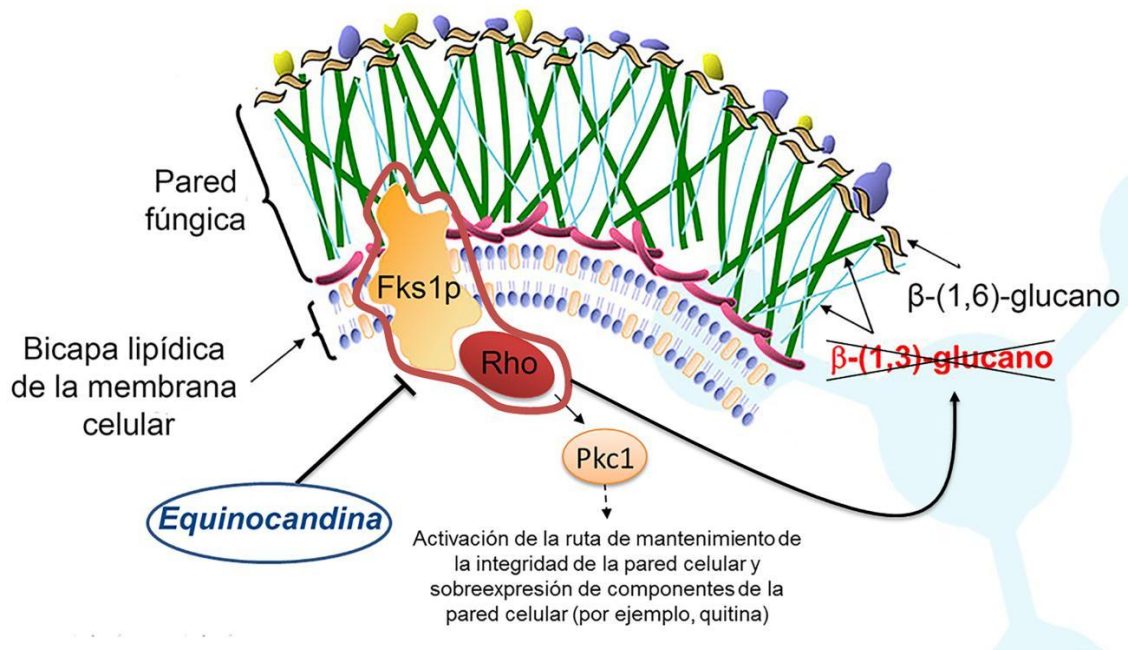


Figura 1.10. Mecanismo de acción de las equinocandinas. Imagen adaptada de la presentación de Kartsonis *et al.*, 2003, según las modificaciones realizadas por Guirao-Abad, 2016 (63).

iii. Azoles

Se trata de un grupo de compuestos con intensa actividad antifúngica y un amplio espectro de actividad. Estas moléculas sintéticas contribuyeron a un avance notable en el tratamiento de las micosis sistémicas oportunistas refractarias a otros antifúngicos. La introducción en clínica de estas moléculas como el Fluconazol, después de la anfotericina, contribuyó a disminuir la toxicidad de los tratamientos antimicóticos para el hospedador humano. La estructura base de todos los azoles está formada por un anillo derivado del imidazol. Se clasifican en dos grupos principales según el número de átomos de nitrógeno que forman parte del anillo (Fig. 1.11).

- Azoles de primera generación (imidazoles): Contienen dos nitrógenos en su estructura. Ketoconazol y Miconazol son los representantes más utilizados de este grupo.

- Azoles de segunda generación (triazoles): con tres nitrógenos en su estructura. Itraconazol y Fluconazol conforman este grupo, que se completa con nuevas moléculas derivadas de los anteriores, por introducción de distintos grupos funcionales, como el Voriconazol (derivado del fluconazol) y el Posaconazol (derivado del itraconazol).

Actualmente, los triazoles son los de mayor aplicación por ser los que mejor se toleran, pero en general la toxicidad de este grupo depende de la afinidad que tengan estos compuestos por el citocromo P450 de los mamíferos. Estos compuestos actúan uniéndose al grupo hemo de las enzimas que intervienen en la síntesis del ergosterol (como lanosterol-14- α -desmetilasa también conocido como citocromo P450_{14DM}) (Fig. 1.11). Como consecuencia, la membrana de las levaduras pierde fluidez y permeabilidad. Adicionalmente, se activan rutas alternativas de biosíntesis de esteroides que resultan tóxicos y producen cambios en la disposición de proteínas con dominios transmembrana. El efecto conjunto detiene el crecimiento de los cultivos y termina por producir también la muerte celular (59,60,66).

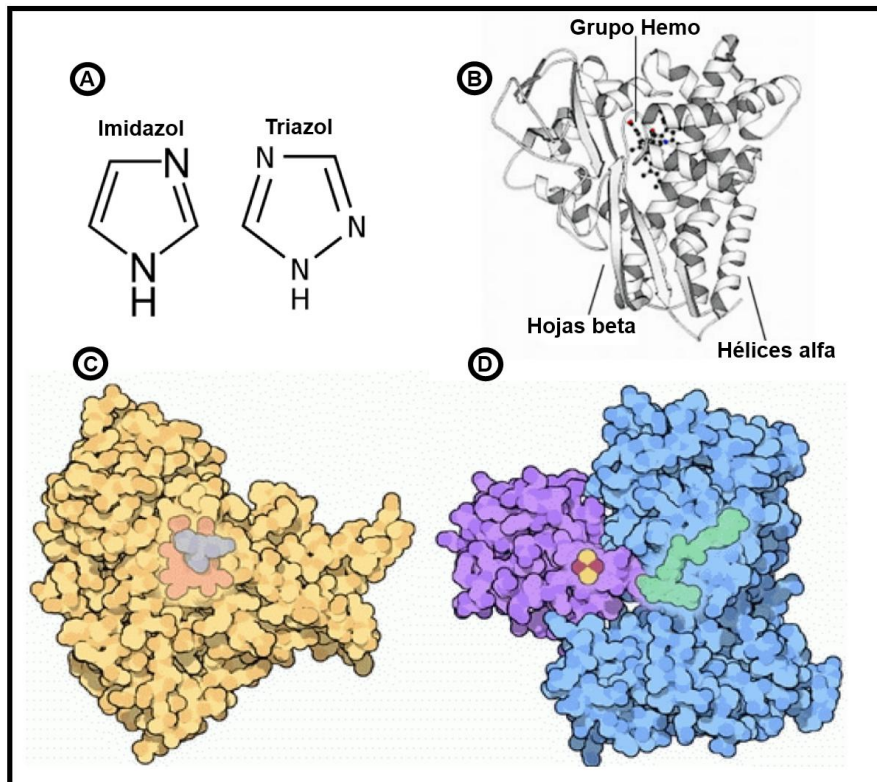


Figura 1.11. A) Estructura molecular del Imidazol (izquierda) y del triazol (derecha); B) Estructura tridimensional del citocromo P450; C) Citocromo P450 de hongos; D) Citocromo P450 de células de mamíferos

iv. Análogos de pirimidinas

Estos antifúngicos fueron descubiertos en el transcurso de investigaciones encaminadas a la obtención de antineoplásicos para terapia antitumoral (web: sociedad española de quimioterapia). El más relevante es la 5-fluorocitosina o flucitosina que tiene una estructura similar a la citosina y a 5-flourouracilo. Necesita ser activada en el interior de las células por la citosina permeasa de membrana y la citosina desaminasa. Una vez trasformada en una molécula activa (fluorouracilo) entra en el núcleo e impide la replicación del ADN y la transcripción a ARN_m (59,60). Tiene carácter fungistático y la activación de esta molécula en las células de mamífero se produce en menor cuantía, de ahí que los efectos secundarios nocivos se den a concentraciones altas del compuesto (60).

v. Griseofulvina

Este antifúngico es producido por diferentes especies de *Penicillium*, en especial por *P. griseofulvum*. Su espectro de acción es muy limitado y sólo se emplea para el tratamiento de diversas micosis cutáneas denominadas tiñas, producidas por *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermiohyton*. Su acción es básicamente fungistática ya que bloquea la reproducción del hongo, impidiendo su expansión por el cuerpo del paciente (71).

El efecto tóxico sobre la reproducción de las células fúngicas, viene determinada por la unión de este fármaco a las moléculas de tubulina, impidiendo la formación de los microtúbulos del huso mitótico. De este modo las células fúngicas no pueden finalizar la mitosis, impidiendo la expansión de la infección. Al microscopio óptico, es habitual observar hifas de morfología aberrante. La griseofulvina solo es efectiva sobre las células en fase de crecimiento activo (71).

Este fármaco también presenta afinidad por la queratina de las células epiteliales, formando un complejo queratina-griseofulvina sumamente estable, cuando el hongo invade los queratinocitos, la griseofulvina se separa de la queratina y se introduce en las células fúngicas ejerciendo su acción fungistática. Entre sus efectos secundarios cabe mencionar: insomnio, molestias gastrointestinales, sequedad bucal o pérdida temporal de la sensibilidad a sabores, así como cefaleas. Otros trastornos menos frecuentes son: la pérdida de la memoria o de atención, visión borrosa o fotosensibilidad, y en algunos casos reacciones alérgicas al fármaco (71).

vi. Otros antifúngicos

Se dispone de otros compuestos de eficacia probada contra las micosis en general, y las candidiasis en particular. Por tanto, se estudia su uso terapéutico y, de hecho, algunos se emplean en clínica. Sin embargo, suelen

tener aplicación limitada porque todavía no se conocen bien sus mecanismos de acción. Hay algunos que están en fase de ensayo clínico. En este heterogéneo grupo encontramos, entre otras moléculas:

- Terbinafina: inhibe la síntesis del ergosterol.
- Sordarinas: inhiben la acción de diferentes factores de elongación que intervienen en la síntesis de proteínas.
- Ciclopirox: se ha establecido que actúa bloqueando el transporte activo hacia la pared, e igualmente impidiendo la reparación del ADN (71).

La trehalosa: utilización de este disacárido como diana terapéutica contra *Candida albicans*

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosas unidas por enlace glucosídico tipo α : 1-1 (Fig. 1.12). Originalmente fue descrito por Wiggers en 1832, como un azúcar presente en el cornezuelo del centeno. Posteriormente Berthelot lo encontró en los capullos del escarabajo *Larinus maculata* más conocido como "**trehala manna**", identificando como trehalosa a dicho azúcar.

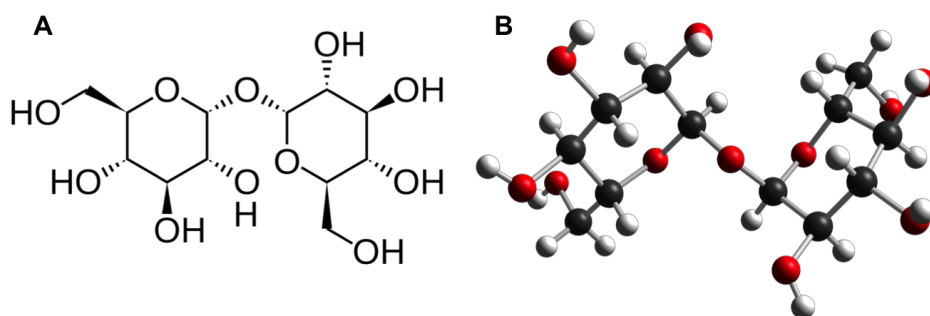


Figura 1.12. Trehalosa. (A) Fórmula y estructura molecular de la trehalosa (Wikipedia). (B) Modelo tridimensional de la estructura cristalizada de la trehalosa (72).

La trehalosa está presente en arqueas, bacterias, hongos, así como en la hemolinfa de los insectos, sobre todo en estado de criptobionte (73–75). Aunque

inicialmente se propuso una función como fuente de carbono, su acumulación está relacionada con el posible papel protector frente a estados de ayuno nutricional y estrés ambiental (76). Éste azúcar también está presente en plantas, en concreto en angiospermas como el tabaco y el arroz. Parte de su importancia biológica, se debe a su función protectora contra la deshidratación, al interaccionar con los fosfolípidos de membrana para mantener el estado fluido, previniendo su fractura (77).

Sorprendentemente, la trehalosa no se ha encontrado en vertebrados, como tampoco ha sido anotado ningún gen involucrado en la síntesis de trehalosa en los mamíferos (57). Las razones de esta carencia no han sido aún establecidas, pero podrían estar relacionadas con la distinta línea evolutiva seguida por los protóstomos y los deuteróstomos (57).

Síntesis de trehalosa

Dependiendo del sistema biológico analizado, existen diferentes vías para la síntesis de este disacárido, concretamente se han descrito hasta cinco (Fig. 1.13). Cada organismo dispone de una o varias de estas rutas debido a su gran importancia. De hecho *Mycobacterium tuberculosis* posee cuatro de esas cinco rutas (74). Es reseñable, que los procariotas han desarrollado un sistema genético para sintetizar trehalosa más complejo y elaborado que los eucariotas (73-75).

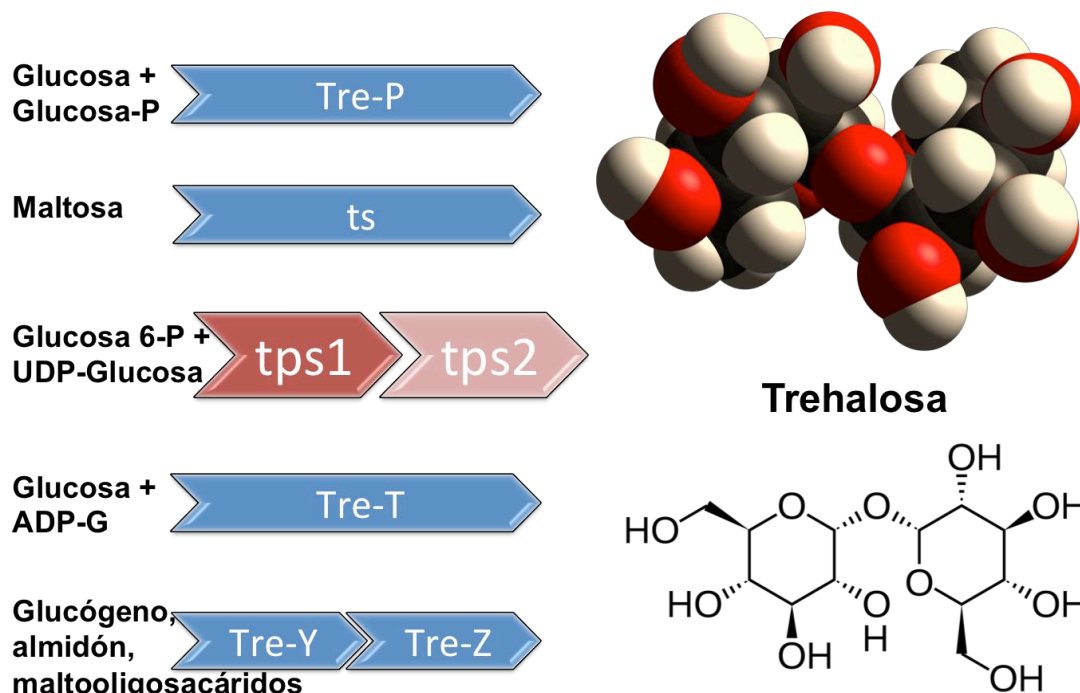
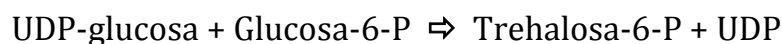


Figura 1.13. Rutas metabólicas de síntesis de trehalosa encontradas en la biosfera. En rojo, destacada la vía principal presente en hongos.

Entre los hongos y levaduras, incluyendo *Candida albicans*, predomina la ruta denominada trehalosa sintasa/fosfatasa, cuyo mecanismo se describe brevemente a continuación (Fig. 1.13). La biosíntesis de la trehalosa tiene lugar en el citosol, a partir de sus precursores, UDP-glucosa y glucosa-6-P, en dos etapas secuenciales. En un primer paso, se produce la transferencia de D-glucosa desde UDP-glucosa a glucosa-6-P para formar trehalosa-6-P en una reacción catalizada por la enzima trehalosa sintetasa, codificada por el gen *TPS1*, de acuerdo con la siguiente reacción global:



Trehalosa-6-P sintasa (Tps1p)

Mg²⁺

Esta enzima es dependiente de Mg²⁺ y muestra actividad máxima a pH 6,6. La reacción es irreversible, por lo que el equilibrio queda desplazado hacia la formación de trehalosa-6-P (74). En un segundo paso, la trehalosa-6P es

defosforilada por una fosfatasa citosólica, la trehalosa fosfatasa, codificada por el gen *TPS2* (78), generando trehalosa libre, que es la forma de almacenamiento del disacárido.



Trehalosa-6-P fosfatasa (Tps2p)

Aparentemente, *C. albicans* contiene otras fosfatasas no específicas que son capaces de defosforilar trehalosa-6-P (78,79). Se ha postulado que la enzima trehalosa-6-P fosfatasa (Tps2p) es un marcador más interesante como posible diana antifúngica que la trehalosa-6-P sintasa (Tps1p). Esta hipótesis está apoyada fundamentalmente por la ausencia de trehalosa en mamíferos, lo que facilitaría el diseño de inhibidores específicos dotados de toxicidad selectiva (79,80).

Hidrólisis de trehalosa

En levaduras, la degradación fisiológica del disacárido se efectúa casi exclusivamente por la trehalasa (α,α -trehalosa-1-C-glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.28). Se trata de una enzima altamente específica para trehalosa, siendo esta su único sustrato, cuya actividad catalítica produce dos moléculas de glucosa a partir de una molécula de trehalosa (73,74,81).



Trehalasa

Las trehalasas pertenecen al grupo de las α -glucosidasas que utilizan trehalosa como sustrato exclusivo. En la mayoría de hongos filamentosos y levaduras, se encuentran dos tipos de trehalasas, clasificadas en función de su pH óptimo de actividad catalítica y mecanismo de regulación. Con un pH de 4,5-5,0 se

encuentra la trehalasa ácida y en el rango de pH 6,8-7,0 se sitúa la trehalasa neutra (81). También se distinguen por su distinta localización subcelular: la actividad ácida tiende a ocupar una localización en la superficie externa (*C. albicans*) o en las vacuolas (*S. cerevisiae*), mientras que la trehalasa neutra reside en el citosol (73,81,82).

En *C. albicans*, un único gen, *NTC1*, codifica para la enzima neutra que tiene un peso molecular de 104 kDa. La actividad Ntc1p está regulada por fosforilación reversible mediada por proteínas quinasas dependiente de AMPc (PKA). Entre sus funciones más destacables, se encuentra la de movilizar la reserva de trehalosa almacenada en respuesta a distintas perturbaciones fisiológicas, como la recuperación tras un choque térmico o la reanudación del crecimiento activo por parte de cultivos procedentes de fase estacionaria (73,81,82).

Por su parte, la actividad trehalasa ácida de *C. albicans* (Atc1p) está localizada en la pared celular (34,83). El gen correspondiente, *ATC1*, ha sido clonado y secuenciado. La proteína Atc1p tiene 1040 aminoácidos, un peso molecular estimado de 117 kDa y un pI de 4,81. El análisis de la secuencia, muestra que esta proteína contiene un péptido señal hidrofóbico y 20 sitios potenciales de N-glicosilación. La caracterización funcional de *ATC1*, indica que tanto su expresión como su actividad están sujetas a control mediante represión catabólica por glucosa (83). A su vez, la enzima ácida está involucrada en el mantenimiento de la arquitectura de la pared, formación de hifas y virulencia de *C. albicans*, pero no afecta a los mecanismos de resistencia a estrés oxidativo, (34).

Distintas aplicaciones de la trehalosa

Investigación científica

El análisis de la estructura molecular de la trehalosa ha revelado un conjunto exclusivo de propiedades físico-químicas, muy útiles en investigación. Además de su carácter no reductor, el disacárido posee una elevada estabilidad química, un alto grado de hidrofiliidad y es muy resistente a la hidrólisis ácida.

En base a estas características, la trehalosa es muy utilizada en estudios de anhidrobiosis (deseccación) y criptobiosis (bajas temperaturas) para preservar proteínas y membranas, ya que sustituye a las moléculas de agua, formando enlaces de hidrógeno entre la proteína y los grupos hidroxilo del disacárido (57,74,81). También ha servido para promover la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas más eficaces en la preservación y aumento de las funciones catalíticas de algunas enzimas importantes en investigación. De hecho, ya se dispone de un nuevo polímero que mejora la capacidad de la trehalosa en cuanto a la conservación de la actividad enzimática (Fuente: <http://www.mariecueriesnews.wordpress.com>).

Un resumen de las principales propiedades físico-químicas y los principales usos de esta molécula, se presenta en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Principales propiedades físico-químicas, actividades fisiológicas y aplicaciones características del disacárido no reductor trehalosa (*O*- α -D-glucopiranosil-[1 \rightarrow 1]- α -D-glucopyranosido) en la biosfera. Adaptado de Argüelles *et al.* (2017). Para otros detalles específicos consultar el texto.

<i>Propiedades físicas</i>	<i>Actividad fisiológica</i>	<i>Aplicaciones biotecnológicas</i>
-Azúcar no reductor	-Fuente de carbono y/o de energía	-Compuesto terapéutico
-Elevada hidrofiliidad	-Protector celular contra estrés	-Diana antifúngica
-Estabilidad química interna	-Estabilizador de membranas y proteínas	-Crioprotector
-Incapaz de formar cristales higroscópicos	-Componente de la pared celular bacteriana	-Profiláctico y estabilizador alimentario
-Ausencia de puentes de hidrógeno internos	-Solutu compatible	-Fermento en industrias
-Resistente a la hidrólisis ácida	-Molécula sensora de señales	-Edulcorante alimenticio
-Elevado punto de fusión	-Regulador metabólico	-Suplemento nutricional
	-Factor de virulencia	-Aditivo en cosmética

Usos terapéuticos

Estudios recientes acerca de las aplicaciones más novedosas de la trehalosa, indican que este disacárido es útil para combatir enfermedades neurodegenerativas por sus propiedades antiagregantes, evitando la formación de placas amiloides junto a otras sustancias como la carnosina (84). Ya se conocían los efectos beneficiosos de la ingestión de trehalosa en el tratamiento de "la corea de Huntington". Una enfermedad neurológica, grave y hereditaria que afecta a 1/10.000 personas en Europa, registrándose en España unas 4.000 personas afectadas y otras 15.000 con potencial riesgo hereditario (85). La proteína implicada se conoce como huntingtina (Htt) y contiene una región de poliglutaminas altamente variable. El gen codificante está localizado en el cromosoma 4, y el número normal de repeticiones CAG (Glutamina) es en

individuos sanos entre 10 y 28 veces. Sin embargo, se adquiere carácter patogénico cuando las repeticiones comprenden desde 36 (síntomas más leves) hasta 120 (la gravedad de los síntomas es mucho más evidente) (85).

Otras evidencias apoyan que trehalosa podría tener un papel terapéutico importante en el retraso de la aparición de graves enfermedades neurodegenerativas, como la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y el Parkinson. La administración controlada de trehalosa en modelos animales afectados de estas enfermedades, ha mostrado que el disacárido impide la formación de agregados de proteínas TAU y α -sinucleína en el cerebro y riñón. Se propone que la trehalosa es capaz de “limpiar” la proteína deteriorada y los agregados de placas amiloides en las neuronas motoras (86,87). También se han realizado ensayos *in vitro* con ratones transgénicos sobre el efecto de la trehalosa sobre la recuperación de fenotipos asociados al Alzheimer (88).

Por otra parte, la trehalosa está siendo empleada como coadyuvante en la preparación de ciertas vacunas y acaba de proponerse su uso para la conservación de células madre criocongeladas (89). De hecho, ya se había utilizado en el mantenimiento de plaquetas destinadas a transfusión durante campaña militares, células que no admiten tratamientos de congelación porque pierden su función coaguladora (90). También se considera su aplicación como agente crioprotector para órganos a la espera de un receptor para el trasplante, lo que permitiría aumentar el tiempo de conservación de un órgano hasta encontrar un receptor compatible.

Otros usos comerciales

Por otro lado, ha sido aprobada la utilización de trehalosa como suplemento nutritivo en la industria alimentaria (Tabla 1.3), incrementando la vida media y el periodo de caducidad de alimentos en polvo; como excipiente y adyuvante en ciertos preparados farmacéuticos, y también en cosmética como conservante.

Igualmente, se han realizado estudios para comprobar el valor de la trehalosa como edulcorante o sustitutivo del azúcar debido a sus propiedades antes reseñadas; si bien, la capacidad edulcorante de la trehalosa representa alrededor de un 50% de esa misma capacidad que tiene la sacarosa.

Sobre los procedimientos de obtención industrial, aunque al principio la trehalosa se extraía de levaduras cultivadas en tanques de fermentación, actualmente está más extendido el método de extracción mediante un proceso en varios pasos a partir de la hidrólisis del almidón de cereales licuados por un proceso enzimático. (Fuente: <http://ayudamosconocer.com/significados/letra-l/la-trehalosa.php>).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Los antecedentes previos, vistos en la Introducción han puesto de manifiesto el grave problema sanitario y terapéutico que plantean las micosis hospitalarias y en comunidad causadas por numerosas especies del género de *Candida*. Aunque en la población sana viven formando parte de la flora cutánea, al ser saprofitas. Sin embargo, diversos factores de virulencia activan su capacidad infectiva, siendo *C. albicans* el patógeno fúngico de mayor prevalencia en humanos (2,3,19). El desarrollo de procesos infecciosos abarca desde micosis superficiales, de buen pronóstico, hasta cuadros sistémicos potencialmente mortales, siendo el estado inmunodeprimido del paciente y su capacidad de respuesta el factor determinante de la gravedad.

Como consecuencia, en los últimos años se ha registrado un preocupante incremento morbilidad y mortalidad de las micosis hospitalarias, agravado por las limitaciones en la disponibilidad de una terapia antifúngica clínica que garantice la curación completa. Las principales limitaciones son: (i) escaso número de antibióticos de acción eficaz y segura; (ii) baja toxicidad selectiva, lo que provoca efectos secundarios en los pacientes; (iii) dificultades en su administración, ya que interactúan con otros fármacos; (iv) espectro de acción restringido y aparición de formas de resistencia; y (v) elevado coste económico.

En consecuencia, una de las prioridades de los sistemas sanitarios consiste en la obtención de nuevos antibióticos más potentes y sin efectos nocivos, así como el diseño de rutas metabólicas capaces de inducir una notable acción fungicida.

En base a estas consideraciones y teniendo en cuenta la experiencia previa del grupo investigador, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral, ha sido profundizar en el hipotético papel de la ruta de biosíntesis de trehalosa como una potencial diana antifúngica de gran interés clínico, tomando como modelo la levadura patógena oportunista *Candida albicans*.

Las estrategias seguidas para verificar este objetivo han sido las siguientes:

- * Evaluar la sensibilidad de los mutantes deficientes en la síntesis de trehalosa (*tps1Δ/ tps1Δ* y *tps2Δ/tps2Δ*) frente a los antifúngicos de uso clínico más habituales: Anfotericina B (polieno), Micafungina (Equinocandina) y Fluconazol (Azol).
- * Analizar si la aplicación de los antifúngicos genera un estrés oxidativo intracelular en *C. albicans*, mediante la determinación de parámetros representativos de estrés.
- * Medir la síntesis de trehalosa como indicador de respuesta antifúngica protectora en *C. albicans*.
- * Estudiar la acción combinada de la trehalosa con otros mecanismos de protección en *C. albicans* frente diversos tipos de estrés ambiental
- * Analizar el efecto que los antifúngicos de uso clínico podrían desencadenar sobre la formación *in vitro* de biofilms en las cepas de *C. albicans* objeto de estudio.
- * Investigar si la posible acción sinérgica de la combinación de los distintos antifúngicos podría aumentar la acción fungicida y su posible interés en terapia clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Cepas de *C. albicans* utilizadas en esta Memoria.

Se utilizaron un conjunto de cepas isogénicas de *C. albicans* ya caracterizadas genotípicamente y conservadas en glicerol a -80°C al 50% (v/v). A partir de dichas "stocks celulares" se realizaron subcultivos en medio YPD que fueron mantenidos a 4°C hasta su uso en el laboratorio.

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

Cepa	Genotipo	Referencia
SC5314	Cepa silvestre	Guillum <i>et al.</i> , 1984
<i>tps1Δ/tps1Δ</i>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm43</i> <i>tps1Δ::hisG/tps1Δ::hisG</i>	Zaragoza <i>et al.</i> , 1998
<i>tps2Δ/tps2Δ</i>	<i>tps2Δ::hisG/tps2Δ::hisG URA+</i>	Zaragoza <i>et al.</i> , 2002

La cepa SC5314 es una cepa "silvestre" de *Candida albicans*. *Tps1Δ* es un mutante homocigótico de *Candida albicans* que tiene interrumpida la ruta de biosíntesis de la trehalosa en la primera enzima, es decir carece de trehalosa 6-P sintasa. *Tps2Δ* es un mutante homocigótico de *C. albicans* que carece de la segunda enzima para la síntesis de la trehalosa: trehalosa 6-P fosfatasa.

En ninguno de los dos casos los mutantes pueden sintetizar trehalosa, por lo que pueden ser utilizados para confirmar si la presencia o ausencia de dicha ruta le confiere resistencia o sensibilidad a los antifúngicos ya usados en la clínica.

Los mutantes nulos de *Candida albicans* para la síntesis de la trehalosa, *tps1Δ* y *tps2Δ*, son factores determinantes para la virulencia, y provoca que dichas cepas

mutantes sean más sensibles a un estrés oxidativo. Además, aportan junto con las otras evidencias descritas en nuestro laboratorio, que los antifúngicos dirigidos específicamente contra este azúcar podrían ser de gran importancia clínica (34,79).

Medios de cultivo

Para el crecimiento de *C. albicans* y sus respectivos mutantes se utilizó el medio YPD, un medio complejo que contiene todos los ingredientes necesarios para el crecimiento rutinario de levaduras (91). Su composición en % se detalla a continuación:

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

Para su preparación se utilizó agua destilada y el medio se esterilizó mediante calor húmedo en autoclave de vapor a 120°C durante 20 minutos.

Para la realización de los ensayos de sensibilidad en placa con diferentes agentes estresantes se utilizó como base medio YPD sólido al que se le añadió la cantidad de compuesto que se estimó necesaria para alcanzar la concentración requerida para cada placa.

Como antifúngicos se emplearon a las concentraciones indicadas en los resultados:

- Anfotericina B (AmB), adquirida de AppliChem GMBH.
- Micafungina (MF), en formato farmacológico de Micamina®, suministrada por Astellas Pharma Europe B.V.
- Fluconazol (Flz), adquirida de Sigma-Aldrich.

Los distintos antifúngicos se prepararon en alícuotas a partir de una disolución madre de 10 mg/ml, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Como el DMSO podría resultar tóxico para las células eucariotas en función de la dosis, se dispuso de un control adicional con DMSO al 1%. Como control de estrés oxidativo interno, se introdujo el peróxido de hidrógeno.

Como compuestos para el estudio del posible sinergismo entre antifúngicos y sustancias de origen natural, se emplearon:

- Menadiona
- Pinocembrina

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

Los cultivos en medios líquidos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer. Para facilitar la aireación fueron rellenados hasta un tercio de su volumen. Los inóculos de *C. albicans* se crecieron a 28°C durante toda la noche y se refrescaron a 37°C en nuevo YPD líquido, partiendo de una D.O._{600nm} $\cong 0,3$ hasta alcanzar una concentración de 10^7 células/ml equivalente a D.O. $\cong 0,8-1,0$ y así iniciar los ensayos con las mismas condiciones para las tres cepas.

Para el crecimiento de los cultivos se utilizaron los incubadores Certomat MO II y Medilow-P (Selecta), con una agitación orbital de 90 rpm, para el caso de los medios en estado líquido. La estufa Heraeus incubator de Thermo Scientific, programada a 28 o 37°C sirvió para los medios en estado sólido.

MÉTODOS

Medida del crecimiento microbiano

La determinación del crecimiento de las distintas levaduras en medio líquido se realizó mediante las pruebas de turbidimetría y peso húmedo.

Turbidimetría

Para esta prueba se tomaron medidas de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda (λ) de 600nm en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1280. Se hicieron las diluciones que fueron necesarias para garantizar que la medida de la densidad óptica estuviese en el intervalo de lectura donde se registra linealidad.

Peso húmedo

En tubos Eppendorf de 1,5ml previamente rotulados y pesados vacíos (p0), se tomaron muestras de 1ml del cultivo líquido en YPD. Se centrifugó a 13000 rpm (4°C) durante 10 minutos y se procedió a retirar el sobrenadante con sumo cuidado, eliminando todos los restos posibles con papel secante. Posteriormente, se pesaron de nuevo los tubos, obteniendo el peso del precipitado (pP). La determinación de la masa celular de la levadura crecida se efectuó mediante la diferencia de las medidas obtenidas, es decir, el peso del precipitado menos la del peso vacío (pP-p0).

Esta prueba se efectuó por duplicado para cada uno de los casos.

Recuentos celulares

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

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

A = media de recuentos efectuados por cuadrícula del hemocitómetro.

D = factor de dilución.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMIs)

Para determinar la concentración mínima capaz de inhibir el 50% y el 90% del crecimiento de *Candida albicans* y sus mutantes, se siguió el protocolo de microdilución en placa M27-S4 del CLSI (Clinical Laboratory Sciences Institute): Las cepas fueron crecidas en placas de YPD sólido a 37°C durante 24h. Al día siguiente se preparó el inóculo, que consistió en dispensar al menos 5 colonias (con un diámetro mínimo de 1mm) de cada cepa en 5 ml de agua destilada estéril. La turbidez de esta suspensión se midió en un espectrofotómetro y se ajustó, añadiendo más suspensión celular o diluyendo con agua estéril, según fuera necesario, hasta una D.0600nm de 0,1 (1-5x10⁶ cels/ml).

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

Las placas se incubaron en ambiente húmedo para prevenir la evaporación del medio, a 37°C durante 24h. Se procedió a la lectura visual de las CMIs según la intensidad colonial en el fondo del pocillo. Se incluyó el control de calidad, establecido por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), dos levaduras de referencia, cuyas CMIs son conocidas para los antifúngicos empleados en este

trabajo. Cada ensayo se realizó por triplicado, utilizándose los valores más representativos.

Viabilidad y sensibilidad en el tratamiento con agentes estresantes

Se diseñaron varios ensayos con agentes estresantes a diferentes concentraciones según el objetivo de este trabajo. El protocolo seguido fue el que se establece a continuación:

Un preinoculo de las cepas estudiadas fue preparado en medio YPD líquido e incubado toda la noche a 28°C, en agitación continua. A la mañana siguiente el cultivo fue refrescado con YPD líquido nuevo, partiendo de una D.O._{600nm} de 0,3 y se dejó crecer en agitación continua a 37°C hasta que alcanzó la fase exponencial o una D.O._{600nm} aproximada de 0,8-1,0, correspondiente a una densidad celular de 10⁷ células/ml. En este punto, se tomaron alícuotas idénticas sobre las que se aplicó el tratamiento con el agente estresante correspondiente, excepto a la alícuota control, que se mantuvo sin ningún tratamiento.

Ensayo de viabilidad

Un mililitro de cultivo, de cada cepa, crecida en YPD hasta fase exponencial, fue recogido en condiciones estériles realizándose diluciones seriadas 1/10 con agua destilada estéril, en el rango desde 10¹ hasta 10⁷. En algunos experimentos se practicaron diluciones medias (1/2).

Sobre placas de YPD sólido se dispersaron 100µl de cada dilución, extendidos en césped con la ayuda de perlas de cristal de 3mm de diámetro mediante agitación suave. Cada agente estresante se probó en las placas por duplicado. La incubación se realizó a 37°C durante 24 horas para posteriormente efectuar un recuento de colonias macroscópicas, que nos proporciona las Unidades

Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml). La validez estadística se verificó mediante contaje llevado a cabo acotando entre 30 y 300 colonias por placa.

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

Formación de macrocolonias: ensayo de sensibilidad en medio sólido

El comportamiento y la sensibilidad de las diferentes cepas estudiadas a los diferentes agentes estresantes, fue complementado con un ensayo en medio YPD sólido.

Igual que para el caso del ensayo de viabilidad, se partió de cultivos en medio YPD líquido que alcanzaron la fase exponencial (D.O._{600nm} de 0,8 - 1,0), y después de aplicarles la exposición prefijada durante una hora se realizaron diluciones seriadas (1/10) de cada uno de ellos. A continuación, se depositaron "gotas" (o spots) de cada dilución (5 µl) sobre YPD sólido en placas Petri. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 o 48 horas, tiempo en el que alcanzaron un crecimiento suficiente para ser valorado y fotografiado.

Obtención de extractos celulares

Se dispuso de extractos celulares a partir de cultivo, para determinar las actividades enzimáticas localizadas en el citosol celular. Para ello, se recogieron volúmenes de 20 ml en condiciones de esterilidad y frío en tubos Falcon. Se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C, decantando a continuación el sobrenadante. A continuación, se lavaron las células con 20 ml de agua estéril fría y se añadieron 1,25 ml de tampón 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 100 mM, pH 6,0, conteniendo cisteína 5mM e incluyendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM y cisteína 5 mM; aditivos importantes por su capacidad de

estabilizar las proteínas de bajo peso molecular e inhibir a las proteasas, respectivamente.

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

Determinación colorimétrica de proteína

El contenido total de las proteínas presentes en los extractos celulares se calculó mediante el método de Lowry *et al.* (1951)(92). Este método permite cuantificar las proteínas presentes en la muestra de estudio gracias al color formado tras interaccionar el reactivo Folin-Ciocalteu con determinados aminoácidos. La intensidad del color de la disolución resultante es proporcional a la concentración de proteínas, dentro de un rango de linealidad, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas:

1. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de complejo con el tartrato.

2. La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin- Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Las soluciones químicas empleadas fueron las siguientes:

A) Solución alcalina de cobre:

-Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 N

-CuSO₄ al 1% en agua destilada

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

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

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

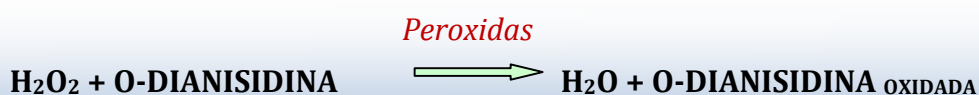
El procedimiento para la determinación de proteína consiste en añadir a 1 ml de la solución problema, 3 ml de la solución alcalina de cobre y dejar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Se añaden a continuación 0,3 ml de la solución Folin-Ciocalteu y al cabo de 30 min el color desarrollado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

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

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



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



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

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

La incubación del ensayo de valoración se realizó a 30°C durante 30 min y se detuvo por adición de 1 ml de HCl 6N. De esta forma, se desnaturaliza la solución de glucosa oxidasa-peroxidasa y el complejo coloreado de o-dianisidina oxidada vira a color rosa. Las lecturas se efectuaron de inmediatamente, a fin de evitar

posibles alteraciones de color, debidas a la oxidación espontánea y progresiva de la o-dianisidina en presencia de aire.

Los valores procedentes de ensayos experimentales se refirieron a una recta patrón de glucosa (Fig. 3.1) y se midieron en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1280) a 540 nm (Ab_{540nm}), estableciéndose un rango de linealidad entre 10 y 100 μg de glucosa/200 μl .

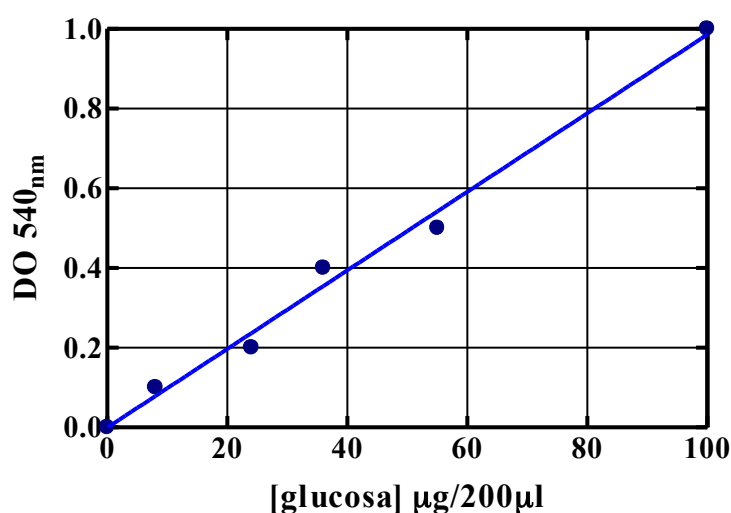


Figura 3.1. Recta patrón de valoración de glucosa con el método glucosa oxidasa-peroxidasa.

Determinación de trehalosa endógena.

Para llevar a cabo la determinación del contenido intracelular de trehalosa se siguió el protocolo descrito por González-Párraga *et al.* (2003)(93). A partir de cultivos celulares en fase exponencial ($D.O. \cong 0,8-1,0$), se tomaron 15 ml que fueron centrifugados y lavados a 3.500 rpm durante 10 min, descartando después el sobrenadante y añadiendo 1 ml de agua fría al precipitado celular, conservándolos a -20°C hasta su análisis. Antes del ensayo, tubos se dispusieron en un baño a 95°C durante 60 minutos con agitación ocasional, para producir la lisis celular y liberar al exterior la trehalosa endógena. A continuación se centrifugaron los tubos a 3.000 rpm durante 10 minutos para posteriormente obtener el sobrenadante.

La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 200 μ l, 90 μ l de tampón acetato sódico 25 mM pH 5,6, 100 μ l de cada muestra correspondiente al extracto libre de células y 10 μ l de trehalasa comercial (Sigma, 2 unidades/ml). Dicha enzima hidroliza la molécula de trehalosa en 2 moléculas de glucosa a 37°C, en las condiciones fijadas. La incubación se mantuvo durante toda la noche. Además de las muestras, se preparó un control con trehalasa comercial (1-5 mM) para obtener una recta patrón. Los blancos fueron realizados sustituyendo la trehalasa comercial por agua destilada.

El método mide la cantidad de glucosa que se genera a partir de la trehalosa presente, siendo valorada mediante la reacción enzimática acoplada con glucosa oxidasa-peroxidasa.

Ensayos enzimáticos

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

Catalasa

A fin de protegerse del radical peróxido de hidrógeno, los organismos eucariotas aerobios disponen de la enzima catalasa, que lleva a cabo la descomposición del H_2O_2 en moléculas de agua y oxígeno.

Para determinar la actividad de esta enzima se usa el método de Aebi (1984)(94). Primero se prepara un tampón: BPK+50mM a pH7 con H_2O_2 10,6M. En una cubeta de cuarzo de 1.5 ml se añadieron 25 μ l del sobrenadante citosólico previamente centrifugado, y 975 μ l de la mezcla tampón. Agitada la mezcla en la cubeta se introduce en el espectrofotómetro Shimazu AV-1203 (con accesorio de

termostatación) utilizando como blanco una cubeta de cuarzo de 1,5ml con tampón fosfato potásico. Se registran los valores de la pendiente. La prueba se realizó a 25°C. Cada muestra se hizo por duplicado.

Si se produce la disociación del H_2O_2 se registra una disminución de la absorbancia a 240nm. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad de reacción y de un coeficiente de extinción molar para H_2O_2 ($\epsilon=39,58M^{-1}cm^{-1}$). Los resultados se expresan en $\mu moles \times min^{-1} \times ml^{-1}$

Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa cataliza la reacción que transforma el anión superóxido en oxígeno. Ésta acción es importante ya que protege a las células la acción oxidante de este compuesto. Existen diferentes métodos directos o indirectos para determinar la actividad de ésta enzima. Uno de los métodos indirectos emplea cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT), pero es poco soluble y al precipitar disminuye su interacción. Por ello, se decidió utilizar un kit comercial (SOD assay kit de Sigma), que usa una sal monosódica de tetrazolio altamente soluble en agua, el WST-1= (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio. El ratio de reducción está linealmente relacionado con la actividad de la xantina oxidasa, y es inhibido por la enzima SOD tal y como se indica en la Fig. 3.1. Así pues, el IC_{50} (inhibición de la actividad en 50%) puede ser determinado por un método colorimétrico.

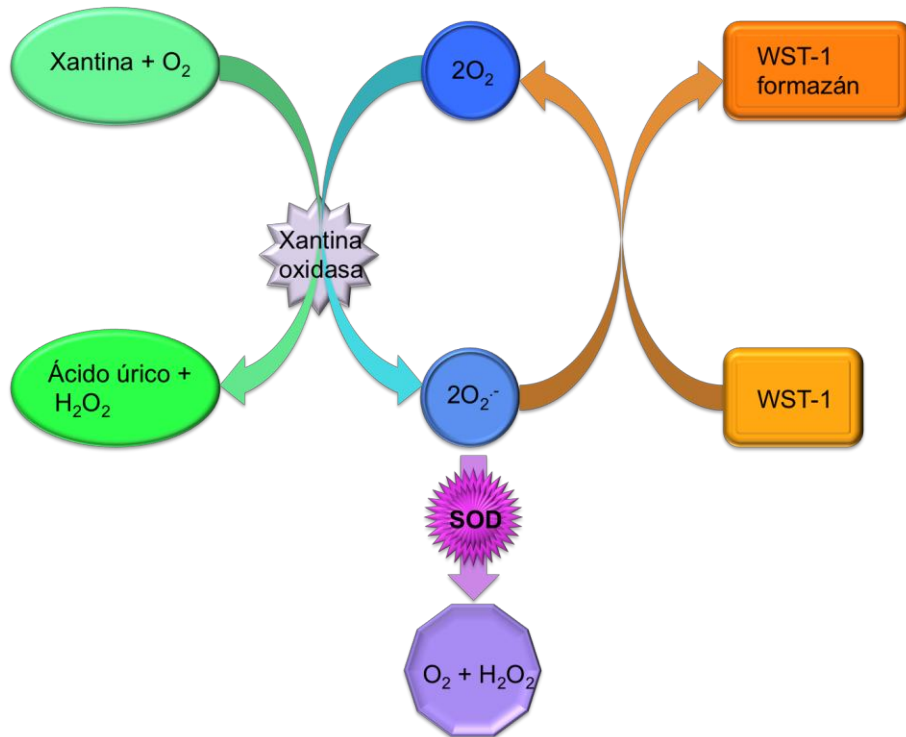


Figura 3.1. Reacción de dismutación del anión superóxido a través de la enzima SOD. Imagen adaptada del kit comercial suministrado por la empresa Sigma, S.A.

Siguiendo las especificaciones del kit, el procedimiento seguido fue primeramente la preparación del "working solution (WST)", para el cual 1 ml de WST comercial fue diluido en 19 ml de buffer solution. También se preparó la enzima del kit, para ello diluimos 15 µl de working solution en 2,5 ml del dilution buffer.

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

Para calcular la actividad SOD se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad SOD (\% de inhibición)} = \frac{[(\text{Ablanco1}-\text{Ablanco3})-(\text{Amuestra}-\text{Ablanco2})]}{(\text{Ablanco1}-\text{Ablanco 3})} \times 100$$

Glutación reductasa (GR)

Se determinó la actividad de la enzima glutación reductasa siguiendo el método descrito por Edwards *et al.* (1990)(95). Este método permite cuantificar la reducción de absorbancia a 340nm, a causa de la oxidación que sufre el NADPH para que se produzca la conversión del glutación oxidado (GSSG) a reducido (GSH) por medio de la enzima glutación reductasa (GR)(Fig. 3.2).

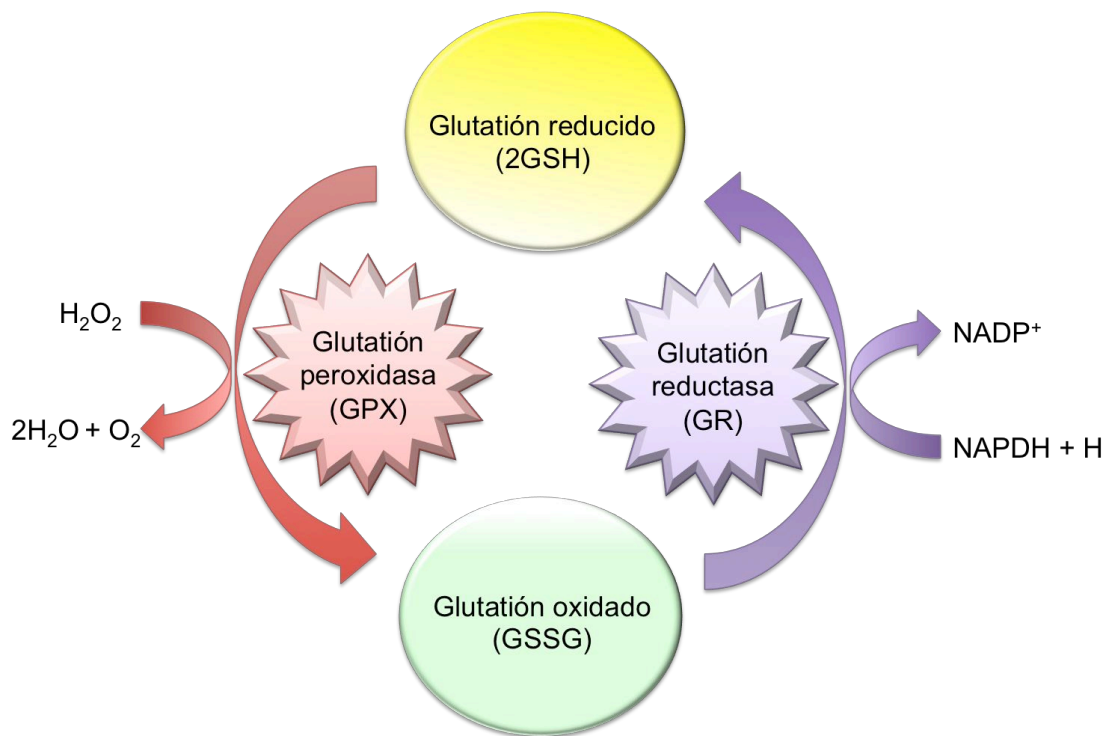


Figura 3.2. Reacción de oxidación reversible del glutación (GSH) por medio de la glutación reductasa (GR).

Para la realización del ensayo, la mezcla de la reacción contenía (en un volumen final de 1ml) tampón Tris-HCl 100 mM a pH 7,8, con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM, MgCl₂, 3mM, Glutati6n oxidado 0,5 mM y 100 µl de muestra.

El ensayo se llev6 a cabo a 25°C en cubetas de cristal de cuarzo de 1,5 ml en un espectofot6metro Shimadzu UV-1203. El inicio de la reacci6n se hace por adici6n de 100 µl de GSSG 4 mM a la mezcla de la reacci6n con NADPH 4 mM y se monitoriza su oxidaci6n durante 2 minutos frente a un blanco que carece de GSSG. A cada medida se le rest6 el blanco para eliminar las interferencias que se pudieran producir por otras vÍas de la oxidaci6n del GSH. La actividad enzimática se calcul6 a partir de la velocidad inicial de la reacci6n y de un coeficiente de extinci6n molar para el NADPH (6,22 mM⁻¹ cm⁻¹). Los valores finales de la actividad de la enzima se expresan en NADPH oxidado × min.⁻¹ × ml⁻¹.

Determinaci6n de las especies reactivas de oxÍgeno (ROS) y el potencial de membrana mitocondrial.

Estos ensayos se llevaron a cabo para conocer el efecto de los antifúngicos empleados respecto de la generaci6n de estr6s oxidativo mediante la producci6n de ROS intracelular. Se utilizaron dos m6todos complementarios: el primero para la detecci6n global de la producci6n de especies reactivas del oxÍgeno, con diacetato de dihidrofluoresceina; y el segundo para la determinaci6n del potencial de membrana mitocondrial, con rodamina 123.

Determinaci6n global de la producci6n de radicales libres de oxÍgeno (ROS)

Para detectar la producci6n de radicales libres, se agreg6 diacetato de dihidrofluoresceina (DHF; 40 µM, Sigma Aldrich) durante 30 min en oscuridad a 37°C. La DHF difunde a trav6s de las membranas celulares y es hidrolizada por las esterasas a un compuesto no fluorescente, que es rÁpidamente oxidado por las especies reactivas de oxÍgeno (ROS) convirti6ndose en una mol6cula

fluorescente. De esta manera, la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo.

Se trataron cultivos de las tres cepas crecidos en YPD hasta alcanzar fase exponencial (D.O. \cong 08-1,0) con los antifúngicos durante 1h a 37°C, en agitación continua. Transcurrida la exposición, las células tratadas se lavaron con PBS 1X para luego añadirles DHF 40 μ M durante 30 minutos a 37°C. La interacción de este compuesto con los radicales libres que hay en el medio provoca la escisión de la fluoresceína, con emisión de una fluorescencia verde medible en el citómetro de flujo en el canal FL1.

Determinación del potencial de membrana

Para la determinación del potencial de membrana se empleó rodamina 123 (Rhd) (96,97). Se trata de una sonda fluorescente que normalmente es usada para determinar la funcionalidad de las mitocondrias, ya que sólo se acumula en éstas cuando las células están vivas y metabólicamente activas, con un potencial de membrana negativo. Así pues se establece una correlación entre la fluorescencia y la variación de potencial.

Al mismo tiempo que el ensayo de DHF, se tomaron las células en fase exponencial tratadas con los antifúngicos después de una hora y se lavaron con PBS 1X. Sin embargo, en esta ocasión el proceso de lavado se realizó tres veces para eliminar el exceso de Rhd, antes de tener la suspensión final con una dilución 1/10 del precipitado del último lavado. El compuesto emite una fluorescencia de color verde medible en el canal FL1 del citómetro de flujo.

Determinación de la muerte celular con Ioduro de propidio (IP).

Se determinó con alícuotas idénticas a las empleadas para la determinación de ROS pero, en este caso, tratadas con ioduro de propidio (IP) 20 μM . Este compuesto se caracteriza por no poder atravesar la membrana celular, interaccionando sólo con el ADN de las células muertas, que tienen la pared dañada y emitiendo fluorescencia de color rojo al intercalarse entre las bases del ADN de las células afectadas. Tras 5 minutos de incubación con el IP, la fluorescencia emitida por las células se captó en el canal FL2 del citómetro de flujo.

En todos los casos se empleó el citómetro FC500 del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Se procesaron 10.000 células y los resultados fueron analizados por el software Flowing Software 2.5.1.

Formación de biofilms o biopelículas

Los biofilms de *Candida albicans* se obtuvieron *in vitro* utilizando placas de poliestireno de 96 pocillos, en las que la levadura se adhiere al fondo de dichas placas. Se siguió el mismo procedimiento descrito previamente por Pierce *et al.* (2010)(98).

Se partió de una suspensión de *C. albicans* (1×10^6 blastoconidios / ml) en medio RPMI 1640, 100 μl de la misma se dispusieron en cada pocillo de la placa. Se dejó que se adhirieran a la placa para formar así el biofilm durante 24h a 37°C. Transcurrido ese intervalo y comprobada la formación de biopelículas mediante inspección ocular, el medio se aspiró y las células no adherentes se eliminaron lavando tres veces con PBS 1X estéril.

Valoración colorimétrica con XTT

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

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

Extracción de grasas

Se preparó un preinóculo de 60 ml de YPD con cada de las levaduras estudiadas que se dejó crecer toda la noche a 28 °C en agitación.

Se realizaron 3 lavados de las muestras con PBS 1X para eliminar restos del YPD, y se congelaron a -80°C hasta la extracción.

La extracción de ácidos grasos se realizó mediante el método de Folch *et al.* (1957)(99). Para ello se pesaron las muestras y se les añadió 10 ml de cloroformo/metanol (C:M, 2:1,v/v) Los tubos se agitaron en vortex (30seg.) y se mantuvieron en hielo un mínimo de 1h.

Las impurezas no lipídicas se eliminaron lavando con KCl al 0,88 % (p/v). El peso de los lípidos obtenidos se determinó gravimétricamente tras la evaporación del solvente y el desecado de la muestra durante toda la noche en vacío.

Metilación del extracto lipídico

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se obtuvieron mediante transesterificación ácida de los lípidos totales de acuerdo con el método descrito por Christie (2003) (100).

Tras añadir un estándar interno (17:0) al 10% de la masa total de lípidos, las muestras fueron transmetiladas durante toda la noche en una mezcla de 1 % de ácido sulfúrico en metanol (más 1 ml de tolueno para disolver los lípidos neutros) a 55 °C. Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces en 5 ml de iso-hexano/dietil éter (1:1 v/v) tras neutralizar con 2 ml de KHCO_3 al 2 %, se desecaron en atmósfera de nitrógeno y se disolvieron de nuevo en 0.2 ml de iso-hexano. Los FAMES se separaron y cuantificaron mediante cromatografía gas-líquido usando una columna capilar flexible de sílice SP™ 2560 (100m de largo, diámetro interno de 0,25 mm y 0,20 mm de grosor; SUPELCO) en el cromatógrafo Hewlett-Packard 5890. La temperatura del cromatógrafo se programó a 5 min a una temperatura inicial de 140 °C, un aumento de 3°C/min hasta 230°C, seguido de un aumento de 2 °C/min hasta 240 °C, manteniéndose esta temperatura durante 12 min. Como gas transportador se utilizó helio a una presión de 300 kPa, y los picos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con estándares apropiados de ésteres metílicos (Sigma). Las concentraciones individuales de ácidos grasos se expresaron como porcentajes del contenido total.

Tratamiento estadístico de los datos, análisis bioinformático y representación gráfica de los resultados.

Para el tratamiento estadístico de los datos se calcularon los valores medios así como la desviación estándar de todos los datos obtenidos. Se comprobó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene. Posteriormente se procedió a la transformación de aquellos valores que no cumplieran con éstos requisitos, utilizando la función más adecuada para cada uno.

En los casos donde no se cumplieron una o ambas condiciones, se realizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis para determinar si existían diferencias entre los grupos, seguido del test de U de Mann-Whitney para la comparación entre pares. En todos los casos el intervalo de confianza utilizado fue del 95% siendo $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,001$ (***).

Las herramientas bioinformáticas que se emplearon durante el desarrollo de esta Tesis doctoral 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/>.

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

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

- ✓ **Prism Graph Pad 7:** Programa de representación de datos y análisis estadístico.

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

RESULTADOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

Acción antifúngica de micafúngina (MF) y anfotericina (AmB) sobre los mutantes de *Candida albicans* alterados en el metabolismo de la trehalosa.

Como ya se ha mencionado en la Introducción, la utilización de las rutas implicadas en la biosíntesis y degradación de trehalosa, ha sido propuesta como una potencial diana terapéutica para la obtención de nuevos antifúngicos más seguros y eficaces (79,101). En consecuencia, se diseñó un grupo inicial de experimentos que permitieran evaluar la aplicación de tratamientos de dos antibióticos prescritos en la práctica clínica (Anfotericina B o AmB y Micafungina o MF), sobre alícuotas que contenían idéntica densidad celular, escogiendo como sistema modelo tres cepas de *Candida albicans*: SC5314 (parental), *tps1Δ/tps1Δ* (deficiente en la actividad trehalosa sintetasa) y *tps2Δ/tps2Δ* (deficiente en la actividad trehalosa fosfatasa). Dichas alícuotas se prepararon a partir de cultivos que habían alcanzado la fase exponencial, determinada mediante el cálculo espectrofotométrico de la absorbancia ($D.O. \cong 0,8-1,0$). El crecimiento se llevó a cabo en medio YPD líquido a 37°C y con agitación orbital (Métodos).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para AmB y MF.

En la cepa parental de *C. albicans* SC5314, la doble interrupción del gen *TPS2*, implicado en la segunda reacción de la biosíntesis de trehalosa (trehalosa fosfatasa), no modificó los valores de la CMI clínica correspondiente a AmB (0.12

µg/ml) (Tabla 3.1). Sin embargo, este mutante resultó ser más susceptible a la presencia de MF respecto a su cepa parental isogénica (0.0078 µg/ml y 0.016 µg/ml, respectivamente Tabla 3.1). Estos valores se calcularon siguiendo el procedimiento de microdilución en placa M27-S4 del CLSI (Clinical laboratory Sciences Institute, ver Métodos), previamente puesto a punto por nuestro grupo (102,103). A su vez, el mutante homocigótico *tps1Δ*, deficiente en la actividad trehalosa sintasa (gen *TPS1*), mostró un patrón opuesto, con una menor CMI en presencia de AmB comparada con la cepa SC5314, pero sin presentar diferencias significativas tras la adición de MF (Tabla 3.1). En función de los resultados obtenidos, se escogieron las siguientes concentraciones como referencia experimental de este estudio:

- 0,1 y 0,25 µg/ml para AmB.
- 0,01 y 0,05 µg/ml para MF

Tabla 3.1. Cálculo de los valores CMIs para MF y AmB correspondientes a las cepas estudiadas en este estudio. Se siguió el protocolo CLSI (ver Materiales y Métodos) utilizando cultivos crecidos en medio RPMI y analizados a las 24h de exposición con los antifúngicos indicados. La CMI para MF es aquella cuya tasa de muerte celular es $\geq 50\%$ a las 24h, mientras que para AmB, la CMI equivale al 100% de mortalidad.

Cepa	MF (mg/L)	AmB (mg/L)
SC5314 (parental)	0.016	0.12
<i>tps1Δ/tps1Δ</i>	0.016	0.06
<i>tps2Δ/tps2Δ</i>	0.0078	0.12

Viabilidad celular en medio líquido

Como se puede observar en la Figura 3.1, la aplicación de un tratamiento con dos concentraciones de MF (0,01 y 0,05 µg/ml) no afectó de forma significativa la tasa de viabilidad celular de levaduras procedentes del mutante nulo *tps1Δ*, respecto a la viabilidad registrada tanto en la cepa parental (SC5314), como en el

mutante homocigótico *tps2Δ*. Por el contrario, cuando cultivos idénticos fueron tratados con AmB (0,1 y 0,25 $\mu\text{g/ml}$), fue ese mismo mutante nulo *tps1Δ* quien mostró un menor nivel de supervivencia celular, siendo el porcentaje de viabilidad del mutante *tps2Δ*, muy similar al registrado en la cepa parental, tomada como control (Fig. 3.1). Como cabría esperar, existe un efecto dependiente de la dosis en el porcentaje de muerte celular observado (Fig. 3.1). Estos resultados sugieren que las enzimas involucradas en la biosíntesis de trehalosa presentan diferente susceptibilidad a la acción fungicida de polienos (AmB) y equinocandinas (MF), utilizados en clínica.

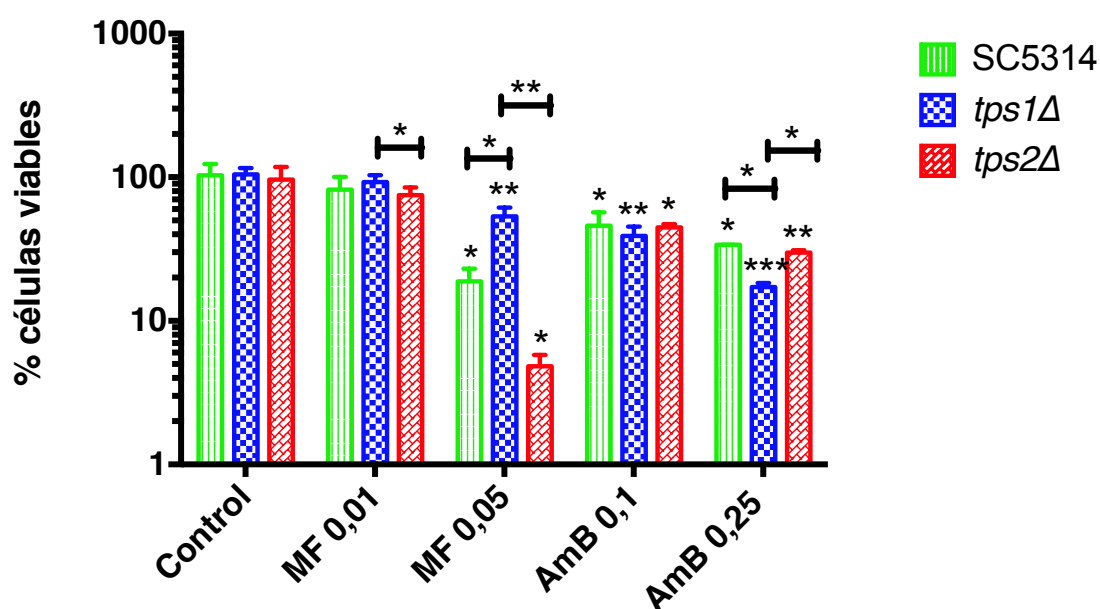


Figura 3.1. Efecto de los antifúngicos clínicos Micafungina (MF) y Anfotericina B (AmB) sobre la viabilidad celular de las cepas de *C. albicans* alteradas en el metabolismo de la trehalosa. Muestras idénticas de las cepas SC5314, y sus mutantes isogénicos homocigóticos (*tps1Δ/tps1Δ*, *tps2Δ/tps2Δ*) fueron tomadas de cultivos crecidos en YPD a 37°C hasta fase exponencial (D.O. \cong 0,8-1), y posteriormente fueron tratadas durante una hora con las siguientes dosis: 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de MF y 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de AmB. El experimento se repitió tres veces y los resultados fueron consistentes. De modo que se muestra el valor promedio más la desviación estándar que se obtuvo de ambos ensayos. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) según el test de U de Mann-Whitney.

Viabilidad celular en medio líquido de los mutantes CAI-4 y *tps1Δ*.

Durante el desarrollo inicial del trabajo experimental, se observó un comportamiento diferente entre el tipo silvestre SC5314 y el mutante nulo *tps1Δ*. En concreto, se comprobó que tanto *tps1Δ* como su cepa parental CAI-4 tienen una velocidad de crecimiento más lenta que las otras dos estudiadas: SC5314 y *tps2Δ*. Por tanto, se procedió a evaluar si dicho comportamiento de *tps1Δ*, era debido sólo a la carencia del gen *TPS1* o a un parecido fenotípico debido a alteraciones genéticas y fisiológicas presentes en su cepa parental CAI-4, que es una construcción procedente de SC5314 (Fig. 3.2).

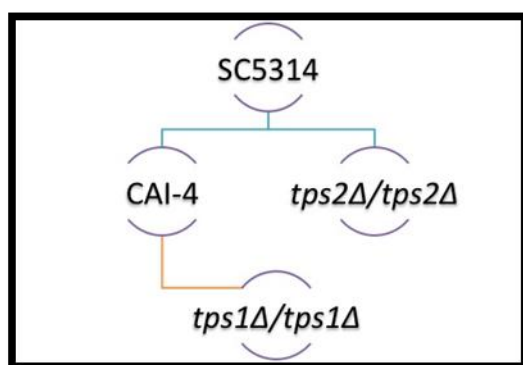


Figura 3.2. Representación esquemática de los linajes celulares correspondientes a las cepas de *C. albicans* empleadas en este trabajo. SC5314 es la cepa silvestre y ha servido para la construcción de CAI-4 y *tps2Δ*, mientras que *tps1Δ* procede de CAI-4 como parental.

A tal efecto, se procedió a realizar un ensayo de viabilidad empleando las concentraciones más altas de antifúngico (MF 0,05 µg/ml y AmB 0,25 µg/ml). Los resultados obtenidos indican que, con respecto a MF, CAI-4 y su mutante isogénico *tps1Δ* presentaron un nivel de toxicidad similar (Fig. 3.3). En cambio, la respuesta frente a AmB fue diferente, mostrando *tps1Δ* un descenso muy superior en el número de viables frente a los registrados en CAI-4 (Fig. 3.3). No obstante este patrón de supervivencia frente a AmB sigue la misma tendencia observada con la cepa standard SC5314 (Fig. 3.1). Por tanto, y con la salvedad de que SC5314 y *tps1Δ* no son isogénicos, el modelo experimental planteado es

válido para analizar la sensibilidad de *C. albicans* a los antifúngicos bajo estudio. Igualmente, este sistema es el más adecuado para estudiar el potencial uso terapéutico de la trehalosa como diana antifúngica, quedando delimitada con las tres cepas escogidas (SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ*) la ruta de biosíntesis del disacárido.

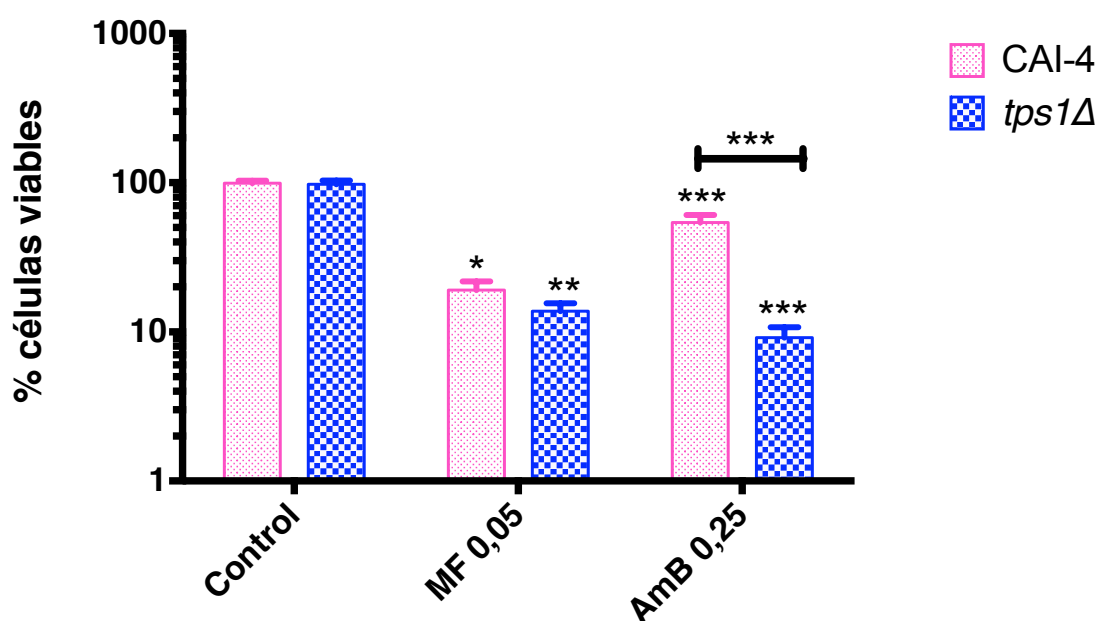


Figura 3.3. Efecto de los antifúngicos anfotericina B y micafungina sobre dos mutantes de *Candida albicans*: CAI-4 y *tps1Δ*. Ambos mutantes fueron crecidos en YPD líquido a 37°C hasta la fase exponencial. Los tratamientos consistieron en la aplicación de una concentración de MF (0,05 µg/ml) y de AmB (0,25 µg/ml) durante 1 hora a 37°C y en agitación. Los valores muestran la media ± D.E. de tres medidas independientes. P<0,05 (*), P<0,01 (**), P<0,001 (***), según el test de U de Mann-Whitney.

Crecimiento colonial en medio sólido.

El propósito de este ensayo fue servir como “complemento” al recuento de viables efectuado en medio líquido, para confirmar o descartar los resultados previamente obtenidos. Se realizó por duplicado, de forma que los datos mostrados en la Figura 3.4, corresponden a una imagen representativa del conjunto de placas obtenido en dicho ensayo. Se puede observar que, al igual que ocurre en medio YPD líquido, el mutante *tps1Δ* registró una mayor intensidad en la formación macroscópica de colonias tras el tratamiento con MF, respecto al

mutante *tps2Δ* (se observan más colonias, aunque son de menor tamaño). Por su parte, el mutante *tps2Δ* -deficiente en la actividad trehalosa fosfatasa-, presentó un crecimiento colonial más elevado tras la aplicación de AmB, en comparación con MF (Fig. 3.4).

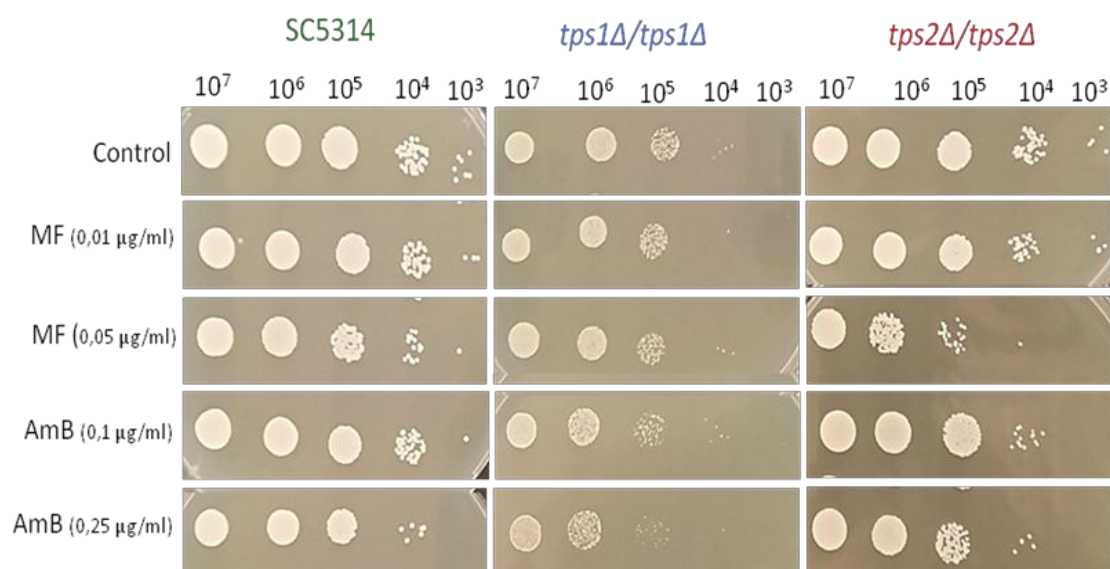


Figura 3.4. Representación del crecimiento colonial de *C. albicans* en medio YPD sólido. Se partió de alícuotas iguales de las cepas SC5314 y los mutantes homocigóticos *tps1Δ* y *tps2Δ*. Después de ser sometidas a 1 hora de tratamiento a 37°C con MF (0,01 y 0,05 μg/ml) y AmB (0,1 y 0,25 μg/ml), se practicaron diluciones seriadas de cada cepa y tratamiento. Volúmenes de 5 μl de cada dilución se dispersaron en forma de gota (“spot”) sobre medio YPD sólido. Las placas se incubaron a 37°C antes de ser fotografiadas.

Determinación del contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se ha demostrado que algunos antifúngicos poseen un modo de acción más complejo respecto del que a priori se les otorga. En el caso de los polienos como la anfotericina B (AmB), junto con el proceso de unión al ergosterol de membrana y posterior formación de poros, las evidencias avalan la existencia de una segunda acción fungicida consistente en la generación de estrés oxidativo intracelular (104). Este mecanismo ha sido comprobado en varias levaduras

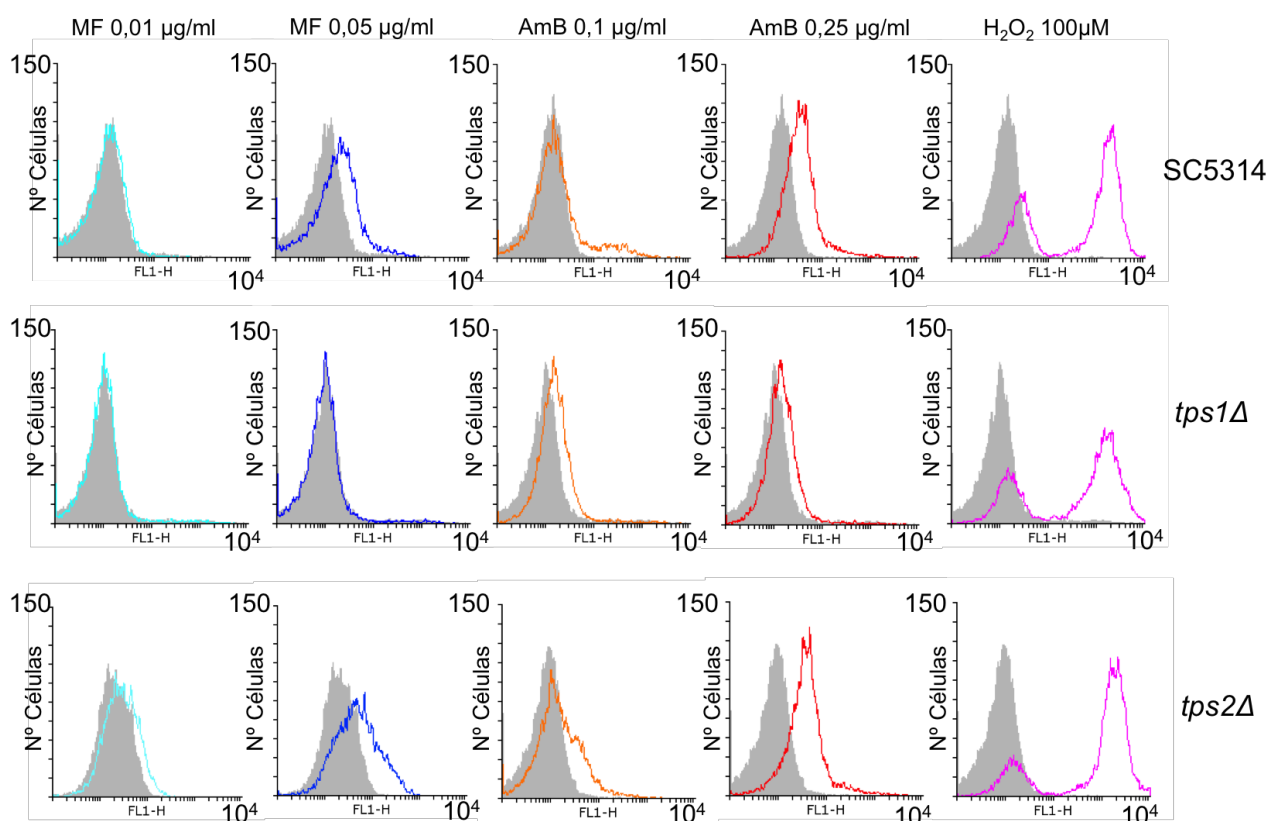
patógenas oportunistas (105). Por tanto, se procedió a medir los niveles de ROS intracelular después de la exposición a los diferentes fármacos para analizar la posible respuesta antioxidante en los mutantes bajo estudio. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante citometría de flujo, utilizando dihidrofluoresceína (DHF) como fluoróforo, un compuesto capaz de captar y escindir en fluoresceína al interactuar con los radicales libres y emitir fluorescencia verde (Métodos).

Con este propósito, se analizó el paso de 10.000 células por el citómetro de flujo, los datos obtenidos se presentan en la Figura 3.5. Como se puede comprobar, los valores de ROS endógeno, utilizando como agente oxidante de referencia peróxido de hidrogeno (100 μM) no variaron significativamente en la cepa parental con respecto al control sin tratar (zona gris), y lo hicieron muy poco en el mutante *tps1 Δ* (Fig. 3.5). Sin embargo, en la estirpe *tps2 Δ* sí se vio una producción nítida de ROS intracelular.

En cuanto al tratamiento con MF, tras la aplicación de la dosis más baja (0,01 $\mu\text{g/ml}$), no se detectaron cambios relevantes en los niveles de ROS en ninguna de las tres cepas estudiadas (Fig. 3.5). Sin embargo, la toxicidad provocada por la adición de MF 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3.1), se acompañó con una marcada síntesis de ROS en las cepas silvestre y *tps2 Δ* , pero no así en el mutante *tps1 Δ* (Fig. 3.5).

Por el contrario, el tratamiento con AmB tuvo un efecto dosis-dependiente sobre la formación de ROS endógeno en cantidades significativas en las cepas SC5314 y *tps2 Δ* (Fig. 3.5), siendo mucho menos prominente sobre *tps1 Δ* , a pesar de su mayor susceptibilidad a este polieno (Figs. 3.1 y 3.5), tal y como se puede apreciar por el desplazamiento de la gráfica de color rojo con respecto al área gris (control, Fig. 3.5).

Figura 3.5. Acumulación intracelular de ROS, medida con dihidrofluoresceína en las cepas de *C. albicans* bajo estudio, tratadas con MF y AmB en medio YPD. Cultivos exponenciales ($D.O_{600} = 0,8-1,0$), fueron tratados con las concentraciones indicadas de los compuestos durante 1 hora a 37°C, sobre medio YPD, incluyendo como control positivo H_2O_2 (100 μ M). Los histogramas grises corresponden al ensayo control, los azules al tratamiento con MF, los rojos a la adición de AmB y los rosas al ensayo con H_2O_2 . Los paneles representan el número de células respecto a la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica.



A fin de confirmar los datos obtenidos en los histogramas y darles significado matemático, se procedió a obtener la media geométrica de la intensidad de fluorescencia del ensayo de citometría, dichas medias se recogen en la tabla 3.2. Como se puede ver, los valores correspondientes a los controles sin tratamiento y los obtenidos en el ensayo con MF 0,01 μ g/ml, apenas difieren entre sí, confirmando que la producción de ROS en esas condiciones fue muy débil. Igualmente, la variación fue mínima para la cepa *tps1Δ* tras cualquier tratamiento, siendo un poco mayor con AmB (Tabla 3.2). El otro dato destacable de los histogramas, es el nivel comparativamente bajo de síntesis intracelular de ROS inducido por los antifúngicos, respecto a un potente inductor de estrés oxidativo (Fig. 3.5 y Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Medias geométricas de ROS, determinadas a partir del paso de 10.000 células marcadas con DHF por el citómetro. Para otros detalles, consultar la Figura 3.5.

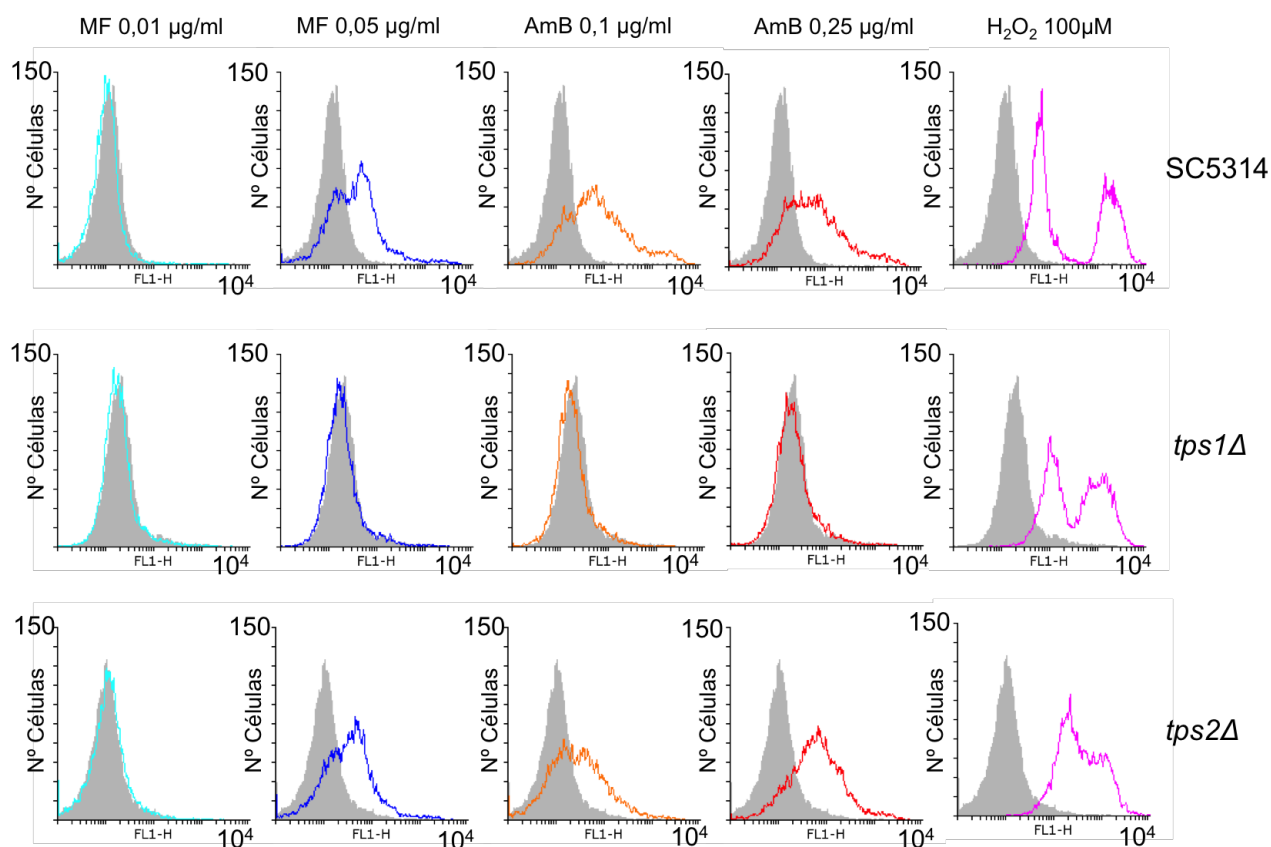
	MF 0,01	MF 0,05	AmB 0,1	AmB 0,25	H ₂ O ₂	Control
SC5314	9,68	17,80	11,33	33,12	392,82	8,86
<i>tps1Δ</i>	10,12	9,51	15,92	14,98	319,87	9,61
<i>Tps2Δ</i>	7,59	12,71	15,34	36,45	557,18	7,53

Determinación del potencial de membrana mitocondrial.

Es bien conocido que la cadena respiratoria mitocondrial es una fuente importante de ROS. Por esta razón, en este estudio, se ha planteado analizar el potencial de membrana empleando la misma técnica del citómetro de flujo y utilizando como fluorocromo Rhodamina 123, un compuesto que es secuestrado por las mitocondrias en fase activa.

En consonancia con los resultados sobre producción de ROS (Fig. 3.5), una intensa actividad mitocondrial pudo ser registrada sólo cuando se emplearon dosis tóxicas de MF (0,05 µg/ml) sobre la cepa parental y el mutante nulo *tps2Δ*, mostrando la menor concentración de esta equinocandina a niveles idénticos a las muestras control (Fig. 3.6). Como era de esperar, estas cepas presentaron un notable grado de inducción en su potencial de membrana tras 1 hora de exposición en presencia de las dos concentraciones escogidas del polieno (Fig. 3.6). Asimismo, una actividad mitocondrial equivalente a la presente en los niveles basales fue observada en el mutante *tps1Δ*, con independencia de la dosis y del antifúngico concreto añadido (Fig. 3.6). Finalmente, una elevada energización de la membrana mitocondrial fue evidente en todos los casos analizados, tras la aplicación de una dosis aguda de un agente oxidante (100 µM H₂O₂) (Fig. 3.6).

Figura 3.6. Determinación del potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con MF y AmB. Células exponenciales (blastoconidios) de las cepas analizadas fueron crecidas en medio YPD toda la noche y resuspendidas en el mismo medio y luego tratadas con ambos antifúngicos durante 1 h a 37°C. Las muestras fueron tratadas con Rhodamina 123 (20 µM). Para otros detalles, ver la Figura 3.5.



Estos resultados se parecen relacionarse con los datos medidos de ROS y son consistentes con experiencias similares realizadas en células parentales en presencia de AmB, pero existe una pequeña discrepancia en relación con la exposición a MF (103,106). Según nuestra interpretación, esto podría ser debido a la distinta metodología seguida en ambos ensayos. En el presente caso, en lugar de lavar las células y tratarlas después con tampón PBS con objeto de conseguir un pH neutro y estable, los antifúngicos fueron añadidos directamente a los cultivos creciendo en YPD, ya que la acción fungicida de la MF es dependiente, en parte, de la actividad metabólica celular (103,106).

Actividades antioxidantes en respuesta al tratamiento con antifúngicos

La acción de los antifúngicos con aplicación clínica podría ser más complejo de lo que previamente se suponía. Así, en el caso de los polienos (AmB) está documentado que, junto al mecanismo clásico de la unión al ergosterol de membrana y la posterior formación de poros, existe una segunda diana consistente en la generación de estrés oxidativo intracelular (104). La validez de esta propuesta, ha sido demostrada en varias levaduras patógenas oportunistas (105). En consecuencia, se procedió a estudiar el efecto de los fármacos empleados sobre un grupo relevante de actividades enzimáticas con función antioxidante, previamente estudiadas por nuestro grupo de trabajo, así como las posibles variaciones que puedan ser detectadas entre el tipo silvestre y los mutantes de *C. albicans*. Por tanto, era necesario comprobar el nivel de actividad de dichas enzimas.

En concreto, las enzimas seleccionadas fueron catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Puesto que, cómo se describió en la introducción, ambas están directamente involucradas en la eliminación de ROS y, según apartados anteriores, que los tratamientos antifúngicos provocan variaciones significativas en el contenido de ROS intracelular.

También fue medida la actividad glutatión reductasa (GR), aunque esta enzima planteó una serie de problemas técnicos (ver más adelante), lo que motivo que únicamente se puedan presentar resultados parciales.

Actividad Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasa (SOD)

El nivel de inducción de estas actividades enzimáticas con función antioxidante, que tiene lugar tras la exposición a varias dosis de AmB y MF, ha sido investigado en blastoconidios de las tres cepas, crecidos en medio YPD y recogidos en fase exponencial. Como se representa en la Figura 3.7, las células parentales mostraron un ligero descenso en la actividad catalasa después del tratamiento con MF, que fue mucho más notable sobre la enzima SOD global con la menor concentración (0,01 µg/ml), aunque dicha reducción resultó suprimida a 0,05 µg/ml (Fig. 3.8). A su vez, la MF provocó un efecto inhibitorio mucho más pronunciado sobre ambas actividades enzimáticas en el mutante homocigótico *tps2Δ* (Figs. 3.7 y 3.8). Sin embargo, debe ser destacado que esta equinocandina no produjo modificaciones significativas sobre la respuesta defensiva antioxidante en el mutante *tps1Δ* (Figs. 3.7 y 3.8), registrándose incluso un leve aumento en la actividad catalasa comparado con el ensayo control (Fig. 3.7).

En lo que respecta al tratamiento con 0,1 µg/ml AmB, una activación evidente de la catalasa tuvo lugar en las tres cepas analizadas, siendo el incremento de menor intensidad en las células *tps1Δ* (Fig. 3.7), mientras un fuerte aumento en la actividad SOD sólo se obtuvo en células del tipo parental y el mutante *tps2Δ* tras el suplemento con 0,25 µg/ml de AmB, siendo más elevado en el primer caso (Fig. 3.8), confirmando así observaciones previas de nuestro grupo (106). Bajo esta última condición experimental, un descenso en la actividad de ambas enzimas antioxidantes fue medido en el mutante *tps1Δ* en comparación con las otras dos cepas de *C. albicans*, aunque sin diferencias estadísticas significativas respecto al nivel basal medido en el control (muestra no tratada) (Figs. 3.7 y 3.8). En conjunto, estas evidencias permiten establecer una relación positiva entre las acciones tóxicas de cada antifúngico con la cantidad acumulada de ROS intracelular, el potencial de membrana mitocondrial y el grado de activación de las enzimas antioxidantes (Figs. 3.5-3.8).

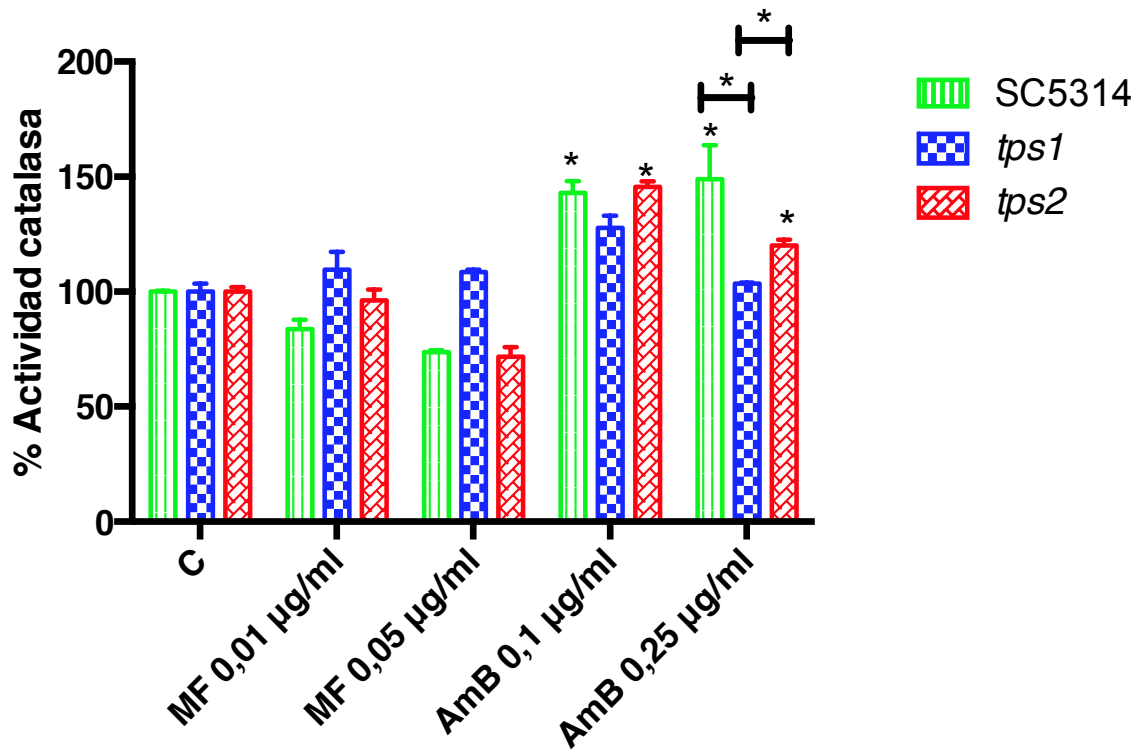


Figura 3.7. Efecto de los antifúngicos miconfungina (MF) y Anfotericina B (AmB) sobre la actividad catalasa de *Candida albicans*. Se aplicaron tratamientos de 1 hora a 37°C a concentraciones crecientes de MF (0,01 µg/ml y 0,05 µg/ml) y de AmB (0,1 µg/ml y 0,25 µg/ml) sobre la cepa parental SC5314 y sus mutantes isogénicos nulos *tps1Δ* y *tps2Δ* crecidos hasta la fase exponencial en medio YPD líquido. Los valores muestran la media ± D.E. de las medidas independientes. P<0,05 (*), según el test de U de Mann-Whitney.

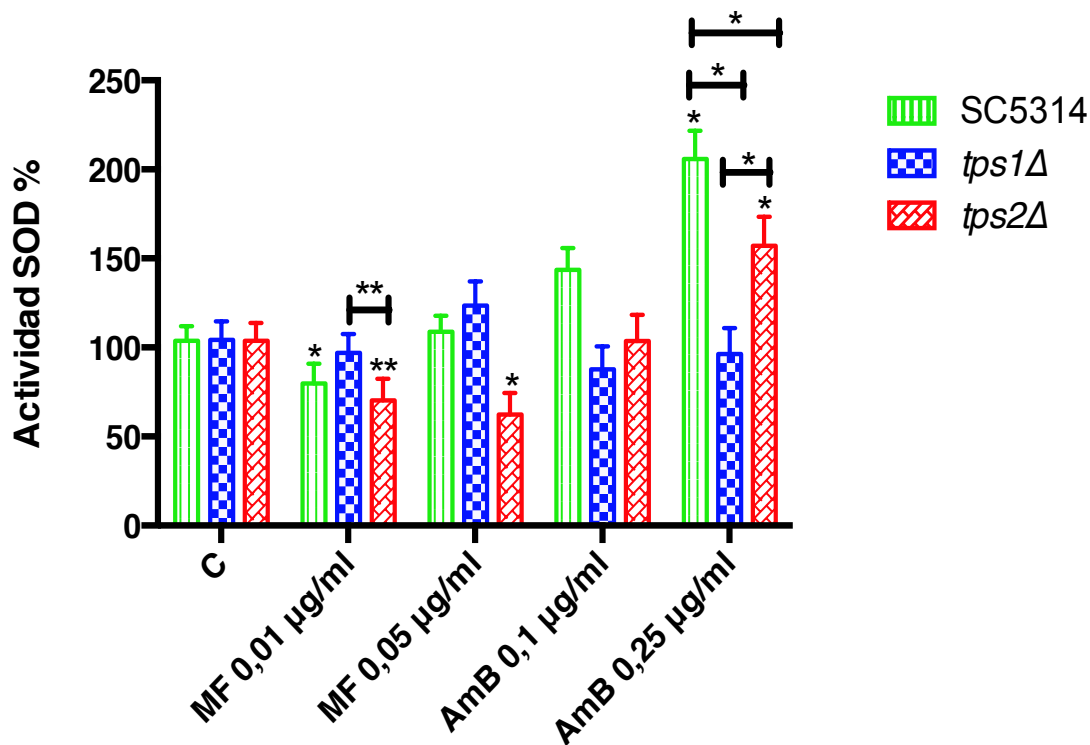


Figura 3.8. Niveles de actividad superóxido dismutasa (SOD) en respuesta al tratamiento antifúngico. Cultivos de las tres cepas SC5314, *tps1*Δ y *tps2*Δ fueron crecidas en YPD hasta fase exponencial y posteriormente se les aplicó los tratamientos de MF y AmB, en las dos concentraciones seleccionadas durante 1h a 37°C. Para otros detalles, consultar la Figura 3.7. Los valores mostrados son la media más la desviación estándar de las medidas independientes. P<0,05 (*), P<0,01 (**), según el test de U de Mann-Whitney.

Glutación reductasa (GR)

Respeto a la capacidad catalítica de la glutatión reductasa (GR), se pudo observar que tanto la cepa parental como el mutante *tps1*Δ incrementaron su actividad al aplicarles MF. Mientras el mutante *tps2*Δ mantuvo el mismo nivel de actividad GR que en ausencia de tratamiento (Fig. 3.9). Sin embargo, cuando el tratamiento aplicado fue el de AmB, el mutante nulo *tps2*Δ vio claramente disminuida su actividad GR, mientras la cepa parental SC5314 y el mutante *tps2*Δ presentaron valores similares al control (Fig. 3.9). Por cuestiones de índole técnico relativas a la disponibilidad de glutatión y problemas con los equipos de medida, no se llevó a cabo el ensayo con las concentraciones inferiores de los antifúngicos probados.

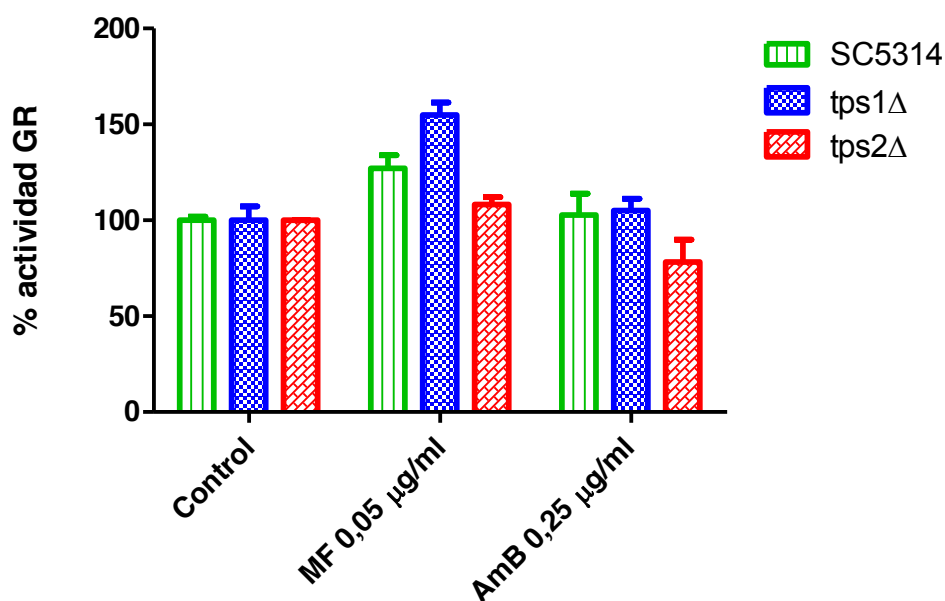


Figura 3.9. Efecto de los antifúngicos MF (0,05 µg/ml) y AmB (0,25 µg/ml) sobre la actividad específica Glutación reductasa (GR). Los tratamientos con la dosis más alta de dichos antifúngicos fueron aplicados a alícuotas idénticas durante una hora a 37°C sobre la cepa SC3514 y sus mutantes isogénicos nulos *tps1*Δ, *tps2*Δ que previamente fueron crecidos sobre medio YPD hasta fase exponencial.

Síntesis de trehalosa endógena en respuesta al tratamiento antifúngico

Estudios previos han demostrado que la síntesis intracelular de trehalosa constituye en *C. albicans* un mecanismo específico de protección frente a estrés oxidativo (93). Aún más importante, la adición de anfotericina B induce la acumulación inmediata de trehalosa endógena como defensa antifúngica de *C. albicans* (104). Por tanto, parecía conveniente determinar las posibles variaciones del contenido interno de trehalosa, en respuesta a las condiciones experimentales establecidas en este trabajo. Para ello, se realizó la aplicación del tratamiento con MF y AmB y posterior valoración enzimática de la trehalosa producida mediante una trehalasa comercial (Sigma), tal y como se describe en Métodos.

Los resultados se pueden observar en la Tabla 3.2, donde se muestran las fluctuaciones en el contenido de trehalosa endógena de los cultivos en función del tratamiento seguido. En las tres cepas analizadas, tan sólo las células del tipo silvestre fueron capaces de responder mediante una marcada acumulación de trehalosa intracelular al desafío antifúngico provocado, si bien un efecto diferencial pudo ser registrado en función de la cepa y el compuesto considerado (Tabla 3.2). Así, mientras una síntesis neta del disacárido tuvo lugar tras la adición de AmB 0,25 µg/ml, ese incremento fue muy moderado o prácticamente cero en presencia de MF (Tabla 3.2). Según lo esperado, el contenido basal de trehalosa en el mutante *tps1Δ* (deficiente en la actividad *tps1p*) fue muy bajo, sin ninguna variación sustancial del disacárido después del tratamiento con cualquiera de los dos antifúngicos; ya que las ligeras variaciones registradas pueden considerarse dentro del error experimental del ensayo (Tabla 3.2), confirmando que la doble interrupción del gen *TPS1* era correcta (107).

Sin embargo, el incremento denotado en el mutante *tps2Δ*, particularmente tras la aplicación de AmB y de la concentración más alta de MF (Tabla 3.2), sí debe valorarse como significativo. Este hecho que ya ha sido descrito por otros grupos (78–80,101). Puesto que el procedimiento determinativo mide exclusivamente trehalosa libre (Métodos), la explicación más plausible de este resultado, es que la ausencia de actividad trehalosa fosfatasa en el mutante *tps2Δ* puede ser compensada por la acción de otras fosfatasas que pueden defosforilar inespecíficamente el intermediario trehalosa-6P hasta trehalosa libre, aunque la eficiencia sea menor respecto a la actividad *Tps2p* (Tabla 3.2).

En resumen, estos resultados permiten concluir que la Anfotericina B, pero no la Micafungina, actúa en *C. albicans* como un inductor efectivo que promueve la activación de mecanismos antioxidantes junto con la síntesis de trehalosa endógena, como parte de una respuesta defensiva general de *C. albicans* frente a la toxicidad potencialmente letal de la acción antifúngica.

Tabla 3.2. Variación del contenido de trehalosa endógena en las cepas SC3514 y los mutantes isogénicos nulos *tps1Δ* y *tps2Δ*, obtenido en alícuotas idénticas de las tres cepas previamente crecidas en medio YPD hasta fase exponencial ($D.O._{600nm} \cong 0.8-1.0$), siendo tratadas de inmediato con MF y AmB a las concentraciones indicadas durante 1h a 37°C en agitación. El contenido de trehalosa se midió como se indica en Métodos. Los datos representan la media más la desviación estándar de un experimento realizado en triplicado. Los números entre paréntesis indican el valor relativo normalizado respecto al control, que es tomado como 1.0.

Tratamientos	Cepas		
	SC5314	<i>tps1Δ</i>	<i>tps2Δ</i>
Control	2,4 ± 0,4 (1,0)	1,9 ± 0,2 (1,0)	2,2 ± 0,3 (1,0)
MF (0,01 µg/ml)	3,5 ± 0,5 (1,4)	2,1 ± 0,3 (1,1)	2,3 ± 0,5 (1,0)
MF (0,05 µg/ml)	4,4 ± 1,2 (1,8)	2,8 ± 0,5 (1,5)	3,6 ± 0,8 (1,6)
AmB (0,1 µg/ml)	6,7 ± 2,3 (2,8)	2,2 ± 0,7 (1,1)	4,0 ± 1,1 (1,8)
AmB (0,25 µg/ml)	13,1 ± 6,6 (6,5)	3,7 ± 0,9 (1,9)	6,1 ± 1,5 (2,8)

^a nmoles trehalosa/mg de peso húmedo

Análisis de la morfología celular por microscopía óptica.

Con el fin de verificar las posibles alteraciones estructurales producidas a causa de los tratamientos antifúngicos, se procedió al examen de la morfología levaduriforme por medio de microscopía óptica. Siempre se analizaron cultivos en fase exponencial, aplicando la técnica del contraste interferencial de Nomarski. Sólo se determinó el análisis morfológico de aquellas concentraciones de MF y AmB donde se comprobó, previamente su efecto fungicida sobre las levaduras estudiadas. Una representación de las fotografías tomadas ha sido recopilada en la Imagen 3.1. En las micrográficas correspondientes al ensayo control (sin tratar), se observó que los dos mutantes homocigóticos *tps1Δ* y *tps2Δ* presentaron espontáneamente un cierto número de células con morfología tipo pseudohifa (células hijas asociadas a células madre sin separación tras la gemación) (Imagen 3.1; flechas azules).

Por otra parte, con el tratamiento de MF 0,05 $\mu\text{g/ml}$ sobre las tres cepas de *C. albicans*, fue visible la formación de agregados celulares que, en el caso del tipo parental SC5314 y del mutante *tps2 Δ* , se entremezclaron además con estructuras tipo pseudohifa (Imagen 3.1; flechas verdes). Finalmente, la aplicación del tratamiento con AmB 0,25 $\mu\text{g/ml}$ provocó también la aparición del mismo tipo de formaciones en agregación, principalmente en el mutante *tps2 Δ* , mientras que en las otras dos cepas la aparición de dichos agregados no fue tan evidente (Imagen 3.1). La cepa parental sometida a ese mismo tratamiento (AmB) manifestó la presencia de pseudohifas, pero no produjo agregados fácilmente detectables. A su vez, el mutante nulo *tps1 Δ* no presentó pseudohifas ni tampoco agregados. Debe ser destacado cómo las células parentales y *tps2 Δ* presentaron una clara filamentación junto con los agregados celulares en presencia de anfotericina B (Imagen 3.1; flechas azules y naranjas) aunque eran más evidentes en el mutante carente de actividad trehalosa fosfatasa (Imagen 3.1).

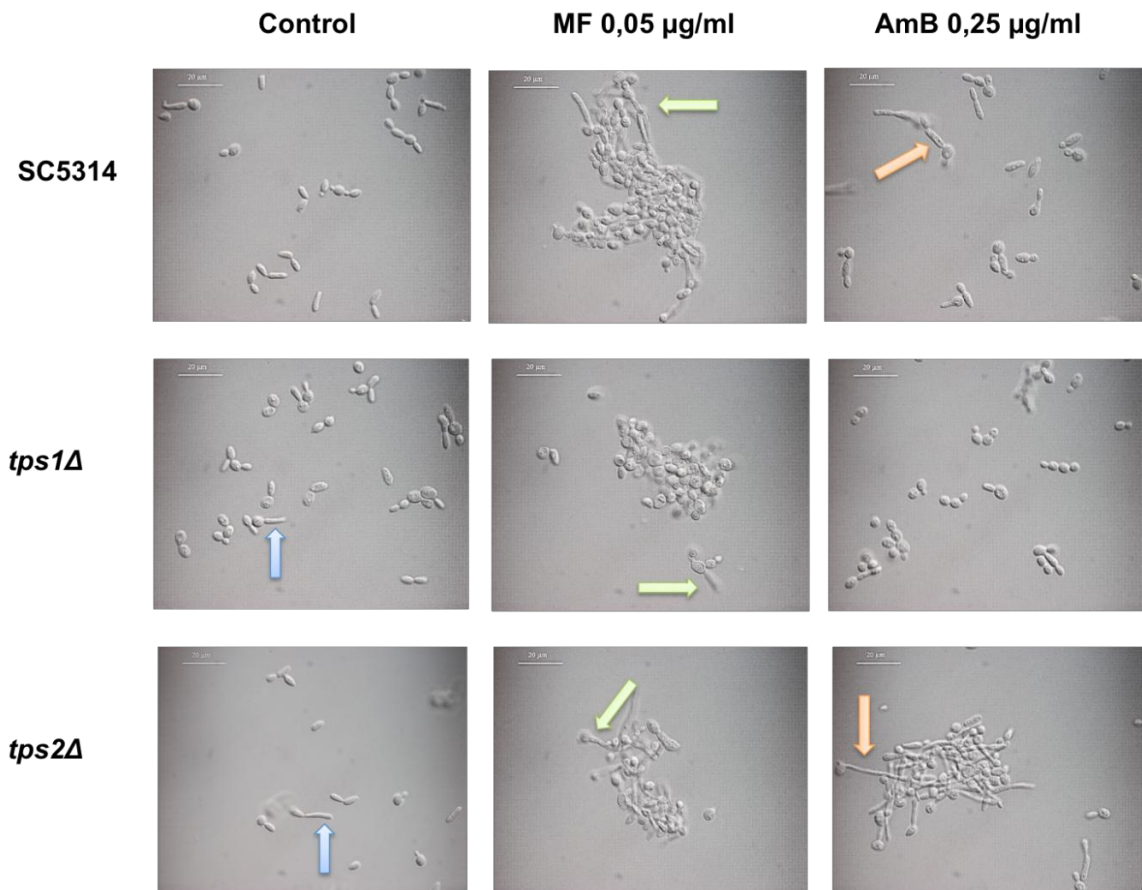


Imagen 3.1. Composición de fotografías correspondientes a la observación microscópica de contraste interferencial de Nomarski de las cepas estudiadas (SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ*) después del tratamiento con la concentración más alta de los antifúngicos MF y AmB.

Efecto de los tratamientos antifúngicos sobre los biofilms (o biopelículas).

Las infecciones sistémicas provocadas por *Candida albicans* que cursan con la formación de biofilms son una causa frecuente de movilidad y mortalidad en pacientes sujetos a hospitalización prolongada, especialmente aquellos en situación de inmunodepresión (108). En la actualidad, las opciones terapéuticas disponibles para un tratamiento eficaz de biofilms resistentes a drogas son escasas (80). Por tanto, es preciso explorar nuevas estrategias para intentar resolver este problema clínico. Como parte de esta investigación, se decidió evaluar la capacidad de AmB y MF en ensayos experimentales de biofilms,

utilizando los mismos mutantes seleccionados deficientes en el metabolismo de la trehalosa. Adicionalmente, nuestros resultados podrían apoyar la hipótesis de escoger la trehalosa como diana terapéutica para la obtención de nuevos antifúngicos. El grado de formación de biofilms se expresa como el porcentaje de actividad metabólica y los valores correspondientes para estas células sésiles aparecen recogidos en la Figura 3.10.

Como se puede apreciar, la formación de biofilms experimentó una clara disminución en las células de *tps1Δ* y *tps2Δ*. Ya desde la aplicación más baja de los antifúngicos se manifiesta una actividad de las deshidrogenasas mitocondriales que es estadísticamente significativa; indicando que las células son perfectamente viables. La actividad deshidrogenasa también quedó patente, para inspección visual, en la diferente coloración que se obtuvo al revelar los biofilms con la sal de XTT tal y como se puede apreciar en la Imagen 3.2.

Por el contrario, los resultados obtenidos con la equinocandina fueron menos concluyentes. Así, la aplicación de la concentración menor de MF reveló que las células pertenecientes a la cepa parental y al mutante *tps2Δ* tienen una ligera reducción, que sólo fue significativa respecto al control sin tratar, en el caso del mutante. El nivel de generación de biofilms sólo aumentó notablemente en el mutante *tps1Δ*, particularmente con la máxima concentración de MF (0,05 µg/ml) (Fig. 3.10), dosis que también dio lugar a una drástica caída de la formación de biofilms en los tipos parental y *tps2Δ*; esta última fue igualmente sensible a la dosis inferior de MF (Fig. 3.10), un dato consistente con las observaciones previas sobre el elevado porcentaje de muerte celular inducido por MF (Figs. 3.1 y 3.2). El incremento de la actividad mitocondrial en el mutante *tps1Δ* sugiere una mayor viabilidad de las células del biofilm, que podría ser debido, como ya se mencionó anteriormente, al metabolismo más lento de *tps1Δ*. Este hecho se sumaría al papel protector de la capa de polímeros que protege a las células sésiles y, por tanto, prevendría una acción tóxica grave de la equinocandina.

Finalmente, y de forma preliminar, estos resultados corroborarían las observaciones sobre la acción fungicida de los compuestos probados inicialmente sobre células planctónicas, reflejados en la Figuras 3.1 y 3.2. El hecho de que las células constitutivas del biofilm se vean afectadas en distinto grado, específicamente en las cepas SC5314 y *tps2Δ*, es una evidencia positiva en cuanto al tipo de acción tóxica que ejerce este antifúngico sobre *C. albicans*. Del mismo modo, cabe destacar que el patrón de actividad mitocondrial recogido en la Figura 3.10 es muy similar al patrón de viabilidad celular (Figs. 3.1 y 3.2). Por lo que igual que ocurre con MF, los ensayos con células del biofilm están en consonancia con los resultados obtenidos de células planctónicas expuestas al tratamiento con el polieno (AmB).

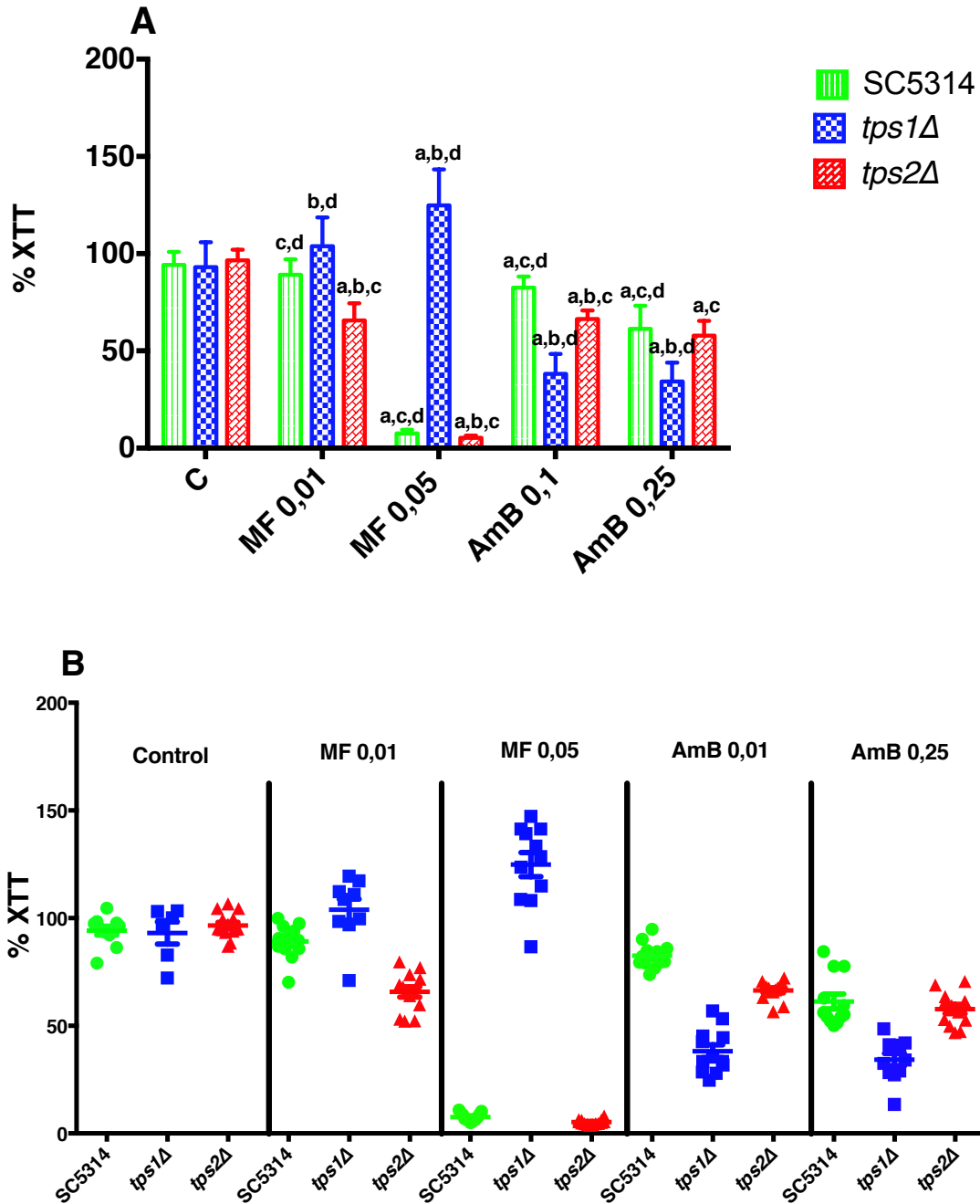


Figura 3.10. Efecto de los antifúngicos sobre la formación de biofilms en *C. albicans*. Las cepas SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ* fueron depositadas durante 24h para permitir la formación de biofilms en placas de 96 pocillos de fondo plano y posteriormente se les aplicó los tratamientos de MF (0,01 $\mu\text{g/ml}$ y 0,05 $\mu\text{g/ml}$) y AmB (0,1 $\mu\text{g/ml}$ y 0,25 $\mu\text{g/ml}$), durante 24h a 37°C. Posteriormente el ensayo de actividad mitocondrial fue revelado con sal de XTT. Para su mejor comprensión, los datos son representados mediante una gráfica de barras [A], o mediante un diagrama de dispersión [B]. Los valores muestran la media \pm D.E. de las medidas independientes. Siendo, según el test de U de Mann-Whitney, a = $P < 0,01$ con respecto al control sin tratar; b = $P < 0,01$ con respecto a cepa SC5314 con el mismo tratamiento; c = $P < 0,01$ con respecto a *tps1Δ* con el mismo tratamiento; d = $P < 0,01$ con respecto a *tps2Δ* con el mismo tratamiento.

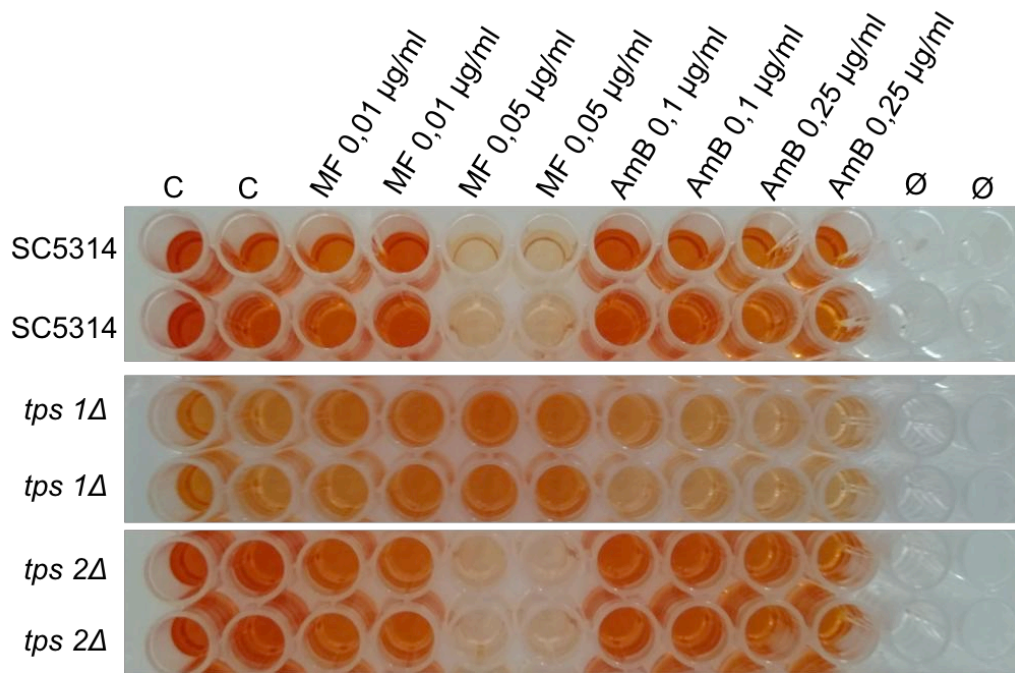


Imagen 3.2. Formación de biofilms revelada con XTT para inspección visual. La fotografía tomada se corresponde con los datos experimentales descritos en la Figura 3.10. La letra C significa control y se refiere a los biofilm que no recibieron tratamiento; y el símbolo Ø significa control de esterilidad, es decir, el medio sin ninguna levadura.

CAPÍTULO II

Análisis de la actividad antifúngica del fluconazol sobre los mutantes

Candida albicans deficientes en la síntesis de trehalosa.

Junto con polienos y equinocandinas, los azoles son el tercer grupo principal de compuestos utilizados en la práctica clínica habitual contra los hongos responsables de infecciones en humanos, generalmente de tipo oportunista. Su estructura está constituida por anillos aromáticos derivados del **imidazol**, con átomos de nitrógeno integrados como se ha mencionado anteriormente en la introducción.

El mecanismo general de acción de todos los azoles es idéntico: interfieren en la biosíntesis del ergosterol, el esterol predominante en la membrana plasmática fúngica, mediante la inhibición específica del citocromo P-450, un cofactor esencial para la enzima **lanosterol 14 α -demetilasa** (Erg11p), que cataliza la conversión de lanosterol en zimosterol (109). La resistencia a los azoles ha aumentado considerablemente en los últimos años y está provocada por mutaciones que afectan al gen diana (*ERG11*), o bien a genes implicados en la internalización o secreción del compuesto (*CDR1*; *CDR2* o *MDR1*) (110). El bloqueo de esta ruta ocasiona en las células una pérdida de fluidez y permeabilidad de la membrana, frenando el crecimiento celular. Igualmente, su interrupción provoca la acumulación del lanosterol, un intermediario que genera una elevada toxicidad, que finalmente puede desencadenar la muerte celular (Introducción).

De acuerdo con las anteriores premisas, se estimó que era necesario ampliar y completar este estudio, realizando el examen de un compuesto representativo de

los azoles, para comprobar la hipótesis propuesta de asignar a la biosíntesis de trehalosa un papel principal como diana antifúngica. Se escogió el Fluconazol, por ser el azol de mayor aplicación tanto en prescripción antifúngica individual como en terapias combinadas. De esta manera se completaría un panorama global de ensayos llevados a cabo con las otras familias; lo que permitiría disponer de datos comparativos procedentes de los principales grupos de antifúngicos clínicos que existen hoy día.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria del Fluconazol

En consonancia con experiencias previas, para poder incorporar un nuevo antifúngico al estudio, el primer requisito consistió en conocer su potencia antibiótica, mediante el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto: el Fluconazol (Flz). De nuevo, se utilizó el procedimiento del CLSI descrito en Materiales y Métodos. Además de las tres cepas habituales (el tipo parental SC5314 y los mutantes homocigóticos deficientes en la síntesis de trehalosa, *tps1Δ* y *tps2Δ*), se introdujo como un control adicional, la cepa 015 de *Candida albicans*, un aislado clínico de la cavidad oral (hospital La Fe, Valencia), ya que su MIC era conocida (0,5 µg/ml).

Según se pudo apreciar mediante inspección visual (Imagen 4.1), la MIC50 calculada para la cepa SC5314 fue de 0,5 µg/ml, sin que se aprecien variaciones del crecimiento después de la concentración escogida (concentraciones menores). En este caso, no fue posible establecer la MIC90, ya que tampoco se pudieron apreciar diferencias en el patrón de crecimiento entre las concentraciones mayores del antifúngico.

Por otro lado, la respuesta de los mutantes fue comparativamente muy diferente entre ellos. A pesar de haber suplementado el medio de cultivo de las células

tps1Δ con uracilo (por ser auxotrófico, es decir URA⁻), con objeto de favorecer la observación gradual de la acción fungicida provocada por las diferentes concentraciones del antifúngico, no se observó turbidez de crecimiento alguna (Imagen 4.1). Ni siquiera en el control de crecimiento (CC) se pudo apreciar una mínima turbidez en *tps1Δ*. Por el contrario, el mutante *tps2Δ* sí experimentó un patrón normal de crecimiento, y se pudo obtener una MIC de 0,25 μg/ml (Imagen 4.1). En consecuencia, teniendo en cuenta que en el mutante *tps1Δ* no se pudo determinar la MIC, y que el mutante *tps2Δ* mostró un resultado inferior al tipo parental, se decidió utilizar como MIC de referencia la concentración correspondiente a SC5314: 0,5 μg/ml. La cepa clínica 015 (control), por su parte, presentó en nuestros ensayos el valor de MIC esperable (0,5 μg/ml) tal y como se recoge en la Imagen 4.1.

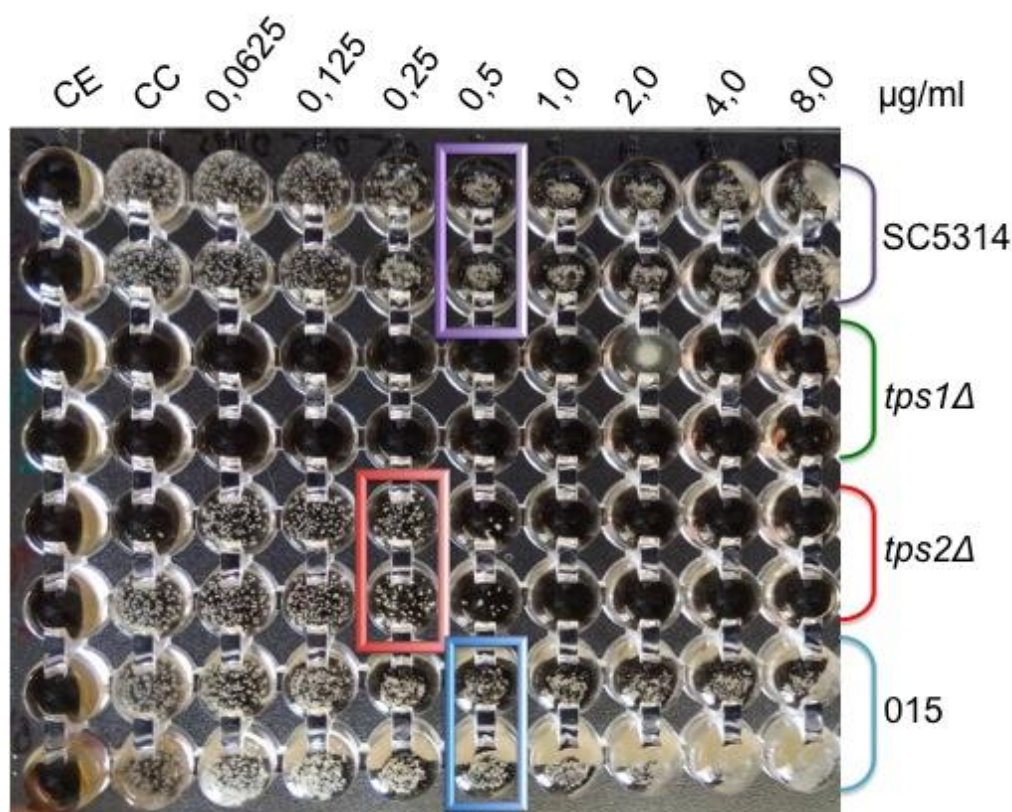


Imagen 4.1. Fotografía correspondiente al ensayo de MICs para Flz sobre las cepas SC5314 y los mutantes isogénicos *tps1Δ* y *tps2Δ*. Se empleó como control la cepa 015 de origen clínico, un aislado oral procedente del Hospital "La Fe" de Valencia. CE= control de esterilidad; CC= control de crecimiento. El mutante fue incapaz de crecer en las condiciones experimentales establecidas.

Cálculo de las concentraciones experimentales de trabajo para Flz

Puesto que la actividad tóxica del Flz suele ser principalmente fungistática antes que fungicida, y con el fin de establecer las concentraciones experimentales de nuestro ensayo, se realizó un experimento inicial de viabilidad sólo con la cepa parental SC5314. Se emplearon concentraciones superiores e inferiores a la MIC, para corroborar si el comportamiento de la levadura en medio YPD era equivalente a los valores obtenidos con el método CLSI. Los resultados se muestran en la Figura 4.1.

Una de las observaciones más sorprendentes, por inesperada, fue comprobar cómo entre las concentraciones 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, la viabilidad celular de las levaduras aumentó, incluso por encima del ensayo control sin tratar (Fig. 4.1). Este comportamiento se confirmó tras la repetición del ensayo hasta tres veces. Aunque no disponemos de una explicación definitiva, podríamos sugerir, basándonos en esta información que, por encima de 1 $\mu\text{g/ml}$ (exclusivamente para el caso de SC5314), se produce lo que parece un “efecto de estimulación paradójica” que ayudaría a los cultivos a mejorar su tasa de crecimiento, bajo condiciones teórica de estrés tóxico producido por la exposición a este antifúngico. Una observación similar se ha descrito con caspofungina, no siendo debido a la inestabilidad o degradación de la equinocandina (111). Las células que muestran crecimiento paradójico a elevadas concentraciones de caspofungina presentan cambios morfológicos notables, como alargamiento celular, septos anormales y ausencia de filamentación. También manifiestan una pérdida de virulencia al ser probadas en el modelo de hospedador invertebrado *Galleria mellonella* (109).

Otra contradicción aparente, consistió en que el dato comparable a una MIC_{50} registrada en la placa determinativa de las MICs (Imagen 4.1), aparece aquí reflejada como una MIC_{90} . Teniendo en cuenta el patrón descendente en viabilidad celular registrado entre las concentraciones 0,25 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 4.1),

decidimos utilizar la MIC₉₀ (0,5 µg/ml) junto con la siguiente concentración (1,0 µg/ml), como referencia para establecer los hipotéticos efectos tóxicos del Flz sobre las cepas estudiadas, escogiendo únicamente estas dos concentraciones según el mismo patrón de ensayo prefijado con AmB y MF (Resultados Capítulo I). Igualmente, en este capítulo se pretendió llevar a cabo un estudio paralelo entre los ensayos de supervivencia frente al Flz con los efectos sobre los parámetros metabólicos previamente definidos en esta Memoria.

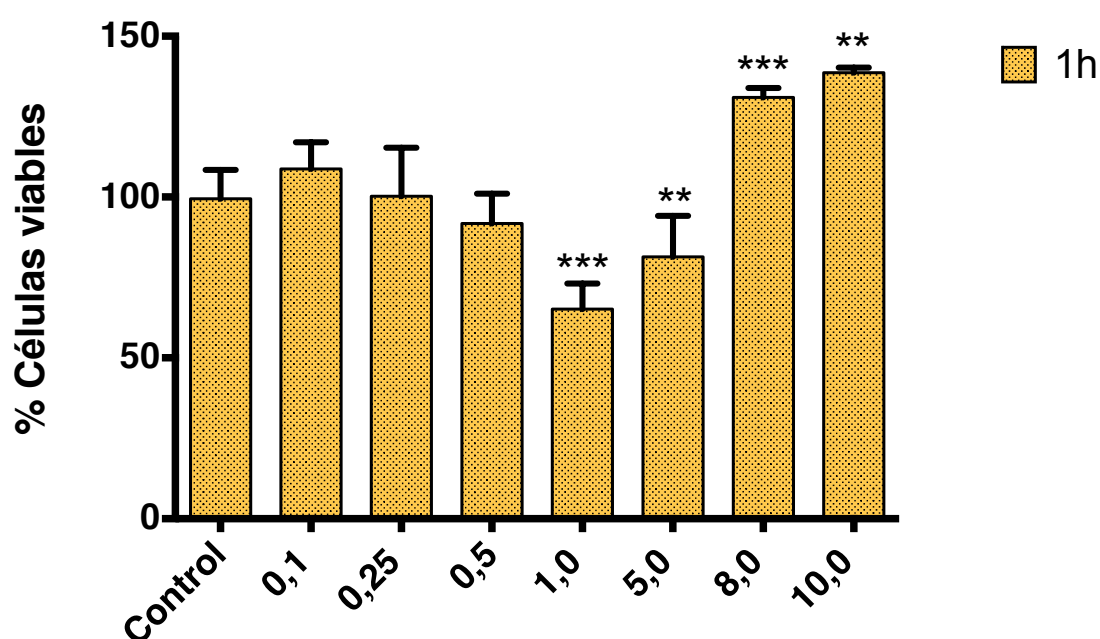


Figura 4.1. Efecto de diferentes concentraciones (µg/ml) de Fluconazol (Flz) sobre la viabilidad de la cepa parental SC5314 de *C. albicans*. Cultivos en YPD líquido a 37°C que crecieron hasta fase exponencial. Los tratamientos consistieron en la aplicación de concentraciones crecientes durante 1 hora a 37°C y en agitación. Para dotar de valor estadístico a los resultados, el experimento fue realizado tres veces. De modo que se muestra el valor promedio más la desviación estándar que se obtuvo de todos los ensayos. Siendo P<0,05 (*), P<0,01 (**), P<0,001 (***), según el test de Mann Whitney.

Dado que, los antifúngicos introducidos previamente en el Capítulo I, **polienos** y **equinocandinas**, tienen una acción esencialmente fungicida y con objeto de que el análisis del Flz fuera lo más fiable y comparativo posible, se procedió a hacer un experimento complementario al anterior para confirmar si este azol tiene una actividad principalmente "estática", tal y como se ha descrito en *Candida sp.*,

mientras que en *Aspergillus sp.* y otros hongos filamentosos se comporta como un antibiótico fungicida (109). Por esta razón, una vez probadas distintas concentraciones del compuesto y habiendo comprobado que únicamente existía una tendencia de reducción en la viabilidad de las levaduras entre ciertas concentraciones (0,25 y 1,0 µg/ml) (Fig. 4.1), se diseñó un ensayo sencillo para determinar si el efecto tóxico observado responde más a un efecto fungicida o fungistático del Flz. Dicho ensayo consistió en la aplicación exclusivamente sobre la cepa parental de varias concentraciones escogidas del Flz, con diferentes horas de tratamiento.

Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 4.2. Después de 1 hora de tratamiento, las muestras recogidas no manifestaron variaciones estadísticamente significativas con las diferentes concentraciones de Flz, aunque visualmente sí parece haber un incremento de la viabilidad según aumentó la dosis del azol. Con idéntica exposición, pero aplicada durante 8 horas el patrón de respuesta fue muy similar, si bien el recuento directo de viables en placa evidenció que hay un claro descenso de la viabilidad con respecto a la incubación de 1 hora (Fig. 4.2).

Finalmente, la prolongación del ensayo durante 24 horas sí dio lugar a descensos en el porcentaje de unidades formadoras de colonias (ufc) estadísticamente significativos, con respecto tanto al control como también a los tratamientos aplicados durante un tiempo inferior (1 y 8 horas) (Fig. 4.2). Este comportamiento podría estar reflejando el carácter principalmente fungistático del azol en cortos periodos de tiempo, mientras que el mantenimiento del compuesto durante mayor número de horas (24h), consigue que se vuelva fungicida. Adicionalmente, estos datos sugieren que el Fluconazol se mantiene estable y no es degradado en cultivos *in vitro*, al menos teniendo en cuenta el intervalo temporal analizado (Fig. 4.2).

En todos los casos se pudo observar, como se ha mencionado previamente, que el aumento en la concentración del azol, supone un ligero incremento en la supervivencia de la levadura (especialmente visible a 5,0 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 4.2). Esta observación "paradójica" también se ha descrito en la Figura 4.1. Ambas evidencias ponen aún más de manifiesto, que el carácter "estático" o "cida" del antifúngico no sería tan sólo dosis-dependiente, sino que se debe también al tiempo de aplicación del mismo.

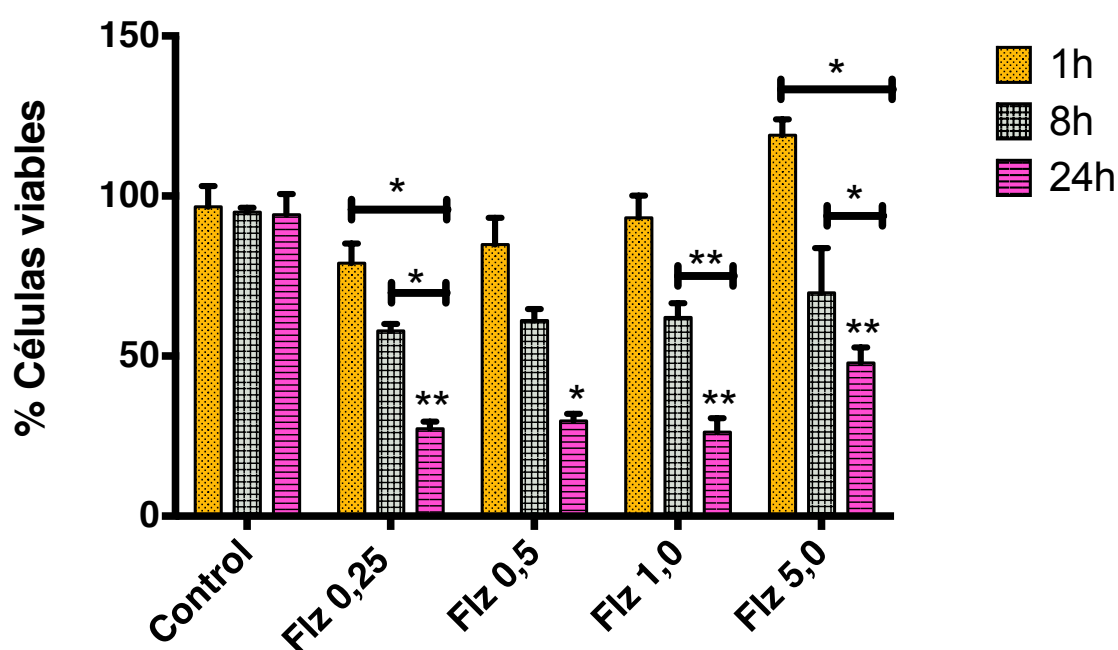


Figura 4.2. Efecto de diferentes concentraciones de Fluconazol (Flz) sobre la viabilidad de la cepa silvestre SC5314 de *C. albicans*, determinada a varios tiempos de tratamiento. Blastocnidios crecieron en YPD líquido a 37°C hasta fase exponencial. Los tratamientos consistieron en la aplicación de concentraciones crecientes de Flz (en $\mu\text{g/ml}$) a 37°C con agitación. Muestras idénticas fueron tomadas a 1, 8 y 24 horas. Para verificar los resultados el experimento fue realizado 3 veces y se muestra el valor promedio más la desviación estándar. $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), según el test de U de Mann-Whitney.

Viabilidad celular en medio líquido de SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ*

El efecto del Flz sobre el porcentaje de viabilidad celular de las cepas estudiadas, se observa en la Figura 4.3. De modo general, se pudo apreciar que el Flz tuvo un mínimo efecto tóxico sobre la supervivencia celular (Fig. 4.3), únicamente disminuyó con significación estadística la viabilidad para el mutante *tps1Δ*, tendencia que se mantuvo al incrementar la concentración de Flz (Fig. 4.3). Sin embargo esta disminución fue muy residual, en ningún caso comparable a la registrada con los tratamientos más elevados de MF y AmB (Figs. 3.1 y 3.2), que produjeron una pérdida muy notable de la supervivencia celular. No obstante, estos resultados parecen sugerir la ausencia del gen *TPS1* funcional, podría contribuir a incrementar la sensibilidad de *C. albicans* frente a los compuestos que afectan a la permeabilidad de la membrana plasmática celular (polienos y azoles). Mientras que las equinocandinas, como MF, que actúan sobre la pared del microorganismo, serían más efectivas cuando la actividad enzimática ausente es la trehalosa fosfatasa (*tps2p*).

Por su parte, la Figura 4.3, también sugiere que el mutante nulo *tps2Δ*, en presencia de Flz, no sólo no ve disminuida su supervivencia, sino que incluso se produce un ligero incremento por encima de los valores control (sin tratar). Aunque una mayor evidencia experimental es necesaria para apoyar este aserto. A su vez, en los tratamientos con MF y AmB (Figs 3.1 y 3.2), el mutante *tps2Δ* tuvo un comportamiento similar al tipo parental, mientras el mutante *tps1Δ* se desmarcaba de esa tendencia, pero con el azol, ocurrió lo contrario.

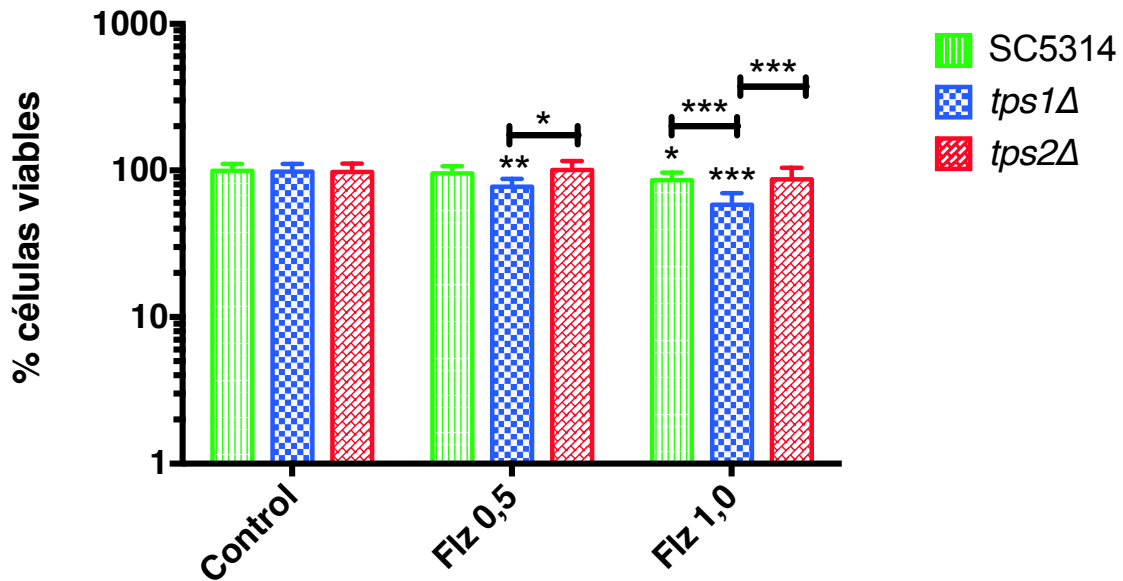


Figura 4.3. Efecto de Flz sobre la viabilidad celular de las cepas de *Candida albicans* SC5314 y sus mutantes isogénicos *tps1Δ* y *tps2Δ*. Las cepas fueron expuestas a las concentraciones indicadas después de haber sido crecidas en medio YPD líquido a 37°C hasta fase exponencial. El tratamiento con dos concentraciones de Flz (0,5 y 1 µg/ml) se aplicó durante 1 hora a 37°C. Lo que se muestra el valor promedio más la desviación estándar que se obtuvo de los tres ensayos. P<0,05 (*), P<0,01 (**), P<0,001 (***), según el test de U de Mann-Whitney.

Crecimiento colonial en medio sólido

En el referente al crecimiento colonial en medio sólido de las distintas levaduras tratadas con Fluconazol (Flz), las colonias macroscópicas visualizadas (“spots”) se presentan en la Figura 4.4. Se apreció que a las densidades más bajas (10^3 y 10^4 células), la formación de colonias macroscópicas fue inferior en el mutante *tps1Δ*. Si bien, y aunque resulte difícil de observar en la imagen, el tamaño de las colonias también es ligeramente más pequeño, esto es probable que sea debido más al crecimiento lento de esta cepa en YPD, que al propio efecto tóxico del antifúngico sobre la misma. Por su parte, el comportamiento del mutante *tps2Δ* a estas diluciones fue muy similar al de la cepa parental (Fig. 4.4).

En las diluciones más elevadas (10^7 , 10^6 y 10^5 células), no se pueden establecer diferencias visuales sobre la densidad colonial, al tratarse de una prueba

fundamentalmente cuantitativa. De forma intuitiva, el crecimiento colonial del mutante *tps2Δ* parecía ser ligeramente superior al obtenido en la cepa parental SC5314, para ambas concentraciones del azol. De nuevo, la intensidad de las colonias formadas por el mutante *tps1Δ* a una densidad de 10^5 células, apareció claramente disminuida con respecto a las otras dos cepas (Fig. 4.4). En conjunto, estos datos parecen corroborar las observaciones registradas en el ensayo previo de viabilidad en medio líquido (Fig. 4.3). Sin embargo, y al igual que ocurre con ese mismo cultivo líquido, el efecto fungicida del Flz sobre la disminución de viabilidad celular es relativamente débil; de ahí que no se aprecien diferencias más evidentes en el crecimiento de los spots.

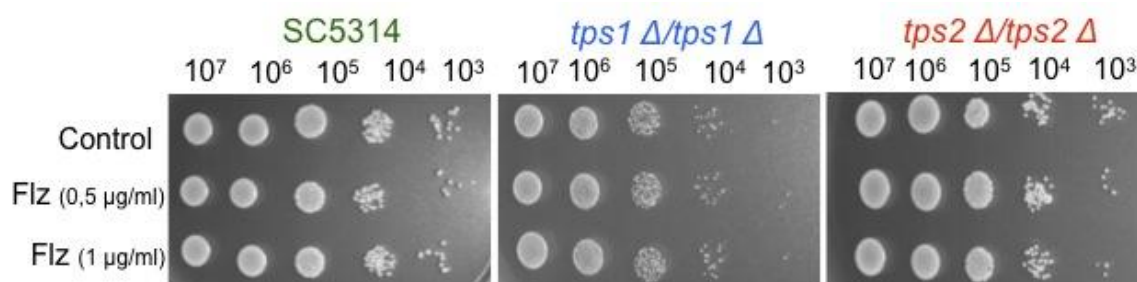


Figura 4.4. Representación del crecimiento colonial en medio YPD sólido. Se partió de alícuotas celulares iguales de las cepas SC5314 y los mutantes isogénicos (*tps1Δ* y *tps2Δ*). Se sometieron a una hora de tratamiento a 37°C con Flz 0,5 y 1,0 μg/ml. Se hicieron diluciones seriadas de cada cepa y tratamiento, tomando 5 μl de cada dilución que fueron dispersados en forma de gota (“spot”) sobre medio YPD sólido. Las placas se incubaron a 37°C durante 24h, antes de ser fotografiadas.

Análisis de la generación de ROS intracelular

A continuación, quisimos comprobar si el Fluconazol, igual que ocurre con la AmB, posee un segundo mecanismo de acción tóxica, relacionado con la producción de ROS intracelular, después de la exposición de la levadura a este azol. Para ello, se procedió a analizar los niveles intracelulares de ROS en los tres tipos celulares en estudio, mediante el análisis del paso por un citómetro de flujo de 10.000 células teñidas con dihidrofluoresceína (DHF). Los resultados de dicho ensayo se pueden visualizar en la figura 4.5.

Siguiendo el mismo protocolo establecido para los antifúngicos examinados en el capítulo I, se tuvo en cuenta tanto la referencia correspondiente a las células sin tratar (zona gris), como el control positivo de estrés oxidativo (H_2O_2) que se representa desplazado a la derecha (color fucsia). Como se aprecia en la Figura 4.5, ni en la cepa silvestre (SC5314), ni en los mutantes deficientes en la síntesis de trehalosa, tuvo lugar la oxidación de la DHF cuando los respectivos cultivos fueron expuestos al azol. Por tanto, apenas se registraron desplazamientos de las curvas control para las dos concentraciones utilizadas del antifúngico (Fig. 4.5). Sin embargo, el control de referencia tratado con peróxido de hidrogeno, sí mostró un deslizamiento de la DHF, indicativo de la presencia de grandes cantidades de ROS (Fig. 4.5), por lo que podemos concluir de forma preliminar que el Flz no debe contener como segundo mecanismo de acción fungicida la generación de un estrés oxidativo intracelular, al menos en lo que a formación de radicales libres se refiere.

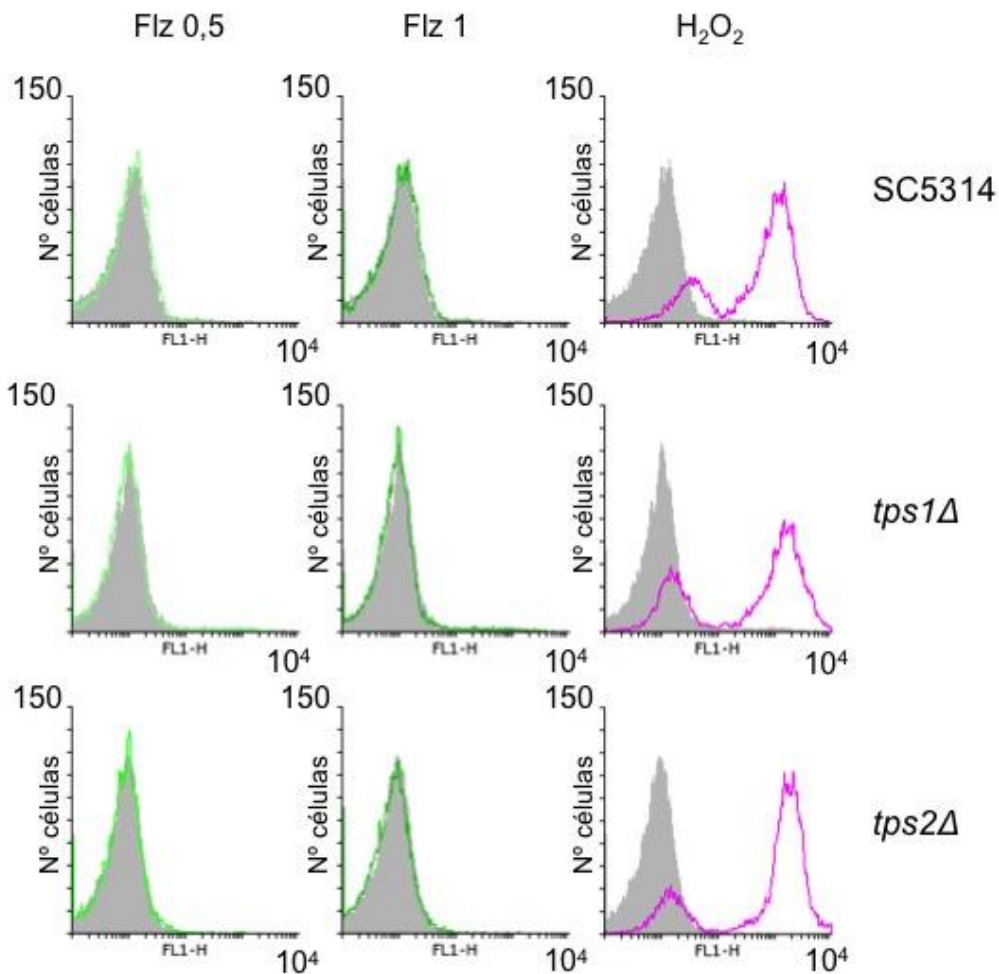


Figura 4.5. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) medida con DHF en cepas tratadas con dos concentraciones de Flz, 0,5 y 1 µg/ml en medio YPD. Tras la aplicación de las dosis del compuesto durante una hora a 37°C en medio YPD, e incluyendo como control positivo la presencia de H₂O₂ 100 mM sobre cada cepa (SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ*), se midió la oxidación de DHF por citometría de flujo.

Medición del potencial de membrana mitocondrial

Aunque los resultados arrojados por el ensayo con DHF indican que una producción significativa de ROS no está directamente involucrada en el efecto del Flz, quisimos verificar utilizando Rhodamina 123 (RhD) si el potencial de membrana mitocondrial se vio afectado por la aplicación de este compuesto. La presencia de variaciones en este podría sugerir una vía alternativa de acción del antifúngico, diferente a la síntesis endógena de ROS. También comprobamos que

hay una ligera disminución de las actividades de las actividades antioxidantes catalasa y SOD (ver más adelante).

En la Figura 4.6, se puede observar que, al igual que ocurre con los datos recogidos en la Figura 4.5, no tiene lugar ningún cambio relevante tras la aplicación de las dos concentraciones del antifúngico, en ninguna de las cepas estudiadas. Las líneas verdes indicadoras de la muestra tratada con Flz, apenas se desplazaron con respecto a la actividad basal de la mitocondria, en cada una de las levaduras sin tratar (zona gris). El único desplazamiento que pudo ser observado con nitidez fue el control positivo con H₂O₂, donde en los tres casos se registra claramente una alteración del potencial de la membrana mitocondrial de las células.

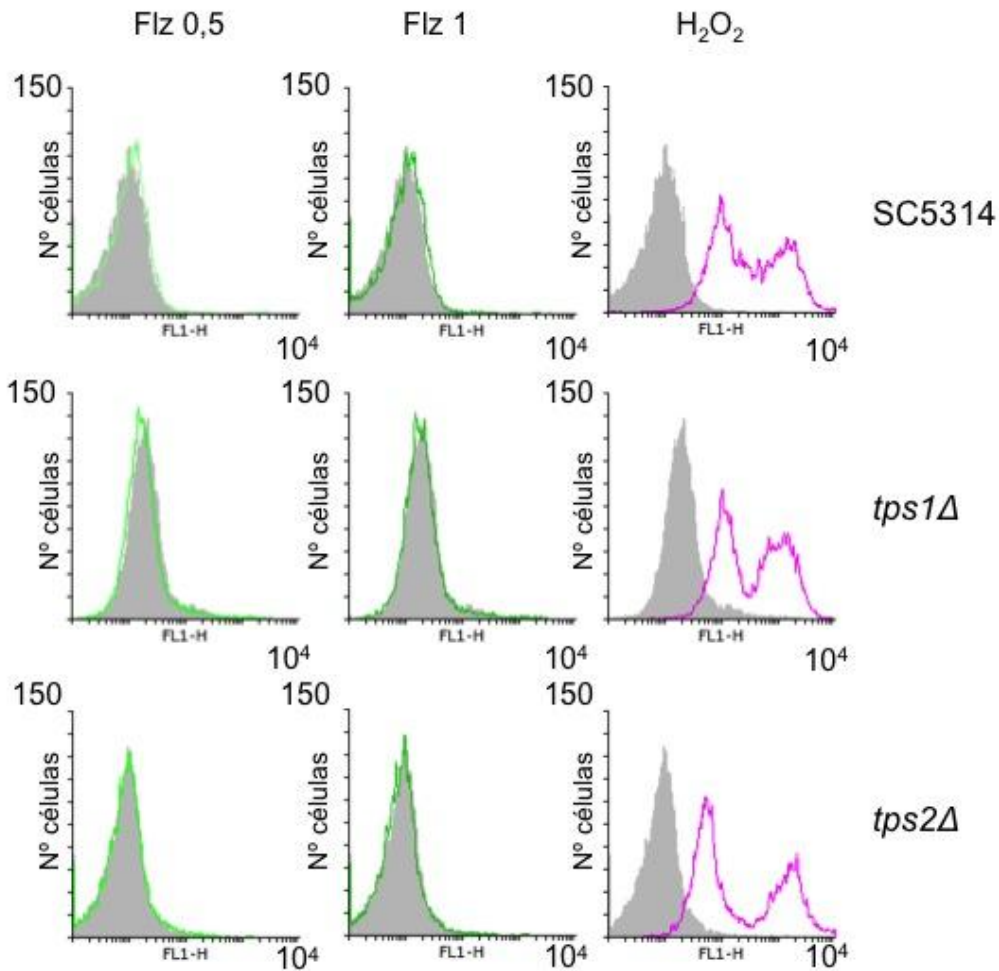


Figura 4.6. Efecto del tratamiento con Flz sobre el potencial de membrana mitocondrial de las células, medido con Rhodamina 123 en medio YPD. Se muestra el análisis por citometría de flujo de la cepa parental y los mutantes, tras la aplicación del tratamiento con Flz más un control positivo (peróxido de hidrogeno). El área gris corresponde al control negativo o muestra sin tratar.

Niveles de actividades antioxidantes en respuesta al Fluconazol

Polienos y equinocandinas tienen la capacidad de modificar la actividad de ciertas enzimas que *C. albicans* utiliza como sistema detoxificante y de protección frente a estrés ambiental (Catalasa y SOD), alterando su patrón normal de actividad (Figs. 3.7 y 3.8). Puesto que los azoles interfieren con las enzimas de la ruta de la síntesis del ergosterol, se decidió realizar estos mismos análisis con el Flz, con la finalidad de comprobar si este antifúngico también posee alguna

acción significativa sobre la actividad de estas enzimas que regulan el metabolismo oxidativo.

Catalasa (CAT)

Los resultados correspondientes al análisis de esta enzima están reflejados en la Figura 4.7. Con la concentración más baja del Flz (0,5 $\mu\text{g/ml}$), la actividad catalasa basal no se vio afectada en ninguna de las tres cepas empleadas. Este dato confirma que a esta concentración el Flz no induce la síntesis de ROS, tal y como se recoge en la Figura 4.5. Sin embargo, al añadir la concentración más alta del azol (1 $\mu\text{g/ml}$), sí se observó una ligera reducción de catalasa en las cepas: SC5314 y *tps1 Δ* (Fig. 4.7), que fue estadísticamente significativa en ambos casos. Este hecho podría ser indicativo de un cierto porcentaje de muerte celular provocado por la acción del antifúngico, tal y como parece desprenderse de los datos recogidos en las Figuras 4.2 y 4.3, tras el tratamiento durante una hora. En consecuencia, a estas dosis el efecto fungistático del Flz se combinaría con un cierto componente fungicida del mismo.

Por su parte, el mutante nulo *tps2 Δ* mostró una actividad catalasa estable, sin oscilaciones relevantes con respecto al control, incluso con un ligero incremento, que no fue significativo y entraría dentro del error experimental (Fig. 4.5). No obstante, dicho incremento para la concentración más alta del azol en este mutante, estaría en consonancia con los porcentajes de viabilidad (Fig. 4.3), donde las células *tps2 Δ* parecen resistir mejor la exposición a Flz que las células *tps1 Δ* . Aunque las evidencias experimentales aún son insuficientes, los datos sugieren que la supervivencia de *C. albicans* tras el tratamiento con Fluconazol sería más dependiente de la enzima catalasa y la presencia de una trehalosa sintasa funcional (*tps1p*); mientras que la ausencia de la enzima *tps2p* conferiría una mayor resistencia y de alguna forma lograría mantener la actividad de la

catalasa, lo que podría estar relacionado con la mejor supervivencia del mutante. En cualquier caso, esta hipótesis requiere un mayor apoyo experimental.

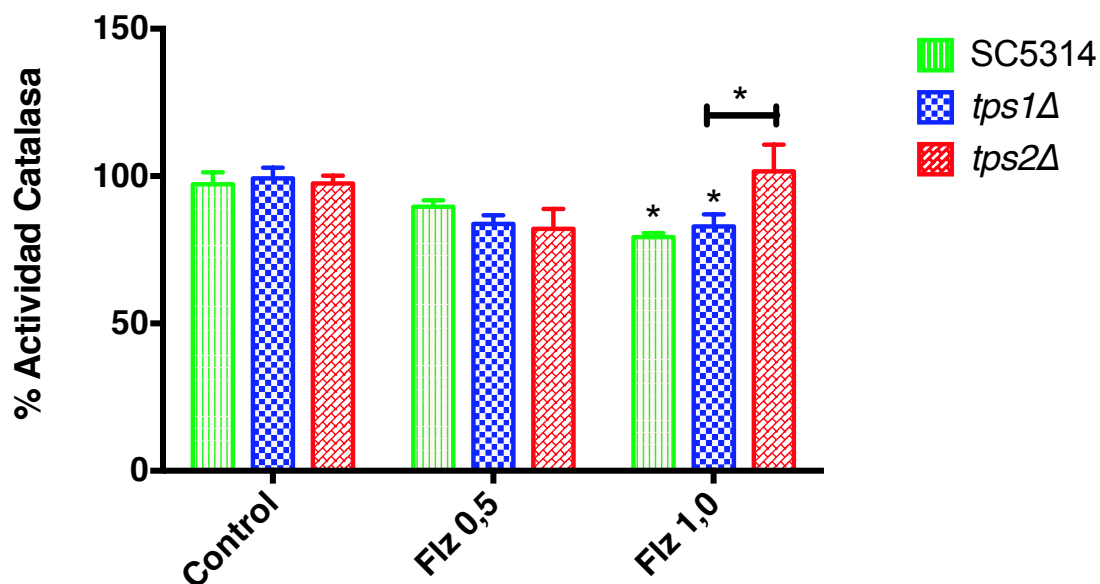


Figura 4.7. Efecto de Flz sobre la actividad catalasa de las cepas seleccionadas de *C. albicans*. A muestras idénticas de cultivos exponenciales, se les aplicó el tratamiento consistente en dos concentraciones del antifúngico a 1 hora y a 37°C. La actividad catalasa se midió como se indica en Métodos. Lo mostrado en la gráfica se corresponde al valor promedio más la desviación estándar que se obtuvo de los ensayos. $P < 0,05$ (*), según el test de U de Mann-Whitney.

Superóxido dismutasa (SOD)

El análisis de la enzima SOD está recogido en la Figura 4.8. Como se puede comprobar, esta actividad presentó ligeros incrementos para el caso de la cepa silvestre SC5314 que no fueron estadísticamente significativos, en función de la concentración del antifúngico. A primera vista, el mutante *tps1Δ* también pareció causar una débil activación de la SOD basal a la concentración más baja de Flz (0,5 $\mu\text{g/ml}$), que tampoco fue estadísticamente significativo. De hecho, cuando se aplicó la concentración más alta (1,0 $\mu\text{g/ml}$), se pudo observar unos niveles de actividad similares a los del ensayo control (Fig. 4.8). Por último, la cepa *tps2Δ*

manifestó un notable descenso de la actividad SOD basal, que fue prácticamente igual para el caso de las dos concentraciones de Flz utilizadas (Fig. 4.8).

Si bien las variaciones de esta actividad no parecen ser significativas en relación con los controles pertinentes, la comparación de los valores de SOD entre ambos mutantes, sí permite establecer cierta diferencia reseñable (Fig. 4.8). Ello vendría a indicar que los resultados obtenidos responderían a un efecto directo del tratamiento aplicado. En este sentido, la mínima alteración de la actividad enzimática SOD, podría ser debida a la casi nula generación de aniones superóxido (que son eliminados por dismutación). Sin embargo, no puede excluirse la influencia de otras rutas detoxificantes operativas en las células, en cuyo caso la actividad SOD se mantendría siempre baja.

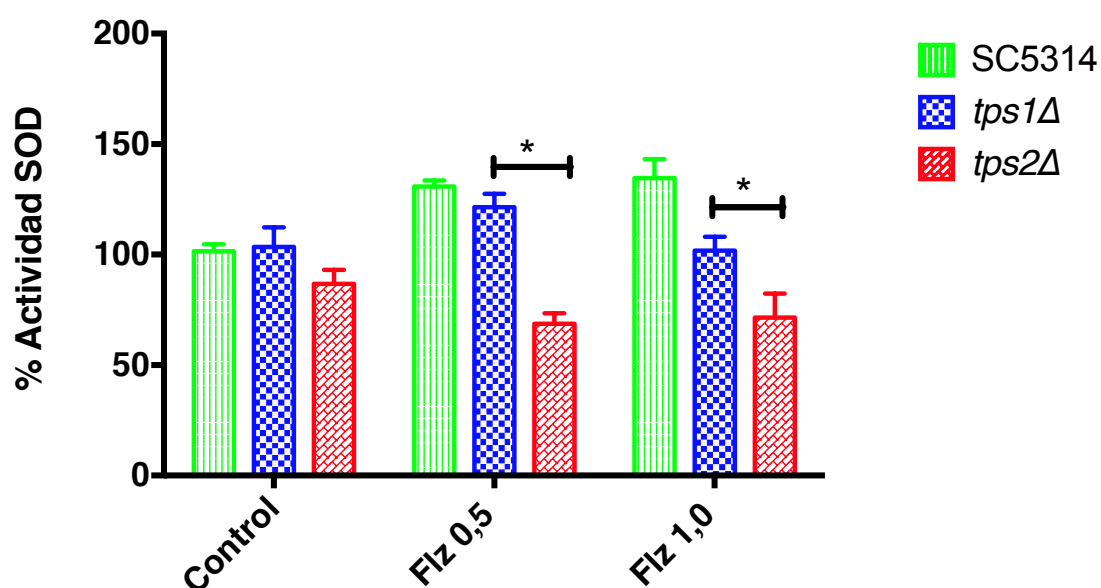


Figura 4.8. Efecto del Flz sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD). Cultivos de las cepas SC5314, *tps1*Δ y *tps2*Δ fueron crecidos hasta fase exponencial. Posteriormente, a alícuotas idénticas se les aplicó los tratamientos Fluconazol ($\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1h a 37°C. La actividad SOD fue determinada como se indica en Métodos. De modo que se muestra el valor promedio más la desviación estándar que se obtuvo de las réplicas. $P < 0,05$ (*), según el test de U de Mann-Whitney.

Efecto del Fluconazol sobre la morfología de *C. albicans*

Se procedió igualmente al análisis de la morfología de *C. albicans* tras el tratamiento con el antifúngico escogido, Fluconazol. De nuevo, se emplearon las tres cepas (SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ*) para ver si entre ellas había alguna alteración fisiológica tras la aplicación del tratamiento. El análisis siempre se hizo partiendo de cultivos es fase exponencial y empleando la técnica de microscopia de contraste interferencial de Nomarski.

El patrón de respuesta en los controles (sin tratamiento) fue similar al visualizado en los ensayos con AmB y MF (Capítulo I). Así, se pudo observar en los mutantes *tps1Δ* y *tps2Δ* la presencia de pseudohifas o grupos de células hijas asociadas a la célula madre sin separar (Imagen 4.2, flechas verdes). Además, se pudo observar la presencia de algunos pequeños agregados celulares en el caso del control correspondiente a la cepa *tps2Δ* (Imagen 4.2, flecha morada). Dichos agregados parecían aumentar de tamaño cuando se aplicó Fluconazol 1,0 µg /ml, siendo ésta la única diferencia relevante observada en distintos campos ópticos con el mutante *tps2Δ* tras la aplicación del tratamiento.

En la cepa silvestre, SC5314, la observación más reseñable tras la adición de Flz fue la aparición de unas escuetas agrupaciones conteniendo estructuras tipo hifa entretejidas (Imagen 4.2, flecha azul), mientras que la exposición a los otros antifúngicos en esta misma cepa tan sólo provocó la mínima formación de pseudohifas (Imagen 4.2, flecha verde), sin que fuera conspicua la formación de agregados interrelacionados (Imagen 4.2, flecha morada). Por su parte, la cepa *tps1Δ* no mostró ninguna variación morfológica reseñable entre el ensayo control y el tratamiento con Flz, aquí fotografiados (Imagen 4.2).

Al igual que ocurrió con la utilización de las concentraciones inferiores de AmB y MF, la concentración menor de Flz (0,5 $\mu\text{g/ml}$), no produjo diferencias morfológicas de interés, por lo que se ha decidido no mostrar las fotografías.

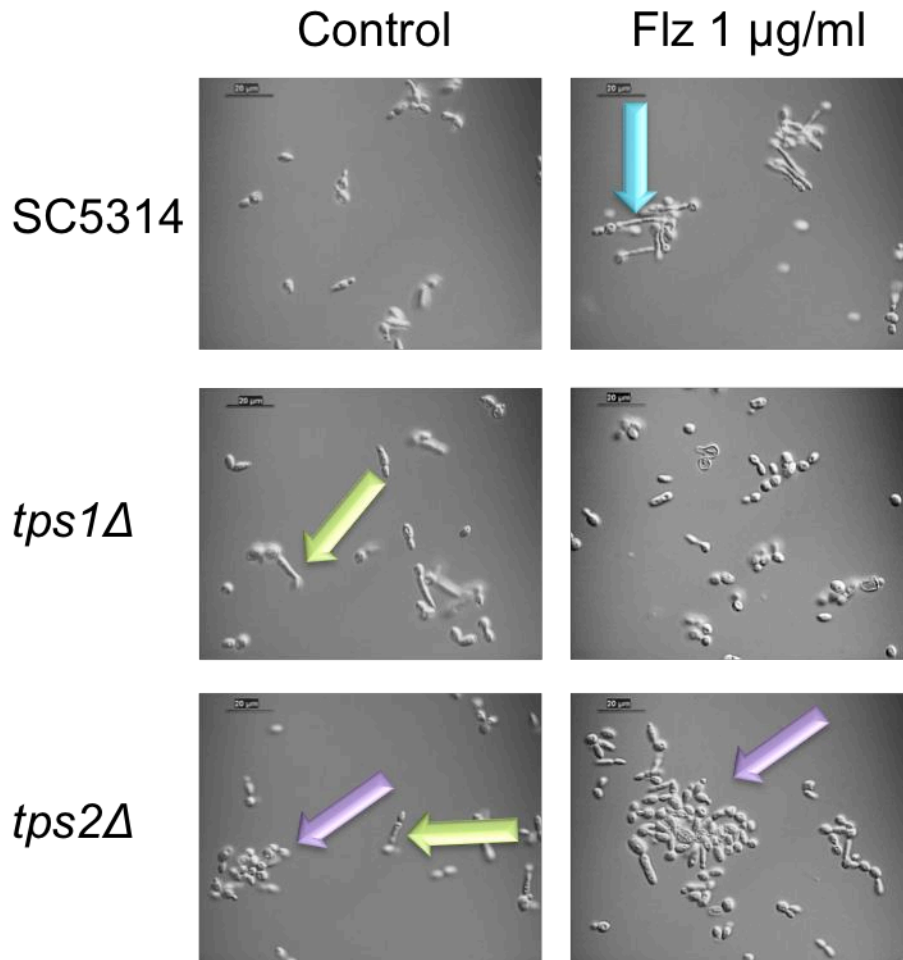


Imagen 4.2. Micrografías relativas al efecto del Flz sobre la morfología celular de *C. albicans*, obtenidas por observación microscópica mediante contraste interferencial de Nomarski. Las fotografías se tomaron después de una hora de tratamiento con Fluconazol a 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Flecha azul= hifa; flecha verde= pseudohifa ; y flecha morada= agregados celulares.

Efecto del Fluconazol sobre el contenido de trehalosa endógena

Por ser la trehalosa un factor de protección celular frente a estrés como se ha visto en apartados anteriores, se procedió al análisis del contenido interno del disacárido, para comprobar si el Flz era capaz de estimular su síntesis, lo que apuntaría a una respuesta defensiva frente al antifúngico. Los datos obtenidos de este ensayo se muestran en la Tabla 4.1. Como se puede observar, en la cepa silvestre (SC5314), que contiene los dos genes involucrados en la síntesis de trehalosa (*TPS1* y *TPS2*), no hubo prácticamente ninguna variación en cuanto al contenido interno de trehalosa tras la adición del azol, respecto a los niveles basales.

A su vez, el mutante *tps1Δ* mostró un ligero incremento en la síntesis endógena del disacárido con las dos concentraciones de Flz probadas (0,5 y 1,0 μg/ml). Aunque en apariencia este resultado parece seguir el patrón previamente verificado tanto en presencia de MF (0,05 μg/ml) como de AmB (0,1 μg/ml) (Tabla 3.2), los valores numéricos obtenidos no permiten establecer conclusiones definitivas, puesto que se encuentran dentro de los propios límites de detección del método y, de hecho, fue virtualmente indetectable en el ensayo control. Por su parte, los resultados registrados con el mutante nulo *tps2Δ* son igualmente consistentes con la presencia en *C. albicans* de fosfatasa inespecíficas, diferentes a la enzima Tps2p, capaces de defosforilar el intermediario trehalosa-6P a trehalosa libre (Tablas 3.2 y 4.1). En conclusión, este azol no parece provocar ningún efecto estimulante sobre la síntesis intracelular de trehalosa.

Tabla 4.1. Variación del contenido intracelular de trehalosa medidos en las cepas SC5314 y los mutantes *tps1Δ* y *tps2Δ* de *C. albicans*, después de la exposición con Flz. Se procesaron alícuotas idénticas a partir de cultivos crecidos en YPD y recogidos en fase exponencial. La medición de trehalosa se efectuó como se indica en Métodos.

Tratamiento	SC5314	<i>tps1Δ</i>	<i>tps2Δ</i>
Control	2,2± 0,8 (1,0)	1,2 ± 0,05 (1,0)	1,6 ± 0,04 (1,0)
Flz 0,5 µg/ml	2,4± 0,1 (1,1)	0,8 ± 0,2 (0,6)	0,9 ± 0,2 (0,5)
Flz 1,0 µg/ml	2,2± 0,2 (1,0)	2,6 ± 0 (2,1)	2,4 ± 0,9 (1,4)

Efecto del Fluconazol sobre la formación de biofilms

La importancia y repercusiones clínicas de la formación de biofilms ha quedado suficientemente explicada en el capítulo anterior. En consecuencia, y siguiendo el mismo protocolo diseñado para los antifúngicos anfotericina B y Micafungina, en éste epígrafe también se realizó el mismo ensayo, con el fin de comprobar los hipotéticos efectos potenciales del tratamiento con Fluconazol sobre la formación de biopelículas en las cepas estudiadas, utilizando como modelo ensayos *in vitro* con placas de poliestireno.

Los resultados sobre la presencia de Flz se recogen en la Figura 4.9. Comenzando por la concentración más baja aplicada de azol (0,5 µg/ml), tanto la cepa silvestre, SC5314, como el mutante *tps2Δ* no experimentaron ningún cambios significativos con respecto a los respectivos controles. Esto parece indicar que las células siguen permaneciendo plenamente viables después de 24 horas de aplicación del antifúngico. Este dato sería consistente con la naturaleza fungistática del Flz en *C. albicans*.

Por su parte, el mutante nulo *tps1Δ* manifestó un descenso notable en la formación de biofilms a la misma dosis de Flz, 0,5 µg/ml (Fig. 4.9). Aunque el descenso no sea estadísticamente significativo, se asemeja mucho a la disminución de los biofilms observada en la misma cepa tras la aplicación de Anfotericina B (Fig. 3.10). En conjunto, estos resultados parecen sugerir que en *C. albicans*, la carencia de la enzima Tps1p funcional, conferiría una mayor sensibilidad a la acción global de los antifúngicos en comparación con las otras dos cepas analizadas. De hecho, se puede comprobar cómo sí existe una diferencia muy relevante en el contenido de biofilms entre dicho mutante *tps1Δ* y las otras dos cepas, SC5314 y *tps2Δ* (Fig. 4.9).

Sin embargo, y a falta de otras evidencias, es preciso recordar, como ya se ha constatado previamente, que las células *tps1Δ* presentan un crecimiento más lento en medio YPD que los otros dos tipos celulares (SC5314 y *tps2Δ*) (Fig. 3.2). No obstante, sí es factible deducir, gracias a los controles con la propia levadura *tps1Δ*, como en ausencia de tratamiento la actividad mitocondrial es relativamente alta (Fig. 4.9). Por tanto, un crecimiento enlentecido no estaría afectando a las deshidrogenasas de las mitocondrias (medidas a través del XTT), y el efecto observado podría ser realmente la consecuencia de una mayor sensibilidad del mutante *tps1Δ* al azol.

A su vez, con la concentración de Fluconazol 1,0 µg/ml, la cepa SC5314 experimentó una ligera caída en la formación de biofilms, pero dicho descenso no es representativo frente al ensayo control (Fig. 4.9). Por su parte, el mutante *tps2Δ* no mostró ninguna variación de interés en presencia de Flz respecto a su control, a las dos concentraciones (0,5 y 1,0 µg/ml). Por tanto, se podría concluir de forma preliminar que la viabilidad de las células *tps2Δ* que conforman el biofilm no se ve comprometida por la exposición con este azol. De nuevo, fue el mutante *tps1Δ* el que volvió a comportarse como más susceptible al efecto del Flz (Fig. 4.9). El descenso en la formación de biofilms resultó similar al observado con la concentración inferior de Flz (0,5 µg/ml). Ello implica que un aumento

progresivo en la dosis de este antifúngico no ejerce una mayor presión sobre la capacidad de resistencia de la cepa (Fig. 4.9), ni tampoco sobre la capa de matriz polimérica extracelular que protege a las células del estrés ambiental exterior. En consecuencia, combinando los resultados sobre la formación de biofilms obtenidos anteriormente con AmB y MF (Fig. 3.10) y en este capítulo con Flz (Fig. 4.9), es factible proponer que la actividad trehalosa sintasa tendría una función predominante en la formación de biopelículas en *C. albicans*, correspondiendo a la enzima trehalosa fosfatasa un papel más secundario.

Finalmente, recapitulando los resultados del Flz sobre la generación de biofilms, éstos confirman el efecto tóxico causado sobre la viabilidad de las células planctónicas de vida libre, previamente presentado en las Figuras 4.2 y 4.3, consistente en una ligera acción fungicida sobre el mutante *tps1Δ*, pero no así sobre las cepas parental y *tps2Δ*. Todas estas consideraciones relativas a la exposición con el Fluconazol, objeto de estudio en este capítulo, se ponen de manifiesto también mediante inspección ocular de la distinta coloración obtenida al revelar la placa de poliestireno (Imagen 4.3).

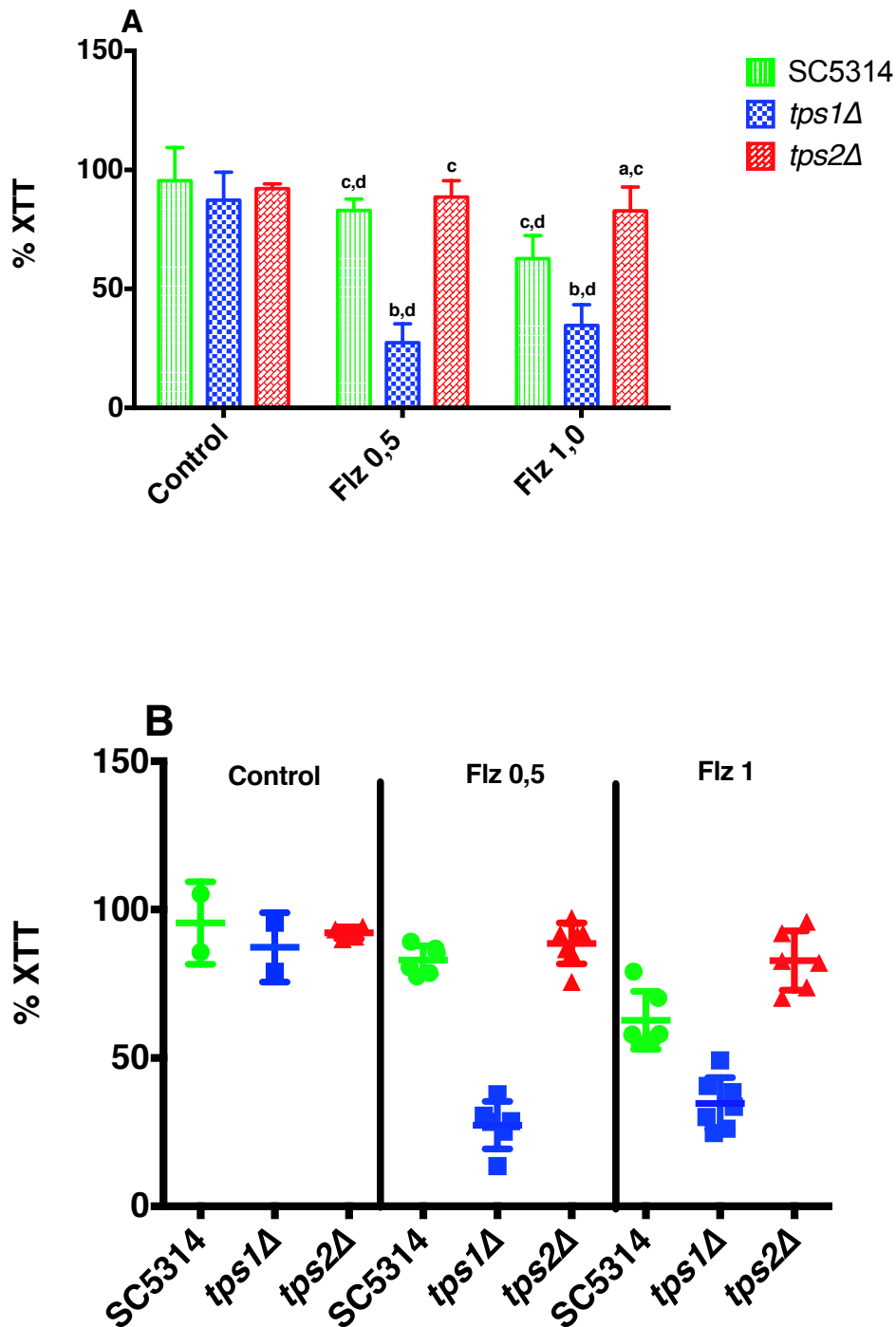


Figura 4.9. Efecto del Fluconazol sobre la formación de biofilms. Para su mejor comprensión, los resultados se representan de dos formas: (A) Gráfica de barras; (B) Diagrama de dispersión. Las cepas SC5314, *tps1*Δ y *tps2*Δ fueron mantenidas durante 24h para permitir la formación de los biofilms en placas de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente, fueron aplicados los tratamientos con Flz 0,5 y 1 μg/ml, durante 24h a 37°C. El revelado se realizó con sal de XTT. Los valores muestran la media ± D.E. de las medidas independientes. Siendo, según el test de U de Mann-Whitney, a = P<0,01 con respecto al control sin tratar; b = P<0,01 con respecto a cepa SC5314 con el mismo tratamiento; c = P<0,01 con respecto a *tps1*Δ con el mismo tratamiento; d = P<0,01 con respecto a *tps2*Δ con el mismo tratamiento.

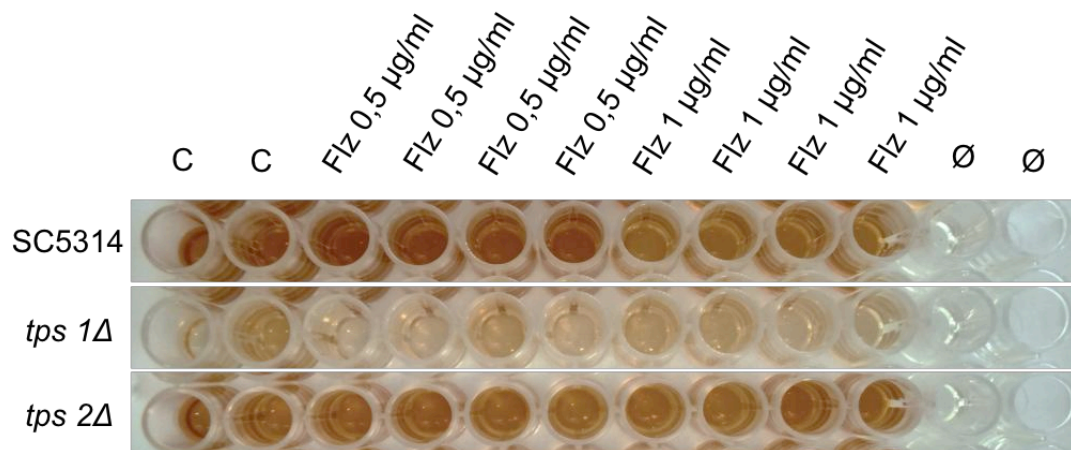


Imagen 4.3. Fotografía realizada en la placa de formación de biofilms para las cepas SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ* sometidas a tratamiento con Flz y ulterior revelado con XTT. El ensayo de biofilms corresponde con los datos recogidos en la Figura 4.9. La letra C significa control y se refiere a los biofilm que no recibieron tratamiento; y el símbolo Ø significa control de esterilidad, es decir, el medio sin ninguna levadura.

CAPÍTULO III

Estudios complementarios: perfil lipídico, análisis del efecto paradójico y posible acción sinérgica sobre la formación de biofilms en *Candida albicans*

Tanto la cepa parental de referencia (SC5314) y los mutantes isogénicos (*tps1Δ* y *tps2Δ*) son ampliamente utilizados en diferentes estudios fisiológicos y genéticos (78–80,101). Asimismo, también se ha visto que en la interacción de *Candida albicans* con algunos antifúngicos, el ergosterol juega un papel primordial, y varios estudios han investigado la posible relación funcional que tienen los fosfolípidos de membrana con el ergosterol, no sólo como componente estructural y de regulación de la osmosis interna de las células, sino también en la señalización y respuesta protectora frente al conjunto de estrés nutritivo y ambiental a los que puede ser expuestos (23).

Así pues, el examen detallado de los resultados experimentales presentados en los capítulos anteriores, planteaba distintas cuestiones, alguna de las cuales fueron abordadas mediante la realización de varios experimentos complementarios. Los ensayos llevados a cabo con Fluconazol sugieren un posible "efecto paradójico", que favorece un aumento del crecimiento levaduriforme a elevadas concentraciones de este azol (ver capítulo II); de modo similar a lo que sucede en tratamientos con caspofungina (111), sin que por el momento dispongamos de una explicación satisfactoria para este fenómeno, más allá de un presumible derivación compensatoria (111). Dado que los datos obtenidos proceden sólo de la cepa parental (Fig. 4.1), consideramos conveniente comprobar si su validez era extensible a otras cepas. Para ello, se ha repetido aquí el mismo ensayo empleando el mutante *tps2Δ* por ser isogénico

con SC5314, sin incluir en este caso el mutante homocigótico *tps1Δ*, que procede una construcción diferente (78,107).

Igualmente, nuestros resultados han mostrado cómo varios de los antifúngicos empleados hoy en día contra las candidiasis provocadas por distintas especies de *Candida* tienen un segundo modo de acción, que consiste en la generación de un estrés oxidativo interno a través de la producción de ROS intracelular, como el caso de la anfotericina B, cuyo efecto hemos confirmado en este trabajo (Capítulo I). Dicho estrés podría afectar a las estructuras físicas de la levadura (pared celular) (34). Puesto que las levaduras son organismos unicelulares, este estrés oxidativo, también podría afectar al sistema de defensa que presentan frente a los compuestos aplicados. Por tanto, los fenotipos observados no sólo serían indicativos de la mutación provocada en la ruta metabólica escogida (biosíntesis de trehalosa), sino también de alteraciones registradas en otras regiones celulares.

Esta información podría ser relevante para entender mejor el comportamiento observado después de la aplicación de los compuestos, ya sea mediante estudios individuales como comprobando su posible combinación sinérgica. Y no sólo en células planctónicas, sino también entre las formadoras de biofilms. Así, se ha descrito que durante la formación del biofilm, varía la expresión de genes implicados en la biosíntesis de los lípidos de membrana (23). En consecuencia, parece conveniente profundizar en el conocimiento de la composición lipídica de la membrana en estado basal y completar estos datos con estudios sobre el posible efecto sinérgico de antifúngicos y productos naturales de interés en la formación de biofilms.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió abordar un breve análisis en las cepas empleadas en este trabajo: SC5314 (silvestre), *tps1Δ* y *tps2Δ* que contemplara los siguientes aspectos:

- **Determinación del perfil lipídico de membrana**, a fin de poder verificar si la composición de lípidos de la membrana plasmática es igual o similar para todas las cepas; y si las hipotéticas diferencias pueden tener influencia en el comportamiento registrado de *C. albicans* cuando es sometida a exposición con los antifúngicos.
- **Análisis del efecto paradójico en el mutante nulo *tps2Δ***. Este propósito perseguía comprobar si la mejora del crecimiento en presencia de altas dosis de Fluconazol ocurría en otras cepas, aparte de la estirpe parental.
- **Medir la actividad combinada de varias formulaciones de antifúngicos y sustancias naturales sobre la formación de biofilms**, con el objetivo de buscar formulaciones alternativas con valor potencial como tratamientos con aplicación terapéutica.

Perfil lipídico de la cepa parental y los mutantes de *C. albicans*

El contenido en ácidos grasos de las levaduras fue determinado mediante la extracción de la fracción lipídica (Materiales y Métodos). Además de las cepas empleadas en este trabajo (SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ*), se incorporó también CAI-4, debido a que es, a la vez, el parental directo de *tps1Δ* y descendiente isogénico de SC5314 (Fig. 3.2).

El estudio se hizo de forma que pudieran medirse los perfiles individuales para cada familia de ácidos grasos, en base a la siguiente pauta:

- AGS: ácidos grasos saturados. Aquellos que no tienen dobles enlaces en la molécula.
- AGM: ácidos grasos monoinsaturados. Son los que tienen un solo doble enlace.
- AGP: ácidos grasos poliinsaturados. Tienen 2 o más dobles enlaces intercalados a lo largo de la cadena de carbono. Se caracterizan porque esta estructura dota de mayor fluidez a las membranas. Además en esta familia se encuentran algunos ácidos grasos que presentan una importante actividad biológica en células de vertebrados. Se distinguen entre:
 - Familia n-3 u omega3 (ω 3)
 - Familia n-6 u omega6 (ω 6)

Durante el ensayo inicial, la cantidad de la fracción lipídica (lípidos totales) que se pudo extraer de las levaduras fue demasiado pequeña (Tabla 5.1 y Fig. 5.1A), siendo necesario en algunos casos concentrar más las muestras para disponer de un contenido suficiente.

Dentro de cada familia de ácidos grasos, se pudo comprobar que de algunos de estos aparecían en una notable mayor proporción. Así, en el grupo de los AGS, los más abundantes son los ácidos **palmítico** (16:0) y **esteárico** (18:0) (Tabla 5.1). El ácido palmítico (16:0) fue el más abundante en todas las condiciones probadas. Al comparar las cepas, no parece que haya diferencias significativas entre el tipo silvestre (SC5314) y el derivado CAI-4 (Tabla 5.1). En cambio, la diferencia sí resultó más notable en el caso de los dos mutantes alterados en la biosíntesis de trehalosa (*tps1Δ* y *tps2Δ*). En ambos se produjo un descenso en la cantidad de ácido palmítico, siendo en células *tps2Δ* donde la reducción fue mayor (Tabla 5.1).

Por su parte el ácido esteárico (18:0) sigue la misma tendencia, siendo más abundante en células SC5314 y CAI-4, mientras disminuye su contenido en los mutantes *tps1Δ* y *tps2Δ*, volviendo a ser inferior en este último (Tabla 5.1). Del resto de AGS detectados, a pesar de estar en una muy baja proporción también permite observar algún avance sobre los cambios registrados entre las cepas. Por ejemplo, en el caso del ácido **mirístico** (14:0), cuyo contenido es similar en la cepa silvestre SC5314 y el mutante *tps1Δ*, pero menor en el *tps2Δ*, mientras se incrementa en la estirpe CAI-4 (Tabla 5.1). En cuanto al ácido **araquídico** (20:0), los datos indican que respecto a la cepa silvestre (SC5314), todas las demás mostraron un menor porcentaje de este ácido (Tabla 5.1). Por su parte, el ácido **behénico** (22:0), también mostró un menor porcentaje -en más de la mitad- de su nivel basal en los mutantes (*tps1Δ*, *tps2Δ* y CAI-4) en comparación con el tipo silvestre (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Contenido de AGS medidos en las cepas de *C. albicans* bajo estudio. El protocolo se describe en Métodos. Los datos se expresan en porcentaje (%). Resaltados en rojo los ácidos grasos que mostraron un mayor porcentaje (palmítico y esteárico).

	SC5314	<i>tps1Δ</i>	<i>tps2Δ</i>	CAI-4
14:0	0,27±0,06	0,30±0,02	0,21±0,05	0,49±0,01
15:0	0,29±0,02	0,25±0,02	0,16±0,00	0,24±0,03
16:0	26,9±2,94	21,27±0,84	18,16±0,46	24,49±0,48
18:0	13,9±3,91	9,21±0,63	7,49±0,02	12,82±1,06
20:0	0,64±0,09	0,31±0,00	0,32±0,00	0,33±0,03
22:0	1,08±0,02	0,38±0,03	0,41±0,01	0,30±0,04
Total AGS	43,1±6,89	37,72±1,54	26,75±0,54	38,68±1,65

Entre los ácidos grasos monoinsaturados (AGM), destacan en abundancia el ácido **palmitoleico** (16:1n-7) y el ácido **oleico** (18:1n-9) (Tabla 5.2). Respecto a al contenido de ácido oleico en las levaduras, únicamente fue el mutante *tps2Δ* quien presentó un mayor porcentaje, mientras que las otras cepas mostraron aproximadamente la misma cantidad de esta molécula. El ácido palmitoleico (16:1n-7), por su parte, parece presenta una concentración mayor en los tres mutantes analizados en comparación con el tipo parental (Tabla 5.2).

En el resto de AGM, el nivel de detección fue muy bajo, como ocurrió con el grupo anterior de ácidos grasos analizados. No obstante, también en este caso se encontraron algunas diferencias como la representada por el ácido **miristoleico** (14:1n-5), con una concentración en torno al 1% en células SC5314, mientras que en el resto de tipos celulares donde se detectó éste ácido graso, su proporción descendió hasta 0,13%. (Tabla 5.2). A su vez, el ácido **vaccénico** (18:1n-7) se mantuvo estable en todas las cepas excepto en *tps2Δ*, donde mostró un contenido mayor, hasta el 1%. El ácido **eicosenóico** (20:1n-9) parece guardar una relación de proporcionalidad entre el tipo silvestre y *tps2Δ*, mientras que en las estirpes CAI-4 y la cepa *tps1Δ* se encontró una menor proporción (Tabla 5.2). En cuanto a los dos últimos ácidos grasos, erúcico (22:1n-9) y nervónico (24:1n-9), el nivel detectado es muy bajo y se halla en los límites de resolución del método.

Tabla 5.2. Contenidos de AGM detectados. Los datos se expresan en porcentaje (%). En aquellos casos donde se muestra un valor nulo (0,00), no significa la ausencia de ese tipo de ácido graso, sino que los límites del método no permiten su detección. Resaltados en azul los AGM en mayor proporción (palmitoleico y oleico).

	SC5314	<i>tps1Δ</i>	<i>tps2Δ</i>	CAI-4
14:1n-5	1,02±0,27	0,13±0,13	0,00±0,00	0,13±0,13
16:1n-7	4,75±0,62	6,24±0,15	8,95±0,63	7,79±0,19
18:1n-9	22,68±2,77	21,44±0,52	30,61±1,16	21,16±0,23
18:1n-7	0,70±0,09	0,69±0,02	1,11±0,02	0,67±0,05
20:1n-9	0,23±0,0	0,13±0,02	0,21±0,02	0,15±0,01
22:1n-9	0,22±0,00	0,17±0,02	0,19±0,02	0,19±0,03
24:1n-9	0,00±0,00	0,74±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
Total AGM	29,60±3,2	29,54±0,57	30,09±0,17	30,09±0,17

Por último, al medir la familia de los ácidos grasos poliinsaturados (AGP), los valores encontrados en mayor cantidad corresponden al ácido **α -linolenico** (ALA) (18:3n-3) (Tabla 5.4) y al **ácido linoleico** (LA)(18:2n-6) (Tabla 5.3). En todos los cultivos celulares analizados, el ácido linoleico fue claramente el más abundante con una enorme diferencia sobre el resto, si bien mostró variaciones de unos tipos celulares a otros (Tabla 5.3). La concentración de LA presente en la cepa SC5314 fue elevada, si bien inferior al resto de las cepas, seguida de los mutantes *tps2Δ* y CAI-4 que manifestaron un mayor porcentaje. En cambio, la mayor concentración de éste ácido graso corresponde a la cepa *tps1Δ* (Tabla 5.3). Por el momento, desconocemos si esta distinta proporción de LA observada está o no involucrada en la susceptibilidad diferencial a los antifúngicos mostrada por las respectivas cepas (Capítulos I y II).

Se detectaron otros ácidos grasos, como el ácido **γ -linolenico** (18:3n-6), que a pesar de su baja presencia, mantiene una concentración estable en SC5314 y *tps1Δ*, con un menor porcentaje que en las otras dos cepas (Tabla 5.3). Otro componente del grupo es el ácido **araquidónico** (20:4n-6), que sólo se detectó de forma conspicua pero con bajo contenido en la cepa SC5314, mientras que fue indetectable en el resto (Tabla 5.3). En estos casos tampoco podemos establecer una relación directa entre la variación de AGP con el tipo de mutación homocigótica introducida. El resto de componentes lipídicos AGP fue virtualmente inmedible con la técnica seguida en este estudio, sugiriendo en todo caso, que su contenido debe ser extraordinariamente reducido (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Familia de lípidos n-6 AGP medidos en las cepas de *C. albicans*. Los datos se expresan en porcentaje (%). En aquellos casos donde se muestra un valor nulo (0,00), no significa la ausencia de ese tipo de ácido graso, sino que los límites del método no permiten su detección. Resaltado en naranja el más abundante, el ácido linoleico.

	SC5314	<i>tps1Δ</i>	<i>tps2Δ</i>	CAI-4
18:2n-6	19,74±2,96	31,38±0,93	23,38±0,01	25,92±1,51
18:3n-6	0,21±0,03	0,19±0,01	0,10±0,10	0,06±0,06
20:4n-6	0,22±0,01	0,03±0,03	0,00±0,00	0,06±0,00
Total n-6 AGP	20,17±2,97	31,64±0,87	23,48±0,09	26,05±1,58

Tabla 5.4. Fracción de lípidos correspondiente a la familia n-3 AGP. Los datos se expresan en porcentaje (%). En aquellos casos donde se muestra un valor nulo (0,00), no significa la ausencia de ese tipo de ácido graso, sino que los límites del método no permiten su detección. Resaltado en rosa el más abundante, el ácido α -linolénico.

	SC5314	<i>tps1</i>Δ	<i>tps2</i>Δ	CAI-4
18:3n-3	7,03\pm0,71	6,88\pm0,10	8,52\pm0,12	5,06\pm0,29
20:3n-3	0,00 \pm 0,00	0,17 \pm 0,04	0,18 \pm 0,02	0,07 \pm 0,00
20:5n-3	0,00 \pm 0,00	0,05 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	0,03 \pm 0,03
Total n-3 AGP	7,03 \pm 0,71	7,10 \pm 0,09	8,69 \pm 0,10	5,18 \pm 0,25

Por otra parte, la relación entre los ácidos grasos AGP n-3/n-6 es importante para las células eucariotas ya que afecta a las moléculas que se vayan a sintetizar a partir de los ácidos grasos, debiendo de mantenerse dentro de un orden que favorezca el que haya un nivel más alto de la fracción n-3. Estas relaciones son importantes para conservar en equilibrio la fluidez y permeabilidad de las membranas (112). Dado que *Candida sp.* tiene un modelo de organización celular tipo eucariota y que, además, estas levaduras son patógenos oportunistas del ser humano, quisimos averiguar cuál era esta relación de ácidos grasos y su posible importancia en los distintos tipos celulares de *C. albicans* estudiados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.5, se observa como en la relación n-3/n-6 está más favorecida la familia n-6 que la n-3, por lo que la cantidad relativa de estos n-3 en las células de la levadura no tendría tanta importancia como la que desempeña en células humanas (112).

Tabla 5.5. Relación de los ácidos grasos AGP n-3 y n-6. Se adjunta también la cantidad total del extracto lipídico obtenido a partir de extractos procedentes de las cepas SC5314, *tps1Δ*, *tps2Δ* y CAI-4. (-) indica que no pudo efectuarse el ensayo.

	SC5314	<i>tps1Δ</i>	<i>tps2Δ</i>	CAI-4
n-3/n-6	0,35±0,02	0,22±0,00	0,37±0,01	0,2±0,00
Lípidos totales	1,02±0,16	0,59±0,15	0,43±0,20	-

Con el fin de facilitar una mejor comprensión del trabajo experimental realizado en la medición de los extractos lipídicos, una presentación global de los resultados se recoge en la Figura 5.1.

Conviene tener en cuenta que la peroxidación de lípidos es una consecuencia de la generación de ROS y el subsiguiente estrés oxidativo, un fenómeno importante que deviene en las cepas estudiadas, procedentes de un hongo patógeno oportunista que debe enfrentarse a la respuesta fagocitaria innata del sistema inmune (explosión respiratoria y generación de ROS). Del mismo modo, ciertos antifúngicos como la Anfotericina B inducen una elevada síntesis de ROS intracelular (capítulo I). Sin embargo, una relación entre los contenidos relativos y clases de ácidos grasos con la sensibilidad antifúngica manifestada por los distintos tipos celulares, no resulta evidente. Así, los dos mutantes deficientes en trehalosa presentan menos lípidos en su contenido total respecto a la cepa parental (Fig. 5.1A), mientras las células *tps1Δ*, que mostraron una elevada sensibilidad a AmB (Figs. 3.1 y 3.2), presentaron un mayor contenido de AGP n-6 total y una relación más elevada que el resto (Fig. 5.1B y 5.1D). Por su parte, el mutante *tps2Δ*, cuya viabilidad resulta seriamente comprometida en presencia de MF (Figs. 3.1 y 3.2), tiene un nivel ligeramente superior de AGM y n-3 AGP totales (Fig. 5.1C y 5.1F), siendo inferior el de AGS (Fig. 5.1E). Si existe una interrelación biunívoca entre ambos procesos, no puede ser concluido con las evidencias actualmente disponibles.

En otro orden de cosas, al analizar la escasa cantidad de extracto graso que pudo obtenerse de las células (Fig. 5.1 y Tabla 5.4, lípidos totales) y comprobar como en dicho extracto la concentración de ácidos grasos perteneciente al grupo de los poliinsaturados fue baja (Tabla 5.3 y Tabla 5.4), se podría inferir que la casi ausencia de esta fracción lipídica supone una ventaja para garantizar la viabilidad celular, ya que no sufrirían el proceso de peroxidación, o al menos éste acontecería en un grado mínimo. Sin embargo, debemos indicar al respecto, que los intentos llevados a cabo en el laboratorio para medir peroxidación de lípidos en *C. albicans* utilizando la técnica del malondialdehído, no han dado resultados positivos.

En consecuencia, y como conclusión preliminar, aunque entendemos que el trabajo experimental es novedoso y abre interesantes expectativas, es preciso disponer de evidencias científicas más consistentes para apoyar una posible correlación entre el contenido y naturaleza de los lípidos de membrana y la susceptibilidad a los antifúngicos en *C. albicans*.

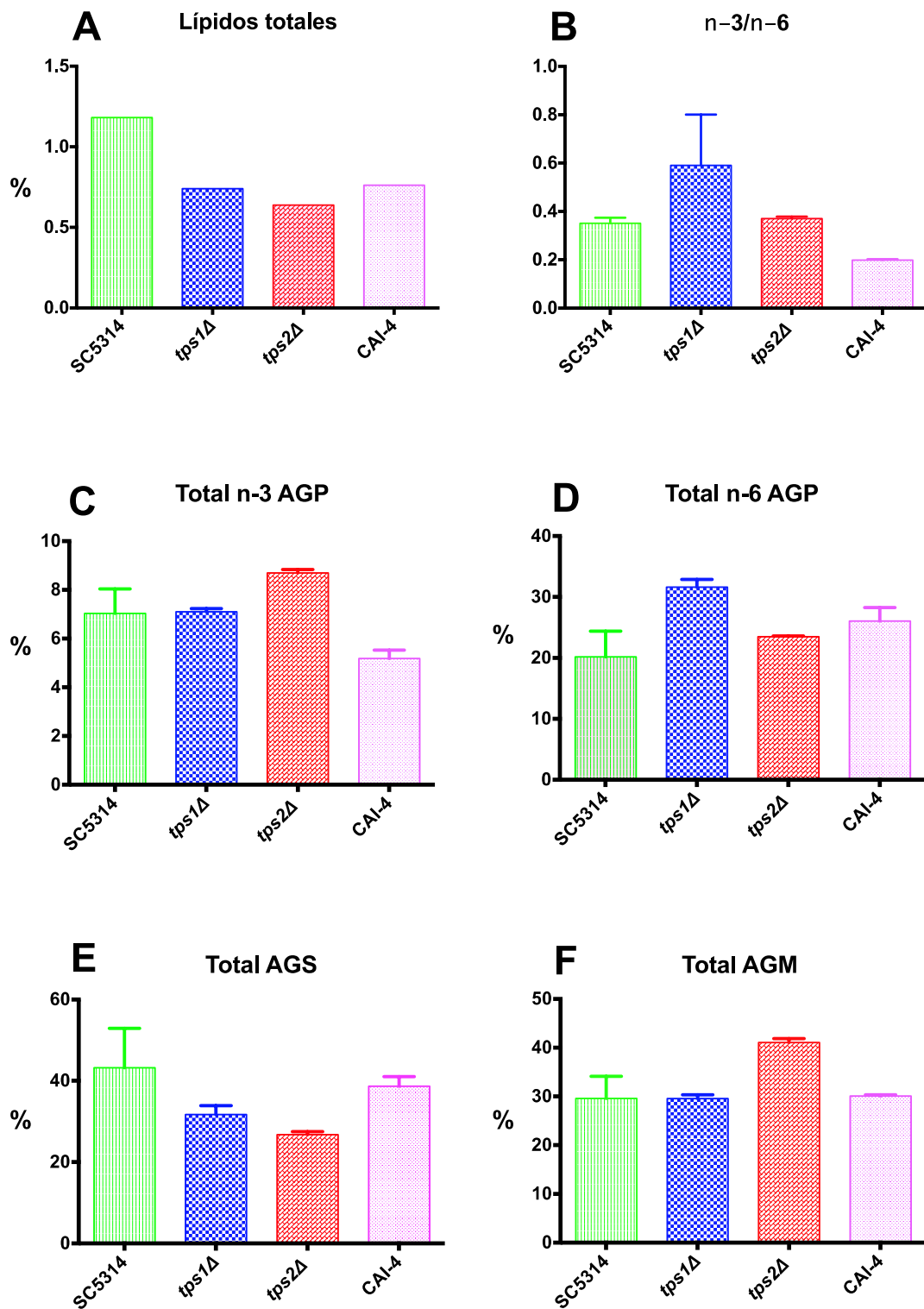


Figura 5.1. Perfil lipídico de las levaduras SC5314, *tps1Δ*, *tps2Δ* y CAI-4. Los valores corresponden a la media de los valores totales obtenidos y representados en porcentaje respecto de la cantidad total de las distintas familias de ácidos grasos. La determinación se realizó como se indica en Métodos. AGS= ácidos grasos saturados; AGM= ácidos grasos monoinsaturados; AGP= ácidos grasos poliinsaturados. Para más detalles, consultar las Tablas 5.2, 5.3 y 5.4.

Efecto del Fluconazol sobre el mutante *tps2Δ* de *C. albicans*

Durante el estudio del efecto fungicida del Fluconazol, fue necesario determinar las concentraciones de trabajo del Flz. Para ello, se sometió a la cepa silvestre SC5314 a un "cribado" empleando diferentes dosis y ensayando la viabilidad posterior (Figs. 4.1 y 4.2, capítulo II). El resultado proporcionó una visión inesperada de lo que parecía un efecto paradójico, por el cual, mejoraba la viabilidad de las células a partir de la concentración 5 µg/ml (Fig. 4.1). Con el fin de comprobar si era una propiedad exclusiva de esta cepa, se decidió realizar el mismo ensayo con el mutante isogénico deficiente en la actividad Tps2p, y verificar si el efecto se reproducía en él. No se ensayó el mutante *tps1Δ* por haber sido construido en un tipo parental genéticamente distinto.

Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 5.2. En principio, parece que el mutante *tps2Δ* no adquirió un "efecto paradójico" similar hasta alcanzar la concentración de 10 µg/ml de Flz, permaneciendo el porcentaje de supervivencia a 5,0 µg/ml y 8,0 µg/ml en valores que son estadísticamente comparables con los de 1,0 µg/ml, concentración escogida aquí por haber causado la disminución de viabilidad en la cepa silvestre SC5314 (Figs. 4.2 y 4.3). Los datos apuntan a la confirmación del efecto paradójico en *C. albicans* promovido por el Flz, aunque la concentración que lo induce sería diferente (Fig. 5.2). Igualmente, se podría concluir que la carencia de actividad Tps2p confiere sensibilidad fungicida al azol, ya que las concentraciones 5,0 y 8,0 ocasionaron un elevado grado de muerte celular (Fig. 5.2).

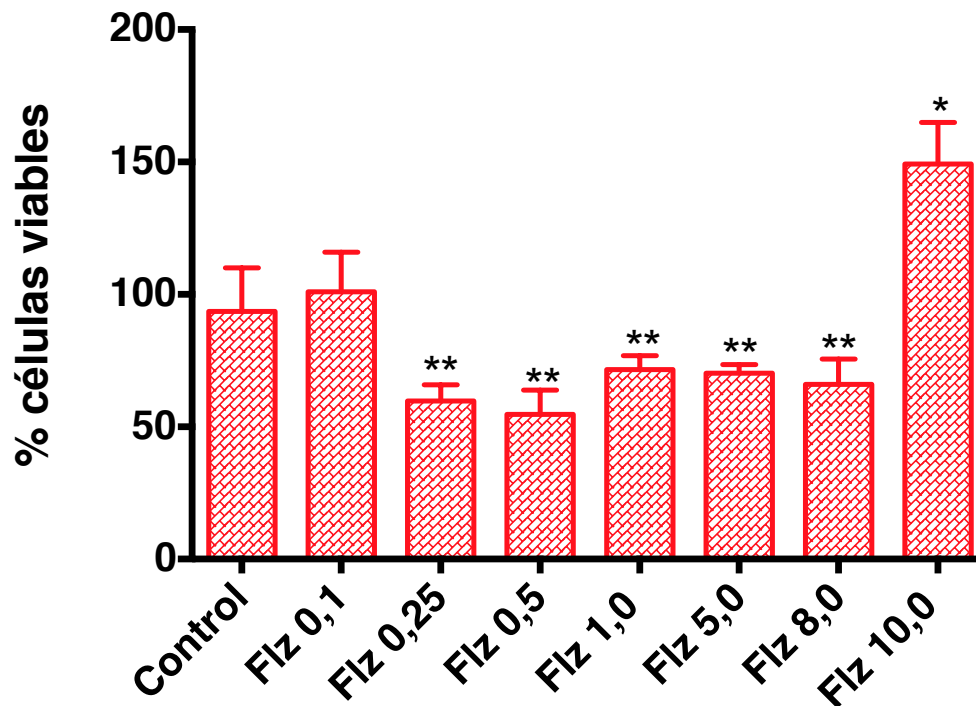


Figura 5.2. Ensayo del posible "efecto paradójico" del Fluconazol en *Candida albicans*. Se aplican varias concentraciones de Flz sobre el mutante *tps2Δ*. Los tratamientos se aplicaron durante 1h en medio YPD líquido a 37°C y con agitación. Se muestra el valor promedio más la desviación estándar que se obtuvo de las diferentes replicas y el tratamiento estadístico que se aplicó fue test de U de Mann-Whitney siendo las diferencias de las medias con respecto a los tratamientos significativas a $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**).

Para complementar los datos de viabilidad de este ensayo, se tomaron valores de turbidimetría durante 48 horas, con objeto de monitorizar la cinética de crecimiento microbiano a lo largo del tiempo en presencia del antifúngico. (Fig. 5.3). De la gráfica parece desprenderse que la estabilidad del Fluconazol decae al cabo de 8 horas y con la concentración más elevada de Flz (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), después la levadura es capaz de recuperar el crecimiento exponencial hasta que la limitación de algún nutriente le lleva a entrar en fase estacionaria (Fig. 5.3). Por tanto, estaría justificada la administración terapéutica de dosis sucesivas de Flz. Adicionalmente, este experimento no permite discernir si la acción del Flz es fungistática o fungicida.

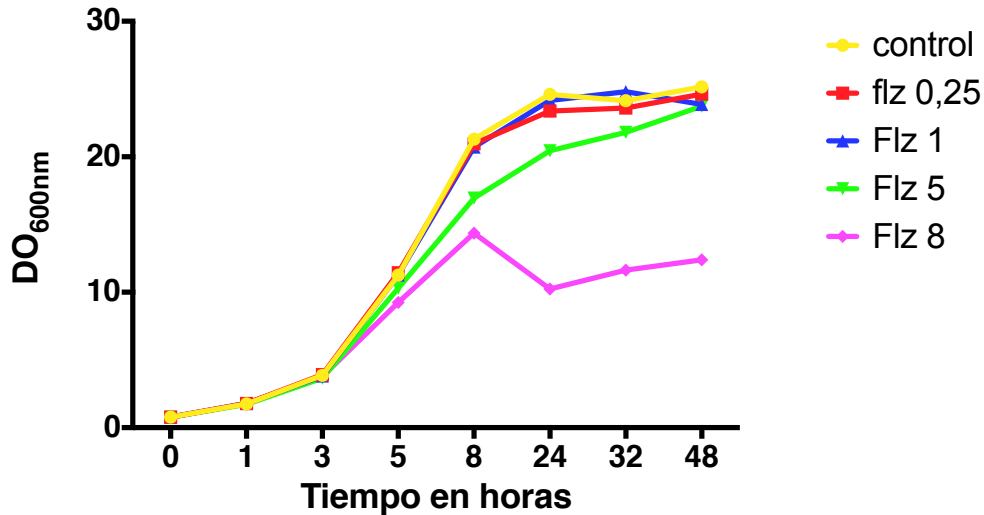


Figura 5.3. Cinética de crecimiento de la cepa *tps2Δ* de *C. albicans* con diferentes concentraciones de Fluconazol en medio YPD líquido, a 37°C con agitación orbital, durante 48 horas.

Efecto combinado del Fluconazol con otros antifúngicos sobre células planctónicas de *tps2Δ*

Dado que el Fluconazol por sí solo no arrojó resultados que fuesen altamente efectivos contra el crecimiento de *C. albicans*, se planteó hacer un experimento combinando este antifúngico con los otros para comprobar si, de modo conjunto y dado que tienen diferente modo de acción, podría ser potenciado el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura. Se decidió emplear el mutante *tps2Δ*, ya que de las cepas empleadas, es ésta la que tiene mayor grado de isogenicidad con la silvestre, salvo por la carencia del gen *TPS2*, sin presentar dificultades añadidas durante el ciclo de crecimiento. Se escogió una concentración media de Flz que afectaba la viabilidad, 5,0 µg/ml, siendo combinado con las concentraciones más bajas usadas en este estudio de los otros antifúngicos (MF 0,01 µg/ml y AmB 0,1 µg/ml) aplicados durante el mismo tiempo (1 hora). Se introdujeron controles correspondientes a las mismas concentraciones de los antifúngicos por separado.

De acuerdo con los resultados recogidos en la Figura 5.4, parece existir un efecto sinérgico evidente en una de las combinaciones de compuestos (MF+Flz), respecto a la acción fungicida de los antifúngicos individuales, siendo la validez de los datos estadísticamente significativa. Sin embargo, en el caso de la aplicación (Flz+AmB y MF+AmB), los porcentajes de muerte celular fueron claramente similares o incluso inferiores en comparación con los registrados con AmB y MF por sí solas; mientras que la adición conjunta de estos dos fármacos tampoco mejoró la eficacia fungicida (Fig. 5.4). Sorprende que la combinación de MF+Flz tenga el mismo efecto fungicida que la aplicación de AmB por si sola (Fig. 5.4). A su vez, los controles empleados (los antifúngicos por separado) ofrecieron un resultado similar al obtenido con los ensayos equivalentes de los capítulos I y II.

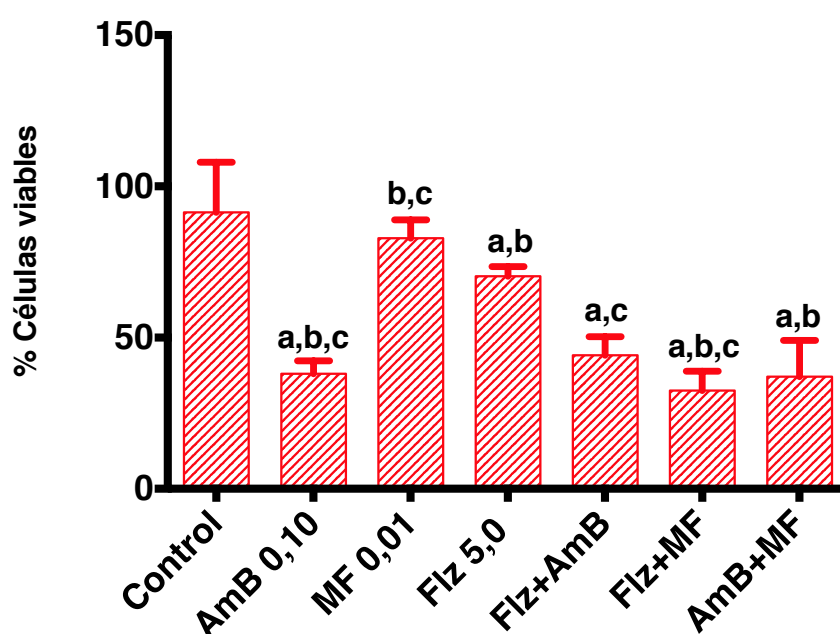


Figura 5.4. Efecto de las combinaciones de Flz con AmB y MF sobre la viabilidad de las células de *tps2Δ*. El cultivo fue crecido en YPD a 37°C hasta fase exponencial (D.O. \cong 0,8-1,0), posteriormente, alícuotas idénticas fueron sometidas durante una hora a los siguientes tratamientos: 5 μ g/ml de Flz en combinación con 0,01 μ g/ml de MF y 0,1 μ g/ml de AmB. El experimento se repitió dos veces y los resultados fueron consistentes. Se muestra el valor promedio más la desviación estándar obtenidos de los ensayos. La significación estadística se validó siguiendo el test de U de Mann-Whitney, siendo las diferencias de las medias con respecto a los tratamientos significativas a = P<0,05 con respecto al control sin tratar; b = P<0,05 con respecto al tratamiento con MF; c = P<0,05 con respecto al tratamiento con Flz.

Los resultados de viabilidad se cotejaron con medidas de turbidimetría, con el fin de comprobar si el hipotético efecto tóxico podría extenderse a lo largo del tiempo, ya que algunas evidencias previas parecen sugerir que el Flz puede incrementar su acción fungicida con más horas de aplicación (Fig. 5.3).

Se pudo apreciar que hubo un enlentecimiento en la absorbancia de las levaduras *tps2Δ* cuando los antifúngicos se aplican combinados [Fig 5.5.A (línea azul) y B (líneas naranja y negra)]. Dicho retraso parece más evidente a las 3 y 5 horas que en la primera hora de tratamiento. Sin embargo, transcurrido ese intervalo, dicho retardo en el crecimiento desapareció y las curvas de crecimiento se equipararon asintóticamente a las que presentaron los cultivos control. Ya a las 24h, no parece observarse ninguna variación con respecto a las muestras tratadas, probablemente por haber alcanzado la fase estacionaria (Fig. 5.5).

Con respecto al ensayo de sinergismo medido mediante viabilidad entre el Flz y la MF (Fig 5.4B), no se pudo visualizar ninguna disminución de crecimiento con el método turbidimétrico que avalara dicho efecto. Se trata de algo esperable, teniendo en cuenta que la turbidimetría no distingue entre células vivas y muertas. Por tanto, dado que una fracción de células resiste la aplicación terapéutica y logra crecer en el medio de cultivo, puede ir incrementando la turbidez al seguir dividiéndose junto con el resto de las células muertas que hay en el mismo, resultado del tratamiento.

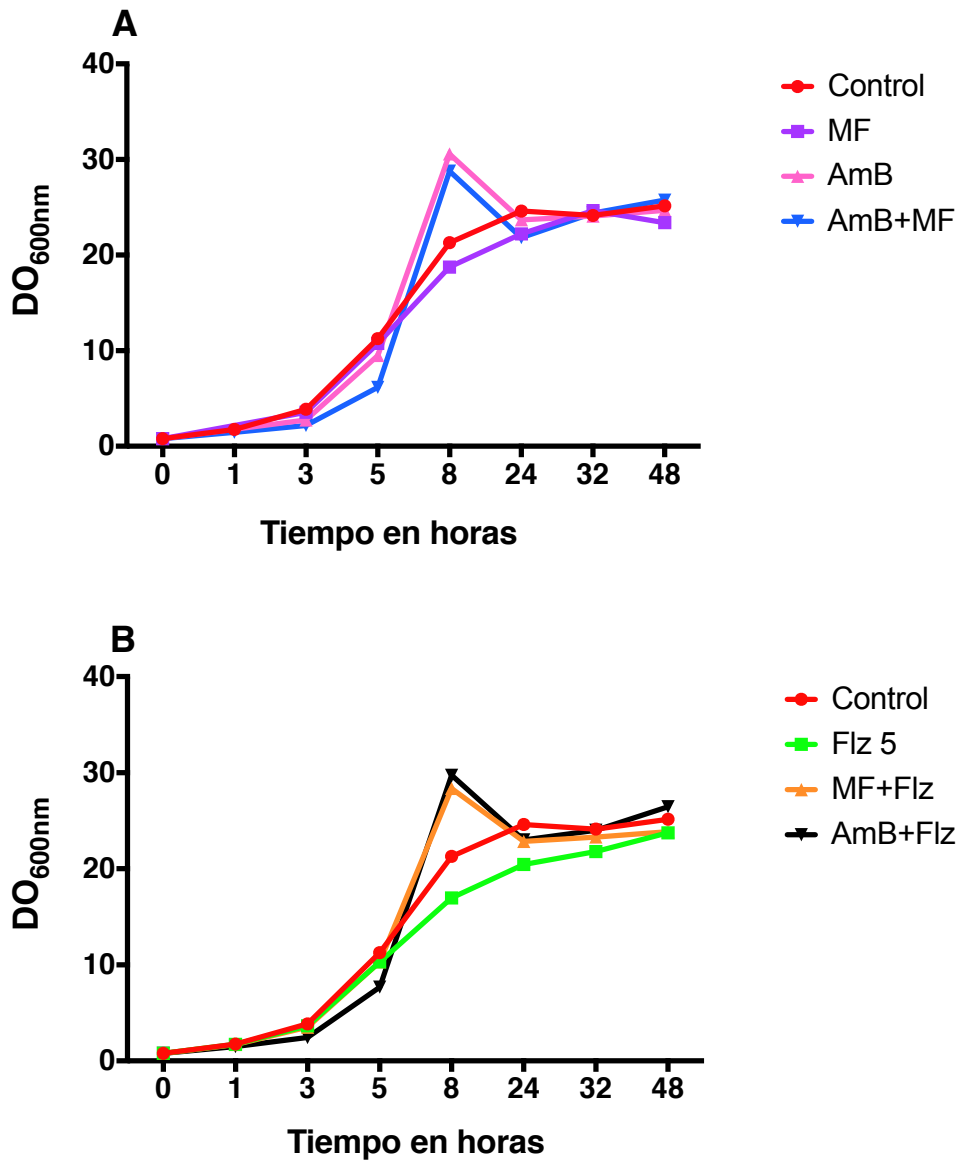


Figura 5.5. Curva de crecimiento (D.O._{600nm}) del mutante *tps2Δ* como resultado de las combinaciones sinérgicas. El Flz junto con la AmB y MF se añadió a cultivos de células planctónicas crecidas en YPD líquido a 37° C. Se efectuaron medidas por turbidimetría durante 48h. (A) Controles individuales de MF y AmB (0,01 y 0,1 µg/ml respectivamente) junto con la combinación de ambas; (B) Control de Flz (5 µg/ml) y combinaciones con los antifúngicos AmB y MF.

Actividad metabólica basal durante la formación de biofilms en *C. albicans*

Un biofilm o biopelícula es un ecosistema complejo de microorganismos y sus productos extracelulares adheridos sobre una superficie biótica o abiótica (113). Estas biopelículas presentan resistencia no solo frente a quimioterápicos, sino también a las especies reactivas del oxígeno producidas durante la explosión respiratoria fagocítica desencadenada en el transcurso de una infección (44). Como ha sido descrito en ensayos previos, la capacidad de formar biofilms se determinó midiendo la actividad metabólica basal que tienen las levaduras en superficies de poliestireno. A tal efecto, se dejó a las células formar un biofilm durante 24h sobre placas de 96 pocillos en medio RPMI 1640 y posteriormente, se midió su actividad mitocondrial con la sal de XTT.

Con el fin de verificar los resultados previos obtenidos en el mutante *tps1Δ*, se procedió a usar la cepa parental directa, CAI-4, como control (Capítulo I). Según se muestra en la Figura 5.6, el comportamiento de las células *tps1Δ* con respecto a las CAI-4 fue distinto durante el desarrollo de un biofilm. Como ocurre en el análisis de células planctónicas (Figura 3.3), la cepa silvestre SC5314 y su “descendiente” CAI-4 actuaron de forma muy similar, sin que hubiera diferencias estadísticamente relevantes en su actividad metabólica basal, a pesar del distinto patrón de crecimiento.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se pudo constatar que pese a las dificultades de crecimiento del mutante *tps1Δ* en medio RPMI, éste sí fue capaz de desarrollar un biofilm consistente, que poseía una actividad basal mitocondrial notablemente más baja respecto a *tps2Δ* y a la cepa silvestre (Fig. 5.6). Adicionalmente, las células sésiles del mutante *tps2Δ* exhibieron una actividad metabólica igual a la del tipo parental, a pesar de la falta del gen *TPS2* (Fig. 5.6).

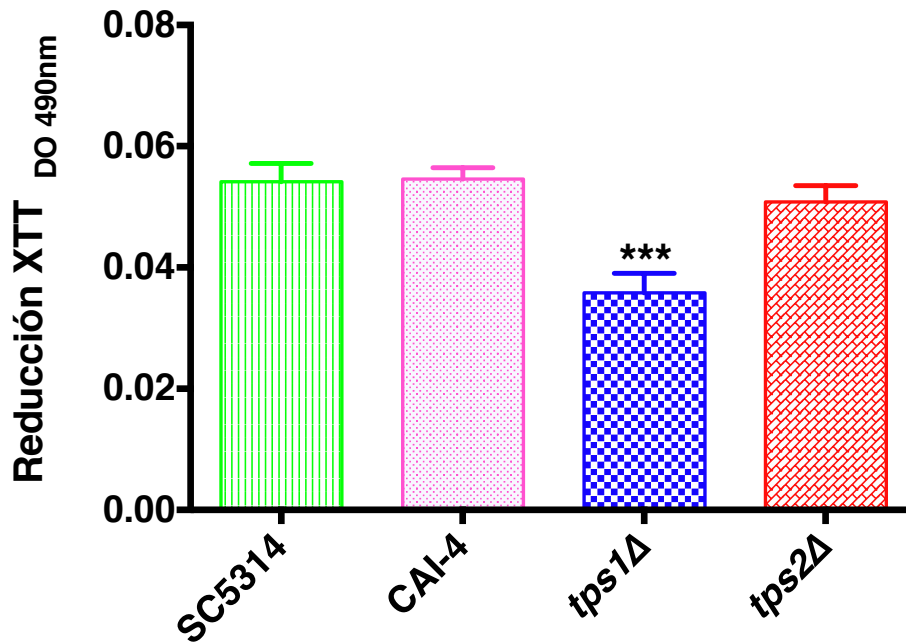


Figura 5.6. Actividad mitocondrial basal de las células formadoras de biopelículas en *C. albicans*. El protocolo experimental seguido está descrito en Métodos. Los resultados obtenidos se representan aquí como la media más la D.E. según el test de U de Mann-Whitney, siendo $P < 0,001$ (***) para *tps1Δ* con respecto a todos los demás.

Efecto de las combinaciones de antifúngicos y diferentes compuestos naturales sobre la formación de biopelículas en *C. albicans*.

Cuando las células de *C. albicans* se encuentran formando biofilms, su nivel de protección y resistencia es más elevado, mientras varía su comportamiento en referencia a las células planctónicas, ya que soportan mejor el estrés inducido por los antibióticos (114). Teniendo en cuenta que los antifúngicos empleados en este trabajo tienen diferentes mecanismos de acción sobre esta levadura patógena, se procedió a comprobar el posible efecto sinérgico de las diversas combinaciones propuestas sobre los biofilms, utilizando las concentraciones que se aplicaron a las células planctónicas.

Además de los antifúngicos de uso clínico, se amplió el estudio incluyendo otros dos compuestos, uno la menadiona y otro la pinocembrina, de origen natural,

descritos como inductores de efectos específicos sobre la formación de biopelículas en *C. albicans* (44,115). La menadiona o vitamina K es una vitamina liposoluble que interviene en el proceso de coagulación de la sangre y usada en clínica para tratar a los pacientes que presentan hipoprotrombiemia secundaria a alteraciones que limitan la absorción o síntesis de vitamina K. Además, la menadiona es un potente generador de radicales superóxido y participa en procesos de estrés oxidativo inducido (116). La pinocembrina es una flavona que se encuentra en productos como la miel y el propóleo y en plantas como *Turnera diffusa* y *Boesenbergia rotunda*. Desde la antigüedad se ha usado para curar heridas ya que como se está estudiando en la actualidad tiene actividad bactericida y fungicida (117).

El objetivo fue averiguar si una combinación de estas sustancias frente a la aplicación de manera individual, podría suponer una mejora en la capacidad fungicida de los antifúngicos empleados, en los procesos de formación de biofilms en *C. albicans*, de gran relevancia clínica. Los resultados obtenidos de estos ensayos se recogen en la Figura 5.7.

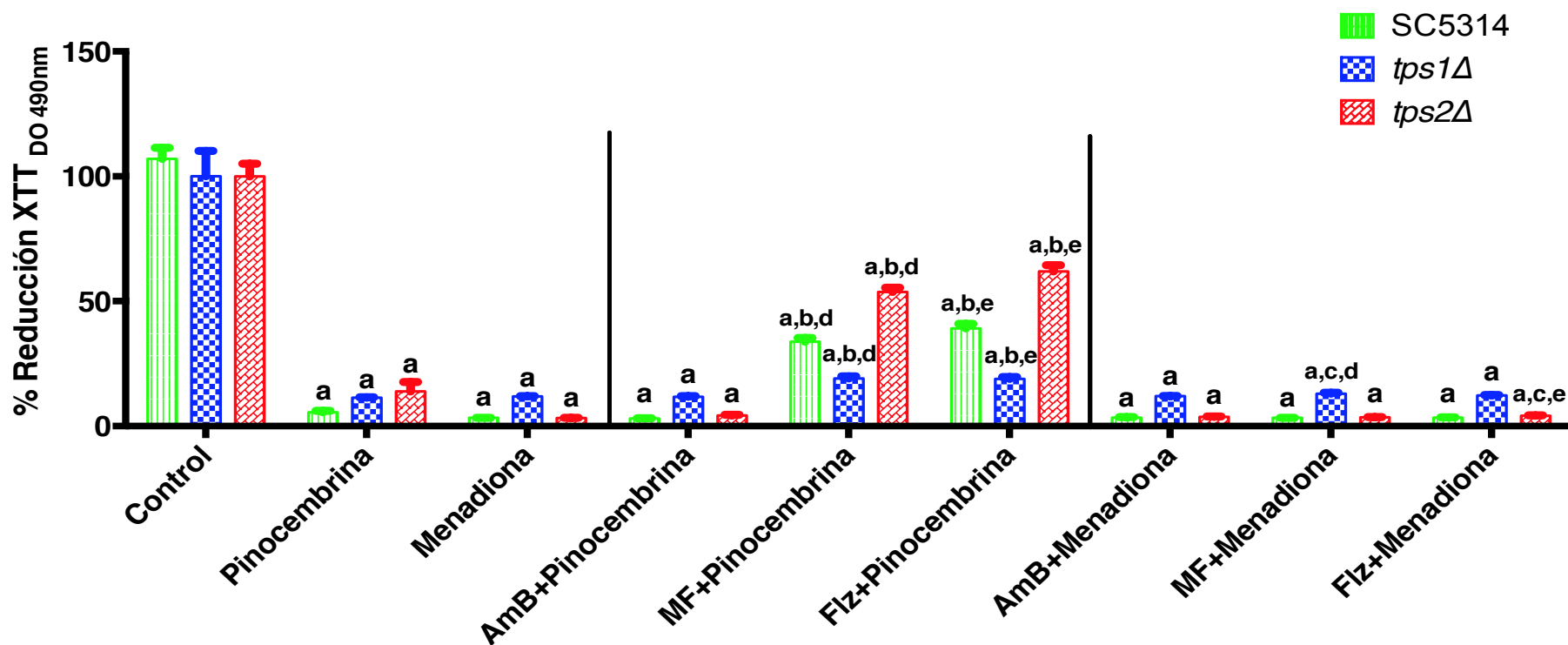


Figura 5.7. Medida de la actividad metabólica de las mitocondrias (absorbancia) correspondiente a la reducción del XTT (DO_{490nm}) proporcional a la formación del biofilms por las cepas SC5314, *tps1Δ* y *tps2Δ* crecidas en medio RPMI y posteriormente tratadas con diferentes compuestos naturales (pinocebrina 100µg/ml y menadiona 2,4 mM) y antifúngicos (AmB 0,25 µg/ml y MF 0,05 µg/ml y Flz 5 µg/m) en combinaciones de ellos. Se muestra el valor promedio más la desviación estándar obtenidos los ensayos. La significación estadística se validó siguiendo el test de Mann-Whitney, siendo las diferencias de las medias con respecto a los tratamientos significativas a= P<0,05 con respecto a los controles de las respectivas cepas sin tratar; b= P<0,05 con respecto al control de tratamiento con pinocebrina; c= P<0,05 con respecto al tratamiento control con menadiona; d= P<0,05 con respecto al tratamiento control con MF; e= P<0,05 con respecto al tratamiento control con Flz. Los controles con antifúngicos se han omitido al ser los resultados similares a los vistos en los capítulos I y II.

Como se pudo observar, los compuestos utilizados de manera individual (menadiona y pinocembrina), presentaron una reducción notable, por si solos, en el contenido total de biofilms para las tres cepas respecto al ensayo sin tratar (Fig. 5.7). Las combinaciones de MF+Pinocembrina y Flz+Pinocembrina destacaron por el incremento en la formación de biopelículas observado en todos los casos, siendo esta subida especialmente destacable en el mutante *tps2Δ* (Fig. 5.7). En comparación con los controles que incorporan cada antifúngico individual (datos no mostrados por ser similares a los obtenidos en los capítulos I y II), el comportamiento de las células sésiles también fue idéntico, disminuyendo su porcentaje de biofilms de forma significativa (Fig. 5.7).

Así pues, tomando como referencia los niveles de biofilms generados únicamente por pinocembrina, las anteriores combinaciones con antifúngicos, más que un efecto sinérgico parecen inducir una acción antagónica que se traduce en una mayor proporción de biopelículas estables en las placas (Fig. 5.7). Por su parte, en las formulaciones que incorporan menadiona, sólo se registran pequeñas variaciones con MF para el mutante *tps1Δ* y con Flz para el *tps2Δ* (Fig 5.7).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GENERAL

Las levaduras y los hongos microscópicos son organismos eucariotas y su baja toxicidad selectiva representa el principal inconveniente para el desarrollo de una quimioterapia antifúngica segura y eficaz. De hecho, la principal diana antibiótica en hongos es el ergosterol, que está presente en la membrana plasmática o, alternativamente, su ruta de biosíntesis (118). Este esterol es un análogo estructural de colesterol humano y pertenece a la misma familia de lípidos isoprenoides. Por tanto, la prescripción facultativa de polienos y azoles para combatir las micosis sistémicas tienen una eficacia limitada, ya que puede causar algunos efectos secundarios no deseados, principalmente daños hepáticos y renales (103,119). Además, se debe tener en cuenta el hecho de que la mayoría de los azoles poseen principalmente actividad fungistática. Por el contrario, la resistencia al antibiótico poliénico Anfotericina B ha resultado ser excepcionalmente rara, a pesar de su temprana introducción en la década de 1950 y su amplia utilización a nivel mundial (61). A su vez, la continua e imprescindible búsqueda de dianas alternativas, ha dado lugar a la introducción en clínica de las equinocandinas, el grupo más reciente de compuestos fungicidas con valor terapéutico.

En este contexto, la propuesta de estudiar la trehalosa como potencial diana para desarrollar nuevos quimioterápicos antifúngicos más seguros y eficaces resulta muy atractiva, ya que la síntesis de este disacárido no reductor está específicamente ausente en los vertebrados (80,120), mientras que la síntesis masiva de trehalosa endógena debe ser considerado como un mecanismo protector desarrollado por numerosos hongos patógenos durante la infección y colonización *in vivo* del hospedador (93,121). Sin embargo, esta propuesta necesita un apoyo experimental considerable antes de que sea aceptable (121-123).

Por este motivo, hemos analizado en *C. albicans* la susceptibilidad de los dos mutantes nulos deficientes en la biosíntesis de trehalosa frente a exposiciones con anfotericina B (AmB) y micafungina (MF), dos antifúngicos que se prescriben habitualmente en la práctica médica. De acuerdo con nuestros resultados, se detecta una respuesta diferente en función del mutante y antibiótico específicos considerados. Así, la falta de un gen *TPS1* funcional que codifica la trehalosa sintasa (células *tps1Δ*) causó una caída drástica de la supervivencia celular después del tratamiento con AmB, lo que confirma los resultados previos de otros fondos genéticos (104), mientras que estas células muestran una susceptibilidad insignificante a la presencia de MF (Figs. 3.1 y 3.4). El fenotipo opuesto se registró en un mutante nulo deficiente en trehalosa fosfatasa (*tps2Δ*), que fue refractario a la adición de AmB pero sufrió un grado significativo de destrucción celular en presencia de MF. Ya sea en medios líquidos o sólidos (Figs. 3.1 y 3.4). La discrepancia mostrada por los dos mutantes homocigotos podría explicarse, al menos en parte, en términos de alteraciones estructurales de la pared celular. Por lo tanto, la doble interrupción del gen *TPS1* provocó una cierta remodelación en la arquitectura de la pared celular (34,80). Sin embargo, en *C. albicans*, la integridad estructural de la pared celular no parece sufrir ninguna modificación sustancial después de la eliminación del gen *TPS2* (79). En particular, MF es un inhibidor no competitivo de la pared celular β -1,3-glucano sintasa y se ha demostrado que MF mejora la respuesta a *C. albicans* a través de la exposición a β -glucano (103), lo que apunta a una interacción directa entre la enzima Tps2p y el contenido de β -glucano estructural de la pared.

Respecto de los ensayos realizados con Fluconazol (Flz), los resultados no fueron en absoluto determinantes. Se registraron mínimas diferencias en los porcentajes de supervivencia celular entre las distintas cepas, tanto en medio líquido como sólido (Figs. 4.3 y 4.4), y aunque los datos apuntan a una mayor susceptibilidad del mutante deficiente en la actividad *tps1p*, a 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de Flz (Fig. 4.3), no permiten obtener conclusiones definitivas. Por otra parte, los experimentos sobre cinética de mortalidad realizados a distintos tiempos (Fig. 4.2), sugieren que el Flz en *C. albicans* podría tener una acción fungicida aparte

de fungistática, como tradicionalmente se ha sostenido. Dicha acción sólo sería visible a dosis y tiempos de tratamiento elevados (Fig. 4.2). Sin embargo, fue llamativo la manifestación de un aparente "efecto paradójico", que ocurre a concentraciones por encima de la MIC (8 y 10 $\mu\text{g/ml}$; Fig. 4.1). No disponemos de una explicación satisfactoria sobre este proceso, pero podría tratarse de un mecanismo compensatorio de adaptación, similar al que ha sido descrito para caspofungina (111). Las células de *C. albicans* con crecimiento paradójico a elevadas concentraciones de caspofungina, presentan profundas alteraciones morfológicas acompañadas de una pérdida de virulencia en el modelo de hospedador invertebrado *Galleria mellonella* (111). Las posibles implicaciones clínicas del interesante efecto paradójico todavía no han sido elucidadas.

Los resultados aportados en este estudio permiten establecer de forma preliminar una acción diferencial de AmB y MF sobre la generación de estrés oxidativo interno en *C. albicans*, manifestada por la producción de ROS, el potencial de membrana mitocondrial y la activación de un grupo de actividades enzimáticas antioxidantes (catalasa, GR y SOD), junto con la estimulación de la síntesis intracelular de trehalosa (Figs. 3.7-3.9, Tabla 3.2). De hecho, las evidencias sostienen que la AmB es un potente inductor de la producción de ROS endógeno, mediante la activación del potencial de membrana mitocondrial (Figs. 3.5 y 3.6) incluso en concentraciones con toxicidad limitada (Fig. 3.1; (106)). Curiosamente, dicha inducción parece depender de la actividad trehalosa-6P sintasa (Tps1p), porque el mutante *tps1Δ* nulo es incapaz de inducir una intensa respuesta oxidativa (Figs. 3.5 y 3.6)(124) han descrito que, en *Saccharomyces cerevisiae*, el genotipo *tps1Δ* muestra una disminución de la frecuencia respiratoria mitocondrial junto con la desregulación de la ruta glucolítica, debido a su incapacidad para inhibir la hexoquinasa II. Estas propuestas concuerdan con hallazgos recientes realizados en mamíferos, donde la hexoquinasa II muestra un papel inhibitorio de la fosforilación oxidativa, al suprimir la formación endógena de ROS (125,126). Del mismo modo, estas evidencias se ven reforzadas por la ausencia de una clara inducción de dos actividades antioxidantes fundamentales

(catalasa y SOD) en dicho mutante, después de haber sido expuesto a los antifúngicos en estudio (Fig. 3.7 y 3.8).

Merece ser destacado como las células de *C. albicans tps1Δ* son altamente sensibles a AmB, a pesar de su incapacidad para inducir la producción de ROS (Figs. 3.1, 3.2 y 3.5), lo que confirma las importantes funciones reguladoras de Tps1p sobre el metabolismo de azúcares en levaduras (82,127), que son esenciales para compensar el aumento de la relación ADP/ATP inducida por AmB (128). Además, la disfunción de la vía glucolítica y la baja frecuencia respiratoria mostrada por el mutante *tps1Δ*, también permiten explicar la resistencia mostrada por *C. albicans* a MF (Figs. 3.5 y 3.6), lo que corrobora el hecho de que la toxicidad de este antifúngico es altamente dependiente del estado metabólico de las células (103,106).

Siguiendo un patrón inverso, la cepa *tps2Δ* mostró una clara susceptibilidad a MF 0.05 µg/ml (Fig. 3.1) acompañada por el aumento concomitante de la producción de ROS y la subsiguiente actividad mitocondrial (Figs. 3.5 y 3.6), siendo la respuesta oxidativa ligeramente más elevada que en SC5314 (Fig. 3.5). De la misma manera, solo se detectó una inhibición significativa (aproximadamente del 30%) de la actividad de SOD en presencia de MF 0.05 µg/ml en este mutante (Fig. 3.8). Sin embargo, esta reducción de SOD fue comparativamente muy similar con las dos concentraciones de MF empleadas (Fig. 3.8). Por tanto, no parece haber una correlación directa con la fuerte sensibilidad exhibida por las células *tps2Δ* frente a la equinocandina (Fig. 3.1). Las alteraciones en la integridad de la pared celular causadas por la doble interrupción del gen *TPS2*, deben ser probablemente responsables de esta aguda sensibilidad (78,80). En particular, el polieno ejerció un nivel de respuesta muy similar en las cepas parental y *tps2Δ*, independientemente de la concentración aplicada (Figs. 3.1, 3.5 y 3.6). En consecuencia, mientras que la actividad Tps1p parece cumplir una función esencial en la resistencia de *C. albicans* frente a AmB, Tps2p podría jugar un papel equivalente para enfrentar tratamientos con MF.

La exposición de las cepas escogidas con Flz tampoco parece ocasionar modificaciones reseñables en la generación de estrés oxidativo interno. Ni la acumulación intracelular de ROS (Fig. 4.5), ni el potencial de membrana mitocondrial manifestaron variaciones significativas tras la aplicación de Flz $\mu\text{g/ml}$. La introducción de un agente oxidante como control positivo (peróxido de hidrógeno), confirma que el procedimiento de medida es correcto (Figs. 4.6 y 4.7). A su vez, las mediciones efectuadas en la actividad de las dos enzimas detoxificantes (catalasa y SOD) en presencia de Flz no arrojó cambios relevantes de capacidad catalítica respecto de los valores basales (Figs. 4.7 y 4.8); siendo lo más reseñable la marcada disminución de actividad SOD global observada en el mutante *tps2 Δ* (Fig. 4.8). En consecuencia, y a falta de un soporte experimental más consistente, podemos concluir que la generación de un estrés oxidativo intracelular no contribuye de forma notable a la actividad antifúngica del fluconazol en *C. albicans*.

Los resultados relativos a la formación de biopelículas también merecen ser destacados (Fig. 3.10). El primer paso en la formación de biopelículas para cualquier microorganismo consiste en adherirse a un biomaterial en la superficie, o un dispositivo permanente en el interior del cuerpo del hospedador (prótesis, catéteres, marcapasos, etc.) (108). La adherencia inicial de *Candida sp.* está mediada por proteínas de la pared celular a través de diferentes tipos de enlaces químicos (129). Con posterioridad, la capacidad de *C. albicans* para inducir la formación de biopelículas en catéteres y otros dispositivos bioprotésicos facilita el desarrollo de una candidemia severa, cuyo manejo eficiente requiere a menudo la extracción y sustitución del dispositivo, aunque esta aproximación clínica no siempre es posible. Por tanto, son necesarias las pruebas para dilucidar si las biopelículas de *C. albicans* formadas en los diferentes bioprotésicos pueden ser erradicadas por la terapia de bloqueo (130).

Aunque los mecanismos de resistencia antifúngica generados por la matriz exopolimérica que conforma el biofilm no están completamente aclarados, una

estrategia plausible podría consistir en la difusión restringida de fármacos a través de dicha matriz. Diferentes investigaciones sugieren que ciertos componentes de la pared celular, como los β -glucanos, pueden interactuar físicamente con el antibiótico e inhibir su penetración en el sitio de acción (131,132). En este sentido, el mutante *tps1 Δ* parece tener alterada su composición de β -glucanos en la estructura de la pared celular (34). Por tanto, después de aplicar Micafungina, que actúa específicamente contra una enzima clave en la síntesis de pared, el compuesto vería impedido ejercer su efecto inhibitorio. Este hecho explicaría el aumento de viabilidad celular registrado en dicho mutante en respuesta a la presencia de MF, durante la formación de biopelículas (Fig. 3. 10).

Como parte de la Memoria, se ha llevado a cabo el análisis del perfil lipídico mediante cromatografía de las levaduras bajo estudio (Capítulo III). Evidencias previas sugieren que las variaciones en el contenido de ergosterol y esfingolípidos de membrana, afectan a la capacidad de *C. albicans* para formar biofilms y también se asocian con la resistencia a ciertos antifúngicos (23). Por otra parte, el análisis de mutantes de *C. albicans* afectados en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga, revela su incapacidad para incorporarlos aunque sean proporcionados desde el medio exterior, siendo más susceptibles a la acción de la MF cuando están formando biofilms (133). La presencia de ácidos grasos aun cuando sean externos a la propia levadura también podrían influir sobre la estructura de la membrana plasmática y el metabolismo celular. Por ejemplo, los ácidos de cadena corta (acético, propiónico o butírico) producidos por bacterias del intestino, parecen inhibir la formación de colonias de *C. albicans*, así como la transición morfológica levadura-micelio de esta de levadura (134).

Los resultados del análisis realizado sobre el perfil lipídico en las cepas escogidas de *C. albicans* no son concluyentes. En el caso de los ácidos grasos saturados (AGS), los mayores porcentajes fueron del palmítico y el esteárico (Tabla 5.1 y

Fig. 5.1), registrándose un porcentaje ligeramente inferior en los dos mutantes deficientes en trehalosa respecto al tipo parental SC5314 (Tabla 5.1), que pudiera explicar su mayor susceptibilidad a los antifúngicos, aunque esta diferencia no llegar a ser significativa. Igualmente, la comparación en el contenido de AGP n-3 y n-6 no ofrece diferencias de interés entre las cepas (Tabla 5.5).

Los datos disponibles unidos a otros estudios previos de células vegetales en suspensión (*Brassica napus*), que proponen una regulación directa de la trehalosa-6-P sobre la síntesis de los ácidos grasos (135), sugieren una línea de trabajo para investigar si hay alguna correlación entre el metabolismo de la trehalosa y el contenido de ácidos grasos en *C. albicans*. Es particularmente interesante el mutante *tps1Δ*, carente del gen que codifica la sintasa que da lugar al intermedio trehalosa-6-P, que actúa como señal regulatoria en plantas, donde también parece estar involucrada en la síntesis de ácidos grasos. Si la alteración de la biosíntesis de trehalosa provoca un descenso en la cantidad global de ácidos grasos en esta levadura patógena, quedaría reforzada la importancia de esta ruta metabólica como diana terapéutica.

En consecuencia, como conclusión preliminar, aunque entendemos que el trabajo experimental es novedoso y abre interesantes expectativas, es preciso disponer de evidencias científicas más consistentes para apoyar una posible correlación entre el contenido relativo y naturaleza de los lípidos de membrana con la sensibilidad antifúngica manifestada por los distintos tipos celulares de *C. albicans*.

En conjunto, nuestros datos respaldan que la inducción de un fuerte estrés oxidativo intracelular, es un componente esencial que contribuye a la acción fungicida ejercida por AmB, pero no por MF, en *C. albicans* (Figs. 3.1, 3.4 y 3.5-3.8), extendiendo la validez universal de este mecanismo a los hongos patógenos

en conjunto (103,106,130). Un mecanismo similar no puede ser propuesto, al menos por el momento, para la utilización de Flz (Figs. 4.1; 4.6-4.8). Igualmente, son consistentes con la utilización de enzimas involucradas en la biosíntesis de trehalosa como objetivos potenciales en el diseño de estrategias enfocadas a la obtención de nuevos compuestos con aplicación en terapia antifúngica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo con el conjunto de resultados presentados en este estudio, es posible establecer las siguientes conclusiones:

1. La ausencia del gen funcional *TPS1* (trehalosa sintasa), incrementa la sensibilidad de *Candida albicans* a la acción fungicida de la Anfotericina B, mientras la interrupción del gen *TPS2* (trehalosa fosfatasa), produjo una mayor susceptibilidad de esta levadura patógena a Micafungina. En ambos casos, la actividad antifúngica fue dependiente de la dosis utilizada.

2. La aplicación de concentraciones crecientes de Fluconazol reveló un patrón de crecimiento paradójico de la cepa parental SC5314, igualmente demostrable en el mutante *tps2Δ*, aunque el rango de concentraciones inductoras de este comportamiento no es el mismo en las dos cepas.

3. La presencia de Anfotericina B promueve un incremento de la síntesis intracelular de trehalosa exclusivamente en la cepa silvestre, pero no así en los dos mutantes deficientes en la síntesis de trehalosa. El tratamiento con Fluconazol y Micafungina no produjo cambios significativos en la acumulación de trehalosa endógena en ninguna de las cepas.

4. La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el potencial de membrana mitocondrial, determinadas mediante citometría de flujo, confirman que la inducción de estrés oxidativo intracelular es un factor esencial del efecto fungicida causado por la Anfotericina B. Sin embargo, este mecanismo no es operativo para Micafungina y Fluconazol, cuyos tratamientos no producen cambios relevantes en la producción de ROS, ni en el potencial de membrana mitocondrial.

5. Los datos experimentales apoyan la existencia de una cooperación positiva entre la síntesis de trehalosa y el sistema de defensa antioxidante, en la protección celular de *C. albicans* frente a tratamientos con antifúngicos potencialmente tóxicos para esta levadura patógena.

6. Los niveles de las actividades enzimáticas medidas: Catalasa, Glutatión reductasa (GR) y Superóxido dismutasa (SOD) mostraron importantes variaciones tanto en función del antifúngico aplicado (Anfotericina B, Micafungina o Fluconazol), como del mutante específico, deficiente en la síntesis de trehalosa estudiado (*tps1Δ* o *tps2Δ*).

7. La capacidad de los dos mutantes *tps1Δ* and *tps2Δ* para desarrollar biopelículas sobre superficies inertes está claramente dañada por el tratamiento con Anfotericina B, aunque las células *tps1Δ* experimentaron una cierta mejoría tras la adición de Micafungina. A su vez, el Fluconazol no afectó el desarrollo de biofilms funcionales en las cepas SC5314 y *tps2Δ*, mientras provocó una notable reducción en el mutante *tps1Δ*.

8. Con las evidencias actuales, no es factible establecer una correlación entre el perfil y naturaleza de los lípidos de membrana con la sensibilidad antifúngica manifestada por los distintos tipos celulares estudiados de *C. albicans*.

9. La utilización de sustancias naturales sin capacidad antifúngica, como menadiona y pinocembrina, inhiben la capacidad de *C. albicans* para formar biofilm. Diversas combinaciones de dichas sustancias con los antibióticos analizados, no parecen ofrecer un incremento de toxicidad sobre esta levadura; registrándose, en algunos casos, un resultado antagónico más que sinérgico.

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: En las últimas décadas se ha producido un enorme incremento de las infecciones causadas por hongos, siendo el género *Candida* el agente etiológico con mayor prevalencia, afectando en mayor medida a la población humana de mayor edad o aquejada por algún tipo de inmunodeficiencia. De hecho, *Candida albicans* es la cuarta causa de infecciones nosocomiales. La quimioterapia antifúngica necesita el desarrollo de compuestos más potentes, seguros y con menor toxicidad. En este contexto, el disacárido no reductor trehalosa ha sido propuesto como una interesante diana terapéutica para el diseño de nuevos antifúngicos.

Objetivos: Con el fin de profundizar en esta hipótesis, hemos examinado en el patógeno oportunista *Candida albicans*, el nivel de susceptibilidad que presentan los mutantes homocigóticos deficientes en los dos genes que codifican las etapas secuenciales en la biosíntesis de trehalose, denominados respectivamente como trehalosa sintasa (*TPS1*) y trehalosa fosfatasa (*TPS2*), frente a los siguientes antifúngicos de uso clínico: Anfotericina B (AmB), Micafungina (MF) y Fluconazol (Flz).

Métodos: En el transcurso del trabajo experimental, se ha llevado a cabo la determinación de varios parámetros fisiológicos y bioquímicos. En concreto, podemos destacar el recuento de células viables y la sensibilidad en placa, la medida de la producción intracelular de ROS, el potencial de membrana mitocondrial, el contenido de trehalosa y la formación de biofilms. Mencionar igualmente, el ensayo de enzimas antioxidantes, junto con la extracción y metilación de extractos lipídicos.

Resultados: Mientras el mutante *tps1Δ* se comportó como muy sensible frente a la exposición con AmB, mostró un significativo nivel de resistencia a MF. Curiosamente, el fenotipo opuesto se registró en el mutante *tps2Δ*. A

su vez, la MF promovió un cierto incremento en la producción endógena de ROS en la cepa parental SC5314 y en células *tps2Δ*, mientras la formación de ROS en el mutante *tps1Δ* fue virtualmente indetectable. En este mismo mutante *tps1Δ* el tratamiento con Flz mostró una ligera susceptibilidad que no puede considerarse relevante. El nivel endógeno de ROS se correlaciona positivamente con la actividad mitocondrial. La aplicación de Flz no causó variaciones de importancia en la generación de estrés oxidativo en ninguna de las levaduras analizadas.

Tan sólo AmB fue capaz de promover la síntesis intracelular neta de trehalosa en la cepa parental SC5314, mientras el disacárido estaba ausente en células *tps1Δ* y mostró valores residuales en las *tps2Δ*, confirmando que otras fosfatasas citosólicas distintas a la enzima *tps2p* pueden llevar a cabo la defosforilación de trehalosa-6P in *C. albicans*. Además, la capacidad de ambos mutantes *tps1Δ* y *tps2Δ* para formar biofilms experimentó una drástica disminución tras el tratamiento con AmB; si bien experimentó un ligero aumento en células *tps1Δ* después de añadir MF. Los análisis de los respectivos perfiles lipídicos no fueron concluyentes, sin que ninguna evidencia pueda ser aportada, por el momento, que permita explicar la diferente sensibilidad a los antifúngicos de las cepas de *C. albicans* bajo estudio.

Conclusión: Nuestros datos aportan consistencia a la idea de utilizar trehalosa como una interesante diana para nuevas terapias antifúngicas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Prado J, Dehnhardt WL, Ledermann W. Editorial Historia sucinta de Candida albicans, blanca pero no tanto [Internet]. [cited 2018 Aug 21]. Available from: www.interscience.wiley.com
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2019 Mar 10];20(1):133–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223626>
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2010 Feb 20 [cited 2019 Mar 10];36(1):1–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088682>
4. Gómez-López A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Pharmacotherapy of yeast infections. Expert Opin Pharmacother [Internet]. 2008 Nov 20 [cited 2019 Mar 14];9(16):2801–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937613>
5. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. Med Mycol [Internet]. 2015 Sep 18 [cited 2019 Mar 10];54(1):myv076. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385381>
6. Cisterna R, Ezpeleta G, Telleria O, Guinea J, Regueiro B, Garcia-Rodriguez J, et al. Nationwide Sentinel Surveillance of Bloodstream Candida Infections in 40 Tertiary Care Hospitals in Spain. J Clin Microbiol [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2019 Mar 14];48(11):4200–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826636>
7. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance. Curr Opin Infect Dis [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Mar 9];27(6):484–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304391>
8. Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Soares Mendes Gianinni MJ, et al. Amphotericin B mediates killing in Cryptococcus neoformans through the induction of a strong oxidative burst. Microbes Infect.

- 2011;13(5):457–67.
9. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling Human Fungal Infections. *Science* (80-) [Internet]. 2012 May 11 [cited 2019 Mar 9];336(6082):647–647. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582229>
 10. Bennett RJ. The parasexual lifestyle of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Jun 24];28:10–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210747>
 11. Kreger-Van Rij NJW. *The Yeasts : a taxonomic study* [Internet]. Elsevier Science Publishers; 1984 [cited 2019 Mar 10]. 1082 p. Available from: https://books.google.es/books/about/The_Yeasts.html?id=UAxrAAAAMAAJ&redir_esc=y
 12. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2003 Nov [cited 2019 Mar 9];3(11):685–702. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592598>
 13. Lipke PN, Klotz SA, Dufrene YF, Jackson DN, Garcia-Sherman MC. Amyloid-Like β -Aggregates as Force-Sensitive Switches in Fungal Biofilms and Infections. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2017 Nov 29 [cited 2017 Dec 28];82(1):e00035-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29187516>
 14. Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara J-P. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2018 Aug 27];46(8):749–72. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780802206435>
 15. Mendes Giannini MJS, Bernardi T, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM, Sardi JCO. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2019 Mar 10];62(1):10–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180477>
 16. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. 2014 Feb [cited 2019 Mar 10];10:95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611015>

17. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2015 Apr 3 [cited 2019 Mar 7];41(2):208–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962107>
18. Kadosh D. Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2016 Nov 16 [cited 2019 Mar 7];73(22):4265–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312239>
19. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL, et al. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. Maurelli AT, editor. Infect Immun [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Mar 9];84(10):2724–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27430274>
20. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2006 Jan 11 [cited 2018 Aug 27];32(4):217–26. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410601023524>
21. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol [Internet]. 2001 Sep [cited 2019 Jan 14];183(18):5385–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514524>
22. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cell Microbiol [Internet]. 2006 Sep [cited 2019 Jan 14];8(9):1382–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2006.00761.x>
23. Alim D, Sircaik S, Panwar S. The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. J Fungi [Internet]. 2018 Dec 18 [cited 2019 Jan 20];4(4):140. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30567300>
24. Phan QT, Eng DK, Mostowy S, Park H, Cossart P, Filler SG. Role of Endothelial Cell Septin 7 in the Endocytosis of *Candida albicans*. Konopka J, Berman J, editors. MBio [Internet]. 2013 Dec 17 [cited 2019 Mar 14];4(6):e00542-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345743>

25. Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2019 Mar 14];15(4):406–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609181>
26. Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Müller WH, Andel A, Verkleij AJ, et al. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* [Internet]. 2000 Feb [cited 2019 Mar 14];35(3):601–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672182>
27. Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2019 Mar 14];72(3):495–544. Available from: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00032-07>
28. Valentin E, Mormeneo S, Sentandreu R. The cell surface of *Candida albicans* during morphogenesis. *Contrib Microbiol* . 2000;5:138–50.
29. Pereira M, Felipe MS, Brígido MM, Soares CM, Azevedo MO. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* [Internet]. 2000 Mar 30 [cited 2019 Mar 14];16(5):451–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0061%2820000330%2916%3A5%3C451%3A%3AAID-YEA540%3E3.0.CO%3B2-O>
30. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2019 Mar 14];61(1):529–53. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.61.080706.093341>
31. González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza O, Argüelles J-C. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2011 Aug [cited 2019 Mar 9];1810(8):777–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416511000948>
32. Kelly MT, MacCallum DM, Clancy SD, Odds FC, Brown AJP, Butler G. The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004 Aug 22 [cited 2018 Aug 28];53(3):969–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2004.04185.x>

33. Badrane H, Cheng S, Nguyen MH, Jia HY, Zhang Z, Weisner N, et al. *Candida albicans* IRS4 contributes to hyphal formation and virulence after the initial stages of disseminated candidiasis. *Microbiology* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2018 Aug 28];151(Pt 9):2923–31. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27998-0>
34. Pedreno Y, Gonzalez-Parraga P, Martinez-Esparza M, Sentandreu R, Valentin E, Arguelles J-C. Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiology* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2019 Mar 10];153(5):1372–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17464051>
35. Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. [Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*]. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2018 Aug 28];27(4):195–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140610000860>
36. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* [Internet]. 2009 [cited 2018 Aug 28];56(2):211–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543556>
37. Universidad del Zulia. Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales B, Mesa C LM, Magaldi S, Beltrán-Luengo H, Pineda M, Colmenares C, et al. *Kasmera* [Internet]. Vol. 34, *Kasmera*. Universidad del Zulia; 2006 [cited 2018 Aug 28]. 93-101 p. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222006000200003
38. Zhai Y, Liu J, Zhou L, Ji T, Meng L, Gao Y, et al. Detection of *Candida* species in pregnant Chinese women with a molecular beacon method. *J Med Microbiol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Feb 7];67(6):783–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29676728>
39. Yang C-H, He X-S, Chen J, Ouyang B, Zhu X-F, Chen M-Y, et al. Fungal infection in

- patients after liver transplantation in years 2003 to 2012. *Ann Transplant* [Internet]. 2012 Dec 31 [cited 2019 Jan 13];17(4):59–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274325>
40. Marukutira T, Huprikar S, Azie N, Quan S-P, Meier-Kriesche U, Horn D. Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance registry, a multicenter, observational study. *HIV/AIDS - Res Palliat Care* [Internet]. 2014 Mar [cited 2019 Jan 13];6:39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648769>
 41. Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 Jan 2];7(6):755–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22702528>
 42. Brown AJP, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, et al. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2019 Jan 14];217(Pt 1):144–55. Available from: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.088930>
 43. Ueno K, Matsumoto Y, Uno J, Sasamoto K, Sekimizu K, Kinjo Y, et al. Intestinal resident yeast *Candida glabrata* requires Cyb2p-mediated lactate assimilation to adapt in mouse intestine. Idnurm A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Sep 9 [cited 2019 Jan 14];6(9):e24759. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0024759>
 44. Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Reyna-López GE, Martínez-Gómez MA, Vega-González A, Cuéllar-Cruz M. Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Candida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 14];2015:1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705688>
 45. Kauffman CA. Management of candidemia and invasive candidiasis in adults - UpToDate [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 16]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/management-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults>
 46. De Rosa FG, Garazzino S, Pasero D, Di Perri G, Ranieri VM. Invasive candidiasis

- and candidemia: new guidelines. *Minerva Anestesiol* [Internet]. [cited 2019 Jan 16];75(7-8):453-8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19078900>
47. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2019 Mar 9];4(2):119-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302789>
 48. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, López J, et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect* [Internet]. 2011 Feb [cited 2019 Mar 9];77(2):157-61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216030>
 49. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-*albicans* Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. Chauhan N, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 3 [cited 2019 Mar 10];9(7):e101510. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991967>
 50. Mascellino MT, Oliva A. Epidemiology of Candidaemia: A Prospective Comparison between Invasive Candidiasis in Italy and All Over the World. *J Clin Exp Pathol*. 2016;6:1:1000e120.
 51. Lockhart SR. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clin Microbiol Newsl* [Internet]. Elsevier; 2014 Sep 1 [cited 2019 Mar 10];36(17):131-6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439914000580>
 52. Alobaid K, Khan Z. Epidemiologic characteristics of adult candidemic patients in a secondary hospital in Kuwait: A retrospective study. *J Mycol Med* [Internet]. 2018 Dec 18 [cited 2019 Jan 16]; Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30578148>
 53. Ramos A, Romero Y, Sánchez-Romero I, Fortún J, Paño JR, Pemán J, et al. Risk factors, clinical presentation and prognosis of mixed candidaemia: a population-based surveillance in Spain. *Mycoses* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Mar 10];59(10):636-43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12516>
 54. Shor E, Perlin DS. Coping with Stress and the Emergence of Multidrug Resistance

- in Fungi. Heitman J, editor. PLOS Pathog [Internet]. 2015 Mar 19 [cited 2019 Mar 10];11(3):e1004668. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25790300>
55. de Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartágenes M do S, Filho AKDB, do Nascimento FRF, et al. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. Front Microbiol [Internet]. Frontiers Media SA; 2018 [cited 2019 Jan 11];9:1351. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30018595>
56. Merenstein D, Hu H, Wang C, Hamilton P, Blackmon M, Chen H, et al. Colonization by *Candida* Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-Infected and Noninfected Women. AIDS Res Hum Retroviruses [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Mar 14];29(1):30–4. Available from:
<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2012.0269>
57. Argüelles J-C. Why can't vertebrates synthesize trehalose? J Mol Evol [Internet]. 2014 Oct 18 [cited 2019 Mar 9];79(3–4):111–6. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s00239-014-9645-9>
58. Armstrong-James D. Invasive *Candida* species infection: the importance of adequate empirical antifungal therapy. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2019 Mar 14];60(3):459–60. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646200>
59. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? Intensive Care Med [Internet]. 2014 Sep 5 [cited 2019 Mar 9];40(9):1241–55. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091787>
60. Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifúngicos para uso sistémico. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2009 Jun [cited 2019 Mar 10];27(6):353–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482382>
61. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. Mitchell AP, editor. PLoS Biol [Internet]. 2013 Oct 29 [cited 2019 Mar 10];11(10):e1001692. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1001692>
62. Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin

- primarily kills yeast by simply binding ergosterol. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2012 Feb 14 [cited 2019 Mar 9];109(7):2234–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308411>
63. Guirao-Abad JP. Acción de validamicina A y los antifúngicos de uso clínico, micafungina y anfotericina B, sobre *Candida albicans* [Internet]. Universidad de Murcia; 2016 [cited 2019 Mar 10]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=154791>
 64. Klepser M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. J Crit Care [Internet]. 2011 Apr [cited 2019 Mar 9];26(2):225.e1-225.e10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951541>
 65. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2002 Feb [cited 2019 Mar 9];49 Suppl 1:7–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801575>
 66. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses [Internet]. 2015 Jun [cited 2019 Mar 10];58:2–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26033251>
 67. Chen SC-A, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections. Drugs [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2019 Mar 9];71(1):11–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175238>
 68. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. Lancet [Internet]. 2003 Oct 4 [cited 2019 Mar 9];362(9390):1142–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550704>
 69. Perlin DS. Current perspectives on echinocandin class drugs. Future Microbiol [Internet]. 2011 Apr [cited 2019 Mar 14];6(4):441–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21526945>
 70. Chandrasekar PH, Sobel JD. Micafungin: a new echinocandin. Clin Infect Dis [Internet]. 2006 Apr 15 [cited 2019 Mar 9];42(8):1171–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/501020>
 71. Flórez J, Armijo J antonio, Mediavilla Á. *Farmacología humana* 5a ed. Elsevier Masson Barcelona, editor. 2008. 1531-1316 p.

72. Nagase H, Ogawa N, Endo T, Shiro M, Ueda H, Sakurai M. Crystal Structure of an Anhydrous Form of Trehalose: Structure of Water Channels of Trehalose Polymorphism. *J Phys Chem B* [Internet]. American Chemical Society; 2008 Jul [cited 2019 Feb 27];112(30):9105–11. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp800936z>
73. Argüelles JC. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* [Internet]. 2000 Oct [cited 2019 Mar 9];174(4):217–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081789>
74. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2019 Mar 9];13(4):17R–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626396>
75. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2019 Jan 8];40(7):871–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065209>
76. Alvarez-Peral FJ, Argüelles JC. Changes in external trehalase activity during human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*. *Res Microbiol* [Internet]. 2000 Dec [cited 2018 May 28];151(10):837–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11191809>
77. CROWE JH, CROWE LM, CHAPMAN D. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science* (80-) [Internet]. 1984 Feb 17 [cited 2019 Mar 9];223(4637):701–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17841031>
78. de Virgilio C, Pontón J, Zaragoza O, Gancedo C. Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2019 Mar 10];148(5):1281–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988502>
79. Martínez-Esparza M, Martínez-Vicente E, González-Párraga P, Ros JM, García-

- Peñarrubia P, Argüelles J-C. Role of trehalose-6P phosphatase (TPS2) in stress tolerance and resistance to macrophage killing in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2019 Mar 9];299(6):453–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19231283>
80. Van Dijck P, De Rop L, Szlufcik K, Van Ael E, Thevelein JM. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Apr [cited 2019 Mar 10];70(4):1772–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895938>
81. Maicas S, Guirao-Abad JP, Argüelles J-C. Yeast trehalases: Two enzymes, one catalytic mission. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Mar 9];1860(10):2249–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27133444>
82. GANCEDO C, FLORES C. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2004 Jan [cited 2019 Jan 5];4(4–5):351–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734015>
83. Pedreño Y, Maicas S, Argüelles J-C, Sentandreu R, Valentin E. The *ATC1* Gene Encodes a Cell Wall-linked Acid Trehalase Required for Growth on Trehalose in *Candida albicans*. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Sep 24 [cited 2019 Mar 10];279(39):40852–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15252058>
84. Grasso GI, Bellia F, Arena G, Satriano C, Vecchio G, Rizzarelli E. Multitarget trehalose-carnosine conjugates inhibit A β aggregation, tune copper(II) activity and decrease acrolein toxicity. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2017 Jul 28 [cited 2019 Mar 9];135:447–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475972>
85. Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, et al. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* [Internet]. 2004 Feb 18 [cited 2019 Mar 14];10(2):148–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730359>
86. Castillo K, Nassif M, Valenzuela V, Rojas F, Matus S, Mercado G, et al. Trehalose

- delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* [Internet]. 2013 Sep 29 [cited 2019 Mar 9];9(9):1308–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851366>
87. Zhang X, Chen S, Song L, Tang Y, Shen Y, Jia L, et al. MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* [Internet]. 2014 Apr 14 [cited 2019 Mar 14];10(4):588–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441414>
 88. Du J, Liang Y, Xu F, Sun B, Wang Z. Trehalose rescues Alzheimer’s disease phenotypes in APP/PS1 transgenic mice. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2019 Mar 14];65(12):1753–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jphp.12108>
 89. Martinetti D, Colarossi C, Buccheri S, Denti G, Memeo L, Vicari L. Effect of trehalose on cryopreservation of pure peripheral blood stem cells. *Biomed reports* [Internet]. 2017 Mar [cited 2019 Mar 9];6(3):314–8. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2017.859>
 90. Liu Q, Xu L, Jiao S, Wang T, Song Y, Wen Z. Trehalose inhibited the phagocytosis of refrigerated platelets in vitro via preventing apoptosis. *Transfusion* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Mar 9];49(10):2158–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2009.02254.x>
 91. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual* [Internet]. 2nd ed. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989 [cited 2019 Mar 10]. Available from: <https://www.worldcat.org/title/molecular-cloning-a-laboratory-manual/oclc/17262855>
 92. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 Nov [cited 2019 Mar 9];193(1):265–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
 93. González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress (H₂O₂) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* [Internet]. 2003 Oct 30 [cited 2019 Mar

- 9];20(14):1161–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14587100>
94. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* [Internet]. 1984 [cited 2019 Mar 9];105:121–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>
95. Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux P. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* [Internet]. 1990 Jan [cited 2019 Mar 9];180(2):278–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201957>
96. Ludovico P, Côrte-Real M, Sansonetty F. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2019 Mar 9];147(12):3335–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739765>
97. Hwang JH, Hwang I-S, Liu Q-H, Woo E-R, Lee DG. (+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*. *Biochimie* [Internet]. 2012 Aug [cited 2019 Mar 9];94(8):1784–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908412001447>
98. Pierce CG, Uppuluri P, Tummala S, Lopez-Ribot JL. A 96 Well Microtiter Plate-based Method for Monitoring Formation and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *J Vis Exp* [Internet]. 2010 Oct 21 [cited 2019 Jan 5];(44). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048668>
99. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* [Internet]. 1957 May [cited 2019 Mar 14];226(1):497–509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781>
100. Christie WW, Han X. *Lipid analysis : isolation, separation, identification and lipidomic analysis*. Oily Press, an imprint of PJ Barnes & Associates; 2010. 428 p.
101. Maidan MM, De Rop L, Relloso M, Diez-Orejas R, Thevelein JM, Van Dijck P. Combined inactivation of the *Candida albicans* GPR1 and TPS2 genes results in avirulence in a mouse model for systemic infection. *Infect Immun* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2019 Mar 9];76(4):1686–94. Available from:

- <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01497-07>
102. Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Albuquerque B, Hernández JA, Argüelles J-C. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2018 May 28];307(4–5):241–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28412040>
 103. Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Machado F, Argüelles JC, Martínez-Esparza M. Micafungin Enhances the Human Macrophage Response to *Candida albicans* through β -Glucan Exposure. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 Feb 26 [cited 2019 Jan 5];62(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29483123>
 104. González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza Ó, Argüelles J-C. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2011 Aug [cited 2018 May 28];1810(8):777–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570449>
 105. Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to the Fungicidal Effect of This Drug. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014 Nov [cited 2018 Nov 18];58(11):6627–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155595>
 106. Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Albuquerque B, Hernández JA, Argüelles J-C. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2019 Mar 9];307(4–5):241–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28412040>
 107. Zaragoza O, Blazquez MA, Gancedo C. Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. *J Bacteriol* [Internet]. 1998 Aug [cited 2019 Jan 8];180(15):3809–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683476>

108. Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Phenylpropanoids of plant origin as inhibitors of biofilm formation by *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2019 Jan 5];24(9):1216–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24851813>
109. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2019 Mar 14];133:86–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295216304221>
110. Liu TT, Lee REB, Barker KS, Lee RE, Wei L, Homayouni R, et al. Genome-Wide Expression Profiling of the Response to Azole, Polyene, Echinocandin, and Pyrimidine Antifungal Agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2019 Mar 14];49(6):2226–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917516>
111. Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014 Feb [cited 2019 Mar 10];58(2):1071–83. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00946-13>
112. Tocher DR. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev Fish Sci* [Internet]. Taylor & Francis Group ; 2003 Apr 24 [cited 2019 Mar 14];11(2):107–84. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/713610925>
113. Davey ME, O’toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics [Internet]. Vol. 64, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. 1092 [cited 2019 Mar 14]. Available from: <http://mibr.asm.org/>
114. Zhu Z, Wang H, Shang Q, Jiang Y, Cao Y, Chai Y. Time course analysis of *Candida albicans* metabolites during biofilm development. *J Proteome Res* [Internet]. 2013 Jun 7 [cited 2019 Mar 14];12(6):2375–85. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr300447k>
115. Tobaldini-Valerio FK, Bonfim-Mendonça PS, Rosseto HC, Bruschi ML, Henriques M, Negri M, et al. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2019 Mar 7];11(8):1035–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27501739>

116. Alonso-Monge R, Navarro-García F, Román E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C, et al. The Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Essential in the Oxidative Stress Response and Chlamyospore Formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2003 Apr [cited 2019 Mar 14];2(2):351–61. Available from: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.2.2.351-361.2003>
117. Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. *Chin J Integr Med* [Internet]. 2017 Mar 7 [cited 2019 Mar 3];23(3):201–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149083>
118. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2002 Feb [cited 2019 Jan 8];49 Suppl 1:7–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801575>
119. Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Albuquerque B, Hernández JA, Argüelles J-C. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2019 Jan 5];307(4–5):241–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422116303617>
120. Argüelles J-C. Why Can't Vertebrates Synthesize Trehalose? *J Mol Evol*. 2014 Oct;79(3–4):111–6.
121. Salci TP, Negri M, Abadio AKR, Svidzinski TIE, Kioshima ÉS. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. *Drug Discov Today* [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Jan 5];23(4):802–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29353694>
122. Argüelles J-C. Trehalose as antifungal target: The picture is still incomplete. *Virulence* [Internet]. 2017 Feb 17 [cited 2019 Jan 9];8(2):237–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27459134>
123. Miao Y, Tenor JL, Toffaletti DL, Maskarinec SA, Liu J, Lee RE, et al. Structural and *In Vivo* Studies on Trehalose-6-Phosphate Synthase from Pathogenic Fungi Provide Insights into Its Catalytic Mechanism, Biological Necessity, and Potential for Novel Antifungal Drug Design. Hendrickson WA, editor. *MBio* [Internet]. 2017 Sep 6 [cited 2017 Oct 24];8(4):e00643-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28743811>

124. Noubhani A, Bunoust O, Bonini BM, Thevelein JM, Devin A, Rigoulet M. The trehalose pathway regulates mitochondrial respiratory chain content through hexokinase 2 and cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Oct 2 [cited 2019 Jan 5];284(40):27229–34. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109.029454>
125. Mailloux RJ, Dumouchel T, Aguer C, deKemp R, Beanlands R, Harper M-E. Hexokinase II acts through UCP3 to suppress mitochondrial reactive oxygen species production and maintain aerobic respiration. *Biochem J* [Internet]. 2011 Jul 15 [cited 2019 Jan 5];437(2):301–11. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20110571>
126. DeWaal D, Nogueira V, Terry AR, Patra KC, Jeon S-M, Guzman G, et al. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 31 [cited 2019 Jan 5];9(1):446. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29386513>
127. Schmidt M, Akasaka K, Messerly JT, Boyer MP. Role of Hog1, Tps1 and Sod1 in boric acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2019 Mar 14];158(Pt 10):2667–78. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.060590-0>
128. Belenky P, Camacho D, Collins JJ. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Rep* [Internet]. 2013 Feb 21 [cited 2019 Jan 5];3(2):350–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416050>
129. Cuéllar-Cruz M, Vega-González A, Mendoza-Novelo B, López-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza MA, et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012 Oct 12 [cited 2019 Jan 14];31(10):2513–27. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1634-6>
130. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2019 Jan 5];304(8):1192–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224357>

131. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D. β -1,3 Glucan as a Test for Central Venous Catheter Biofilm Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2019 Jan 5];195(11):1705–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17471441>
132. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2019 Jan 5];8(10):1325–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059922>
133. Tejima K, Ishiai M, Murayama SO, Iwatani S, Kajiwara S. *Candida albicans* fatty acyl-CoA synthetase, CaFaa4p, is involved in the uptake of exogenous long-chain fatty acids and cell activity in the biofilm. *Curr Genet* [Internet]. 2018 Apr 23 [cited 2019 Feb 28];64(2):429–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28942495>
134. Cottier F, Tan ASM, Chen J, Lum J, Zolezzi F, Poidinger M, et al. The Transcriptional Stress Response of *Candida albicans* to Weak Organic Acids. *Genes & Genomes Genetics* [Internet]. 2015 Apr 29 [cited 2019 Mar 1];5(4):497–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636313>
135. Zhai Z, Keereetaweeep J, Liu H, Feil R, Lunn JE, Shanklin J. Trehalose 6-phosphate positively regulates fatty acid biosynthesis by stabilizing WRINKLED1. *Plant Cell* [Internet]. 2018 Sep 24 [cited 2018 Oct 21];tpc.00521.2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30249634>