

## Análisis comparativo del efecto de la Validamicina A y la Anfotericina B sobre *Candida albicans*

José P. Guirao-Abad<sup>1</sup>, Ruth Sánchez-Fresneda<sup>1</sup>, María Martínez-Esparza<sup>2</sup>, Juan-Carlos Argüelles<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España.

\* correspondencia: arguelle@um.es

### Resumen

La levadura dimórfica *Candida albicans* es el hongo patógeno oportunista con mayor prevalencia en humanos. Actualmente, los mayores problemas en la práctica clínica provienen del incremento de candidiasis sistémicas nosocomiales, la baja toxicidad selectiva de los antifúngicos disponibles y el aislamiento creciente de cepas resistentes. Todos estos datos hacen necesaria la búsqueda de nuevos blancos antifúngicos. Las rutas implicadas en el metabolismo de la trehalosa se han considerado dianas potenciales para el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos. La validamicina A es un inhibidor competitivo de la actividad trehalasa y se ha aplicado con éxito para controlar el añublo de la vaina de arroz producida por el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* en Japón y China. Sin embargo, la acción de la validamicina A contra hongos patógenos en humanos no ha sido estudiada. Nuestros datos sugieren que bajas concentraciones de validamicina A (0,1 mg/ml) causan una pérdida parcial de la viabilidad celular en la cepa parental (CAI-4). Es necesario aplicar dosis elevadas, (1 mg/ml) de validamicina A, para lograr un grado significativo de muerte celular. El mutante congénico *atc1Δ/atc1Δ* carente de actividad trehalasa ácida (Atc1p) funcional fue menos sensible a la presencia de validamicina A. Además, la validamicina A actúa como un potente inhibidor competitivo de esta actividad Atc1p localizada en la pared celular así como de la trehalasa citosólica (Ntc1p). En general, la validamicina A actúa como un compuesto antifúngico débil contra *Candida albicans*, pero efectivo como inhibidor de trehalasas.

### Abstract

The opportunistic dimorphic yeast *Candida albicans* is the most prevalent infectious fungus in humans. At present, the most dangerous problems faced in clinical practice are the dramatic increase of nosocomial bloodstream candidiasis, the low selective toxicity of available antifungal therapies and the increase resistant yeast strains. All these data make necessary the search for new antifungal targets. The pathways involved in trehalose metabolism have been proposed as potentially interesting targets for the development of new antibiotics. Validamycin A is a competitive inhibitor of trehalase activity and has been successfully applied in the fight against rice sheath blight caused by the phytopathogen fungus *Rhizoctonia solani* in Japan and China. However, the action of validamycin A against fungal human pathogens had never been examined so far. Our data suggest that a concentration of 0.1 mg/ml of validamycin A caused a partial loss of cell viability on the parental strain (CAI-4). Higher concentrations (1 mg/ml) of Validamycin A were required in order to achieve a significant degree of cell killing. A congenic *atc1Δ/atc1Δ* mutant lacking functional Atc1p activity was less sensitive to the presence of validamycin A. In addition, validamycin A acts as a potent competitive inhibitor on the cell-wall linked trehalase (Atc1p) as well as on the cytosolic trehalase (Ntc1p). Collectively, validamycin A behaves as a weak antifungal against *Candida albicans*, but is an effective compound as inhibitor of trehalases.

**Palabras clave:** antifúngico; trehalosa; trehalase; MIC<sub>50</sub>

### Introducción

Los tratamientos antifúngicos han experimentado avances sustanciales en las últimas dos décadas, principalmente debido al aumento de la población inmunocomprometida y envejecida (Odds et al. 2003), junto con el aislamiento en hospitales de hongos originalmente no patogénicos, responsables de brotes nosocomiales (Pfaller & Diekema 2007, 2010). Dichos hongos pertenecen principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Cryptococcus* y a las especies “no albicans” de *Candida*,

aunque *Candida albicans* sigue siendo el hongo con mayor prevalencia en infecciones fúngicas humanas (Cowen et al. 2002; Eggimann et al. 2003; Ortega et al. 2011; Pfaller & Diekema 2007). Recientemente, los principales problemas planteados por las infecciones fúngicas en la práctica clínica provienen del considerable incremento de candidiasis sistémicas nosocomiales, las cuales exhiben nuevos factores de virulencia (Eggimann et al. 2003), del aumento de cepas fúngicas resistentes provocado por nuevas mutaciones, así como de la baja toxicidad selectiva de los tratamientos antifúngicos actualmente disponibles (Almirante et al. 2005; Cowen et al. 2002; Eggimann et al. 2003; Pfaller & Diekema 2007). Debido a este preocupante escenario es necesario encontrar terapias antifúngicas más seguras y efectivas.

En este contexto, se han realizado considerables esfuerzos centrados en mejorar los compuestos antimicóticos ya disponible, caso de las nuevas fórmulas liposomales de anfotericina B (Kim et al. 2012). Una estrategia alternativa debe ser la búsqueda de dianas celulares alternativas junto con la obtención de nuevos compuestos antifúngicos (Odds et al. 2003). Nuestro trabajo previo respalda las investigaciones centradas en las enzimas implicadas en el metabolismo de la trehalosa como potenciales dianas antifúngicas, así como los ensayos clínicos de inhibidores específicamente diseñados contra las enzimas involucradas en la ruta hidrolítica de trehalosa (Martínez-Esparza et al. 2009, 2011; Pedreño et al. 2007). Este disacárido no reductor se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (arqueas, bacterias, invertebrados y plantas) aunque está ausente en mamíferos. Tanto la pérdida de virulencia causada por la doble interrupción de los genes implicados en la ruta biosintética de trehalosa (*TPS1* y *TPS2*), como la sorprendente susceptibilidad de sus mutantes nulos correspondientes, *tps1* y *tps2*, al estrés oxidativo y al choque térmico, suponen razones de peso a favor a esta propuesta (Álvarez-Peral et al. 2002; Argüelles 2000; Iturriaga et al. 2009; Singer & Lindquist 1998). Dentro de la hidrólisis de trehalosa, el gen *ATC1* codifica la trehalasa ácida (Atc1p) localizada en la pared celular y requerida para hidrolizar la trehalosa exógena. Dicha trehalasa ácida también está involucrada en la inducción de la filamentación y en la virulencia en *C. albicans*, así como en la mejora de la resistencia frente a diferentes tipos de estrés, como el estrés oxidativo y el choque térmico (Pedreño et al. 2004).

La validamicina A, un metabolito secundario producido por *Streptomyces higroscopycus*, ha sido aplicada de forma satisfactoria tanto en Japón como en China para el control del añublo de la vaina del arroz, producido por el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, (Asano et al. 1987), también se ha probado el efecto de dicha droga sobre varios ascomicetos y basidiomicetos (Robson et al. 1988). Respecto a su estructura, la validamicina A consta de una fracción aglicona, validoxilamina A, unida a glucosa mediante un enlace  $\beta$ -glucosídico (Asamizu et al. 2011). Este compuesto muestra una potente inhibición competitiva sobre las trehalasas de diversas plantas e insectos, sugiriendo un posible uso potencial como herbicida o insecticida (Asano et al. 1990; Goddijn et al. 1997; Müller et al. 1995). Sin embargo, aún no se ha analizado la acción de la validamicina A contra hongos patógenos en humanos. Este hecho nos ha llevado a investigar la hipotética acción antifúngica de la validamicina A contra *Candida albicans*, tomando como modelo la cepa parental CAI-4 y su mutante isogénico homocigótico *atc1Δ/atc1Δ* (carente de trehalasa ácida). Nuestros resultados claramente indican que validamicina A tiene el potencial necesario para ser considerado una alternativa para el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos contra *Candida albicans*.

## Material y métodos

### *Cepas empleadas y condiciones de cultivo*

Se han utilizado dos cepas de *C. albicans*: CAI-4 (*ura-3::imm-434/ura-3::im-434*) y el mutante congénico carente de actividad trehalasa ácida (*atc1Δ/atc1Δ*) (Pedreño et al. 2004). Los cultivos crecieron con agitación orbital a 28 °C en medio YPD compuesto por: peptona (2%), extracto de levadura (1%) y glucosa (2%). Las cepas se mantuvieron mediante subcultivos periódicos en medio YPD sólido. La monitorización del crecimiento se efectuó mediante determinaciones de la D.O.<sub>600nm</sub> de los cultivos en un espectrofotómetro Shimadzu UV.

### *Sensibilidad de la validamicina A*

La validamicina A fue adquirida de Duchefa Biochimie y la solución se preparó disolviendo el polvo en dimetil sulfóxido consiguiendo una concentración final de 10 mg/ml. El stock se almacenó a -20°C hasta su uso.

Los cultivos crecieron en YPD líquido a 37 °C hasta llegar a fase exponencial ( $DO_{600nm} = 0,8-1,0$ ) y se dividieron en varias alícuotas que fueron tratadas con distintas concentraciones de validamicina A. Después de incubar durante 24 h y 48h a 37 °C, se determinó la viabilidad (ver siguiente epígrafe) respecto a un control sin validamicina A. De estos datos se calculó la concentración del compuesto que provocó la reducción de la viabilidad celular hasta el 50 % ( $MIC_{50}$ ).

### *Determinación de la viabilidad y la sensibilidad en placa*

Los cultivos fueron crecidos en YPD líquido durante toda la noche a 28 °C y se refrescaron en el mismo medio hasta llegar a fase exponencial temprana ( $D.O_{600nm} = 0,2-0,3$ ). En este momento, las muestras se dividieron en varias alícuotas idénticas que fueron tratadas con dos concentraciones diferentes de validamicina (0,1 y 1,0 mg/ml), elegidas en función de la  $CMI_{50}$ , o mantenidos sin tratar como alícuotas control. Todas ellas se incubaron a 37 °C hasta una  $D.O_{600nm} = 0,8-1,0$ .

La viabilidad se determinó tras la realización de diluciones seriadas en agua destilada estéril y la disposición de 100 µl de cada dilución sobre placas de YPD sólido. Seguidamente, se incubaron las placas durante 2-3 días a 37 °C y se contaron entre 30 y 300 colonias por placa. Los ensayos se hicieron por triplicado normalizando el número de supervivientes en función a las muestras control (100% de viabilidad).

Los ensayos de sensibilidad en placa se realizaron mediante la disposición por goteo de 5 µl de las diluciones seriadas realizadas previamente sobre YPD sólido. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2-3 días.

### *Preparación de los extractos celulares*

Después de la exposición a validamicina A, las muestras se cultivaron y resuspendieron a una densidad conocida (10-15 mg ml<sup>-1</sup> de peso húmedo) en el tampón de extracción ácido N-mofolinetanosulfónico (MES), 100 mM a pH 6,0 que contiene cisteína 5 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0,1 mM. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos de hemólisis de 0,5 cm de diámetro que contienen perlas Ballotini (0,45 mm de diámetro). Las células se sometieron a un proceso de rotura mecánica en vortex. Los tubos se dispusieron rápidamente en hielo, y el extracto celular se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min. El sobrenadante (extracto citosólico), y el precipitado resuspendido en el mismo tampón (extracto particulado o de pared celular) se conservaron a 4 °C si eran usados de forma inmediata o a -20 °C para análisis posteriores. El contenido de proteína de los extractos celulares se determinó según Lowry et al. (1951) con suero de albumina bovina como patrón de referencia.

### *Ensayos enzimáticos*

Los ensayos para determinar la actividad trehalasa ácida consistieron en la incubación de 50 µl del extracto de pared celular con 200 µl de trehalosa (200 mM) preparado en tampón citrato sódico 200 mM a pH 4,5 y con EDTA 2mM. La actividad trehalasa neutra se determinó mediante la incubación de 50 µl del extracto citosólico y 200 µl de trehalosa (200 mM) preparados en tampón MES 25 mM a pH 7,1 y CaCl<sub>2</sub> 125 µM. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 30 min y se pararon por inmersión en agua hirviendo (95-100 °C) durante 5 min. La cantidad de glucosa liberada se determinó usando el método glucosa oxidasa-peroxidasa. La actividad específica es expresada como nmol min<sup>-1</sup> (mg proteína)<sup>-1</sup>.

### *Determinación de trehalosa endógena*

La trehalosa intracelular se midió siguiendo el método descrito en Pedreño et al. (2007). Las muestras celulares se lavaron y resuspendieron en 1 ml de agua destilada y se hirvieron durante 30-45 min agitando de forma esporádica. La concentración de trehalosa liberada en el sobrenadante se determinó con trehalasa comercial (Sigma). Los ensayos contenían 90 µl de

tampón acetato sódico 25 mM a pH 5,6, 100  $\mu$ l del sobrenadante de los extractos libres de levadura y 10  $\mu$ l de trehalasa (2 unidades  $\text{ml}^{-1}$ ). Después de incubar toda la noche a 37 °C, la cantidad de glucosa formada se determinó por el método glucosa oxidasa-peroxidasa. Paralelamente, se dispuso una mezcla control preparada de igual manera, pero sustituyendo las muestras problema por trehalosa comercial.

### *Análisis morfológico*

Las imágenes de los diferentes tratamientos fueron captadas en un microscopio Leica DM6000B, con una cámara Leica DFC280 conectada a un PC con el software de adquisición Leica Application Suite V 2.5.0 R1. Las imágenes se capturaron en microscopía de campo claro, utilizando el objetivo de 40X con una magnificación en pantalla de 920x. Tanto el procesado como el posterior análisis de imagen se llevaron a cabo mediante el software de libre distribución Imagen J. Dicho programa es un software de procesado y análisis de imagen de propósito general desarrollado por el Instituto Nacional de Salud.

### *Análisis estadístico*

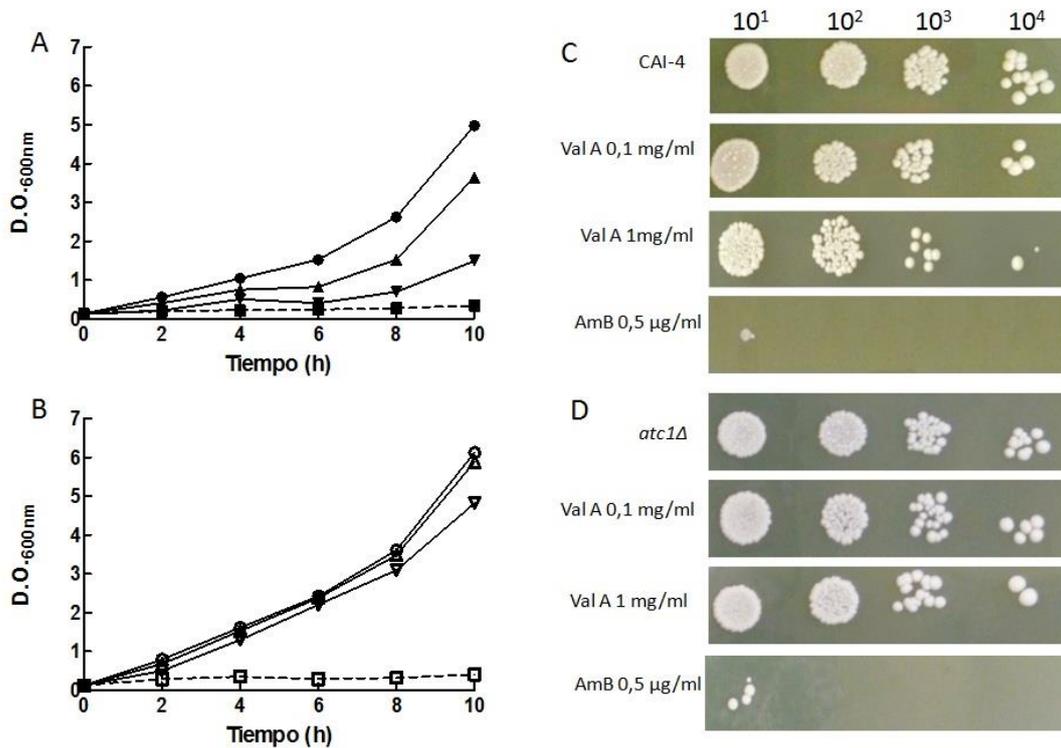
Los datos se representan como la media  $\pm$  DE. Los datos fueron analizados por el test de rango múltiple de Duncan. Los resultados mostrados proceden de 3-5 experimentos independientes.

## **Resultados**

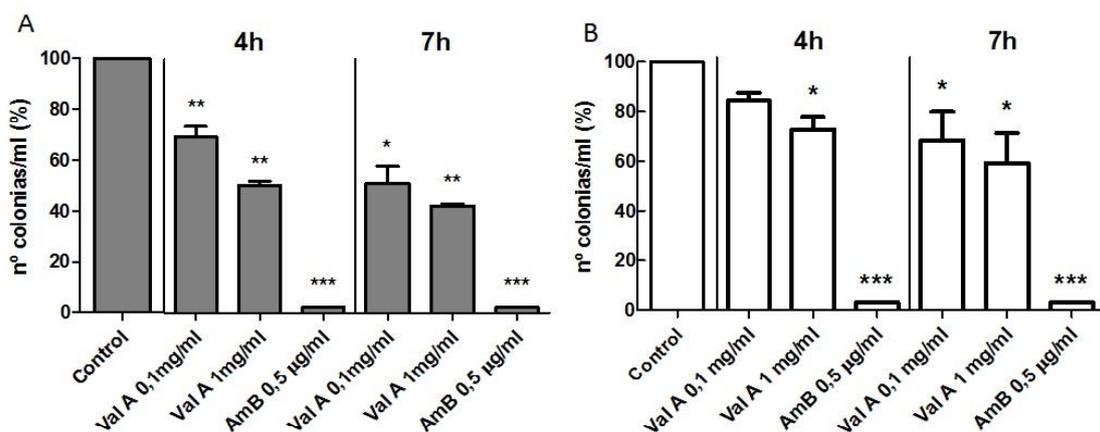
### *Efecto de la validamicina A sobre el crecimiento celular y la viabilidad de las cepas CAI-4 y atc1 $\Delta$ de C. albicans*

Con el objetivo de comprobar el hipotético papel antifúngico de la validamicina A, analizamos la respuesta de las células CAI-4 a la adición de dos concentraciones de este inhibidor, seleccionadas en función de la  $\text{CMI}_{50}$  correspondiente (0,5 mg/ml), calculada como viene descrito en Materiales y Métodos. Según el análisis turbidimétrico (Fig. 1A), al añadir 0,1 mg/ml de validamicina A se produjo una ligera disminución en el crecimiento celular, siendo esta reducción mucho más notable en muestras expuestas a concentraciones de 1 mg/ml ( $2 \times \text{MIC}_{50}$ ) (Fig. 1A). La viabilidad celular (Fig. 2A) fue consistente con los datos de absorbancia previamente obtenidos (Fig. 1A). Tras 4 h de exposición, la concentración de 0,1 mg/ml de validamicina A causó una reducción débil en el número de supervivientes en comparación con el control (Fig. 2A), y solamente la dosis mayor dio lugar a un nivel de muerte celular significativo (casi del 50%). Incubaciones prolongadas (7 horas) en presencia del compuesto, solamente produjeron un ligero aumento adicional de la actividad antifúngica, que fue dependiente de la dosis empleada (Fig. 2A), sugiriendo que la validamicina A permanece estable durante largo periodos de tiempo. Estos datos se correlacionan con lo observado en ensayos de sensibilidad en placa, donde puede observarse una disminución del número e intensidad de las colonias formadas en medio sólido, en función de la concentración de validamicina A empleada (Fig. 1C).

A continuación se analizó el grado de acción antifúngica de la validamicina A sobre el mutante nulo *atc1 $\Delta$ /atc1 $\Delta$*  carente de la actividad trehalasa ácida funcional, dicha enzima es inhibida por esta droga (Fig. 1 y 2). Como era de esperar, tanto el análisis turbidimétrico como los ensayos de sensibilidad en placa y el recuento de células viables en medio YPD líquido, revelaron una mayor resistencia por parte del mutante a la acción inhibitoria del compuesto, a diferencia la cepa parental (Fig. 1B, 1D y 2B). Se puede apreciar como exposiciones elevadas (1 mg/ml) de validamicina A dieron lugar a un mayor porcentaje de supervivientes en el mutante tras 7 h de incubación, con respecto a las células parentales (58% frente al 42%, respectivamente) (Fig 2A y 2B). A lo largo del trabajo, la acción antifúngica de la validamicina A fue comparada con muestras idénticas tratadas con anfotericina B (0,5  $\mu$ g/ml), usada como control positivo. La presencia del polieno provocó una fuerte porcentaje de muerte celular en ambos tipos celulares (Fig. 2A y 2B).

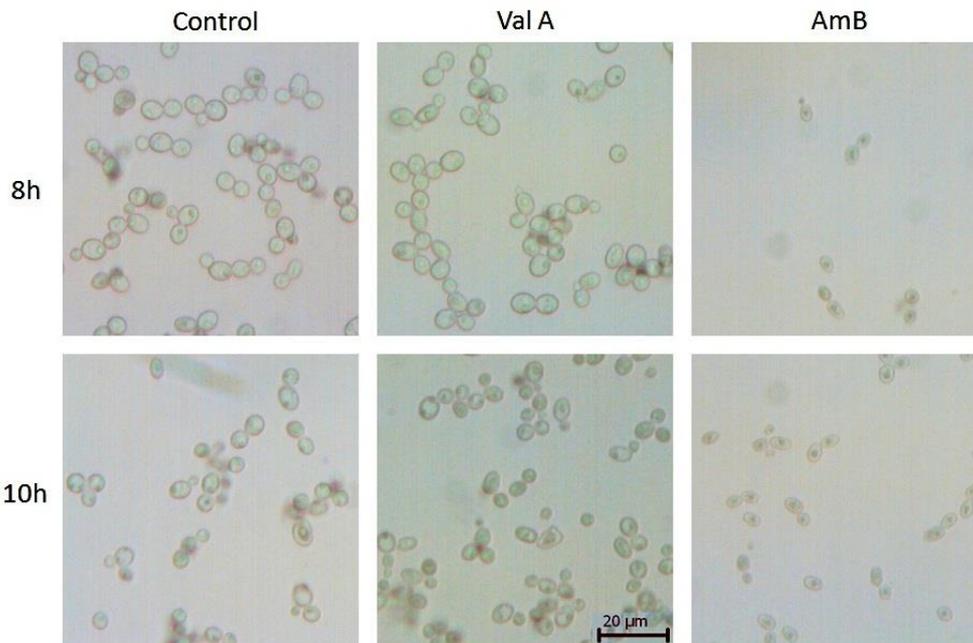


**Figura 1.** Efecto de la validamicina A (Val A) y la anfotericina B (AmB) sobre el crecimiento turbidimétrico y la sensibilidad en medio sólido en la cepa parental CAI-4 y su mutante isogénico *atc1Δ/atk1Δ* de *Candida albicans*. Los cultivos crecieron a 37 °C en medio YPD líquido con agitación, en ausencia (●) o presencia de validamicina A 0.1mg/ml (▲), 1 mg/ml (▼), o anfotericina B 0.5 μg/ml (■). Las muestras se cultivaron por duplicado a los tiempos indicados en las medidas de la D.O. <sub>600nm</sub> en las cepas CAI-4 (A) y *atc1Δ/atk1Δ* (B). Los ensayos de sensibilidad en placa se analizaron en las cepas CAI-4 (C) y *atc1Δ/atk1Δ* (D) sometida a los tratamientos indicados durante 7h. Se mantuvieron muestras sin tratar a 37 °C como control. La distinción entre las medias de los valores obtenidos fue estadísticamente significativa en P<(0,05) (\*), P<(0,01) (\*\*), P<(0,001) (\*\*\*), según la prueba de rango múltiple de Duncan.



**Figura 2.** Niveles de viabilidad celular de las cepas CAI-4 y *atc1Δ/atk1Δ*, en respuesta a la adición de validamicina A (Val A) y anfotericina B (AmB). Las muestras se ajustaron a una D.O. <sub>600nm</sub> baja (~0,3) y se sometieron a los tratamientos indicados durante 1 h. Se mantuvieron muestras sin tratar a 37 °C como control. Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados constantes y los valores mostrados son la media ± DE de dos medidas independientes. La distinción entre las medias de los valores obtenidos fue estadísticamente significativa en P<(0,05) (\*), P<(0,01) (\*\*), P<(0,001) (\*\*\*), según la prueba de rango múltiple de Duncan.

Por otro lado, el análisis al microscopio óptico de la morfología celular parecía sugerir una posible reducción del tamaño celular en función del antifúngico específico probado (validamicina A o anfotericina B). Esta reducción fue más evidente tras incubaciones prolongadas en el caso de la validamicina A (Fig. 3). Los resultados procedentes de 5 medidas independientes en cultivos exponenciales de la cepa CAI-4 mostraron una correlación directa entre el tratamiento antifúngico empleado durante 10 horas y el tamaño celular observado, siendo el área celular de las muestras control (sin tratamiento) mayor que el de las muestras tratadas con 0,1 mg/ml de validamicina A ( $22,75 \pm 5,3$  versus  $18,14 \pm 3,8 \mu\text{m}^2$ ). A su vez, y como cabría esperar, la menor superficie celular correspondió a las muestras tratadas con 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B ( $16,96 \pm 3,6 \mu\text{m}^2$ ).



**Figura 3.** Cambios morfológicos inducidos por la validamicina A y la anfotericina B en la cepa CAI-4 de *C. albicans*. Las células CAI-4 ( $D_{0.600\text{nm}} = 0,3$ ) se trataron con validamicina 0,1 mg/ml o anfotericina 0,5  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 h y 10 h. Se mantuvieron muestras sin tratar a 37 °C como control. Las micrografías ópticas de las muestras se tomaron con un microscopio Leica DM6000B de contraste de fases.

#### *Cambios en el contenido de trehalosa durante el tratamiento con validamicina A*

En *C. albicans*, el disacárido trehalosa actúa como un protector específico contra el estrés oxidativo (Álvarez-Peral et al. 2002), y también es sintetizado en respuesta a exposiciones con anfotericina B (González-Párraga et al. 2011). Debido a que la adición de validamicina A en varios tipos de plantas dispara la síntesis de trehalosa (Goddijn et al. 1997; Lopez et al. 2009; Müller et al. 1995), se procedió a medir el contenido de trehalosa almacenada en las cepas CAI-4 y *atc1Δ* aquí estudiadas. Como se presenta en la Tabla 1, las alícuotas expuestas a concentraciones de validamicina A de 0,1 mg/ml mostraron un conspicuo incremento en la acumulación intracelular del disacárido, mientras que una concentración 10 veces mayor produjo una menor acumulación del mismo (Tabla 1). Debido al alto porcentaje de muerte celular producido por la anfotericina B tras una hora de tratamiento (datos no mostrados), la población residual superviviente sintetizó menos trehalosa *de novo* (Tabla 1) (González-Párraga et al. 2011). Como ya se ha demostrado anteriormente, el mutante homocigótico nulo *atc1Δ* mostró un contenido intracelular del disacárido ligeramente mayor (Tabla 1) (Pedreño et al. 2007).

**Tabla 1.** Cambios en la trehalosa endógena almacenada medida en respuesta a diferentes concentraciones de validamicina A en las cepas CAI-4 y *atc1Δ/atc1Δ* de *C. albicans*. Los cultivos crecieron a 28 °C en medio YPD hasta una fase exponencial temprana ( $OD_{600nm}=0.3$ ) y se trataron con la concentración correspondiente de validamicina A durante 4 h y anfotericina B durante 1 h a 37 °C. Los resultados son la media  $\pm$  DE de tres medidas independientes. La distinción entre los valores medios obtenidos fue estadísticamente significativa en  $P<(0,05)$  (\*),  $P<(0,01)$  (\*\*),  $P<(0,001)$  (\*\*\*), según la prueba de rango múltiple de Duncan.

Tratamiento	Trehalosa <sup>†</sup>	
	CAI-4	<i>atc1Δ/atc1Δ</i>
Control	4,7 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 1,0
Validamicina A (0,1mg/ml)	14,5 $\pm$ 1,5***	16,6 $\pm$ 2,5***
Validamicina A (1mg/ml)	6,9 $\pm$ 1,2*	7,2 $\pm$ 1,4*
Anfotericina B (0,5 $\mu$ g/ml)	7,1 $\pm$ 1,1*	9,4 $\pm$ 1,9**

**Tabla 2.** Niveles de actividad enzimática correspondientes a las trehalasas ácida (Atc1p) y neutra (Ntc1p), en cultivos en fase exponencial de la cepa CAI-4 y el mutante nulo *atc1Δ/atc1Δ* de *Candida albicans*, tratado con 0,1 mg/ml de Validamicina A durante 4 h y anfotericina B 0,5  $\mu$ g/ml durante 1 h a 37 °C. Los números entre paréntesis representan la actividad relativa normalizada respecto al control para cada parámetro, que es tomado como 1,0. Los resultados son la media  $\pm$  DE de tres medidas independientes. La distinción entre los valores medios obtenidos fue estadísticamente significativa en  $P<(0,05)$  (\*),  $P<(0,01)$  (\*\*),  $P<(0,001)$  (\*\*\*), según la prueba de rango múltiple de Duncan.

Tratamiento	CAI-4		<i>atc1Δ</i>	
	Atc1p <sup>x</sup>	Ntc1p <sup>x</sup>	Atc1p <sup>x</sup>	Ntc1p <sup>x</sup>
Control	1,5 $\pm$ 0,10 (1,0)	17,5 $\pm$ 0,31 (1,0)	<0,3	19,1 $\pm$ 1,73 (1,0)
Validamicina A (0,1 mg/ml)	1,2 $\pm$ 0,45 (0,76)	9,8 $\pm$ 0,72 (0,56)***	<0,3	13,6 $\pm$ 1,32 (0,72) *
Anfotericina B (0,5 $\mu$ g/ml)	1,7 $\pm$ 0,4 (1,13)	24,7 $\pm$ 0,49 (1,41)***	<0,3	26,3 $\pm$ 6,9 (1,37)***

<sup>x</sup> nmol glucosa (mg proteína)<sup>-1</sup>

### Actividad enzimática de las actividades trehalasa en respuesta a tratamientos con validamicina A

Para complementar estos estudios, estudiamos una serie de actividades enzimáticas que podrían jugar un papel importante en la protección de la integridad celular de *C. albicans* frente a los distintos tratamientos antifúngicos empleados (González-Párraga et al. 2011; Pedreño et al. 2007). Es factible observar que la actividad Atc1p fue parcialmente inhibida en presencia de validamicina A (0,1 mg/ml) en células CAI-4 (Tabla 2), aunque los niveles basales de dicha actividad fueron ya bajos debido a que el gen *ATC1* está reprimido catabólicamente por glucosa en medio YPD. Como cabría esperar, la trehalasa ácida fue indetectable en el mutante nulo *atc1Δ* (Tabla 2). Por su parte, la actividad citosólica Ntc1p también disminuyó en presencia de validamicina A tanto en la células CAI-4 como *atc1Δ*, aunque el mutante exhibió un menor grado de reducción en su actividad (Tabla 2). Sin embargo, la anfotericina B causó un incremento de actividad Ntc1p, probablemente debido a la necesidad de hidrolizar la trehalosa y obtener energía necesaria para resistir el estrés producido.

### Discusión

De acuerdo a nuestros resultados, la validamicina A actúa como un potente inhibidor competitivo de la trehalasa ácida, Atc1p (Tabla 2) (Asano et al. 1987) con una constante de inhibición aparente ( $K_i$ ) en torno a 1,7  $\mu$ g/ml (datos no mostrados). Este compuesto también redujo de forma significativa la

actividad de la trehalasa neutra citosólica (Ntc1p) en *C. albicans* (Tabla 2), lo que sugiere que la validamicina A o su fracción aglicona (validoxilamina A) es capaz de atravesar la pared celular y la membrana plasmática afectando a las hidrolasas citosólicas, aunque es necesario realizar más experimentos al respecto.

Al aplicar concentraciones menores de la  $CMI_{50}$  (0,1 mg/ml), el compuesto mostró un efecto liviano sobre la viabilidad celular de la cepa CAI-4 de *Candida albicans*, y aún menor en el mutante *atc1Δ/atc1Δ* carente de actividad Atc1p funcional (Fig. 2). Por tanto, fue necesario incrementar la dosis de validamicina a 2 x  $CMI_{50}$  para poder obtener una reducción notable, aunque aún parcial, en la viabilidad de la población celular, y sólo en la cepa parental. Como era de esperar, el mutante nulo *atc1Δ* fue menos sensible a la droga (Fig. 2). La utilidad de la validamicina A como potencial agente antifúngico está claramente limitado al comparar su efecto sobre el grado de supervivencia celular con el efecto letal producido por la anfotericina B (Fig. 1 y 2), al menos en el caso *C. albicans*.

El contenido de trehalosa endógena aumentó después de añadir 0,1 mg/ml de validamicina A (Tabla 1), mostrando resultados similares a los obtenidos en otros fondos genéticos de *C. albicans* (Serneels et al. 2012). Sin embargo, el nivel de inducción fue menor en presencia de dosis elevadas, así como tras la adición de anfotericina B, probablemente debido al efecto tóxico provocado por estos tratamientos antifúngicos (Tabla 1).

Los cambios producidos en las propiedades tanto morfológicas como físicas de las células fúngicas (tamaño, forma, peso, altura, rugosidad y rigidez) están relacionados con la acción específica desencadenada por los distintos antifúngicos ensayados, claramente demostrable con la anfotericina B y la 5-fluorocitosina (Kim et al. 2011). En nuestro caso, la adición de dosis no letales de validamicina A causó una pequeña pero consistente disminución del tamaño celular con respecto a las muestras control (Fig. 3). Sin embargo, las células tratadas con anfotericina B experimentaron una reducción mayor del área interna (Fig. 3). Por tanto, y de forma preliminar, nuestros resultados permiten concluir que, aunque la validamicina A por sí sola no puede considerarse actualmente como un antifúngico clínico adecuado, podría ser utilizada como sustrato con el potencial suficiente para diseñar nuevos compuestos antifúngicos que actúen de forma directa contra la ruta implicada en el metabolismo de trehalosa. Todo ello debería promover la realización de futuras investigaciones con el objetivo de desarrollar y probar nuevas drogas que nos permitan combatir más eficazmente las infecciones sistémicas producidas por *Candida albicans*.

### Agradecimientos

El trabajo experimental ha sido respaldado por la beca PI12/01797 (Ministerio de Economía y Competitividad, ISCIII, España) y el contrato financiero proporcionado por Cespa, S.A.

### Referencias

- Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW & Pahissa A. 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (4): 1829-1835.
- Álvarez-Peral FJ, Zaragoza O, Pedreño Y & Argüelles JC. 2002. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology* 148 (Pt 8): 2599-2606.
- Argüelles JC. 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology* 174 (4): 217-224.
- Asamizu S, Yang J, Almabruk KH & Mahmud T. 2011. Pseudoglycosyltransferase catalyzes nonglycosidic C-N coupling in validamycin A biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 133 (31): 12124-12135.
- Asano N, Takeuchi M, Kameda Y, Matsui K & Kono Y. 1990. Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *The Journal of Antibiotics* 43 (6): 722-726.
- Asano N, Yamaguchi T, Kameda Y & Matsui K. 1987. Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*. *The Journal of Antibiotics* 40 (4): 526-532.
- Cowen LE, Anderson JB & Kohn LM. 2002. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* 56 139-165.

- Eggimann P, Garbino J & Pittet D. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases* 3 (11): 685-702.
- Goddijn OJ, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RW, de Graaf PT, van Dun K, Poels J, Ponstein AS, Damm B & Pen J. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology* 113 (1): 181-190.
- González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza O & Argüelles JC. 2011. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810 (8): 777-783.
- Iturriaga G, Suarez R & Nova-Franco B. 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 10 (9): 3793-3810.
- Kim JH, Faria NC, Martins Mde L, Chan KL & Campbell BC. 2012. Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes. *Frontiers in Microbiology* 3: 261.
- Kim KS, Kim YS, Han I, Kim MH, Jung MH & Park HK. 2011. Quantitative and qualitative analyses of the cell death process in *Candida albicans* treated by antifungal agents. *PloS One* 6 (12): e28176.
- Lopez M, Tejera NA & Lluch C. 2009. Validamycin A improves the response of *Medicago truncatula* plants to salt stress by inducing trehalose accumulation in the root nodules. *Journal of Plant Physiology* 166 (11): 1218-1222.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265-275.
- Martínez-Esparza M, Martínez-Vicente E, González-Párraga P, Ros JM, García-Penarrubia P & Argüelles JC. 2009. Role of trehalose-6P phosphatase (TPS2) in stress tolerance and resistance to macrophage killing in *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology*: 299 (6): 453-464.
- Martínez-Esparza M, Tapia-Abellán A, Vitse-Standaert A, García-Penarrubia P, Argüelles JC, Poulain D & Jouault T. 2011. Glycoconjugate expression on the cell wall of tps1/tps1 trehalose-deficient *Candida albicans* strain and implications for its interaction with macrophages. *Glycobiology* 21 (6): 796-805.
- Müller J, Boller T & Wiemken A. 1995. Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* 197 (2): 362-368.
- Odds FC, Brown AJ & Gow NA. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology* 11 (6): 272-279.
- Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, López J, Pitart C y Mensa J. 2011. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *The Journal of Hospital Infection* 77 (2): 157-161.
- Pedreño Y, González-Párraga P, Martínez-Esparza M, Sentandreu R, Valentín E & Argüelles JC. 2007. Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiology* 153 (Pt 5): 1372-1381
- Pedreño Y, Maicas S, Argüelles JC, Sentandreu R & Valentín E. 2004. The ATC1 gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* 279 (39): 40852-40860.
- Pfaller MA & Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20 (1): 133-163.
- Pfaller MA & Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology* 36 (1): 1-53.
- Robson GD, Kuhn PJ & Trinci AP. 1988. Effects of validamycin A on the morphology, growth and sporulation of *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum* and other fungi. *Journal of General Microbiology* 134 (12): 3187-3194.
- Serneels J, Tourneau H & Van Dijck P. 2012. Tight control of trehalose content is required for efficient heat-induced cell elongation in *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (44): 36873-36882.
- Singer MA & Lindquist S. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology* 16 (11): 460-468.