

## Efecto del estrés oxidativo en dos especies patógenas de *Candida*

Orlando Espinosa González (1), Mayra Cuéllar Cruz (2)

1 [Escuela de Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [orlando\_espinosa\_gonzalez@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [mCuellar@ugto.mx]

### Resumen

**Introducción.** Las especies de *Candida* son una de las principales causas de los altos índices de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados. Para colonizar a su hospedero humano, estos microorganismos requieren neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas durante el estallido respiratorio por las células fagocíticas. Con la finalidad de entender como *Candida* responde a una ERO, en el presente trabajo *C. albicans* y *C. glabrata* fueron expuestas a diferentes concentraciones de hidroperóxido de cumeno (CHP). **Materiales y Métodos.** Las dos especies de *Candida* fueron crecidas hasta fase estacionaria y fueron expuestas a diferentes concentraciones de CHP. **Resultados y Discusión.** Nuestros resultados indican que *C. albicans* es capaz de soportar concentraciones mayores de CHP con respecto a *C. glabrata*. Dato que probablemente se debe al número de genes presentes en cada microorganismo que codifica para glutatión peroxidasa y glutaredoxinas, las cuales son las enzimas principales encargadas de neutralizar al CHP. **Conclusión.** Estos resultados sugieren que *C. albicans* ha adquirido una respuesta más eficiente al estrés oxidativo para poder detoxificar las ERO, lo cual le permite evadir el ataque y su eliminación por las células fagocíticas.

### Abstract

**Introduction.** *Candida* species are a primary cause of high mortality in immunocompromised and hospitalized patients. In order to colonize their hosts, these microorganisms neutralize the reactive oxygen species (ROS) produced by phagocytic cells during the respiratory burst. In an attempt to understand this change in response to oxidative stress, in this study, *C. albicans* and *C. glabrata* were exposed to increasing concentrations of cumene hydroperoxide (CHP). **Materials and Methods.** *C. albicans* and *C. glabrata* were grown to the stationary phase and exposed to different concentrations of CHP. **Results and Discussion.** Data revealed that *C. albicans* is more resistant to CHP than *C. glabrata*. The CHP is removed in part by glutathione peroxidases and glutaredoxins. One likely explanation of the difference in resistance between these pathogens could be dosage of glutathione peroxidase and glutaredoxin genes. **Conclusion.** This result suggests that *C. albicans* could have acquired a more robust response to oxidative stress in order to evade the attack and elimination by phagocytic cells.

### Palabras Clave

*Candida albicans*; *Candida glabrata*; Hidroperóxido de cumeno

## INTRODUCCIÓN

### Respuesta a estrés oxidativo por *C. albicans* y *C. glabrata*

Las infecciones fúngicas invasivas debidas a las especies del género *Candida* constituyen una de las principales causas de altos índices de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados [1]. Para poder colonizar diferentes órganos del hospedero humano, estos patógenos requieren de varios factores de virulencia como son la expresión de adhesinas, la producción de proteínas hidrolíticas, el cambio fenotípico, la formación de biopelículas y la respuesta a estrés oxidativo (REO) [2,3]. La REO es considerada un factor de virulencia importante debido a que durante el proceso de infección, las especies de *Candida* tienen que hacer frente a las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas durante el estallido respiratorio por las células fagocíticas del hospedero humano [1,4]. Las ERO dañan a todas las biomoléculas, como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas [5]. *Candida* como cualquier patógeno ha desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que le permiten detoxificar a las ERO, sobrevivir en el interior del fagolisosoma y finalmente evadir el sistema inmune del hospedero humano [6-9]. No obstante, aun cuando se han descrito algunos de los mecanismos por los cuales ERO como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el ión superóxido ( $O_2^-$ ) son detoxificados, es indispensable conocer como las especies de *Candida* responden a otros agentes oxidantes como es el hidroperóxido de cumeno (CHP), esto debido a que en el interior del fagolisosoma, estos patógenos se encuentran expuestos a varias ERO. El entender como *Candida* responde a las distintas ERO permitirá conocer de manera integral como estos microorganismos evaden y escapan de las células fagocíticas del hospedero humano. En el presente trabajo se propuso evaluar la REO en *C. albicans* y *C. glabrata* ocasionada por el agente oxidante CHP.

Ambas especies de *Candida* fueron crecidas hasta fase estacionaria y expuestas a diferentes concentraciones de CHP. Nuestros datos indican que *C. albicans* es capaz de soportar concentraciones mayores de CHP que *C. glabrata*.

Resultado que sugiere que probablemente se debe al número de genes presentes en cada especie que codifica para glutaredoxinas y glutatión peroxidasa, las cuales son las principales enzimas encargadas de neutralizar el CHP. Diferencia que posiblemente le ha permitido a *C. albicans* evadir el sistema inmune del humano y colonizarlo eficientemente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas fúngicas

Las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* son aislados clínicos de la colección del Departamento de Microbiología, ENCB-IPN, México.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados como se describió previamente [10], y a las placas se le adicionó 2% de agar bacteriológico (Bioxon). El medio YPD contiene extracto de levadura 10g/L, peptona 20g/L, suplementado con 2% glucosa.

### Condiciones de cultivo

Las cepas de *Candida* fueron cultivadas en medio YPD incubadas a 28 °C durante 24 h, en el caso de cultivos líquidos en un agitador orbital 311DS (Labnet) durante 48 h.

### Ensayo de susceptibilidad a CHP

*C. albicans* y *C. glabrata*, se cultivaron en 50 mL de medio YPD durante 48 h a 28 °C en agitación constante. Los cultivos en fase estacionaria con una  $OD_{600nm}$  15.0 fueron diluidos a  $OD_{600nm}$  0.5 con agua desionizada estéril, después se realizaron 10 alícuotas de 5 mL, a cada una de las alícuotas se les adicionaron diferentes concentraciones del CHP al 88% (Sigma-Aldrich), las muestras control no fueron tratadas con los agentes oxidantes. El CHP fue preparado en dimetil sulfoxido (DMSO), por lo que a la muestra control se le adiciono DMSO. Las muestras se incubaron durante 90 min con el agente oxidante, transcurrido el tiempo se midió la  $OD_{600nm}$ , y se realizó un cálculo para ajustar 1 mL de muestra a una  $OD_{600nm}$  de 0.5. Después, el agente oxidante se eliminó por centrifugación a 10,000 g durante 5 min y las células fueron resuspendidas en 1 mL de agua desionizada estéril obteniendo una  $OD_{600nm}$  de 0.5. De acuerdo con el cálculo se realizaron diluciones

seriadas exponenciales en placas de 96 pozos y se sembraron las células por goteos en placas con medio YPD y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Finalmente, las placas fueron fotografiadas en el fotodocumentador (Sygene Gene Genius Bio Imaging system).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *C. albicans* y *C. glabrata* responden diferencialmente al CHP

Para determinar como responden *C. albicans* y *C. glabrata* al estrés oxidativo generado por el CHP durante fase estacionaria, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de este agente oxidante (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0, 7.2, 8.4 mM), el cual es un peróxido orgánico.

Como se muestra en la Figura 1, en presencia de CHP, *C. glabrata* es la especie más susceptible, ya que solo fue capaz de crecer hasta 6.0 mM, en contraste con *C. albicans* que mostró resistencia hasta 8.4 mM.

La susceptibilidad de *C. glabrata* y la resistencia de *C. albicans* a este agente oxidante al parecer es una característica que puede deberse al número de genes presentes en estas especies [3,8,11]. En *C. albicans* se ha reportado una peroxidasa (Px1p) que detoxifica eficientemente peróxidos orgánicos como es el CHP [11]. Adicionalmente, se han identificado en su genoma dos genes que codifican para peroxidases (orf19.87 y orf19.85) [3]. Mientras en el genoma de *C. glabrata* mediante un análisis de secuencia solo se ha identificado un gen que codifica para una peroxidasa putativa. Además de las peroxidases, otras enzimas que detoxifican peróxidos orgánicos son las glutaredoxinas [12,13].

De acuerdo al banco de datos del genoma de *Candida* (Candida Genome Database), *C. albicans* tiene cuatro genes que codifican para estas proteínas, denominados *GRX1*, *GRX2*, *GRX3*, y *GRX4* [12,13]. En el genoma de *C. glabrata* se han identificado tres genes que codifican para las glutaredoxinas.

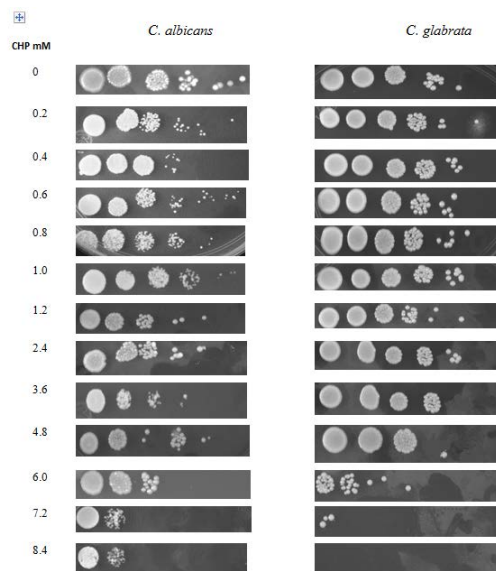


Figura 1. Resistencia de *C. albicans* y *C. glabrata* a CHP.

Datos en conjunto que muestran que al parecer *C. albicans* es capaz de neutralizar eficientemente el CHP debido a que cuenta con un número mayor de peroxidases y glutaredoxinas con respecto a *C. glabrata*. Ventaja que este patógeno utiliza para poder colonizar un mayor número de órganos en el humano.

## CONCLUSIONES

La especificidad en la resistencia de *C. albicans* a una ROS, como un peróxido orgánico, puede proveerle una ventaja con respecto a *C. glabrata*. Ventaja que puede favorecer que *C. albicans* sea capaz de colonizar distintos nichos fisiológicos en el hospedero humano, siendo actualmente la principal especie de este género causante de micosis invasiva.

## AGRADECIMIENTOS

Orlando Espinosa González agradece a la Universidad de Guanajuato y al Programa del Verano de la Investigación Científica 2015 por la oportunidad de realizar el presente trabajo. Los autores agradecen a la Dra. Claudia Erika Morales Hernández de la Escuela de Nivel Medio Superior, Campus Guanajuato, de la Universidad de Guanajuato por todo el apoyo logístico otorgado

para la realización de la estancia de investigación. Los autores agradecen a Martín Tonatiuh Robledo Alonso, de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, de la Universidad de Guanajuato por su apoyo técnico.

## REFERENCIAS

- Chiang, L. & Rotstein, C. (2011). **Emerging fungal infections in immunocompromised patients.** *F1000 Medicine Reports*, 3, 14. doi:10.3410/M3-14.
- Deorukhkar, S.C., Saini, S. & Mathew, S. (2014). Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. *International Journal of Microbiology*, 2014, 456878. doi:10.1155/2014/456878.
- Kusch, H., Engelmann, S., Albrecht, D., Morschhäuser, J. & Hecker, M. (2007). Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics*, 7, 686–697.
- Kaloriti, D., Tillmann, A., Cook, E., Jacobsen, M., You, T., Lenardon, M., & Brown, A.J.P. (2012). Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species. *Medical Mycology*, 50(7), 699–709. doi:10.3109/13693786.2012.672770.
- Brown, A. J., Haynes, K., & Quinn, J. (2009). Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 384–391. doi:10.1016/j.mib.2009.06.007.
- Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I. & De Las Peñas, A. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic Cell*, 7(5), 814–825.
- Cuéllar-Cruz, M., Gutiérrez-Sánchez, G., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J.L. & Rodríguez-Sifuentes, J.L. (2013). Identification of *Candida albicans* heat shock proteins and *Candida glabrata* and *Candida krusei* enolases involved in the response to oxidative stress. *Central European Journal of Biology*, 8(4), 337–345.
- Cuéllar-Cruz, M., Castaño, I., Arroyo-Helguera, O. & De Las Peñas, A. (2009). Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 649–654.
- Tillmann, A., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2011). Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 39, 219–223.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE & *et al.* (2001). *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Srinivasa, K., Kim, NR., Kim, J., Kim, M., Bae, J.Y., Jeong, W., Kim, W. & Choi, W. (2012). Characterization of a putative thioredoxin peroxidase prx1 of *Candida albicans*. *Molecules and Cells*, 33:301–307.
- Chaves, G.M., Bates, S., MacCallum, D.M. & Odds, F.C. (2007). *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genetics and Molecular Research*, 6:1051–1063.
- F Chaves, G.M. & da Silva, W.P. (2012). Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107:998–1005.