

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**



**CAMPUS GUANAJUATO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**POSGRADO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**“Papel de la proteasa Kex2 en la composición de la pared celular y reconocimiento inmune de *Candida albicans*”**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**  
**BIOL. MANUELA GÓMEZ GAVIRIA**

**ASESOR:**  
**Dr. HÉCTOR MANUEL MORA MONTES**

Guanajuato, Gto., julio de 2020

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis va dedicada a todas aquellas personas que aportaron su granito de arena para hacer de este posgrado una experiencia inolvidable en mi vida. Primeramente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada, a la Red Temática de Glicociencias en Salud, a la Universidad de Guanajuato por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella durante estos dos años, así como también a los maestros que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para culminar con éxito mis estudios de maestría. En especial a mi asesor de tesis el Dr. Héctor Manuel Mora Montes y a la Dra. Nancy E. Lozoya López, gracias por haberme dado la oportunidad de pertenecer al laboratorio de Glicobiología, y sobre todo por haberme tenido la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis. Gracias a mis amigos del laboratorio Alma K. Tamez, Laura C. García, Uriel Ramírez, Emmanuel Juárez y a la MsC. Luz A. López Romero.

Gracias a mis padres Felipe Gómez y Carmencita Gaviria, a mi hermana Luisa María y a mi mejor amigo que es como mi hermano Daniel Gallego por ser mi motivación y un apoyo incondicional en mi vida y en cada una de las metas que me propongo. Las gracias son también para Dios por haberme dado la oportunidad de encontrar personas maravillosas en este país, en especial a mi segunda familia Silvia Mendoza, Pablo Caballero, Edgar Caballero, Marco Caballero, Carolina Caballero que sin duda alguna han sido las personas más incondicionales durante este proceso y a mi novio Daniel Caballero gracias por tanto amor, tanta dedicación y paciencia, gracias por estar en los buenos y malos momentos, este logro también es para ti.

Gracias a mis amigos Jesus Mompar, Blanca Zapata, Alejandra Rangel, Lisset Martínez y Lizbeth Cervantes que me han hecho sentir como en casa, a cada uno de ustedes les agradezco cada palabra de aliento y por confiar siempre en mí, los quiero.

Finalmente, gracias al Dr. Bernardo Franco y al Dr. Gustavo Niño por la ayuda que me brindaron con algunos experimentos.

“El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta” Charles Dickens

Gracias a la vida por haberme dado la oportunidad de intentarlo

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	1
 <b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 <i>Candida albicans</i> .....	2
1.2 Pared celular de <i>C. albicans</i> .....	3
1.3 Glicosilación de proteínas ( <i>N</i> - y <i>O</i> - glicosilación) .....	4
1.4 Ruta secretora de Kex2 .....	6
1.5 Función de Kex2 en <i>C. albicans</i> .....	7
1.6 Reconocimiento inmune de <i>C. albicans</i> .....	8
1.7 Antecedentes .....	10
 <b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	 12
 <b>III. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo general .....	13
3.2 Objetivos específicos .....	13
 <b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	 13
 <b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1 Cepas y condiciones de cultivos.....	14
5.2 Análisis de la composición de la pared celular	
• Hidrólisis ácida.....	14
• Hidrólisis alcalina .....	15
• Ensayo de unión al colorante azul de Alciano .....	15
• Análisis del contenido de mananas: extracción de <i>N</i> - y <i>O</i> -mananas.....	16
• Ensayo de tinción con fluorocromos.....	17

• Ensayo de cambio en la movilidad electroforética de Hex1 ( $\beta$ -N- acetil hexosaminidasa) .....	18
• Ensayo de susceptibilidad a agentes perturbadores de pared .....	18
• Ensayo de susceptibilidad a antifúngicos .....	19
<b>5.3 Reconocimiento inmune de mutantes de <i>KEX2</i> de <i>C. albicans</i> por células de la inmunidad innata</b>	
• Consideraciones éticas .....	20
• Preparación de células de levadura para las interacciones con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y macrófagos .....	20
• Aislamiento y estimulación de PBMCs humanas .....	21
• Interacción de PBMCs con células de <i>C. albicans</i> .....	21
• Diferenciación de PBMCs humanas a macrófagos .....	22
• Interacción de macrófagos con células de <i>C. albicans</i> .....	22
• Cuantificación de citocinas .....	22
• Análisis de la fagocitosis de <i>C. albicans</i> por macrófagos humanos derivados de PBMCs .....	22
<b>5.4 Participación del gen <i>KEX2</i> en la virulencia de <i>C. albicans</i></b>	
• Ensayo de supervivencia en <i>Galleria mellonella</i> .....	23
• Determinación de las unidades formadoras de colonia (UFCs) .....	24
• Ensayo de citotoxicidad producida por <i>C. albicans</i> en hemocitos de <i>G. mellonella</i> .....	24
• Análisis estadístico .....	25

## VI. RESULTADOS

• Morfología de las cepas: NGY152 (WT), <i>kex2</i> $\Delta$ y <i>kex2</i> $\Delta$ + <i>KEX2</i> .....	26
• Análisis de carbohidratos de pared celular.....	26
• Determinación del nivel de fosfomananas de la pared celular por la unión al colorante azul Alciano .....	27

• Contenido de <i>N</i> - y <i>O</i> -mananas .....	28
• Exposición de quitina y $\beta$ -1,3- glucanos .....	29
• Exposición a agentes perturbadores de pared .....	32
• Prueba de susceptibilidad antifúngica en cepas de <i>C. albicans</i> .....	34
• Concentración de proteínas .....	35
• Actividad de Hex1 .....	36
• Interacción de cepas de <i>C. albicans</i> con PBMCs .....	37
• Producción de interleucinas por macrófagos derivados de PBMCs, estimulados con levaduras .....	40
• Ensayo de la fagocitosis de <i>C. albicans</i> por macrófagos humanos derivados de PBMCs .....	41
• Ensayo de virulencia en <i>G. mellonella</i> .....	42
• Citotoxicidad producida por <i>C. albicans</i> en hemocitos de <i>G. mellonella</i> .....	44
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	46
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>IX. PERSPECTIVAS</b> .....	58
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfologías de crecimiento de <i>C. albicans</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura y composición de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	4
<b>Figura 3.</b> Estructura de las <i>N</i> - y <i>O</i> - glicanas de <i>C. albicans</i> .....	5
<b>Figura 4.</b> Localización de la proteasa Kex2 en la ruta de secreción de proteínas .....	7
<b>Figura 5.</b> Células del sistema inmune y PRRs involucrados en el reconocimiento de <i>C. albicans</i> .....	9
<b>Figura 6.</b> Morfología de las cepas NGY152 (WT), <i>kex2Δ+KEX2</i> y <i>kex2Δ</i> en condiciones de inducción de hifas .....	10
<b>Figura 7.</b> Morfología de las cepas NGY152 (WT), <i>kex2Δ+KEX2</i> y <i>kex2Δ</i> .....	26
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de carbohidratos de pared celular .....	27
<b>Figura 9.</b> Fosfomanosilación de la pared celular en cepas de <i>C. albicans</i> .....	28
<b>Figura 10.</b> Cuantificación de <i>N</i> - y <i>O</i> - mananas .....	29
<b>Figura 11.</b> Tinción con fluorocromos .....	30
<b>Figura 12.</b> Tinción con WGA-FITC y dectina-1 para evaluar la exposición de quitina y β-1,3-glucanos .....	31
<b>Figura 13.</b> Ensayos de sensibilidad a perturbadores de pared .....	32
<b>Figura 14.</b> Cuantificación de proteínas de pared celular .....	35
<b>Figura 15.</b> Ensayo de zimograma para ver el estado de <i>N</i> - glicosilación en <i>C. albicans</i> .....	36

<b>Figura 16.</b> Estimulación de la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ en PBMCs puestas en interacción con cepas de <i>C. albicans</i> .....	37
<b>Figura 17.</b> Estimulación de la producción de IL-10 en PBMCs puestas en interacción con cepas de <i>C. albicans</i> .....	39
<b>Figura 18.</b> Estimulación de la producción de IL-10 por macrófagos derivados de PBMCs puestos en interacción con cepas de <i>C. albicans</i> .....	40
<b>Figura 19.</b> Interacción de <i>C. albicans</i> con macrófagos humanos derivados de PBMCs.....	42
<b>Figura 20.</b> Ensayo de virulencia en <i>G. mellonella</i> .....	43
<b>Figura 21.</b> Unidades formadoras de colonia en <i>G. mellonella</i> .....	44
<b>Figura 22.</b> Citotoxicidad de cepas de <i>C. albicans</i> en hemocitos de <i>G. mellonella</i> .....	45
<b>Figura 23.</b> Conceptualización de la estimulación de la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF $\alpha$ por PBMCs .....	50
<b>Figura 24.</b> Conceptualización de la estimulación de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 por PBMCs y macrófagos derivados de PBMCs .....	51
<b>Figura 25.</b> Representación esquemática de la pared celular de la cepa WT y <i>kex2</i> $\Delta$ .....	55
<b>Figura 26.</b> Representación esquemática del proceso de secreción de proteínas mediado por vesículas .....	56
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>C. albicans</i> usadas en este trabajo .....	15
<b>Tabla 2.</b> Rangos de concentración mínima inhibitoria (CMI) de diferentes agentes antifúngicos .....	35
<b>Tabla 3.</b> Susceptibilidad antifúngicos de las cepas de estudio .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **GPI:** glicosilfosfatidilinositol
- **RE:** retículo endoplásmico
- **AG:** aparato de Golgi
- **PC:** pared celular
- **PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés)
- **TLRs:** receptores tipo Toll (por sus siglas en inglés)
- **PRRs:** receptores de reconocimiento de patrones (por sus siglas en inglés)
- **MR:** receptores de manosa (por sus siglas en inglés)
- **°C:** grado(s) Celsius
- **min:** minutos
- **h:** horas
- **M:** molar
- **N:** normal
- **mM:** milimolar
- **mL:** mililitro(s)
- **μL:** microlitro(s)
- **mg:** miligramo(s)
- **ng:** nanogramo(s)
- **μg:** microgramo(s)
- **nm:** nanómetros
- **U:** unidades
- **V:** voltios



- **rpm:** revoluciones por minuto
- **HK:** inactivadas por calor (del inglés “Heat killed”)
- **PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés)
- **ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)
- **PS:** penicilina- estreptomicina
- **IL-6:** interleucina 6
- **IL-10:** interleucina 10
- **TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral
- **UFC:** unidades formadoras de colonia
- **D.E:** desviación estándar

## Resumen

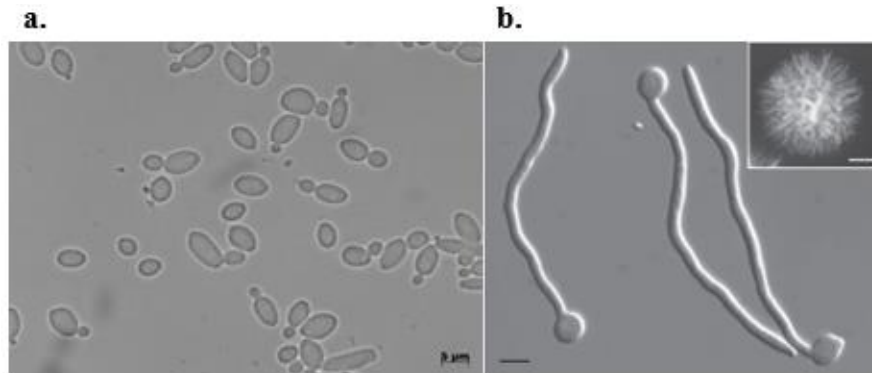
*Candida albicans* es un hongo diploide, asexual y dimórfico que forma parte de la microbiota comensal de las superficies mucosas. La estructura más importante es su pared celular, que está compuesta de residuos de manosa, de glucanos y quitina. Durante el proceso de patogénesis, el transporte hacia el espacio extracelular juega un papel importante, por ejemplo, las enzimas hidrolíticas liberadas al finalizar este evento deben ser secretadas para permitir la remodelación de la pared celular y para su posterior activación. La proteasa Kex2 interviene en este proceso de transporte y se encarga de eventos indispensables en la célula, como de la formación y remodelación de la pared celular, procesa factores de virulencia y proteínas que son esenciales para la integridad de la superficie celular. Se ha reportado que cepas mutantes de este gen manifiestan una morfología aberrante en las células y pierden la capacidad para formar hifas, es decir que la interrupción de la función de este gen tiene efectos pleiotrópicos que pueden afectar la capacidad del organismo. Debido a lo antes mencionado, sugerimos que estos efectos pleiotrópicos podrían estar afectando la capacidad de *C. albicans* de interactuar con células del sistema inmune, así como la composición de la pared celular. Para probar esto, se llevó a cabo la caracterización de la pared celular de la cepa mutante de *kex2Δ*, mediante ensayos de hidrólisis ácida y alcalina, unión al azul Alciano, análisis del contenido de *N*- y *O*-mananas y movilidad electroforética de Hex1. Además, se realizó el aislamiento y estimulación de células mononucleares y macrófagos para determinar la capacidad de interacción con células del sistema inmune. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un aumento en los polisacáridos estructurales quitina y glucana y una disminución en la manana para la mutante nula de *kex2Δ*, acompañado de una disminución en los niveles de fosfomananas, además de un aumento de las *O*-mananas, pero una notoria reducción de las *N*-mananas de la pared celular. En la mutante nula *kex2Δ* se observó una mayor exposición de quitina y glucanos, mayor sensibilidad a agentes que perturban la pared, defectos en la *N*-glicosilación y diferencias significativas al estimular diferentes interleucinas pro- y antiinflamatorias. La mutante de *kex2Δ* presentó además una disminución en la virulencia y citotoxicidad, comparada a la cepa NGY152 y *kex2Δ+KEX2*. En conjunto, estos datos mostraron que la pérdida de *KEX2* afectó la composición de la pared celular, las vías de glicosilación de proteínas y la interacción con las células inmunes innatas.

## I. Introducción

### 1.1 *Candida albicans*

Cada año millones de personas son infectadas por hongos, en los últimos años estas infecciones se han incrementado notablemente debido a la resistencia a antifúngicos y al uso de inmunosupresores en diferentes terapias. Existen alrededor de 600 especies de hongos patógenos de humanos, entre los cuales se encuentra el género *Candida*, que se encuentra clasificado dentro de la familia Saccharomycetaceae y es uno de los más prevalentes, en la clínica (Brown et al., 2012). Los organismos que pertenecen a este género se encuentran distribuidos a nivel mundial, sin embargo, algunas de sus especies se restringen a zonas específicas. Este género está conformado por más de 200 especies de hongos levaduriformes, de las cuales alrededor de 40 especies han sido reportadas como agentes causales de la candidiasis en humanos (Linton et al., 2007; Turner y Butler, 2014).

En el género *Candida*, la especie *C. albicans* es el patógeno fúngico oportunista más importante, es un hongo diploide, asexual y dimórfico, la infección por este patógeno sigue siendo la más comúnmente identificada y se aísla con mayor frecuencia que otras especies del mismo género (Zhu y Filler, 2010). Este hongo cuenta con la capacidad de crecer en forma de levadura a 28 °C (Fig. 1, a) y en forma de hifa a 37 °C (Fig. 1, b) (Spampinato y Leonardi, 2013). *C. albicans* forma parte de la microbiota comensal de las superficies mucosas, colonizando el tracto gastrointestinal, genitourinario y la mucosa oral y conjuntiva de individuos sanos (Zhu y Filler, 2010). Sin embargo, cuando los mecanismos locales o sistémicos de la defensa del hospedero están afectados, este hongo puede causar candidiasis. Además, en individuos inmunocomprometidos *C. albicans* puede penetrar la mucosa gastrointestinal y permitir la colonización de casi todos los órganos del cuerpo humano, causando candidiasis diseminada, que puede provocar la muerte del hospedero (Gow y Hube, 2012; Spampinato y Leonardi, 2013; Kiyoura y Tamai, 2015).



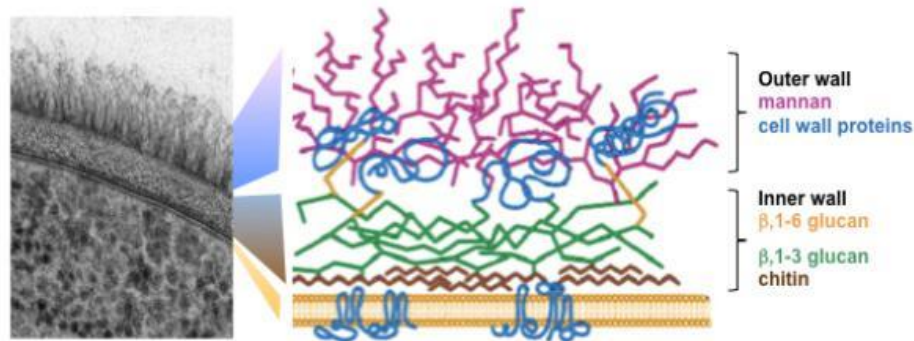
**Figura 1. Morfologías de crecimiento de *C. albicans*** a. Células de levadura de *C. albicans* (microscopía de campo claro 63X), b. Morfología de hifa de *C. albicans* (Sudbery 2011).

### 1.2 Pared celular de *C. albicans*

La pared celular de *C. albicans* ha sido un foco constante de atención durante las últimas décadas debido a que cumple dos funciones esenciales, mantener la integridad de la célula e interactuar con el medio ambiente (Chaffin, 2008; Gow y Hube, 2012). La pared celular es el primer punto de contacto entre el microorganismo y las células del sistema inmune innato del hospedero, está compuesta de un 90% de carbohidratos y un 10% de proteínas. Los carbohidratos dominan el reconocimiento inmune y las proteínas desempeñan un papel clave en las interacciones adhesivas con las superficies de las células del hospedero (Netea et al., 2008; Mora- Montes et al., 2009; Gow y Hube, 2012).

Los carbohidratos están organizados en dos capas (Fig. 2). La capa interna que está cerca a la membrana plasmática está compuesta por quitina y  $\beta$ - glucanos ( $\beta$ -1,3 glucano y  $\beta$ -1,6 glucano). Tanto la quitina como los  $\beta$ -1,3 glucanos son polisacáridos estructurales que le dan fuerza y forma a la pared celular, los  $\beta$ -1,6 glucanos actúan como moléculas enlazadoras entre el glicosilfosfatidilinositol (GPI) y los  $\beta$ -1,3 glucanos (Ruiz- Herrera et al., 2006). La quitina representa del 1-2% del peso seco en las levaduras, los  $\beta$ -1,3 glucanos son componentes de pared muy abundantes representando alrededor del 40% del peso seco y los  $\beta$ -1,6 glucanos solamente el 20% del peso seco (Pérez- Garcia et al., 2011). En la capa más externa de la pared celular se encuentran las mananas (del tipo *N*- y *O*-) que son modificaciones postraduccionales de proteínas de la pared celular, estas se hallan más

expuestas que los otros componentes y se caracterizan por estar menos estructuradas, por tener una menor permeabilidad y porosidad (Gow y Hube, 2012).



**Figura 2.** Estructura y composición de la pared celular de *C. albicans* (Imagen obtenida de Gow et al., 2012).

### 1.3 Glicosilación de proteínas (*N*- y *O*- glicosilación)

La capa más externa de la pared celular de *C. albicans* está compuesta por varias manoproteínas que están implicadas en la adhesión del patógeno al hospedero. La síntesis de éstas es llevada a cabo por un proceso llamado glicosilación, el cual es una modificación covalente que modula la estructura y función de las proteínas de secreción (Herscovics y Orlean, 1993).

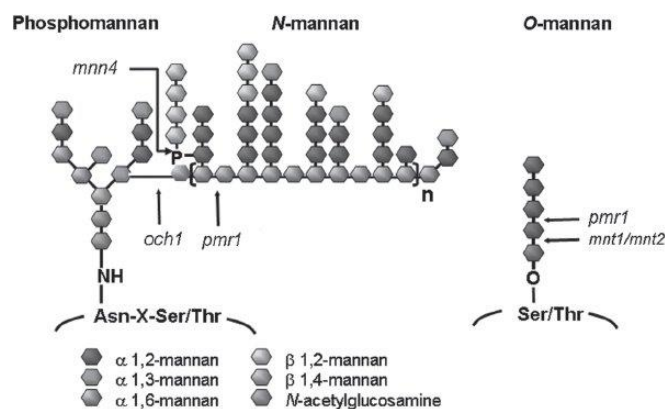
Una vez que se lleva a cabo la modificación covalente de las proteínas, por la adición de uno o más residuos de azúcar, estas adquieren propiedades fisicoquímicas distintas y su función puede ser alterada. En los hongos como *C. albicans*, las glicoproteínas forman parte importante de la pared celular, realizando un papel clave en el mantenimiento de su forma e integridad, así como en la adhesión a superficies y formación de biopelículas (Mora-Montes et al., 2009). Se ha reportado que tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en *C. albicans* la glicosilación de proteínas es una modificación esencial para la viabilidad celular (Spiro 2000). El proceso de glicosilación se inicia en el retículo endoplásmico (RE) como un evento postraduccional y se divide en dos rutas principales, *N*- y *O*-glicosilación.

#### 1.3.1 *N*-Glicosilación

Debido a que las glicoproteínas son el primer punto de contacto con las células del hospedero, la glicosilación resulta ser muy importante para el establecimiento del proceso infeccioso y por tanto para la virulencia. La *N*-glicosilación comienza en el RE, donde el precursor  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  ( $\text{G}_3\text{M}_9$ ) se transfiere del donador dolicol-pirofosfato (Dol-PP), a un residuo de asparagina, dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (Fig. 3), por acción del complejo enzimático oligosacaril transferasa (OST) (Herscovics y Orlean, 1993). Una vez que se ha unido a la proteína, el precursor  $\text{G}_3\text{M}_9$  es modificado por glicosil hidrolasas, en primer lugar, el residuo externo de glucosa es removido por la acción de la  $\alpha$ -glucosidasa I, posteriormente la  $\alpha$ -glucosidasa II remueve los dos residuos restantes de glucosa y finalmente se elimina un residuo de manosa por la acción de una  $\alpha$ 1,2-manosidasa, para la generación del oligosacárido  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  ( $\text{M}_8$ ). Posteriormente, las proteínas son transportadas al aparato de Golgi (AG) donde el proceso de glicosilación continua, el  $\text{M}_8$  es procesado por manosiltransferasas que añaden residuos de manosa para la formación de las *N*- mananas (Herscovics y Orlean, 1993).

### 1.3.2 *O*-Glicosilación

La *O*-glicosilación es realizada de manera similar, pero las modificaciones postraduccionales se llevan a cabo sobre un residuo de Ser/Thr (Fig. 3). La ruta comienza con la incorporación de una  $\alpha$ -manosa por la acción de las enzimas proteína- manosiltransferasas del RE. Posteriormente, la cadena es extendida hasta 5 residuos de  $\alpha$ 1,2-manosas por dos de los miembros de la familia *KRE2/MNT1* de manosiltransferasas del AG (Mnt1 y Mnt2) (Munro et al., 2005; Díaz- Jiménez et al., 2012).

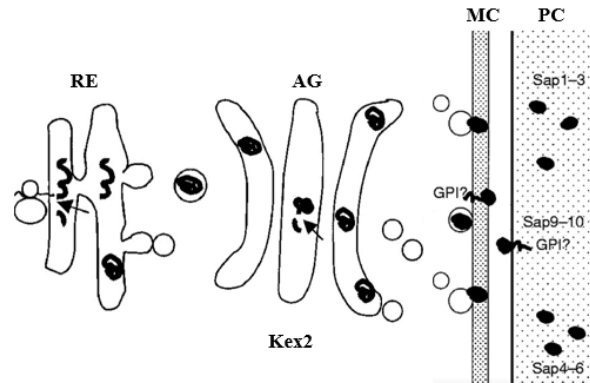


**Figura 3.** Estructura de las *N*- y *O*-glicanas de *C. albicans* (Sheth et al., 2011).

#### 1.4 Ruta secretora de Kex2

El proceso de la secreción de proteínas esta mediado por una variedad de mecanismos de control de calidad que operan en el RE y en otros compartimentos que participan en esta ruta, garantizando la regulación y el plegamiento correcto de las proteínas (Pakdel y Blume, 2018). Una pauta general es que solo las proteínas que logran ser seleccionadas bajo un estricto proceso pueden ser transportadas a sus organelos y compartimentos correspondientes, como endosomas, lisosomas y membrana plasmática. Si algo falla en este proceso de selección, el producto debe ser degradado (Ellgaard et al., 1999; Arvan et al., 2002). Las proteínas deben dirigirse al organelo correcto para su función, modificación o destrucción (Bowers y Stevens, 2005).

Kex2 es una proteasa similar a subtilisina que se localiza en el AG y que se encuentra implicada en esta ruta de secreción, además, parece ser necesaria para el tránsito entre el AG y los endosomas. Kex2 recibe señales de retención de las proteínas conocidas como TLS2 (secuencia de localización de red *trans*- Golgi) (Redding et al., 1996). El AG es un centro de transporte retrógrado y anterógrado asociado con glicosiltransferasas que mantienen la distribución de proteínas (Fig. 4). Kex2 realiza un ciclo entre la cara externa del AG y el compartimiento prevacuolar donde procesa proteínas que están involucradas en el mantenimiento y remodelación de la pared celular, esta proteasa permite también que se lleve a cabo la proteólisis, proceso importante para la maduración de proteínas y para la activación de enzimas (Hube y Naglik, 2001; Staniszewska et al., 2016). Además, Kex2 interviene en el mecanismo de transporte retrogrado y anterógrado de proteínas, este proceso que se lleva a cabo desde el AG hasta el RE y viceversa, es ampliamente conocido para el correcto funcionamiento de la vía de secreción de proteínas (Spang, 2013; Zhao et al., 2019). El flujo retrógrado asegura el retorno de las proteínas plegadas de manera incorrecta, para ser nuevamente censadas y enviadas posteriormente al AG. Este proceso es altamente selectivo y permite un adecuado sistema de reciclaje y de desecho de proteínas (Cole et al., 1998; Spang 2013), siendo esencial para muchos eventos celulares.



**Figura 4.** Localización de la proteasa Kex2 en la ruta de secreción de proteínas. RE (retículo endoplásmico), AG (aparato de Golgi), MC (membrana celular), PC (pared celular) (Imagen obtenida y modificada de Hube y Naglik, 2001).

### 1.5 Función de Kex2 en *C. albicans*

Kex2 es una proteasa dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que actúa en la vía secretora y que se encuentra dentro de la familia conservada de las serín proteasas, es decir hidrolasas que degradan enlaces peptídicos y proteínas, que poseen en su centro activo un aminoácido serina esencial para la catálisis enzimática (Newport y Agabian, 1997). Kex2 se encarga de romper el enlace peptídico entre los aminoácidos Lisina-Arginina (Lys-Arg) y Arginina-Arginina (Arg-Arg) (Newport y Agabian, 1997; Bader et al., 2008). La escisión de preproteínas en el lado carboxilo terminal de los residuos de Lys-Arg es característica de esta familia de tipo subtilisina a la que pertenece Kex2. La escisión del polipéptido generalmente tiene lugar intracelularmente, antes de la secreción, a finales del AG, lo que facilita la entrada posterior de las proteínas maduras hacia las vesículas de secreción y, por lo tanto, representa un paso clave en las vías de secreción en levaduras. Los eucariotas poseen una gran familia de estas proteasas reguladoras, denominadas prohormonas o preproteínas convertasas, los hongos como *C. albicans* albergan un gen único que codifica una serin proteasa de tipo subtilisina con esta actividad (Monod et al., 1994; Naglik et al., 2003; Granger, 2018).

Kex2 tiene tres sitios de unión a aminoácidos, el sitio P1, P2 y P4. En el sitio P1 solo se acepta el aminoácido arginina, el P2 lisina y en el P4 leucina (u otro aminoácido alifático). La caracterización bioquímica de Kex2 sugiere que el sitio P1 es el determinante primario de especificidad, mientras que P2 y P4 son importantes desde el punto de vista energético



(Holyoak et al., 2003). Kex2 es la principal proteasa en la vía secretora de *C. albicans* debido a que tiene especificidad de reconocimiento y sitios de escisión preferidos, lo que le confiere gran importancia en este proceso (Granger, 2018).

Kex2 contribuye a la activación de algunos factores de virulencia como secreción de proteasas que son esenciales para la integridad de la superficie celular y el polimorfismo del hongo (Newport y Agabian, 1997; Staniszewska et al., 2016). Además, está implicada en la modificación postraducciona de enzimas hidrolíticas y recientemente se ha descubierto que esta proteasa también participa en la formación del péptido candidalísina, un fragmento peptídico de la enzima convertidora de endotelina 1 (Ece1) que es necesaria para el ingreso de las hifas a través de las barreras epiteliales de las células del hospedero (Moyes et al., 2016; Richardson et al., 2018).

## **1.6 Reconocimiento inmune de *C. albicans***

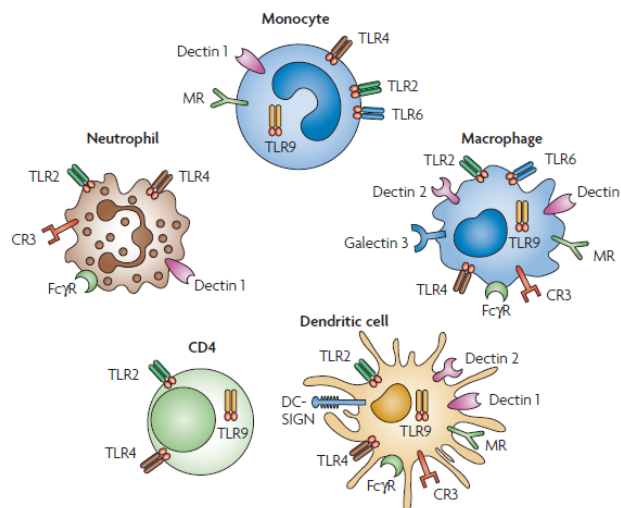
En individuos inmunocompetentes, el sistema inmune y la microbiota son los encargados de controlar la población de *C. albicans* presente en las mucosas del hospedero (Mora- Montes et al., 2009). Trabajos previos han demostrado que la inmunidad innata es la primera línea de defensa que el hospedero utiliza para combatir las infecciones causadas por *C. albicans* (Netea et al., 2008; Mora- Montes et al., 2009). Este reconocimiento es llevado a cabo a nivel de la pared celular, que, al ser la capa más externa, y estar conformada por elementos que no son sintetizados por las células del hospedero, contiene la mayoría de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en *C. albicans*. La tarea de reconocer a un patógeno invasor y activar la respuesta del hospedero se lleva a cabo mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Fig. 5), que reconocen las firmas químicas microbianas conservadas llamadas PAMPs (Mora- Montes et al., 2011; Pérez- García et al., 2011; Gow y Hube, 2012).

Se han identificado cuatro tipos principales de PRRs receptores tipo Toll (TLRs), receptores de lectina de tipo C (CLRs), receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) y receptores similares al gen I (RIGI) inducible por ácido retinoico (RLI),

de los cuales dos son de importancia en el reconocimiento de hongos, en especial de *C. albicans*: los TLRs y CLR (Dennehy et al., 2008; Netea et al., 2008; Zheng et al., 2015).

Los TLRs reconocen diversas estructuras conservadas de microorganismos. Varios TLRs han sido implicados en el reconocimiento de componentes fúngicos, TLR2 reconoce fosfolipomananas, TLR4 reconoce *O*-mananas, TLR6 está involucrado en el reconocimiento de zimosano y TLR9 detecta el ADN fúngico (Netea et al., 2008). Los receptores de lectina de tipo C son principalmente receptores unidos a la membrana que reconocen las estructuras de polisacáridos de *C. albicans*, la dectina-1 reconoce los  $\beta$ -1,3-glucanos, mientras que el receptor de manosa (MR) y DC-SIGN reconocen las *N*-mananas. El receptor TLR2 en cooperatividad con dectina-1 reconocen la  $\beta$ 1,3-glucano (Netea et al., 2008; Dennehy et al., 2008). Estudios previos en *C. albicans* han demostrado que hay otras lectinas que tienen un papel importante en el reconocimiento de este patógeno, dectina-2, dectina-3 y lectina de tipo C inducible por macrófagos (Mincle), las cuales reconocen  $\alpha$ -mananas (Drummond et al., 2011).

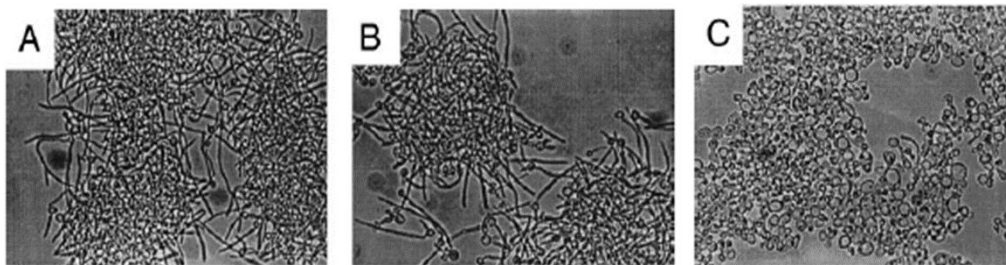
Los estudios sobre PAMPs han revelado que las estructuras de la PC de *C. albicans* son reconocidas por el sistema inmune mediante diversos receptores presentes en macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DC), células CD4<sup>+</sup> y monocitos (Fig. 5). Solo en la última década ha quedado claro que el sistema inmune innato no solo reconoce específicamente varias clases de microorganismos, sino que también inicia y modula las respuestas adaptativas posteriores que son mediadas por las células T y las células B (Netea et al., 2008).



**Figura 5.** Células del sistema inmune y PRRs involucrados en el reconocimiento de *C. albicans*. TLR (receptores tipo Toll), MR (receptor de manosa), CR3 (receptor del complemento 3), Fc $\gamma$ R (receptor gamma Fc), DC-SIGN (molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas) (Imagen obtenida de Netea et al., 2008).

### 1.7 Antecedentes

En trabajos previos, como el de Newport y Agabian en 1997, se identificó y caracterizó genéticamente la proteasa similar a Kex2 de *C. albicans*, reportando que en la mutante del gen *KEX2* de *C. albicans* se vio afectada la morfogénesis del hongo. Cuando éste se cultivó en condiciones de inducción de formación de hifas, la cepa mutante fue incapaz de generarlas, además se dieron cuenta que las células de levadura de la mutante tendían a ser más grandes y se agregaban entre sí (Fig. 6). Las mutantes carentes de Kex2 procesaron de manera aberrante una aspartil proteasa secretada (SAP), lo que conduce a una secreción disminuida de la misma enzima (Newport y Agabian, 1997). Esta incapacidad para procesar SAPs o para la producción de hifas afectó la patogénesis y virulencia del hongo (Chambers et al., 1993; Newport y Agabian, 1997).



**Figura 6. Morfología de las cepas WT, *kex2Δ+KEX2* y *kex2Δ* en condiciones de inducción de hifas. a.** Cepa WT. **b.** Cepa reintegrante *kex2Δ+KEX2*. **c.** Cepa mutante *kex2Δ*. (Imagen obtenida de Newport y Agabian, 1997).

La proteasa Kex2 de *C. albicans* participa en vías que conducen a la expresión de dos de los factores de virulencia mejor caracterizados del organismo: cambios fenotípicos y secreción de enzimas hidrolíticas (Newport et al., 2003). La cepa mutante en *KEX2* tiene atenuada la virulencia en un modelo de ratón de infección sistémica. En la candidiasis sistémica, donde el sitio primario de patogénesis es el riñón, las cepas mutantes son incapaces de invadir la matriz renal, comparado a las cepas de tipo parental (Newport et al., 2003). Además, se ha reportado que la mutante nula de *KEX2* es incapaz de salir de los fagolisosomas de macrófagos, lo cual podría explicar la disminución de la virulencia. (Newport et al., 2003).

Se sabe también que los riñones de ratones infectados con mutantes carentes de Kex2 sufren menos daño en el tejido, comparado al que sufren con cepas de tipo parental (Newport et al., 2003).

Sin embargo, la base molecular de la morfología atípica de la mutante carente de Kex2 en *C. albicans* no está clara, pero las posibilidades incluyen un defecto en la formación de la pared celular y un efecto sobre la polaridad celular. Se sabe que en *C. albicans*, Kex2 es importante para el procesamiento de una exo- $\beta$ -(1, 3)-glucanasa y Hwp1 que codifica para una proteína de la pared celular hifal, con funciones de adhesión y virulencia (Chambers et al., 1993; Staab et al., 1996; Newport y Agabian, 1997). En *S. cerevisiae*, se han descrito componentes de la pared celular que requieren de un procesamiento dependiente de Kex2, la ausencia de Kex2 en este hongo genera incapacidad para esporular (Basco et al., 1996). En *Aspergillus oryzae* se ha sugerido que las aspartil proteasas secretoras desempeñan un papel directo en la formación de la pared celular, quizás reorganizando la arquitectura de la hifa en crecimiento (Mizutani et al., 2004).

En otras especies como *Yarrowia lipolytica* y *S. cerevisiae* la ausencia de Kex2 también genera defectos morfológicos en la formación de hifas, las células que se forman son más grandes y alargadas de lo habitual y permanecen unidas después de la gemación (Enderlin y Ogrydziak, 1994). Las deformaciones en las células de *S. cerevisiae* parecen estar asociadas con patrones anormales de deposición de quitina, como se ha observado con tinciones de blanco de calcofluor, compuesto que se une a la quitina. En otro patógeno fúngico, como *Candida glabrata*, las mutantes de Kex2 son hipersensibles a blanco de calcofluor (Komano y Fuller, 1995; Bader et al., 2008).

Según Bader y colaboradores (2001), mutantes de Kex2 en *C. glabrata* mostraron un crecimiento con agregados celulares, y además estas mutantes eran hipersensibles a algunos medicamentos antimicóticos que atacan la membrana celular, como anfotericina B y algunos azoles. En modelos *in vitro* de candidiasis oral, las mutantes de Kex2 mostraron daño tisular reducido en comparación con otras cepas. Estos datos sugieren que Kex2 en *C. glabrata* está involucrado en el procesamiento de proteínas que son esenciales para la integridad de la superficie celular (Brown y Gow, 1999; Bader et al., 2001).

Estos resultados, en conjunto, indican que la interrupción de la función de Kex2 tiene efectos pleiotrópicos que pueden afectar la capacidad del organismo para colonizar e invadir tejidos. El fenotipo complejo de las mutantes de delección refleja un papel importante para Kex2 en una amplia gama de procesos celulares (Newport y Agabian, 1997).

## **II. Justificación**

*Candida albicans* es la especie patógena humana más común que puede causar un amplio espectro de enfermedades que incluyen infecciones de la piel, mucosas y sistémicas. Las enzimas hidrolíticas liberadas por este patógeno juegan un papel importante en la adherencia, penetración del tejido, invasión y destrucción de los tejidos del hospedero. Las enzimas hidrolíticas más importantes son las proteasas que tienen que ser modificadas en el AG para su actividad.

En *C. albicans*, la serín proteasa Kex2 residente del AG desempeña un papel clave en la modificación de proteasas secretables, proteínas involucradas en la formación de la pared celular y mecanismos de remodelación, la pared celular participa en el reconocimiento y la modulación del sistema inmune del hospedero y permite adherirse a las superficies celulares. Considerando la función de la proteasa Kex2, es de nuestro interés determinar cambios en la pared celular y en el reconocimiento inmune del hongo en cepas mutantes de este gen.

### **III. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el papel de la proteasa Kex2 en la composición de la pared celular y reconocimiento inmune de *C. albicans*

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar la pared celular de la mutante *kex2Δ* de *C. albicans*
- Dilucidar el reconocimiento de células del sistema inmune innato a mutantes *kex2Δ* de *C. albicans*
- Establecer la participación del producto del gen *KEX2* en la virulencia de *C. albicans*

### **IV. Hipótesis**

El fenotipo aberrante de *kex2Δ* y el papel pleiotrópico de la proteasa Kex2 afecta la composición de la pared celular de *C. albicans* y además su interacción con células del hospedero.

## V. Materiales y métodos

### 5.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este estudio fueron: NGY152, cepa Ura<sup>+</sup> derivada de la cepa SC5314 CAI-4/CIp10, la cual se denominó cepa parental (WT); CNA1, una mutante Ura<sup>+</sup> con el genotipo *kex2Δ* + CIp10-*KEX2* y CNA3, una mutante nula Ura<sup>+</sup> *kex2Δ/ kex2Δ*, ambas derivadas de la cepa SC5314 de *C. albicans* y con su genotipo previamente caracterizado (Tabla 1) (Newport y Agabian, 1997; Brand et al., 2004).

Las células de *C. albicans* se crecieron a 28 °C en medio Sabouraud (1% [p/v] de peptona carne y peptona de caseína, 4% [p/v] de glucosa). Para medio sólido Sabouraud, se suplementó con agar bacteriológico al 2% (p/v).

**Tabla 1.** Cepas de *C. albicans* usadas en este trabajo

Cepas	Origen	Genotipo
NGY152	Derivado de CAI-4/CIp10	<i>ura3Δ-iro1Δ::imm434/Δura3Δ-iro1Δ::imm434</i> , <i>RPSI/rps1Δ::CIp10</i>
CNA1	Derivado de CNA3	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> , <i>kex2Δ::hisG/ kex2Δ::hisG</i> , <i>RPSI/rps1Δ::Clp10-KEX2</i>
CNA3	Derivado de CAI-4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> , <i>kex2Δ::hisG/ kex2Δ::hisG</i> , <i>RPSI/rps1Δ::Clp10</i>

### 5.2 Análisis de la composición de la pared celular

- **Hidrólisis ácida**

Para determinar cambios en el porcentaje de carbohidratos de la pared celular de *C. albicans*, se llevó a cabo el ensayo de hidrólisis ácida (Mora-Montes et al., 2007). Para ello, se obtuvieron células de levadura de un cultivo en fase exponencial (5 h), la pastilla de éstas se obtuvo por centrifugación a 3500 x g durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente

se procedió a hacer la ruptura de las células en un homogeneizador Precellys 24 (Bertin) con ocho ciclos de 90 segundos a 6000 rpm, con períodos de reposo de 20 segundos en hielo entre ciclos. Luego, el homogeneizado de las células se centrifugó a  $3500 \times g$  durante 5 min a temperatura ambiente, la pastilla se lavó cinco veces con 10 mL de NaCl 1M y posteriormente se almacenó. Para llevar a cabo la liberación de proteínas intracelulares, las células fueron tratadas con 5 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3 M, EDTA 1 mM (pH 7.5) y Tris 50 mM. Una vez realizado este tratamiento, la suspensión se llevó a calentamiento durante 10 min a  $100^\circ\text{C}$  y posteriormente se realizaron lavados con agua destilada para eliminar restos de la solución. Las muestras se liofilizaron, las paredes celulares se hidrolizaron con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M y se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) con un sistema Dionex (Thermo Fisher Scientific) equipado con una columna CarboPac PA-1. La separación de carbohidratos se realizó con un gradiente de acetato de sodio 150 mM NaOH (flujo de 0.5 mL/min) de la siguiente manera: 0-5 min = 45-75 mM NaOH, 5.1-15.0 min = 90 mM NaOH, 15.1- 17.0 min = 105 mM NaOH + 75 mM acetato de sodio, 17.1- 20.0 min = 75 mM NaOH + 150 mM acetato de sodio y de 20.1- 25.0 min = 45 mM NaOH, a una temperatura de columna de  $25^\circ\text{C}$  (Mora-Montes et al., 2007; Pérez- García et al., 2016).

- **Hidrólisis alcalina**

Para la cuantificación de las proteínas de pared celular, el procedimiento que se siguió es similar al mencionado anteriormente para la hidrólisis ácida, la variante para esta hidrólisis es que las muestras de las paredes celulares previamente liofilizadas se hidrolizan con NaOH 1 N. Para determinar el total de proteínas se utilizaron alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras y éstas fueron analizadas usando el ensayo de proteínas DC<sup>TM</sup> (compatible con detergentes) (Bio-Rad) (Mora- Montes et al., 2007).

- **Ensayo de unión al colorante azul Alciano**

El contenido de fosfomananas de la pared celular se determinó por la habilidad de las células de *C. albicans* para unir el colorante catiónico azul Alciano (Hobson et al., 2004). Las células del hongo se crecieron en medio Sabouraud a  $28^\circ\text{C}$ , en agitación (120 rpm) durante 18 h, se



tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  y se inocularon en matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL del medio de cultivo Sabouraud, incubándose a las mismas condiciones durante 5 h para asegurar que las células alcanzaran la fase exponencial. Posteriormente, se sedimentaron por centrifugación a 3500  $\times g$  durante 5 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con agua desionizada y se ajustó la concentración celular a  $\text{D.O.}_{600\text{ nm}} = 0.2$ . Se resuspendieron en 1 mL de una solución de azul de Alciano de 30  $\mu\text{g} / \text{mL}$  en HCl 0.02 M (Sigma- Aldrich) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Pasado este tiempo las células se centrifugaron y al sobrenadante se le determinó la  $\text{D.O.}_{620\text{ nm}}$ . Los resultados para este ensayo se calcularon a partir de una curva de calibración, cuantificando la cantidad de azul de Alciano no unido a las células, lo que da una medida indirecta del colorante retenido por la pared de la célula (Hobson et al., 2004).

- **Análisis del contenido de mananas: extracción de *N*- y *O*-mananas**

Para determinar cambios en los procesos de manosilación de la pared celular se llevó a cabo la eliminación de *N*- y *O*-mananas. A partir de un cultivo de 18 h se tomaron 500  $\mu\text{L}$  que posteriormente fueron inoculados en 50 mL de medio Sabouraud, incubándose por 5 h a 28  $^{\circ}\text{C}$  y en agitación a 120 rpm. Posteriormente, se recuperó la pastilla mediante centrifugación y se realizaron dos lavados con agua desionizada. Todas las células fueron ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL.

Para la eliminación de las *N*- mananas, a la pastilla obtenida se le agregaron 24 mL de agua desionizada estéril, 1 mL de acetato de sodio (NaOAc) 3 M pH 5.2 y 25 U de Endoglicosidasa H (New England Biolabs). La muestra se incubó 18 h a 37  $^{\circ}\text{C}$  con agitación, pasado el tiempo de incubación se centrifugó la muestra durante 5 min a 1700  $\times g$  y se recuperó el sobrenadante, este se ajustó a pH 7.0 con NaOH 2 M, se congeló la muestra, se liofilizó y posteriormente se guardó a -18  $^{\circ}\text{C}$  (Diaz- Jiménez et al., 2012; Navarro- Arias et al., 2016).

Para eliminar las *O*-mananas, la pastilla celular fue tratada con 20 mL NaOH 0.1 M y llevada a incubación durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación suave, pasado el tiempo de incubación se recuperó por centrifugación el sobrenadante y este fue ajustado a pH 7.0 con HCl 100 mM, se congeló la muestra, se liofilizó y se guardó a -18  $^{\circ}\text{C}$  (Diaz- Jiménez et al., 2012; Navarro- Arias et al., 2016).

Una vez liofilizadas ambas muestras, se procedió a realizar la cuantificación de azúcares por el método de fenol-ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), para ello se realizó una curva de calibración por duplicado usando manosa como estándar. A partir de una solución de manosa de 1 mg/mL se hicieron diluciones seriadas para ajustar la curva a las concentraciones necesarias: 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL de manosa en un volumen de 100  $\mu\text{L}$ , posterior a ello se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de fenol y 2.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, se agitó y se incubó durante 15 min en ausencia de luz. El tratamiento para todas las muestras fue el mismo, lo único que varió fue la adición de 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras, de igual manera para leer el blanco se reemplazaron los 100  $\mu\text{L}$  de muestra por 100  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. Posteriormente, se realizó la medición de la curva y de las diferentes muestras a una absorbancia de 490 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Lozoya- Pérez et al., 2019).

- **Ensayo de tinción con fluorocromos**

Para determinar cambios en los polisacáridos estructurales de la pared celular se realizó una tinción con fluorocromos. Para ambos ensayos se utilizaron células vivas y células inactivadas por calor (HK), en ambas condiciones las células se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL. Para llevar a cabo la inactivación por calor las células se resuspendieron en 1 mL de tampón fosfato salino, por sus siglas en inglés PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 7.4) y se llevaron al Termomixer durante 1 h a 56 °C (Mora-Montes et al., 2011). Para asegurarnos que las células realmente estuvieran inactivadas por calor, se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de la muestra y se incubó a 28 °C durante dos días en una placa de agar Sabouraud, observándose ausencia del crecimiento celular.

Para la tinción de quitina, las células fueron tratadas con 100  $\mu\text{L}$  de isotiocianato de fluoresceína acoplada a aglutinina germen de trigo (WGA- FITC) (1 mg/mL) (Sigma), las células fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave y protegidas de la luz, pasado el tiempo de incubación las células se centrifugaron a  $9485 \times g$  durante 5 min y posteriormente se lavó la pastilla dos veces con PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS para ser examinadas bajo un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioscope- 40 y una cámara AxioCam MRc) (Marakalala et al., 2013).

Para la tinción de  $\beta$ -1,3-glucanos, las células fueron tratadas con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IgG Fc-Dectina-1 quimera durante 1 h a temperatura ambiente y cubiertas de la luz, seguido se realizó una incubación con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpos de asno anti-FC IgG acoplados a FITC durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a  $9485 \times g$  durante 5 min, la pastilla se lavó dos veces con PBS y las muestras se examinaron por microscopía de fluorescencia usando un microscopio Zeiss Axioscope-40 y una cámara Axiocam MRc. La cuantificación de fluorescencia para 300 células se calculó utilizando Adobe Photoshop CS3 y mediante la siguiente fórmula:  $[(\text{total de píxeles verdes} - \text{píxeles verdes de fondo}) \times 100] / \text{píxeles totales}$  (Graham et al., 2006; Pérez- García et al., 2016).

- **Ensayo de cambio en la movilidad electroforética de Hex1 ( $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa)**

Para determinar cambios en el proceso de *N*-glicosilación se realizó un ensayo de zimograma, esperando observar cambios en la movilidad electroforética de la enzima hidrolítica Hex1. Para inducir la actividad de esta enzima, las células se incubaron en medio SC (0.7% [p / v] YNB con aminoácidos, glucosamina 25 mM) durante 24 h a 28 °C con agitación, estas se recogieron por centrifugación y la pastilla se resuspendió en Tris- HCl 10 mM (pH 6.8), las células se rompieron mecánicamente con un homogeneizador Precellys 24, como se describió anteriormente. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó durante 10 min a  $1700 \times g$ , se recuperó el sobrenadante y se liofilizó. Una vez concentrada la muestra, esta fue resuspendida en el buffer de Tris-HCl y se procedió a cuantificar la cantidad de proteína usando el ensayo de proteínas DC<sup>TM</sup> (Bio-Rad). Todas las muestras fueron ajustadas a una misma concentración de proteína (100  $\mu\text{g}$ ), se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% que se encontraba bajo condiciones nativas y este se dejó migrar durante 9 h a 70 V. La actividad de N-acetilhexosaminidasa se determinó incubando con 4-metilumbeliferil N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (Sigma) 0.4 mM en solución amortiguadora de ácido cítrico-KOH 0.1 M (pH 4.5) durante 30 min a 37 °C. La actividad enzimática se reveló exponiendo el gel a la luz UV (Hernández- Cervantes et al., 2012). La deglicosilación de las muestras se llevó a cabo agregando 1 U de Endo-H durante 16 h a 37 °C, como se mencionó anteriormente.

- **Ensayo de susceptibilidad a agentes perturbadores de pared celular**

Para observar defectos en la síntesis u organización de la pared celular se utilizaron diferentes agentes perturbadores, como el rojo congo, blanco de calcofluor, higromicina B y SDS. Las cepas de *C. albicans* fueron expuestas a diferentes agentes perturbadores para observar susceptibilidad a estos, utilizando un método de microdilución en placas de 96 pozos. Las levaduras se cultivaron hasta que alcanzaron la fase exponencial, se centrifugaron a 1700 x g durante 5 min para recuperar la pastilla. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 1 mL de medio Sabouraud y se ajustaron las células a una  $D.O_{600nm} = 0.05$ . Se prepararon las diferentes concentraciones de los agentes perturbadores, los cuales fueron diluidos en medio Sabouraud: para blanco de calcofluor y rojo congo se partió de una concentración de 2 mg/mL, y se hicieron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 200, 100, 50 y 25 µg/mL, para higromicina B se partió de una dilución concentrada de 10 mg/mL para obtener concentraciones de 75, 50, 25 y 20 µg/mL y para SDS 1%, se hicieron diluciones para obtener porcentajes de 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 %. Una vez obtenidas las diluciones de los agentes perturbadores y de las células de levadura se procedió a agregar las muestras a una placa de 96 pozos. De los agentes perturbadores se agregaron 200 µL a cada pozo y de las células de levadura 20 µL. Las placas se incubaron a 28 °C durante 18 h, y pasado el tiempo de incubación se midió la  $D.O_{600 nm}$ . Como controles del experimento, se incluyeron levaduras sin el agente perturbador (Bates et al., 2005).

- **Ensayo de susceptibilidad a antifúngicos**

Para determinar si se afecta la sensibilidad de las diferentes cepas de *C. albicans* a antifúngicos comerciales, se procedió a realizar el ensayo de microdilución para levaduras, M27-A3, método estandarizado por el CLSI (Lacasa et al., 2007). Se preparó el medio de cultivo con RPMI 1640 suplementado con glutamina y sin bicarbonato de sodio, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.164 M (Sigma), ajustado a pH 7 y con 0.2 % de glucosa. La preparación de los antifúngicos se realizó de dos maneras: para los antifúngicos que son solubles en agua como el fluconazol se prepararon las concentraciones a ensayar comprendidas entre 64 y 0.12 µg/mL, utilizando como diluyente RPMI 1640 (10.4 g RPMI, 34.53 g tampón MOPS y 1 L agua destilada). Para los antifúngicos que son insolubles en agua como anfotericina B e itraconazol se prepararon las concentraciones requeridas para el ensayo que se encuentran entre 16 y 0.03 µg/mL, utilizando como diluyente

dimetil sulfóxido (DMSO). Para los antifúngicos solubles en agua a partir de la solución madre se preparó una serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente RPMI 1640, mientras que para los que no son solubles en agua se preparó una serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO. A cada uno de los pozos de la placa se le adicionaron 100  $\mu$ L del antifúngico. Para la preparación del inóculo, se puso un cultivo de 5 h de *C. albicans* y con ayuda del espectrofotómetro a una D.O.  $_{530\text{ nm}}$  se ajustó la densidad óptica a 0.5 según la escala de McFarland, la cual tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$ -  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente, se realizó una dilución 1:1000 con medio RPMI y esta dilución fue la que se utilizó para inocular 100  $\mu$ L en las placas. Como control del experimento se utilizó medio RPMI. Una vez que se pusieron los antifúngicos correspondientes y el inóculo del hongo, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Pasado el tiempo de incubación se midió la absorbencia de las placas a 490 y 530 nm (Lacasa et al., 2007).

### **5.3 Reconocimiento inmune de mutantes de *KEX2* de *C. albicans* por células de la inmunidad innata**

- **Consideraciones éticas**

En este estudio el uso de células primarias humanas fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Guanajuato (17082011). Se colectaron células humanas de adultos voluntarios sanos, después de que se proporcionó información acerca del estudio y una vez que se obtuvo el consentimiento informado por escrito.

- **Preparación de células de levadura para las interacciones con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y macrófagos.**

Se prepararon células de levadura en diferentes condiciones: vivas, HK,  $\beta$ - eliminadas,  $\beta$ -eliminadas-HK, Endo H y Endo H-HK todas se ajustaron a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/mL. El procedimiento para llevar a cabo la inactivación por calor fue explicado previamente. Para obtener células  $\beta$ -eliminadas se agregó NaOH 0.1 M, estas se dejaron 18 h en incubación a temperatura ambiente y pasado el tiempo de incubación se ajustaron con

PBS a la concentración correspondiente. Para las células  $\beta$ - eliminadas-HK, primero se realizó la inactivación por calor a 56 °C y posteriormente la  $\beta$ - eliminación. Para la condición con Endo H se agregaron a las células 50  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, 1  $\mu$ L de Endo H y 1 mL de agua desionizada, se dejaron incubando toda la noche a 37 °C en agitación. Posterior al tiempo de incubación, las células se ajustaron nuevamente a la concentración requerida. Y para la última condición Endo H-HK primero se realizó el tratamiento de inactivación por calor y posteriormente el de Endo H (Lozoya- Pérez et al., 2019).

- **Aislamiento y estimulación de PBMCs humanos**

Se tomó una muestra sanguínea de 40 mL de seis donadores sanos voluntarios, por punción venosa, en tubos que contenían EDTA. La sangre contenida en los tubos fue transferida a tubos falcon de 50 mL nuevos y estériles, libres de pirógenos, hasta llegar a un volumen de 35 mL, completando hasta esa marca con PBS estéril a temperatura ambiente. Posteriormente, en otro tubo falcon de 50 mL se agregaron 15 mL de Ficoll- Histopaque-1077 (Sigma) a temperatura ambiente, la muestra sanguínea fue vertida lentamente sobre el Ficoll de tal manera que se formaran dos fases, quedando el Ficoll en la parte inferior y la sangre sobre este. Después, se centrifugó a temperatura ambiente a  $874 \times g$  durante 20 min, quitándole el freno a la centrífuga (Pérez- García et al., 2016; Lozoya- Pérez et al., 2019).

Pasados los 20 min se recuperaron inmediatamente los PBMCs, ya que el Ficoll puede ser tóxico para las células y podría afectar el experimento. Las células recuperadas se colocaron en tubos falcon y se les adicionó PBS estéril frío (4 °C) para un volumen final de 50 mL, se llevó a centrifugación a 4 °C a  $874 \times g$  durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, se agitó suavemente la pastilla y se agregó nuevamente PBS frío hasta un volumen final de 30 mL, se centrifugó a 4 °C a  $874 \times g$  por 10 min. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 5 mL de RPMI 1640. Se tomaron 5  $\mu$ L de cada suspensión celular y con 95  $\mu$ L del colorante azul de metileno al 0.1 % se tiñeron los PBMCs. Las células se cuantificaron en la cámara de Neubauer, y posteriormente fueron ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^6$  PBMC/mL con RMPI 1640 (complementado con glutamina 2 mM, piruvato 0.1 mM y gentamicina 0.05 mg/mL; todos los reactivos de Sigma-Aldrich Co) (Lozoya- Pérez et al., 2019).

- **Interacción de PBMCs con células de *C. albicans***

Las interacciones PBMC-levadura se llevaron a cabo en placas de microtitulación estéril de 96 pozos, para cultivos celulares, que contenían alícuotas de 100  $\mu$ L de  $5 \times 10^6$  PBMC/mL y 100  $\mu$ L de  $2 \times 10^6$  células de levadura/mL. Las interacciones se incubaron durante 24 h a 37 °C con 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, al finalizar el tiempo de incubación las placas se centrifugaron durante 10 min a  $874 \times g$  a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes y se mantuvieron a -20 °C para posteriormente ser analizados mediante ensayos de ELISA (Pérez- García et al., 2016).

- **Diferenciación de PBMCs humanas a macrófagos**

Después del aislamiento de PBMC, se colocaron alícuotas de 1 mL que contenían  $5 \times 10^6$  células en RPMI suplementado con solución de penicilina- estreptomina al 1% (v/v) (PS, Sigma- Aldrich) en placas de 24 pozos de fondo plano, y se incubaron 2 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> (v/v). Pasado el tiempo de incubación, las células que no se lograron adherir a la placa se eliminaron suavemente realizando tres lavados con PBS estéril. Posteriormente se agregaron alícuotas de 1 mL de medio X-VIVO (Lonza) suplementado con PS al 1 % (v/v) y 10 ng/mL del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos recombinantes (Sigma) en cada uno de los pozos, y se incubó durante 7 días a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> (v/v), cada tres días se hizo recambio de medio (Pérez- García et al., 2016).

- **Interacción de macrófagos con células de *C. albicans***

Una vez obtenidos los macrófagos derivados de las PBMCs, estos fueron incubados con levaduras de *C. albicans* a una concentración de  $2 \times 10^7$  células/mL. Las condiciones de incubación para estas interacciones fueron de 2 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo de incubación se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C para posteriormente ser analizados mediante ensayos de ELISA.

- **Cuantificación de citocinas**

La concentración de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-10 se cuantificó por ELISA utilizando el kit ABTS ELISA (Peprotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. El sobrenadante de las interacciones de las PBMCs y macrófagos con levadura de *C. albicans* se analizaron para las tres citocinas.

- **Análisis de la fagocitosis de *C. albicans* por macrófagos humanos derivados de PBMCs**

Para el ensayo de fagocitosis se utilizaron células de levadura vivas e inactivadas por calor. Las células de levadura se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^7$  células/mL, se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 1 mg/mL de naranja de acridina (Sigma-Aldrich Co.) El exceso de colorante se eliminó lavando las células dos veces con PBS y se resuspendió a una concentración celular de  $3 \times 10^7$  células de levadura/mL. Las interacciones se realizaron en alícuotas de 800  $\mu$ L de DMEM (Sigma-Aldrich Co.), en placas de seis pocillos con una relación macrófago-levadura de 1: 6. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 ° C y 5% CO<sub>2</sub> (v/v) (González- Hernández et al., 2017). Luego, los macrófagos se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en 1.25 mg/mL de azul de Tripano. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un sistema MoFlo XDP (Beckman Coulter; Brea, CA, EE. UU.) que recolectó 50,000 eventos activados para células de macrófagos. Las señales fluorescentes se obtuvieron utilizando los canales FL1 (verde) y FL3 (rojo) previamente compensados con células de macrófagos sin ningún tipo de etiquetado. La fagocitosis de células de levaduras se analizó a partir de eventos en verde (etapa temprana del proceso de fagocitosis), tanto en verde como en rojo (etapa intermedia del proceso de fagocitosis) y rojo (células dentro de los fagolisosomas acidificados, considerados como etapa tardía del proceso de fagocitosis) (Hernández- Chavez et al., 2018; Lozoya- Pérez et al., 2019).

#### **5.4 Participación del gen *KEX2* en la virulencia de *C. albicans***

- **Ensayo de supervivencia en *Galleria mellonella***

Para determinar la virulencia de las cepas de interés se realizaron tres ensayos de infección y muerte con larvas de *G. mellonella*. Se inyectaron 10  $\mu$ L de levaduras contenidas en PBS directamente en el hemocele, en el último propodio posterior izquierdo a una concentración de  $2 \times 10^7$  células/mL con ayuda de una jeringa Hamilton con aguja calibre 26 (Pérez- Garcia et al., 2016; Navarro- Arias et al., 2016). Antes de la inyección, se desinfectó la zona del propodio con etanol al 70 %. Las larvas se mantuvieron a 28 °C y la supervivencia se monitoreó diariamente durante dos semanas. Cada grupo experimental contenía 40 larvas, los grupos experimentales fueron larvas inyectadas con levaduras de las tres cepas WT,



*kex2Δ+KEX2* y *kex2Δ* (10 por tratamiento), incluido un grupo control inyectado solo con PBS estéril. La pérdida de movimiento y la melanización del cuerpo se tomaron como signos de muerte animal. Los datos de sobrevivencia fueron graficados y analizados en el programa GraphPad Prism6 (Hernández- Chavez et al., 2018).

- **Determinación de las unidades formadoras de colonia (UFCs)**

Para evaluar que el efecto observado en los ensayos de virulencia corresponda a la dosis del patógeno, fueron determinadas las UFC. Tanto las larvas que sobrevivieron como las que murieron fueron disgregadas en 1 mL de PBS estéril, se realizó una dilución 1:100 y del sobrenadante obtenido se sembraron 100  $\mu$ L en placas de YPD con ampicilina. Las placas fueron incubadas a 28 °C y dos días después se realizó el conteo de las colonias de levaduras (Lozoya- Pérez et al., 2019).

- **Ensayo de citotoxicidad producida por *C. albicans* en hemocitos de *G. mellonella***

Para determinar la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se realizó el ensayo de citotoxicidad, utilizando como modelo biológico *G. mellonella*. Fueron inyectadas 60 larvas por cada uno de los experimentos, con levaduras de las diferentes cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo. Los tratamientos que se tuvieron en cuenta para este experimento fueron: larvas sin infectar, larvas inyectadas con PBS, larvas infectadas con la cepa WT, cepa *kex2Δ* y *kex2Δ+KEX2*. Fue necesario además preparar una solución fisiológica que incluía PBS y citrato de sodio al 3.8 %, para prevenir la coagulación de los hemocitos. Una vez inyectadas las larvas se dejaron incubando durante 24 h a 28 °C, pasado este tiempo se etiquetaron los tubos correspondientes, a los cuales se les agregó 900  $\mu$ L del anticoagulante. A cada una de las larvas se le realizó una punción en la pata izquierda del segundo par de patas y se tomaron 10  $\mu$ L de hemolinfa, los cuales fueron resuspendidos en el anticoagulante, este procedimiento se realizó con 10 larvas de cada uno de los tratamientos.

Una vez obtenida la hemolinfa se prepararon las diferentes condiciones: citotoxicidad máxima, muestra y citotoxicidad basal. Para la citotoxicidad máxima se adicionaron a una placa de microtitulación de 96 pozos 100  $\mu$ L de células de hemolinfa y 10  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis (Thermo Scientific), para la muestra se adicionaron 100  $\mu$ L de células de hemolinfa y 10  $\mu$ L de medio que para este caso fue el anticoagulante y para la citotoxicidad

basal se adicionaron 100  $\mu$ L del anticoagulante y 10  $\mu$ L de regulador de lisis. Las interacciones se pusieron por duplicado, la placa se dejó incubando durante 45 min a 37 °C, pasado el tiempo de incubación se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

Las muestras se prepararon de acuerdo con las instrucciones del ensayo de citotoxicidad KIT Pierce LDH de Thermo Scientific. Para la cuantificación del porcentaje de citotoxicidad 50  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra fueron transferidos a una placa de 96 pozos de fondo plano por duplicado, y se añadieron 50  $\mu$ L de la mezcla de reacción y se incubaron durante 30 min protegidos de la luz. Finalmente, se añadieron 50  $\mu$ L de la solución de paro y se mezcló suavemente. La absorbencia se midió a 490 nm y 680 nm. Para obtener la citotoxicidad se aplicó la fórmula: % de citotoxicidad = [(actividad de LDH tratada con compuesto - actividad de LDH espontánea) / (actividad máxima de LDH - actividad de LDH espontánea)]  $\times$  100. Para determinar el % de citotoxicidad, se restó la citotoxicidad de fondo (680 nm) del valor de citotoxicidad a 490 nm.

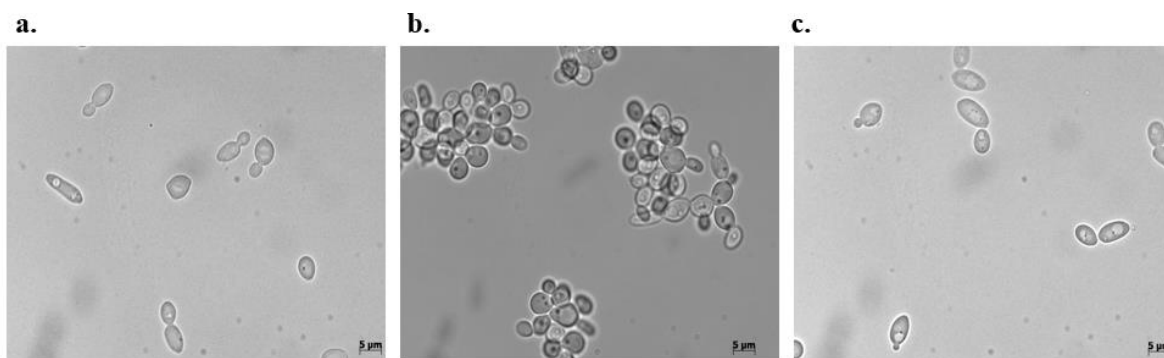
- **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6. Se evaluó la normalidad e independencia de los datos para determinar si las pruebas estadísticas a utilizar debían ser paramétricas o no paramétricas. El efecto de los agentes perturbadores de pared celular sobre el crecimiento fúngico se analizó mediante ANOVA a dos vías. La estimulación de las citocinas y la fagocitosis por células humanas se realizó por duplicado con muestras de seis donantes sanos, mientras que el resto de los experimentos *in vitro* se realizaron al menos tres veces por duplicado. Los perfiles de citocinas, la fagocitosis y la cuantificación de UFC se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Los experimentos de supervivencia con larvas de *G. mellonella* se realizaron con un total de 40 larvas por grupo, y los datos se analizaron mediante la prueba de log-Rank y se informan en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Otros resultados se analizaron con la prueba paramétrica T de Student. La significancia estadística en todos los experimentos se estableció con un  $p < 0.05$ . Todos los datos se representan con la media y desviación estándar.

## VI. Resultados

- **Morfología de las cepas: NGY152 (WT), *kex2Δ* y *kex2Δ+KEX2***

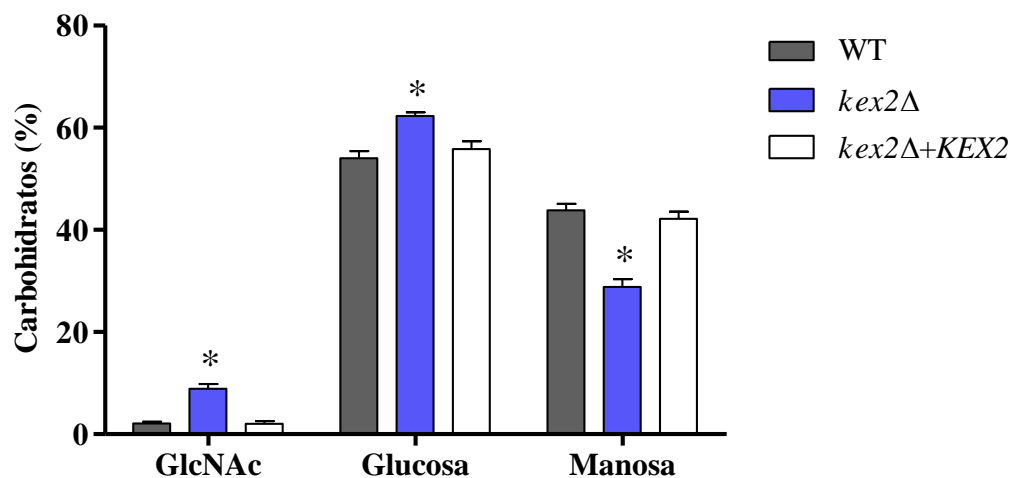
Mediante microscopía de campo claro se analizó la morfología de las diferentes cepas. Las microfotografías de la cepa WT muestran el fenotipo característico de una levadura, es decir, células ovaladas en las cuales se puede observar que algunas están en proceso de gemación (Fig. 7, a). La cepa reintegrante de *Kex2* (*kex2Δ+KEX2*) fue capaz de restaurar el fenotipo de la cepa parental (Fig. 7, c), indicando que el alelo que fue reintegrado es haplosuficiente para dar lugar al mismo fenotipo. Por el contrario, la cepa mutante nula *kex2Δ* presentó un fenotipo aberrante, son células más grandes, que a diferencia de las células de levadura comunes estas no presentaron una figura ovalada, se les observa más redondas. Además, se apreció que las células de esta cepa tienden a formar agregados (Fig. 7, b).



**Figura 7. Morfología de las cepas NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*** a. Cepa NGY152 de *C. albicans*. b. Cepa *kex2Δ* de *C. albicans*. c. Cepa *kex2Δ+KEX2* de *C. albicans*. Microscopio Zeiss Axioscope-40 y una cámara AxioCam MRc. Microscopía de campo claro 63X.

- **Análisis de carbohidratos de pared celular**

Para comprobar si la composición de la pared celular de las tres cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo presentaban cambios, se analizó el porcentaje de carbohidratos de pared celular. Los carbohidratos analizados fueron N- acetil- glucosamina (GlcNAc), glucosa y manosa. Las cepas fueron crecidas en medio Sabouraud y se realizó una hidrólisis ácida como se mencionó anteriormente en la sección de materiales y métodos.



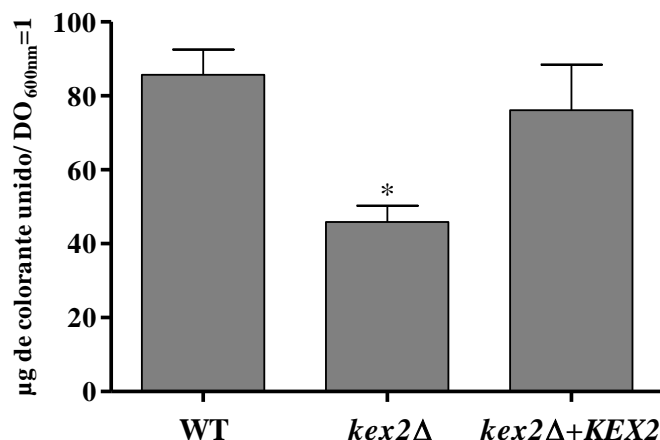
**Figura 8. Porcentaje de carbohidratos de pared celular.** Las cepas de *C. albicans* analizadas fueron NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Este ensayo está expresado en porcentaje relativo de carbohidratos, tomando como un 100% la suma de los porcentajes de N- acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa y manosa de cada una de las cepas. Los resultados representan los promedios y  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. T de Student,  $*p < 0.05$ .

En la pared celular de la cepa mutante *kex2Δ* se observó un aumento estadísticamente significativo tanto de GlcNAc como de glucosa y una disminución de manosa, el aumento de GlcNAc es de 6 % más comparado a la cepa WT, el aumento de glucosa es de 8 % más, mientras que, la cantidad de manosa es de 15 % menos que en la WT (Fig. 8). Por el contrario, las cepas WT y la reintegrante presentaron porcentajes muy similares de los tres carbohidratos analizados en la pared. Estos resultados indican que la pared celular de la cepa mutante se está viendo afectada principalmente en la cantidad de manosa, la cepa reintegrante es capaz de restaurar el porcentaje de carbohidratos al nivel de la cepa WT.

- **Determinación del nivel de fosfomananas de la pared celular por la unión al colorante azul Alciano**

Se analizó el nivel de fosfomananas de la pared celular en las tres cepas de interés. Para determinar esto se probó la capacidad de las células de unir al colorante catiónico azul Alciano, el cual presenta una afinidad por los grupos fosfato de las fosfomananas. Una vez medida la absorbancia a 620 nm se obtuvo la cantidad de colorante retenido por la pared de las células del hongo y los resultados mostraron que la cepa WT unió alrededor de 100 unidades ( $\mu\text{g}$  de colorante unido por las células a una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 1$ ), la cepa *kex2Δ* mostró

una unión al colorante de 48 unidades, y la cepa reintegrante de Kex2 unió 97 unidades de colorante (Fig. 9), reestableciendo completamente la habilidad de unir el colorante a nivel de la cepa parental.

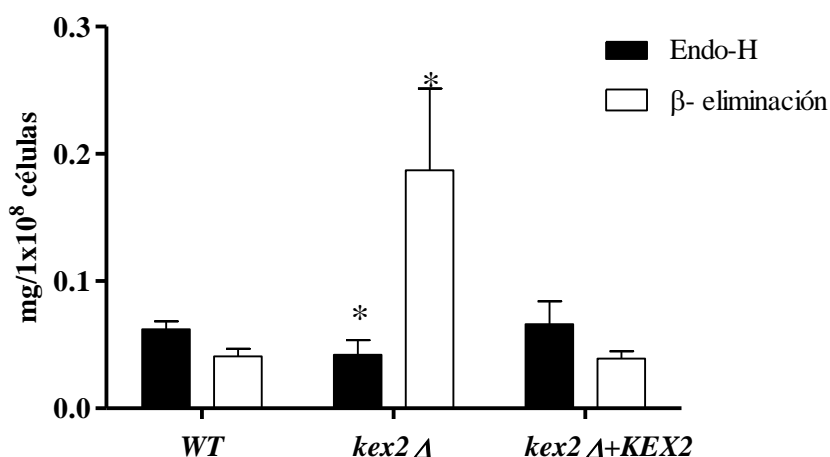


**Figura 9. Fosfomanosilación de la pared celular en cepas de *C. albicans*.** Las células se cultivaron en medio Sabouraud, y se midió la capacidad de estas para unir el colorante azul Alciano. Las cepas utilizadas fueron: NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. T de Student, \* $p < 0.05$ .

Estos resultados indican una disminución de los niveles de fosfomananas en la cepa *kex2Δ*, producto de la poca unión del colorante a la pared de las células. Las otras dos cepas de interés (WT y *kex2Δ+KEX2*), presentan una cantidad similar en los niveles de fosfomananas, y se encuentran en el intervalo de lo ya reportado con anterioridad para NGY152 que oscila alrededor de 105 unidades (González- Hernández et al., 2017).

- **Contenido de *N*- y *O*-mananas**

Para determinar defectos en la manosilación de la pared celular se cuantificó el contenido de *N*- y *O*- mananas. Para esto, se removieron las mananas de la pared celular con ayuda de la enzima Endo-H y de la  $\beta$ - eliminación como se mencionó anteriormente, y estas fueron cuantificadas (Fig. 10).

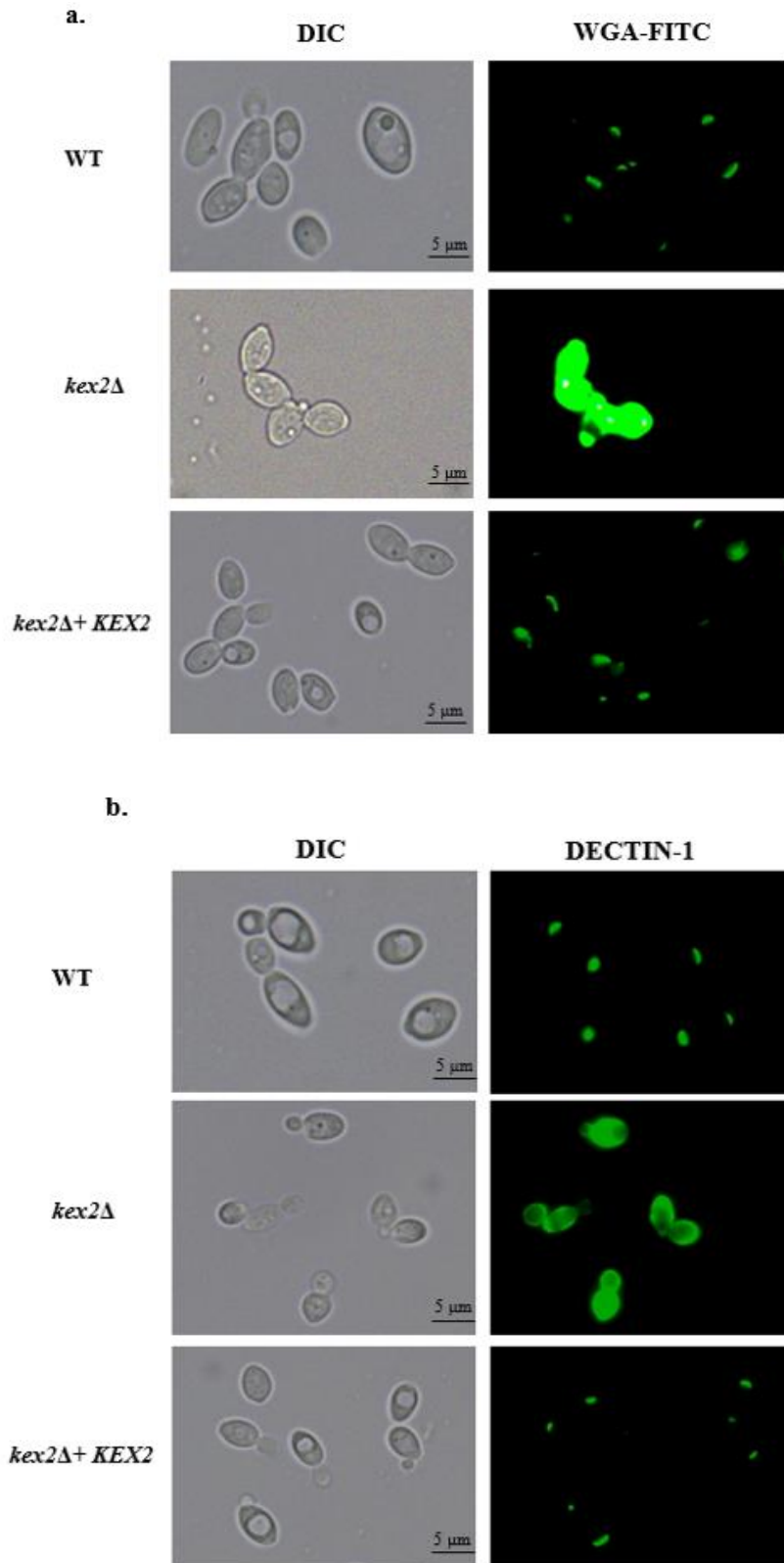


**Figura 10. Cuantificación de *N*- y *O*-mananas.** Las cepas de *C. albicans* analizadas para cuantificar estos azúcares fueron NGY152 (WT), cepa parental; *kex2*Δ, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2*Δ+*KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Las cepas fueron crecidas en medio Sabouraud. Este ensayo está expresado como la cantidad de azúcares eliminados mediante β-eliminación o Endo-H. Se tomó como referencia una curva estándar de manosa (1.0 - 0.03125 mg/mL). Las células fueron crecidas en medio Sabouraud. Los resultados representan los promedios ± D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. T de Student, \* $p < 0.05$ .

En la cepa parental y en la reintegrante no se observó una diferencia significativa en la cantidad de mananas. Los resultados para la mutante nula *KEX2* mostraron una disminución de las *N*-mananas comparado a las *O*-mananas. Las *N*-mananas en la mutante disminuyeron alrededor del 50- 52 % y las *O*-mananas están aumentando en un 40 %.

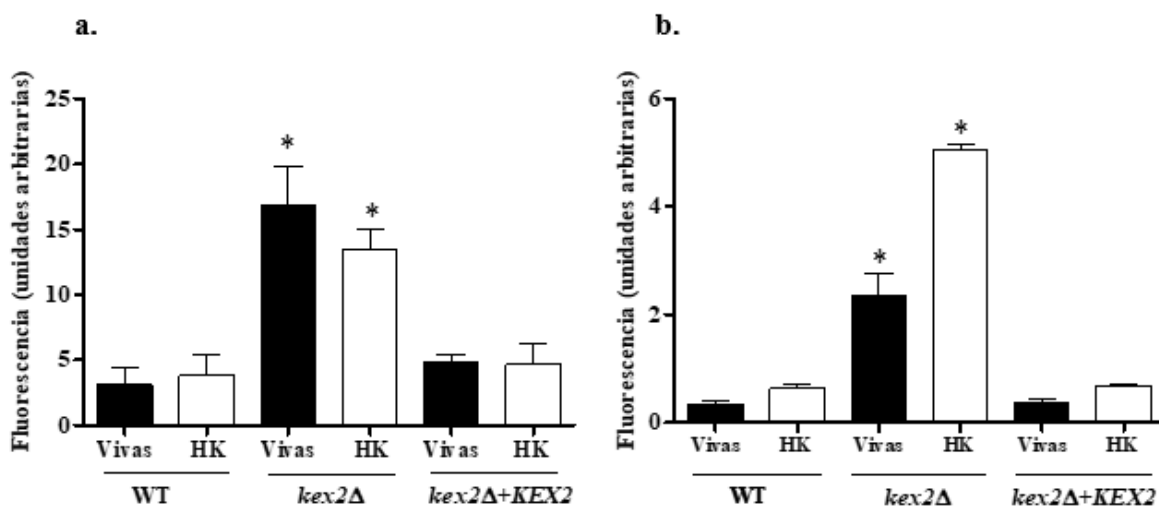
- **Exposición de quitina y β-1,3-glucanos**

Para determinar cambios en la organización de los polisacáridos estructurales en las cepas de *C. albicans* se realizaron tinciones con fluorocromos (WGA-FITC, IgG Fc-Dectin-1), y se comparó la cantidad de fluorescencia que las células retenían en condiciones vivas y HK. Las células se pusieron a interactuar con ambos fluorocromos y se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia (Fig. 11).



**Figura 11. Tinción con fluorocromos. a.** Microfotografías de la tinción con WFA-FITC. En la figura se muestran las imágenes en campo claro y fluorescencia de las cepas NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2* (Zeiss Axioscope-40 y una cámara Axiocam MRc). **b.** Microfotografías de la tinción con dectina-1 en 63X.

En las imágenes se apreció una mayor cantidad de fluorescencia en la mutante carente de Kex2, comparado a las otras dos cepas en ambas condiciones, tanto para WGA-FITC como dectina-1. Se observó que la fluorescencia en la cepa WT y en la *kex2Δ+KEX2* se distribuye principalmente en los extremos de la célula, distribución adecuada para ambos polisacáridos (quitina y glucanos), a diferencia de la mutante nula donde la fluorescencia se localizó en toda la célula de la levadura (Fig. 11). Estos resultados indican defectos tanto en organización de quitina como  $\beta$ -1,3-glucanos para la cepa *kex2Δ*.



**Figura 12. Tinción con WGA- FITC y dectina-1 para evaluar la exposición de quitina y  $\beta$ -1,3-glucanos.** NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2* **a.** Análisis de fluorescencia para WGA-FITC mediante microscopía. **b.** Análisis de fluorescencia para dectina-1 mediante microscopía. Las células que se utilizaron para el ensayo fueron vivas e inactivadas por calor (HK). Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. T de Student, \* $p < 0.05$ . Para obtener los resultados se contó con la ayuda del programa estadístico GraphPad Prism y se analizaron mediante la fórmula [(total de píxeles verdes- píxeles verdes de fondo)  $\times$  100]/ píxeles totales un total de 300 células por cepa y por tratamiento.

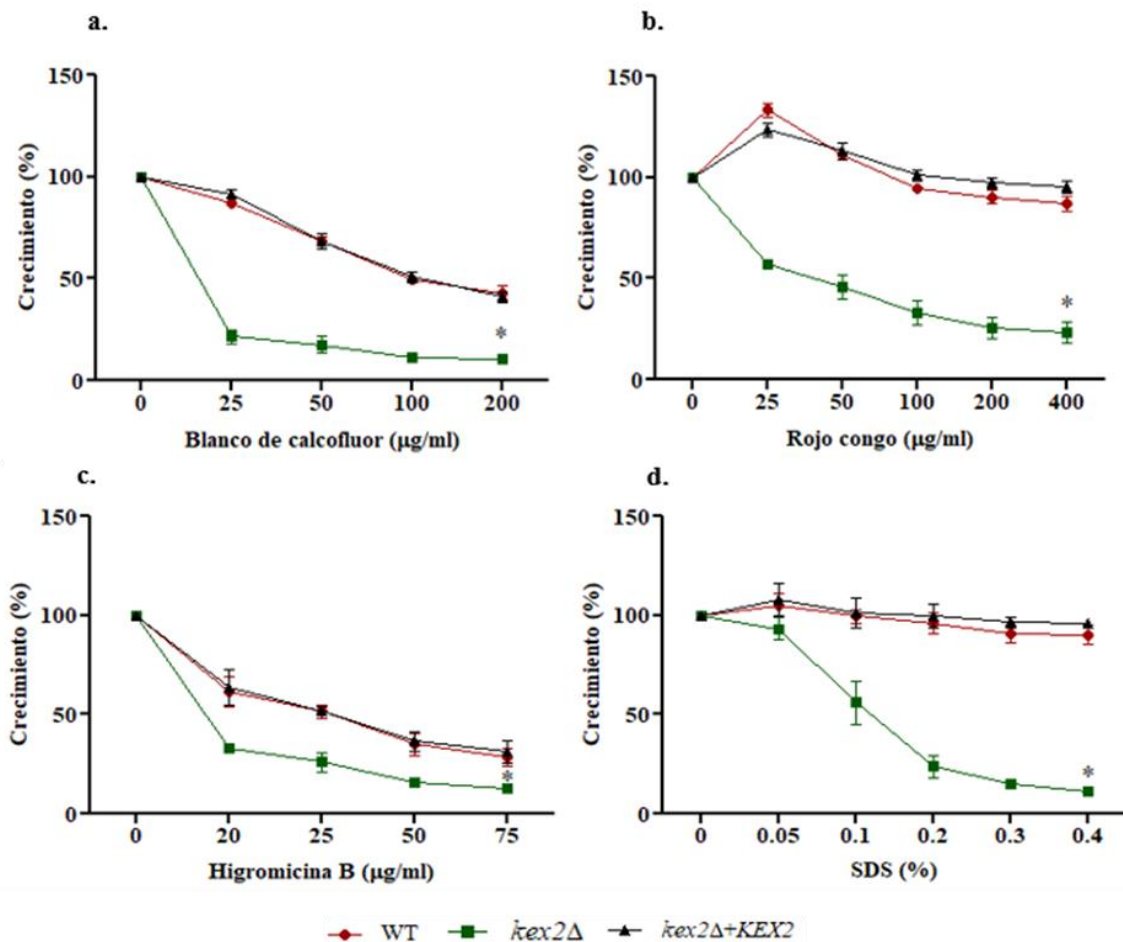
Los resultados mostraron que WGA-FITC tiene una mayor unión en la cepa *kex2Δ* tanto en condiciones vivas como HK (Fig. 12, a), presentando un 70 % más de fluorescencia que la cepa parental, el mismo evento se reflejó en los resultados con dectina-1, donde la mayor



unión de este fluorocromo se presentó en la cepa *kex2Δ* (Fig. 12, b), mostrando un porcentaje de 50 a 80 % más de fluorescencia que en las otras dos cepas, en ambas condiciones. Ambos resultados indican un aumento de quitina y  $\beta$ -1,3-glucanos en la superficie celular, lo que conlleva a una mayor exposición de ambos polisacáridos en la cepa mutante.

- **Exposición a agentes perturbadores de pared**

Para observar defectos en la síntesis u organización de la pared celular se utilizaron diferentes agentes que perturban la pared como blanco de calcofluor, que afecta el ensamblaje de las microfibrillas de quitina, rojo congo, compuesto que se une a las cadenas de  $\beta$ -1,3-glucanos, higromicina B, el cual es un inhibidor de la síntesis de proteína y SDS, detergente que actúa rompiendo los enlaces no covalentes de las proteínas. Tanto higromicina B como SDS son agentes perturbadores que se utilizan para identificar mutantes defectuosas principalmente en la *N*- glicosilación de proteínas.



**Figura 13. Ensayos de sensibilidad a perturbadores de pared.** NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Las cepas fueron crecidas en medio Sabouraud. **a.** Cepas de *C. albicans* sometidas a diferentes concentraciones de blanco de calcofluor, 0, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ . **b.** Cepas de *C. albicans* sometidas a diferentes concentraciones de rojo congo, 0, 25, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/mL}$ . **c.** Cepas de *C. albicans* sometidas a diferentes concentraciones de higromicina B, 0, 20, 25, 50, 75  $\mu\text{g/mL}$ . **d.** Cepas de *C. albicans* sometidas a diferentes concentraciones del detergente SDS, 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 %. Todas las cepas fueron sometidas a estos tratamientos durante 24 h. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ANOVA, \* $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos mostraron que la ausencia de *KEX2* hace más susceptible a la célula al efecto de los diferentes perturbadores. Para el blanco de calcofluor (Fig. 13, a) la mutante carente de Kex2 desde la concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$  mostró mayor sensibilidad a este agente perturbador, comparado con las otras dos cepas, el porcentaje de crecimiento disminuyó en un 75 % en esta concentración; por el contrario, en las otras dos cepas el porcentaje de disminución de crecimiento fue de alrededor del 20 %. Los resultados para el rojo congo (Fig. 13, b) arrojaron un patrón similar al obtenido con blanco de calcofluor, la cepa *kex2Δ* mostró una disminución en la tasa de crecimiento de alrededor del 50 % con la primera concentración (25  $\mu\text{g/mL}$ ) de este agente perturbador, además sigue disminuyendo significativamente con las demás concentraciones hasta alcanzar una disminución del 70 % en el crecimiento, resultado que evidencia una alta susceptibilidad a este perturbador. Las otras dos cepas no se ven afectadas en su crecimiento, se observó que en las primeras concentraciones de rojo congo aumentó el porcentaje de crecimiento atribuyéndole este evento a que *C. albicans* es capaz de internalizar el rojo congo y utilizarlo como nutriente para favorecer su crecimiento. Los resultados de ambos perturbadores en la cepa *kex2Δ* reiteran defectos en la síntesis de quitina y glucanos.

En la interacción de las diferentes cepas de *C. albicans* e higromicina B disminuyó el crecimiento de las tres cepas, la cepa *kex2Δ* tuvo una disminución del 80 %, la cepa WT presentó una disminución del 60 %, al igual que la cepa *kex2Δ+KEX2* (Fig. 13, c); sin embargo, la cepa *kex2Δ* es la que muestra una respuesta de susceptibilidad mayor a este agente perturbador. Los resultados para SDS indicaron que a la concentración de 0.05 % se redujo el crecimiento de la cepa *kex2Δ* en un 7 %, en las demás cepas no disminuyó significativamente el porcentaje de crecimiento (Fig. 13, d). Cuando las células de la cepa *kex2Δ* interactuaron con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 % de SDS, se observó una

disminución significativa en el porcentaje de crecimiento, que alcanzó un 90 %. La disminución en el porcentaje de crecimiento de la cepa *kex2Δ* cuando se pone a interaccionar con higromicina B y SDS se podría atribuir a defectos en la síntesis de glicosilación de proteínas, específicamente en *N*-glicosilación.

- **Prueba de susceptibilidad antifúngica en cepas de *C. albicans***

Los antifúngicos probados en este ensayo fueron fluconazol, itraconazol y anfotericina B. Los inóculos, preparación de los antifúngicos y la interpretación de los resultados se realizaron de acuerdo con el protocolo estandarizado del CLSI M27-A3. Los rangos de susceptibilidad y resistencia de acuerdo con la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los antifúngicos se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 2. Rangos de la CMI de diferentes agentes antifúngicos.** CMI, concentración mínima inhibitoria. Clasificación según las normas del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio M27-A3: Fluconazol (S  $\leq$  8  $\mu\text{g/mL}$ ; SDD 16- 32  $\mu\text{g/mL}$ ; R  $\geq$  64), Itraconazol (S  $\leq$  0.125  $\mu\text{g/mL}$ ; SDD 0.25- 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ; R  $\geq$  1), Anfotericina B (S  $<$  1  $\mu\text{g/mL}$ ; R  $>$  2  $\mu\text{g/mL}$ ).

	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Fluconazol	Itraconazol	Anfotericina B
<b>Susceptible (S)</b>	$\leq$ 8	$\leq$ 0.125	$<$ 1
<b>Susceptibilidad dependiente de la dosis (SDD)</b>	16-32	0.25-0.5	—
<b>Resistente (R)</b>	$\geq$ 64	$\geq$ 1	$\geq$ 2

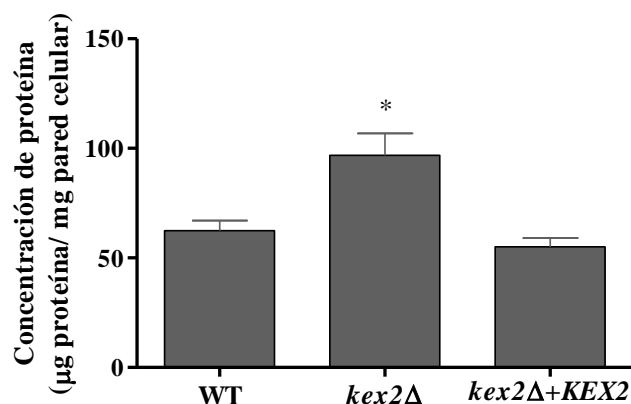
Las actividades *in vitro* de los fármacos antimicrobianos contra las cepas WT, *kex2Δ* y *kex2Δ+KEX2* de *C. albicans* se resumen en la Tabla 3. La pérdida de Kex2 afectó la susceptibilidad de *C. albicans* a los tres antimicóticos evaluados, la cepa mutante *kex2Δ* mostró una CMI de 0.12 y 0.12  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol e itraconazol, respectivamente, estos resultados fueron más bajos que los encontrados en la cepa WT y en la cepa reintegrante *kex2Δ+KEX2* (2.0 y 1.2  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol e itraconazol en la cepa WT; 1.1 y 2.0  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol e itraconazol en la cepa *kex2Δ+KEX2*, estos resultados arrojaron diferencias significativas comparando los valores de la mutante nula con las cepas control) (Tabla 3). Sin embargo, cuando se probó la susceptibilidad a la anfotericina B, las tres cepas (WT, *kex2Δ* y *kex2Δ+KEX2*) mostraron la misma CMI de 0.25  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 3. Susceptibilidad antifúngicos de las cepas de estudio.** Los valores de la CMI están expresados en  $\mu\text{g/mL}$ . S (susceptible), SDD (susceptible dosis dependiente) y R (resistente).

Antifúngicos	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	WT <sub>CMI</sub>	<i>kex2</i> $\Delta$ <sub>CMI</sub>	<i>kex2</i> $\Delta$ + <i>KEX2</i> <sub>CMI</sub>
Fluconazol	2 (S)	0.12 (S)	1.1 (S)
Itraconazol	1.2 (R)	0.12 (S)	2 (R)
Anfotericina B	0.25 (S)	0.25 (S)	0.25 (S)

- **Concentración de proteínas**

Como medida indirecta de defectos de glicosilación se realizó el ensayo de hidrolisis alcalina, para llevar a cabo este procedimiento se hidrolizaron las paredes celulares de las tres cepas y mediante un ensayo de determinación de proteínas DC<sup>TM</sup> se cuantificó la cantidad de éstas.



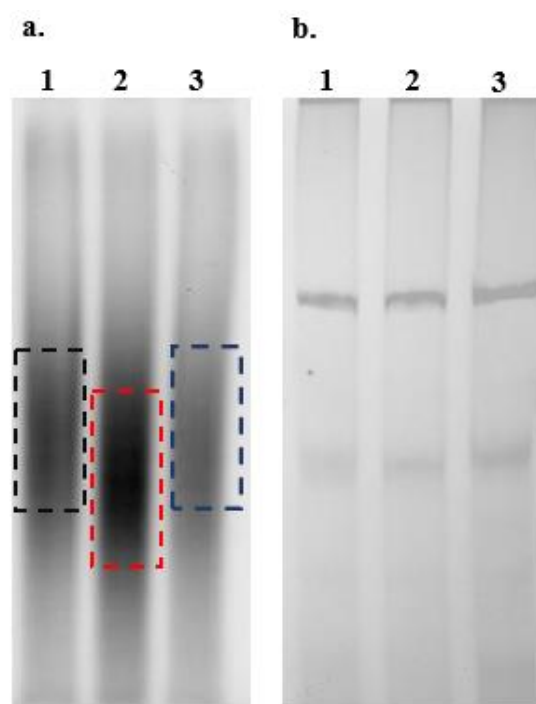
**Figura 14. Cuantificación de proteínas de pared celular.** Las cepas de *C. albicans* analizadas para cuantificar las proteínas de pared fueron, NGY152 (WT), cepa parental; *kex2* $\Delta$ , cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2* $\Delta$ +*KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Se tomó como referencia una curva estándar de albúmina de suero bovino. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. T de Student, \*  $p < 0.05$ .

En los resultados se puede observar un aumento en la concentración de proteínas en la cepa *kex2* $\Delta$ , comparado a la cepa WT. La cepa *kex2* $\Delta$ +*KEX2* presenta una cantidad de proteínas similar a la WT, las concentraciones oscilan entre  $55 \pm 62$   $\mu\text{g}$  de proteína/ mg pared celular para estas dos cepas, y para *kex2* $\Delta$  de  $96.7$   $\mu\text{g}$  de proteína/ mg pared celular, siendo este resultado estadísticamente significativo frente a las demás cepas (Fig. 14). Por lo tanto,

podemos suponer que el aumento en la cantidad de proteínas en la cepa *kex2Δ* podría estar indicando daño en los procesos de glicosilación.

- **Actividad de Hex1**

Para determinar el estado de *N*-glicosilación en *C. albicans* se realizó un ensayo de zimograma utilizando como marcador la enzima hidrolítica Hex1. Para ello se prepararon las muestras celulares y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6 % en condiciones nativas.



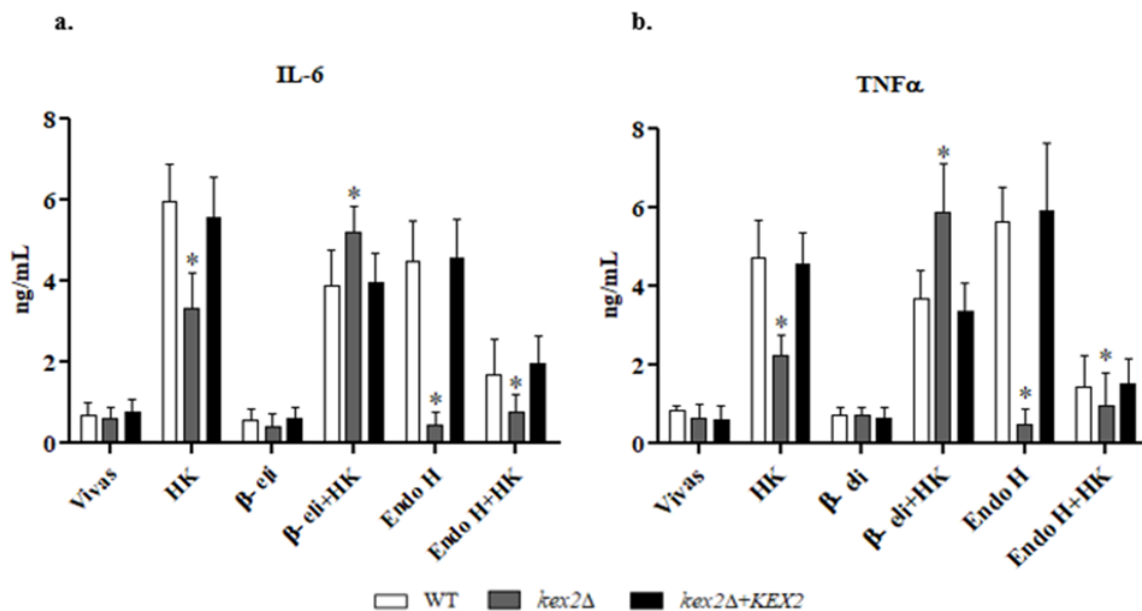
**Figura 15. Ensayo de zimograma para ver el estado de *N*-glicosilación en *C. albicans*.** Las cepas que se utilizaron para realizar este ensayo fueron NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. **a.** Carril 1: movilidad electroforética de la cepa WT. Carril 2: movilidad electroforética de la cepa *kex2Δ*. Carril 3: movilidad electroforética de la cepa *kex2Δ+KEX2*. La actividad de la enzima se detectó con el sustrato 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa. Una mayor movilidad electroforética corresponde a defectos de *N*-glicosilación. **b.** En el carril 1 se observa la deglicosilación de Hex1 en la cepa WT, en el carril 2 se observa la deglicosilación de Hex1 en la cepa *kex2Δ* y en el carril 3 deglicosilación de Hex1 en la cepa *kex2Δ+KEX2*.

El zimograma mostró que la cepa WT y *kex2Δ+KEX2* presentan una movilidad electroforética similar (Fig. 15, a, carril 1 y 3). Sin embargo, al observar la cepa *kex2Δ* (Fig. 15, a, carril 2) se evidenció una mayor migración de la movilidad electroforética. Un aumento en la movilidad electroforética de Hex1 está asociado con defectos de *N*-glicosilación,

fenómeno que puede ser percibido en la cepa mutante (Bates et al., 2006). Posteriormente, para corroborar que el movimiento electroforético no se debía a diferencias en la carga superficial de las proteínas sino a la glicosilación, se realizó una deglicosilación para eliminar los *N*-glicanos, se corrió el gel de poliacrilamida en condiciones nativas y se puede observar que las tres cepas muestran el mismo patrón, Hex1 migró más rápido a través del gel y se logró apreciar dos bandas distintas (Fig. 15, b), indicando que la diferencia en la migración electroforética es debida a la glicosilación. Lo que confirma que la cepa mutante en *KEX2* tiene defectos de *N*-glicosilación de proteínas.

- **Interacción de cepas de *C. albicans* con PBMCs**

Se determinó la capacidad de las células de levadura de *C. albicans* para estimular la producción de citocinas pro y antiinflamatorias por células del sistema inmune. La producción de citocinas por PBMC cuando interaccionan con células de *C. albicans* ya ha sido estudiado anteriormente (Netea et al., 2006). Para las tres cepas utilizadas en este trabajo WT, *kex2Δ* y *kex2Δ+KEX2* se obtuvieron levaduras, las cuales se pusieron a interaccionar con PBMCs y a los sobrenadantes obtenidos se cuantificó la cantidad de citocinas producidas.



**Figura 16. Estimulación de la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  en PBMCs puestas en interacción con cepas de *C. albicans*.** Células de levadura fueron puestas en interacción con PBMCs durante 24 h, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la cuantificación de la producción de citocinas proinflamatorias por el ensayo ELISA. Las cepas

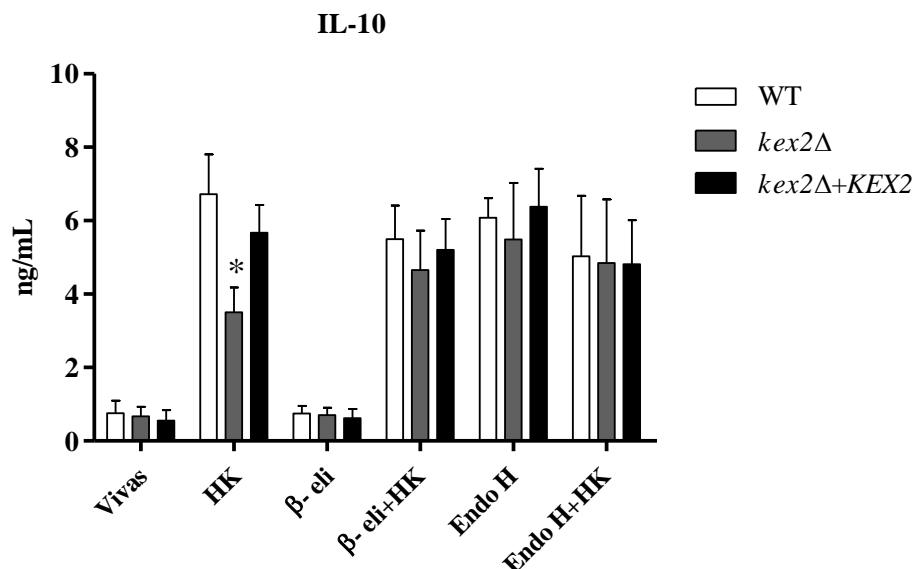
utilizadas fueron NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. **a.** Estimulación de IL-6 por cepas de *C. albicans*. **b.** Estimulación de TNF- $\alpha$  por cepas de *C. albicans*. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de los datos obtenidos por triplicado de seis donadores sanos. Células inactivadas por calor (HK), células  $\beta$ -eliminadas ( $\beta$ -eli). Test de U Mann-Whitney, \*  $p < 0.05$ .

Se analizó la producción de citocinas de las PBMCs al ponerse en interacción con levaduras vivas comparadas con levaduras cuando se exponen los componentes internos de la pared celular (HK,  $\beta$ -eliminadas,  $\beta$ -eliminadas+ HK, Endo H y Endo H- HK) durante la interacción con PBMC. Cuando se analizó la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Fig. 16, a, b), se observó que ninguna de las tres cepas en condiciones vivas modifican la producción de ambas citocinas. Sin embargo, cuando se analizó la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  por PBMCs, comparando las levaduras vivas y las inactivadas por calor, se observó un aumento significativo en la estimulación de IL-6 de hasta 5 veces cuando las células fueron sometidas a este tratamiento (Fig. 16, a) y para TNF- $\alpha$  se observó un aumento de hasta 4 veces (Fig. 16, b). Sin embargo, cuando las células se inactivan por calor el aumento es más notorio en la cepa WT y en la *kex2Δ+KEX2*, en la cepa *kex2Δ* hay una disminución significativa con respecto a las demás.

Cuando las células se someten al tratamiento de  $\beta$ -eliminación tampoco se evidencia un aumento significativo en la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en ninguna de las tres cepas. En el tratamiento de  $\beta$ -eliminación + HK se presenta un aumento en la producción de IL-6, en la cepa WT y en la *kex2Δ+KEX2* el aumento es de alrededor de 3 veces en comparación al tratamiento de  $\beta$ -eliminación y en la cepa *kex2Δ* es de 6 veces más comparado al tratamiento de  $\beta$ -eliminación. Este aumento es significativo en la cepa mutante *kex2Δ* y puede deberse a que los cambios en los componentes de la pared celular están generando un desenmascaramiento de los PAMPS lo que permite que el hongo sea fácilmente reconocido por el sistema inmune.

En el tratamiento con Endo-H se presentó un aumento en la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en las cepas WT y *kex2Δ+KEX2*, sin embargo, en la cepa *kex2Δ* hay una disminución en la producción de estas citocinas, no se genera tanta secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Cuando las células se someten al tratamiento con Endo H- HK se muestra una disminución en la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  de por lo menos 2 veces en la cepa WT y *kex2Δ+KEX2*

comparado al tratamiento con Endo-H. En la cepa *kex2Δ* no se muestran cambios tan significativos con respecto a lo que se obtuvo para el tratamiento con Endo- H.



**Figura 17. Estimulación de la producción de IL-10 en PBMCs puestas en interacción con cepas de *C. albicans*.** Células de levadura fueron puestas en interacción con PBMCs, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la cuantificación de la producción de citocinas antiinflamatorias por el ensayo ELISA. Las cepas utilizadas fueron NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de los datos obtenidos por triplicado de seis donadores. Test de U Mann- Whitney, \*  $p < 0.05$ .

Se analizó también la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 de las PBMCs (Fig. 17) al ponerse en interacción con levaduras vivas comparadas con levaduras cuando se exponen los componentes internos de la pared celular. En el tratamiento de células vivas no hay un aumento significativo en la producción de IL-10 en las tres cepas. Cuando estas se inactivan por calor hay un aumento en la producción de esta citocina de 5 veces en la cepa WT y en la *kex2Δ+KEX2*, en la cepa *kex2Δ* se presentó un aumento de 2 veces con respecto al tratamiento de células vivas (Fig. 17), sin embargo, el aumento no es tan evidente como en la cepa WT y en la *kex2Δ+KEX2*, los análisis estadísticos arrojaron una disminución significativa de *kex2Δ* con respecto a las demás cepas.

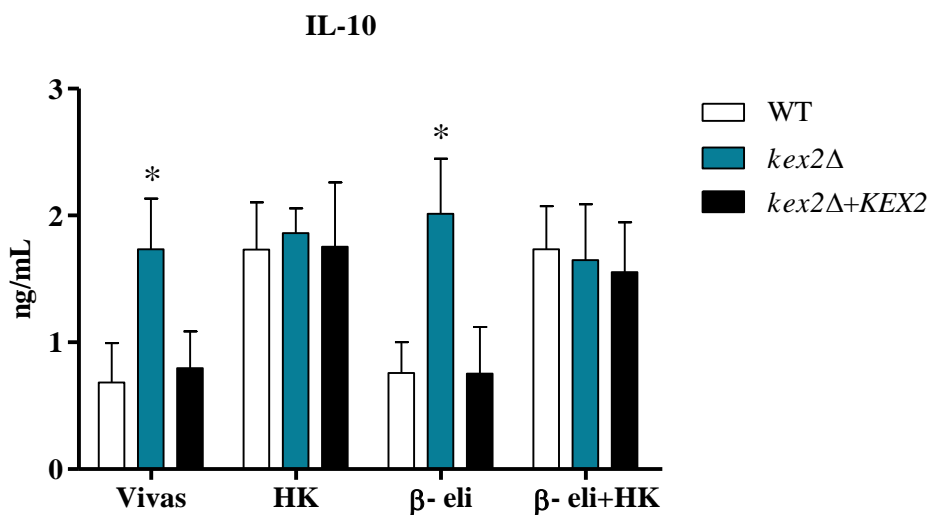
En los demás tratamientos en los que se expusieron los componentes internos de la pared no se observó diferencias significativas entre ninguna de las cepas. En el tratamiento de  $\beta$ -



eliminación se evidencia una baja producción de IL-10 en las tres cepas, por el contrario, en los demás tratamientos como  $\beta$ -eliminación+ HK, Endo-H y Endo H- HK la producción de esta citocina es alta.

- **Producción de interleucinas por macrófagos derivados de PBMCs, estimulados con levaduras**

Se analizó de la misma manera la producción de citocinas pro y antiinflamatorias durante la interacción de células diferenciadas del sistema inmune (macrófagos) y las respectivas cepas de *C. albicans*. Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron macrófagos diferenciados a partir de PBMCs, también se emplearon levaduras de las cepas NGY152 (WT), *kex2 $\Delta$*  y *kex2 $\Delta$ +KEX2*, bajo diferentes tratamientos (células vivas, inactivadas por calor,  $\beta$ -eliminadas y  $\beta$ -eliminadas+HK). Una vez puestas a interaccionar se recuperaron los sobrenadantes y se utilizaron para determinar la producción de citocinas mediante el ensayo de ELISA.



**Figura 18.** Estimulación de la producción de IL-10 por macrófagos derivados de PBMCs puestos en interacción con cepas de *C. albicans*. Levaduras vivas, inactivadas por calor,  $\beta$ -eliminadas y  $\beta$ -eliminadas+ HK fueron puestas en incubación con macrófagos derivados de PBMCs durante 2 h y una relación de 1:6 levadura- macrófago. Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para cuantificar producción de IL-10 por ensayo de ELISA. Se utilizaron las cepas NGY152 (WT), cepa parental; *kex2 $\Delta$* , cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2 $\Delta$ +KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores. Test de U Mann- Whitney, \*  $p < 0.05$ .

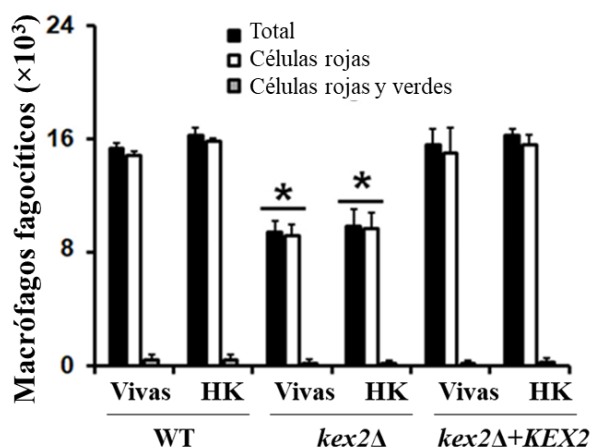
Se analizó la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en macrófagos derivados de PBMCs al ponerse en interacción con levaduras bajo diferentes condiciones. En este ensayo no se vieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos para ambas citocinas (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se analizó la producción de IL-10 se encontró que para el tratamiento de células vivas las cepas WT y *kex2 $\Delta$ +KEX2* presentaron unos niveles similares en la estimulación de los macrófagos, pero, la producción de esta aumentó significativamente en la cepa *kex2 $\Delta$*  (Fig. 18). Cuando las células se inactivaron por calor no se observó diferencias significativas en la producción de IL-10 en ninguna de las tres cepas. Sin embargo, cuando las células se sometieron al tratamiento de  $\beta$ -eliminación hubo un aumento significativo en la producción de esta citocina en la cepa mutante, la cepa WT y *kex2 $\Delta$ +KEX2* muestran los mismos niveles. En el tratamiento de  $\beta$ -eliminación+ HK la producción de esta citocina aumentó en la cepa WT y *kex2 $\Delta$ +KEX2* con respecto al tratamiento de  $\beta$ -eliminación, pero, al comparar con el tratamiento mismo no se observaron diferencias significativas para ninguna de las tres cepas (Fig. 18).

Cuando se ponen a interaccionar macrófagos con células de levadura tratadas bajo diferentes condiciones se puede observar un aumento en la producción de esta citocina en la mayoría de los tratamientos. Esto podría atribuirse a que los macrófagos al ser células más especializadas que las PBMC pueden fagocitar rápidamente el patógeno.

- **Ensayo de la fagocitosis de *C. albicans* por macrófagos humanos derivados de PBMCs**

Se determinó la capacidad de los macrófagos humanos derivados de PBMCs de fagocitar células de levadura de las cepas WT, mutante nula *kex2 $\Delta$*  y reintegrante *kex2 $\Delta$ +KEX2*. Cuando se analizó la capacidad de estas células inmunes para fagocitar a la cepa mutante *kex2 $\Delta$* , se observó que los macrófagos derivados de monocitos fagocitaron una cantidad reducida de células. Estas células primarias fagocitaron un número mayor y similar de células de levadura de la cepa WT y reintegrante *kex2 $\Delta$ +KEX2* (Fig. 19). La estrategia utilizada para analizar la absorción celular por las células inmunes permitió discriminar las células de levadura en color verde, las células verdes y rojas y las células rojas, que se consideran levaduras en la etapa temprana, etapa intermedia o en la etapa tardía del proceso de fagocitosis, respectivamente.

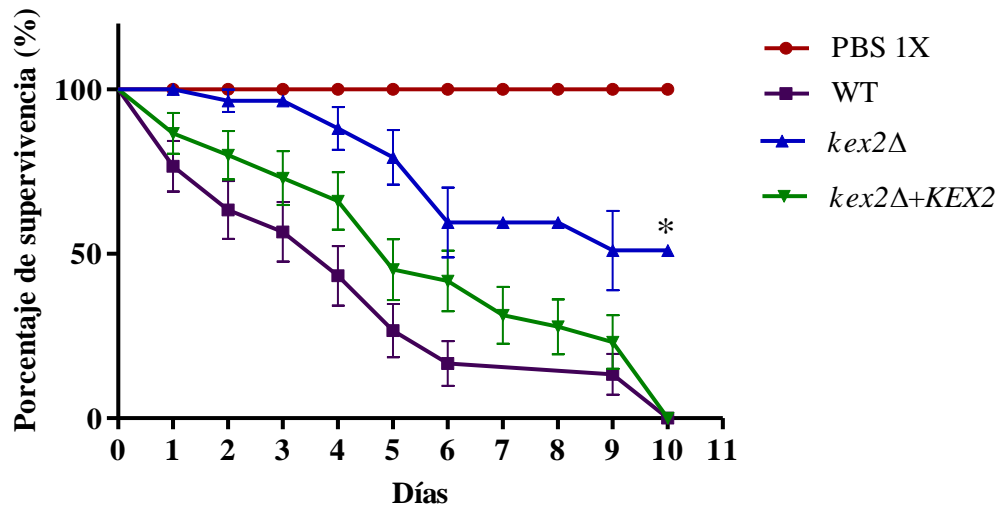
Para las tres cepas en este experimento, la mayoría de las células fúngicas se encontraban en la etapa tardía del proceso de fagocitosis, es decir, dentro de los fagolisosomas acidificados, con una pequeña proporción en la fase intermedia. El número de células en la etapa inicial de la fagocitosis fue marginal, con valores similares a los obtenidos con células humanas sin células de levadura. En conjunto, estos datos indican que la pérdida de Kex2 afectó la interacción de *C. albicans* con macrófagos derivados de monocitos.



**Figura 19. Interacción de *C. albicans* con macrófagos humanos derivados de PBMCs.** Antes de la interacción célula-célula, las células de levadura fueron teñidas con 1 mg/mL de naranja de acridina y después de 2 h de incubación las células humanas fueron analizadas por citometría de flujo como se describe en la sección de materiales y métodos. Total, se refiere al número total de macrófagos que fagocitan al menos una célula de levadura, las células rojas y las células rojas y verdes se consideran células de levadura que están en las etapas tardías e intermedias del proceso de fagocitosis, respectivamente. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores \*  $p < 0.05$ . Se utilizaron las cepas NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*.

- **Ensayo de virulencia en *G. mellonella***

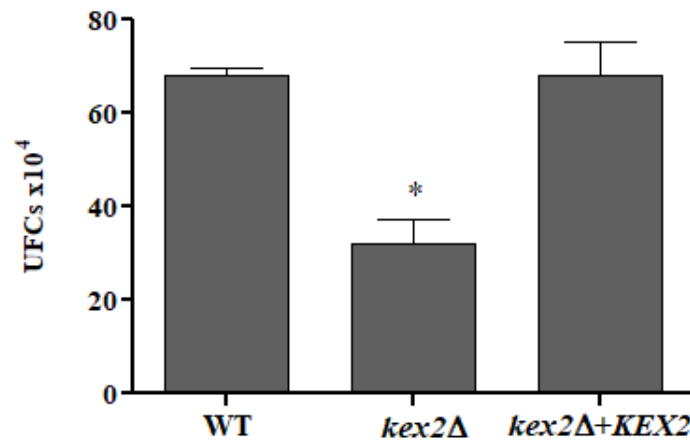
Para determinar si la ausencia de Kex2 tiene algún efecto en la virulencia de *C. albicans*, se analizaron las cepas NGY152, *kex2Δ* y *kex2Δ+KEX2* en un modelo de candidiasis sistémica en larvas de *G. mellonella*. Se inocularon 120 individuos y el proceso de infección se monitoreo durante 10 días, utilizando como control individuos inyectados con PBS estéril.



**Figura 20. Ensayo de virulencia en *G. mellonella*.** Las cepas utilizadas para este ensayo fueron NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Las larvas de *G. mellonella* fueron inoculadas con  $2 \times 10^7$  células de levadura y fueron monitoreadas durante un periodo de 10 días. Como control se inyectaron larvas con PBS 1X. Se analizaron 120 individuos. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de los datos obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Prueba de Log-Rank, \* $p < 0.0001$ .

Los resultados obtenidos a partir de este ensayo mostraron que tanto la cepa WT como la *kex2Δ+KEX2* presentan un porcentaje de mortalidad del 100 % en el día 10, lo que conlleva a decir que ambas cepas presentan un alto porcentaje de virulencia. Mientras que la cepa *kex2Δ* mostró un 50 % de mortalidad en el día 10, lo que indica una disminución de la virulencia en esta cepa del hongo (Fig. 20). Este resultado demuestra que la ausencia de esta proteasa afecta significativamente la virulencia de *C. albicans* en un modelo *in vivo*.

Posteriormente, las larvas que fueron infectadas con las diferentes cepas del hongo se les extrajo la hemolinfa y se realizaron diluciones seriadas para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonia de cada una.

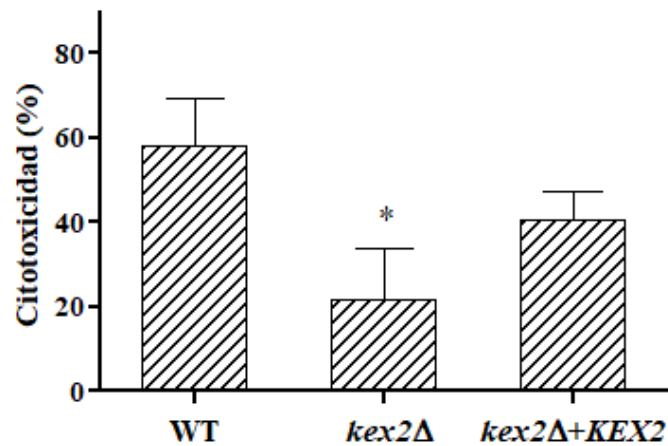


**Figura 21. Unidades formadoras de colonia en *G. mellonella*.** Las cepas analizadas fueron NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*. Después de analizar la virulencia de las diferentes cepas, se tomó la hemolinfa de las larvas y se usó para el cálculo de las UFC. Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. T de Student, \*  $p < 0.05$ .

Se aprecian diferencias significativas de las UFCs de la cepa *kex2Δ* en comparación a la cepa WT (Fig. 21), se observa un comportamiento similar en las UFCs recuperadas de la cepa *kex2Δ+KEX2*. Estos resultados demuestran que la cepa *kex2Δ* no tiene la capacidad de crecimiento igual al de la cepa parental y que la disminución de la virulencia que se observa está relacionada también con defectos en la colonización, es decir que la cantidad de levaduras que está invadiendo el tejido de la larva es menor comparado a las demás cepas.

- **Citotoxicidad producida por *C. albicans* en hemocitos de *G. mellonella***

Mediante ensayos de citotoxicidad se determinó la liberación de la enzima LDH de levaduras de *C. albicans* en hemocitos del insecto *G. mellonella*. Una vez llevada a cabo la infección de las larvas y el respectivo análisis de las muestras, los resultados obtenidos indicaron diferencias significativas en las estimaciones del porcentaje de citotoxicidad, la cepa WT presentó un aumento de alrededor del 60 %, la cepa reintegrante de *KEX2* presentó niveles de citotoxicidad del 40.5 % y la mutante carente de *KEX2* tuvo un porcentaje del 22 %, mostrando una disminución significativa de la liberación de la enzima LDH con respecto a las demás cepas (Fig. 22). La cepa mutante es menos citotóxica para los hemocitos del insecto comparado a la cepa WT y *kex2Δ+KEX2*.



**Figura 22. Citotoxicidad de cepas de *C. albicans* en hemocitos de *G. mellonella*.** La citotoxicidad de las cepas NGY152 (WT), cepa parental; *kex2Δ*, cepa mutante nula de *KEX2* y *kex2Δ+KEX2*, cepa reintegrante con el gen *KEX2*, se midió mediante la liberación de LDH. La liberación de LDH (%) se calculó como valor relativo, según las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Los resultados representan los promedios  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes realizados por triplicado. T de Student, \*  $p < 0.05$ .

## VII. Discusión

Los resultados de este estudio muestran que la cepa reintegrante de *KEX2* es funcionalmente similar a la cepa WT, lo que indica que el alelo reintegrado es haplosuficiente para revertir los efectos observados en ausencia del producto del gen *kex2*. La mutante nula *kex2Δ* de *C. albicans* mostró un fenotipo atípico, es decir, células más grandes que tienden agregarse entre sí. Estos defectos fenotípicos se han encontrado también en otras mutantes nulas de genes importantes que están involucrados en procesos de glicosilación en *Candida spp* (Navarro-Arias et al., 2016; Pérez-García et al., 2016). En mutantes de *KEX2* en organismos como *S. cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *A. niger* y *C. glabrata* se han observado también alteraciones morfológicas. La interrupción de *KEX2* genera hifas más cortas y con múltiples ramificaciones, conidios poco diferenciados, y formación de agregados (Roelants et al., 2002; Mizutani et al., 2004; Bader et al., 2008).

En este trabajo se logró caracterizar la pared celular de la mutante nula de *KEX2* y se obtuvieron resultados relevantes para el conocimiento básico del producto de este gen. En el ensayo de hidrólisis ácida se observó un aumento en la GlcNAc y glucosa y una disminución en el porcentaje de manosa en la cepa *kex2Δ*, indicando defectos en los polisacáridos de la pared. Estos resultados han sido reportados ya en mutantes de otros genes (Navarro-Arias et al., 2016).

La mutante nula *kex2Δ* presenta además niveles bajos de fosfomananas comparado con las cepas WT y *kex2Δ+KEX2*. La cantidad de colorante azul Alciano retenido por las células de la cepa mutante es menor que el que retienen las demás cepas. Lo que nos lleva a sugerir que esta cepa presenta defectos en las rutas de *N*- y *O*-glicosilación de proteínas, ya que la fosfomanosilación ocurre en mananos unidos a *O*- así como en el mananos unidos a *N*- y su cadena externa. La pérdida de Kex2 afectó significativamente la capacidad del hongo para unir al colorante, por lo tanto, es posible que el fosfomanano este ausente en el núcleo de las *N*-mananas, principalmente (Bates et al., 2005; Mora-Montes et al., 2007; Navarro-Arias et al., 2016). Este resultado concuerda con lo obtenido en el ensayo del contenido de *N*- y *O*-mananas, donde se analizó la manosilación de la pared celular de las tres cepas y se observó que tanto las *N*- y *O*- mananas de la pared celular de la cepa mutante están afectadas, los niveles de *N*- mananas disminuyen, mientras que los de las *O*- mananas muestran un

aumento. Las *N*-mananas son esenciales para la viabilidad celular (Spiro 2000; Mora-Montes et al., 2007), probablemente la cepa *kex2Δ* presenta defectos en la biosíntesis de éstas, lo que estaría generando reordenamientos en la composición de la pared celular, como se observó en el ensayo de hidrólisis ácida. Los defectos en la biosíntesis de las *N*-mananas podrían estar indicando que las manosiltransferasas que elaboran el esqueleto de fosfomanano no están agregando correctamente las  $\alpha$ 1,2-mananas,  $\alpha$ 1,3-mananas y  $\beta$ 1,2-mananas, lo que ocasiona que las cadenas queden truncas. Las *O*-mananas están formadas por glicanos lineales más cortos (cinco residuos), el aumento significativo de estos podría estar indicando que las *O*-mananas se están extendiendo más de cinco residuos, debido a que no hay ningún impedimento por parte de las *N*-mananas para que estos sigan creciendo.

Estos resultados dieron un indicio de defectos en la *N*-glicosilación de proteínas, y esto pudo ser corroborado a partir de un zimograma, utilizando como marcador la enzima hidrolítica Hex1, en el cual se monitoreó la movilidad electroforética. La pérdida de Kex2 dio como resultado defectos claros de *N*-glicosilación de proteínas, demostrado por el aumento de la movilidad electroforética de Hex1 (Bates et al., 2013).

Cuando las células de las tres cepas de interés se pusieron a interaccionar con fluorocromos que tienen afinidad por la quitina y los  $\beta$ -1,3-glucanos de la pared celular, se observó una acumulación de estos en las levaduras de la cepa mutante, presentando mayor cantidad de fluorescencia. Por el contrario, para la cepa WT y reintegrante de *KEX2* la fluorescencia se distribuyó principalmente en las cicatrices de gemación. En *C. albicans*, cuando el ensamblaje de mananos se interrumpe o se ve afectado, se produce un aumento de los niveles de quitina y  $\beta$ - glucanos, fenómeno que se está viendo reflejado en la cepa *kex2Δ*, (Mora-Montes et al., 2010; Bates et al., 2013). Se analizó la cantidad de fluorescencia retenida por las células en estado vivo e inactivadas por calor y se obtuvo que la cepa *kex2Δ* es la que presenta mayor unión a ambos fluorocromos, lo que sugiere una mayor exposición de quitina y  $\beta$ -1,3-glucanos. La mutante de *KEX2* tiene más quitina en la pared celular y además se encuentra expuesta en su totalidad, para el caso de los  $\beta$ -1,3-glucanos también se presenta más cantidad de estos, pero a diferencia de la quitina estos no se encuentran totalmente expuestos, es posible que las *O*-mananas estén enmascarando una parte.



Al evaluar el efecto de diferentes agentes perturbadores de pared, como blanco de calcofluor, compuesto que se une a las microfibrillas de quitina, rojo congo, compuesto que se une a los  $\beta$ -1,3-glucanos y compuestos asociados con defectos de glicosilación, como higromicina B, que inhibe la síntesis de proteínas y SDS, detergente que rompe los enlaces no covalentes de las proteínas, se observó que la cepa *kex2 $\Delta$*  es más susceptible a estos compuestos, comparado a la WT y *kex2 $\Delta$ +KEX2*. La susceptibilidad que presenta la cepa mutante *kex2 $\Delta$*  indica defectos en la composición, organización y permeabilidad la pared celular. La disminución significativa en el crecimiento cuando se pone a interactuar con blanco de calcofluor y rojo congo reitera defectos en la síntesis de quitina y  $\beta$ - glucanos (Kopecká y Gabriel 1992). La susceptibilidad que presenta la cepa mutante a SDS e higromicina B estaría indicando defectos en *N*- glicosilación de proteínas (Dean 1995). En cepas mutantes de *kex2 $\Delta$*  de *C. glabrata* se presentó disminución en la tasa de crecimiento e hipersensibilidad, cuando éstas se pusieron a interactuar con agentes como blanco de calcofluor, higromicina B y SDS (Bader et al., 2001). Se ha reportado además que cepas mutantes carentes de Kex2 de *S. cerevisiae* presentan sensibilidad al blanco de calcofluor (Bader et al., 2008). La mayoría de mutantes de pared celular se vuelven más susceptibles a este tipo de agentes, debido a que activan una respuesta al estrés cuando hay aumento de quitina y glucanos (Ram y Klis 2006).

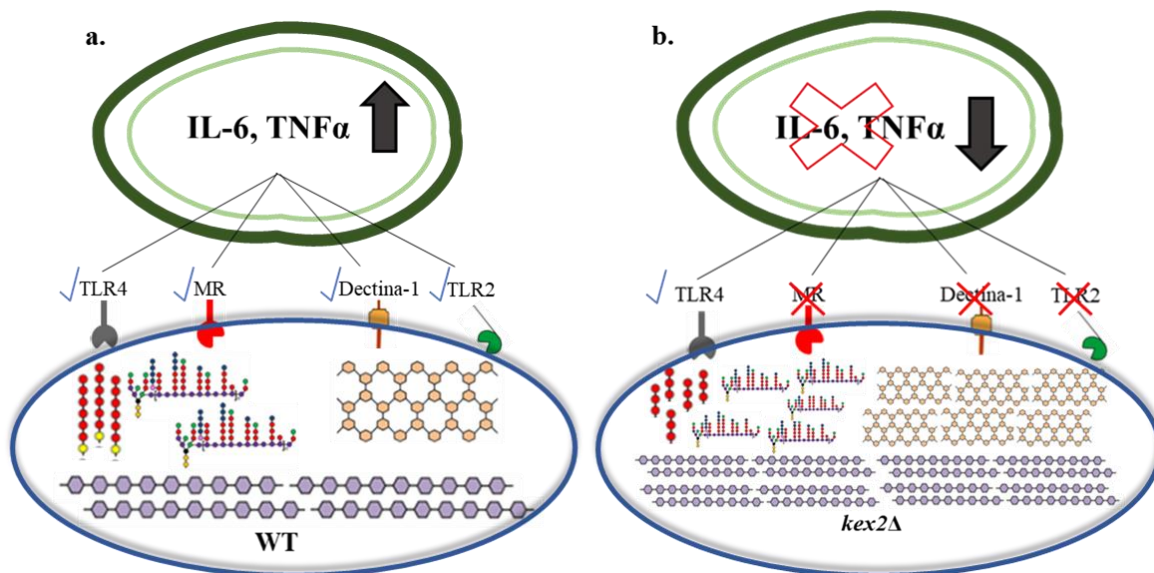
Se evaluó además la susceptibilidad de las tres cepas de *C. albicans* a antifúngicos como fluconazol, itraconazol y anfotericina B. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron susceptibilidad a la anfotericina B en las tres cepas, este antifúngico es de rápida acción y produce mayor toxicidad, además se especula que el modo de acción se basa en la unión al ergosterol de la membrana plasmática, lo que estaría explicando la susceptibilidad. Para el caso de itraconazol y fluconazol la cepa más afectada fue la mutante nula de *KEX2*, esta cepa presentó cambios importantes en la organización de la pared celular, lo que estaría facilitando el paso de estos agentes antifúngicos a la membrana celular. La susceptibilidad a antimicóticos se ha demostrado que ocurre en otras mutantes de la vía de glicosilación de *C. albicans* y otras especies de *Candida* (Bates et al., 2006; Mora-Montes et al., 2007), también se ha observado una mayor susceptibilidad a los antimicóticos en células con defectos en la familia de los genes PMT, cuyos miembros participan en la vía de *O*- manosilación y en cepas mutantes con cambios en las proteínas ancladas a GPI de la pared celular (Prill et al., 2005; Plaine et al., 2008).

Las mananas de la pared celular y los  $\beta$ -1,3-glucanos desempeñan un papel fundamental durante la interacción de *C. albicans* con el sistema inmune innato, el daño asociado a las mananas reduce la producción de citocinas por parte de las PBMCs (Mora- Montes et al., 2007; Martínez- Álvarez et al., 2014). Cuando las células de las cepas WT, *kex2* $\Delta$  y *kex2* $\Delta$ +*KEX2* estuvieron en condiciones vivas se observó una baja estimulación de los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 por las PBMCs. En el tratamiento de inactivación por calor se genera una mayor secreción de citocinas, debido a que el calor desenmascara los PAMPs como glucanos y mananos, exponiendo la capa interna de la célula, principalmente  $\beta$ -1,3-glucanos a los PRR que se encuentran en la superficie de las PBMC (Gow et al., 2007; Hernández- Chávez et al., 2018). Los resultados para el tratamiento de inactivación por calor muestran un aumento en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias en las tres cepas, sin embargo, en la cepa mutante nula, aunque se presentó un aumento en la producción de estas citocinas, no fue tan significativo como en las demás cepas, es posible que se esté presentando un enmascaramiento de receptores y por ende un menor reconocimiento de las levaduras de esta cepa (Plato et al., 2015). En otras cepas de *C. albicans* se ha demostrado un aumento en la secreción de citocinas pro y antiinflamatorias después de la exposición de  $\beta$ -1,3-glucanos por la inactivación por calor (Gow et al., 2007; Estrada- Mata et al., 2015). En células de *C. albicans* que carecen de una elaboración adecuada de *N*-mananas se han obtenido resultados similares (Mora-Montes et al., 2010).

Para estudiar la contribución de las *O*-mananas durante la interacción de *C. albicans* - PBMC, se trataron las células fúngicas con NaOH para eliminar las *O*-mananas de la pared celular. Los resultados muestran una disminución en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias para las tres cepas. Las *O*-mananas representan un componente menor de la pared celular y son un elemento no esencial para estimular la producción de citocinas por las PBMC, así que la pérdida de estos tiene poco impacto en la capacidad de *C. albicans* para estimular la producción de citocinas pro y antiinflamatorias (Munro et al., 2005; Netea et al., 2006).

El tratamiento de las levaduras con  $\beta$ -eliminación e inactivación por calor no afectó la capacidad de las cepas WT, *kex2* $\Delta$ +*KEX2* y *kex2* $\Delta$  para estimular la producción de las citocinas pro y antiinflamatorias, por el contrario, se observó un aumento en la producción

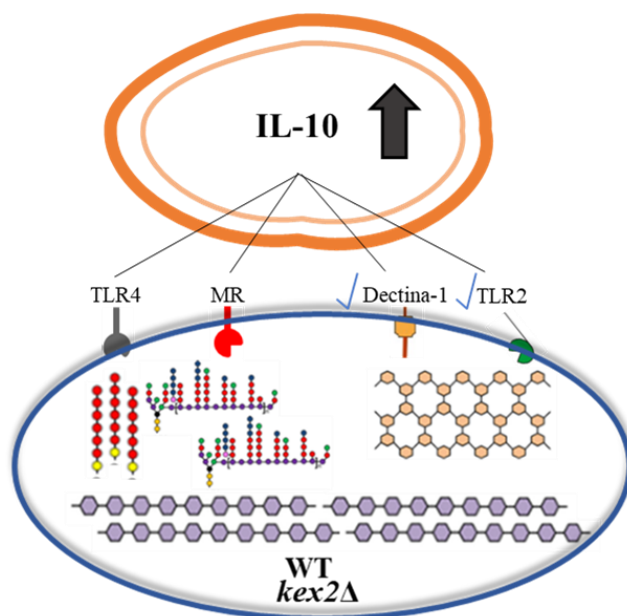
de estas. Sin embargo, aunque hubo un incremento para las tres cepas, la cepa *kex2Δ* es la que representa un aumento estadísticamente significativo. La producción de citocinas estimuladas por las células mutantes HK y  $\beta$ - eliminadas, nos lleva a proponer que las *O*-mananas estarían enmascarando otros patrones moleculares más relevantes para la estimulación de citocinas, lo que resulta en una disminución de la producción de IL-6 y TNF $\alpha$  (Fig. 23). Esto ha sido propuesto previamente en *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* (Pérez-García et al., 2016). Para el caso de la IL-10, se observa un aumento en la producción de esta citocina en las tres cepas, pues el receptor dectina-1 puede inducir por si solo la producción de IL-10 cuando la  $\beta$ -1,3-glucana se encuentra expuesta (Fig. 24) (van de Veerdonk et al., 2009).



**Figura 23. Conceptualización de la estimulación de la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF $\alpha$  por PBMCs.** a. En las células de levadura de la cepa WT, los ligandos para dectina-1, MR, TLR2 y TLR4 se exponen permitiendo un aumento en la producción de ambas citocinas proinflamatorias. b. En las células de levadura de la cepa mutante *kex2Δ* las *N*-mananas y  $\beta$ - glucanos están siendo enmascarados por las *O*-mananas, lo que resulta en una producción limitada de IL-6 y TNF $\alpha$ .

Se evaluó la importancia de las *N*-mananas de la pared celular durante la interacción de cepas de *C. albicans* con las PBMCs, para llevar a cabo este ensayo estas fueron eliminadas. El tratamiento con Endo-H afectó la capacidad de la mutante nula *kex2Δ* para estimular la producción de citocinas proinflamatorias. La falta de *N*-mananas no afectó los niveles de IL-

10 inducidos por la cepa WT, *kex2Δ* y *kex2Δ+KEX2*. La cantidad restante de fosfomananas que son reconocidas por TLR2 y la exposición de los  $\beta$ -1,3- glucanos reconocidos por dectina-1 está dando lugar a que tanto la cepa WT como la reintegrante de *KEX2* puedan generar un aumento en la estimulación de las citocinas proinflamatorias debido a la coestimulación de ambos receptores (Wheeler y Fink 2006; Gow et al., 2007). Sin embargo, en la mutante *kex2Δ* no se presenta tanta secreción de estas citocinas porque se está reconociendo principalmente las glucanas y estas podrías estar ocultas por las *O*- mananas (Plato et al., 2015). Para el caso de la IL-10 el aumento en la producción de esta se atribuye a que el receptor dectina-1 puede inducir la síntesis de IL-10, este resultado se obtuvo también para el tratamiento de Endo H- HK en las tres cepas. En conjunto, estos datos revelan que las *N*- mananas de *C. albicans* son componentes clave de la pared celular para inducir la producción de citocinas por las PBMCs.



**Figura 24. Conceptualización de la estimulación de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 por PBMCs y macrófagos derivados de PBMCs.** Las células de levadura de la cepa mutante de *kex2Δ* presentaron un aumento en la producción de IL-10, esto se debe a que el incremento en la exposición de  $\beta$ -1,3-glucanos afecta positivamente la producción de IL-10 por la vía de señalización de la dectina-1.

Observaciones similares han sido reportadas para otras mutantes de *C. albicans* y *C. parapsilosis* (Mora-Montes et al., 2007, 2010; Pérez-García et al., 2016). Los datos de Reid y colaboradores sugieren que, aunque el reconocimiento de los  $\beta$ -1,3-glucanos es a través del

receptor dectina-1, es importante tener una red de coestimulación donde otros receptores puedan interactuar para producir niveles altos de citocinas. Es decir, que pueda colaborar con receptores como TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR9 de manera sinérgica (Reid et al., 2009 ; Pérez- García et al., 2016).

El análisis de la interacción de *C. albicans* con macrófagos mostró que la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 aumentó significativamente con la mutante nula *kex2Δ* en los tratamientos de células vivas y  $\beta$ -eliminadas en comparación con las demás cepas. Este aumento podría estar relacionado al aumento de las glucanas de pared celular que presenta la mutante nula *kex2Δ*, ya que podrían estarse reconociendo más fácilmente por el receptor de la dectina-1, aumentando entonces la producción de IL-10. Para los demás tratamientos como inactivación por calor y  $\beta$ -eliminación + HK el aumento en la producción de esta citocina fue similar en las tres cepas de estudio, la hipótesis a este resultado es que como se está exponiendo principalmente la capa de  $\beta$ 1,3- glucanos en estos tratamientos el receptor dectina-1 está induciendo la producción de esta citocina (Fig. 24). El papel de la dectina-1 en el reconocimiento de células de levadura de *C. albicans* durante la interacción con macrófagos ya ha sido previamente reportado (Heinsbroek et al., 2008).

La mutante nula de *kex2Δ* mostró una disminución significativa de la virulencia en el modelo biológico *G. mellonella*, esta disminución había sido ya reportada en un modelo murino de candidiasis sistémica (Newport et al., 2003). A diferencia de la mutante nula *kex2Δ* la cepa WT y reintegrante de *kex2Δ* presentan un alto porcentaje de virulencia. Aunque ya se tenían reportes previos de la disminución de la virulencia de la mutante nula, se decidió evaluar la confiabilidad del ensayo en un modelo invertebrado como *G. mellonella*, y los resultados obtenidos muestran que *G. mellonella* es eficiente como modelo biológico para determinar la virulencia de diferentes cepas de *C. albicans* y podría estar reemplazando al modelo murino, para este tipo de ensayos. En mutantes nulas en *C. guilliermondii* se obtuvieron resultados similares, la disminución de la virulencia se observó tanto en el modelo de *G. mellonella* como en el modelo murino (Navarro- Arias et al., 2016). Las células fagocíticas de *G. mellonella* juegan un papel importante en las respuestas inmunes innatas, es posible que la disminución de la virulencia de la mutante nula *kex2Δ* de *C. albicans* fue el resultado de una activación de los hemocitos de la *Galleria* que permitió eliminar las células del hongo

más fácilmente (Hernández- Chávez et al., 2018). Al hacer el recuento de UFC la cepa mutante presentó menor cantidad comparado a las demás cepas, en las cuales se obtuvo una alta virulencia y por ende una mayor colonización en el tejido de la larva. La cepa WT y reintegrante colonizaron de manera similar los tejidos de la *Galleria*, a diferencia de la cepa mutante donde la cantidad de UFC recuperadas fue menor.

Se conoce que *G. mellonella* utiliza estrategias inmunológicas para controlar diferentes tipos de patógenos, y estas incluyen melanización, activación de hemocitos y producción de péptidos antimicrobianos (Pérez- García et al., 2016; Hernández- Chávez et al., 2018). Como experimento adicional para conocer otros elementos importantes de las cepas de estudio, se evaluó la citotoxicidad de cada una de éstas, cuantificando la liberación de la enzima LDH de levaduras de *C. albicans* en hemocitos de *G. mellonella*. La cepa WT y *kex2Δ+KEX2* mostraron un mayor porcentaje de citotoxicidad comparado a la cepa *kex2Δ*. Estos resultados podrían estar relacionados con los obtenidos en el ensayo de virulencia, se sugiere que entre más virulenta sea la cepa más tóxica pueda llegar a ser para el organismo.

Finalmente, se proponen las siguientes hipótesis para explicar los resultados obtenidos:

Se ha reportado en *S. cerevisiae* que Kex2, en conjunto con otras proteínas, participan en el transporte retrogrado y anterógrado de proteínas y además en procesos de glicosilación (Zhao et al., 2019). Tanto la *N*- como la *O*-glicosilación inician en el retículo endoplásmico, posteriormente estos siguen su paso al aparato de Golgi donde finalmente manosiltransferasas agregan los residuos de manosa correspondientes para completar las cadenas. Para el caso de la *N*-glicosilación la cadena final debe quedar con alrededor de 50 – 200 residuos de manosas. En *S. cerevisiae* se ha reportado que Kex2 activa proteolíticamente manosiltransferasas como Och1, la cual cumple la función de agregar  $\alpha$ 1,6- manosas para completar los residuos de las cadenas. A partir de esto, proponemos que la ausencia de Kex2 en *C. albicans* estaría generando *N*-mananas trucas, pues no hay quien lleve a cabo la activación de manosiltransferasas para agregar los residuos de manosa faltantes, lo que trae consigo una disminución de éstas. Esto podría estar explicando además los niveles bajos de fosfomanosilación y que la enzima Hex1 aislada de la cepa mutante de *KEX2* migre más, comparado a las demás.

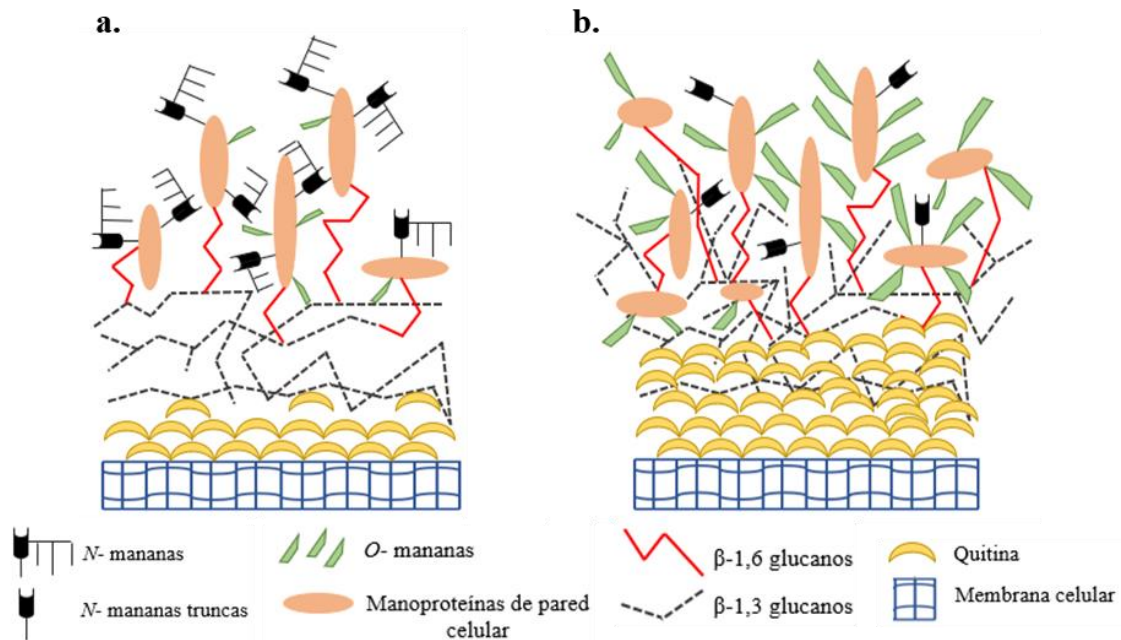
Para el caso de la *O*-glicosilación, las *O*-mananas se podrían estar extendiendo más de cinco residuos, debido a que no hay ningún impedimento por parte de las *N*-mananas para que estas sigan creciendo. Otra alternativa es que las  $\alpha$ 1,2-manosiltransferasas necesiten un procesamiento proteolítico para regular su actividad, al no existir ese control proteolítico por la ausencia de Kex2 estaría permitiendo la adición de muchos residuos de manosa lo que conlleva a generar *O*-mananas más grandes.

Se sabe que Kex2 puede pasar del aparato de Golgi al retículo endoplásmico y viceversa (Zhao et al., 2019), otra posibilidad incluye que el paso de Kex2 al retículo endoplásmico podría estar modulando los sitios donde la oligosacariltransferasa esta adicionando la *N*-manana, si no se presenta la adición de este en el residuo de Asn, se estaría dando lugar a que una *O*-glicana se pegue a los residuos Ser/Thr, produciendo mayor cantidad de éstas en la pared celular.

La disminución en la cantidad de *N*-mananas y el aumento de *O*-mananas podría estar provocando cambios en la remodelación de los componentes internos de la pared celular, pues se observa un aumento de la quitina y de las glucanas. Además, la disminución de *N*-mananas estaría generando espacios en la pared celular, pues son las *N*-mananas las encargadas de recubrir la parte externa. Estos espacios estarían facilitando la entrada de agentes extraños como WGA-FITC y dectina-1, lo que conlleva a una mayor exposición de los polisacáridos internos de la pared celular.

Con los resultados obtenidos también se podría plantear que la célula está compensando la disminución de componentes externos de la pared con un aumento de quitina y glucanos (Fig. 25). La pared celular de la cepa mutante en *KEX2* podría estar utilizando como respuesta al estrés la vía de señalización de integridad de la pared celular, donde la activación de la cascada PKC- Mkc1 y la  $\beta$  1,3- glucano sintasa estarían regulando la producción quitina y  $\beta$  1,3-  $\beta$  1,6 glucanos, así como su distribución al sitio de remodelación de la pared celular, con la finalidad de evitar la muerte celular (de Nobel et al., 2000).

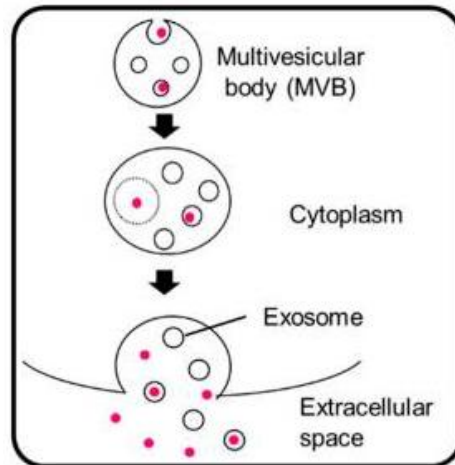
Además, los cambios estructurales que sufrió la pared celular de la cepa mutante podrían estar afectando la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, pues las *N*-mananas y los  $\beta$ -1,3-glucanos son componentes clave para la estimulación de éstas.



**Figura 25. Representación esquemática de la pared celular de la cepa WT y *kex2Δ*.** **a.** Pared celular de la cepa WT **b.** Pared celular de la cepa mutante *kex2Δ*, la cual presenta cambios en la composición y remodelación de la pared celular.

El aumento en la cantidad de proteínas de pared celular de la cepa carente de Kex2 estaría relacionado con un aumento en el estrés celular, debido a la reorganización que sufrió la pared. Esto podría estar ocasionando que la ruta clásica de secreción se vea interrumpida y se estén activando vías alternas como la secreción de proteínas por vesículas extracelulares (Fig. 26) (Miura y Ueda, 2018). Estas proteínas que son liberadas están siendo dirigidas a la pared celular, lo cual en condiciones normales no pasaría, pues estas deberían ser secretadas a la membrana celular. Sin embargo, la célula lo podría estar usando a su favor como una medida de compensación por los componentes que se están viendo afectados en la pared celular.





**Figura 26.** Representación esquemática del proceso de secreción de proteínas mediado por vesículas (Miura & Ueda 2018).

## VIII. Conclusiones

- Kex2 es necesaria para los procesos de *N*- y *O*-glicosilación de proteínas.
- Los defectos en la síntesis de quitina y  $\beta$ - glucanos se generan por la remodelación de la pared celular cuando Kex2 no está presente.
- La proteasa Kex2 es necesaria para mantener la integridad y organización de la pared celular de *C. albicans*.
- La ausencia de Kex2 vuelve más susceptible a la célula a agentes perturbadores como aquellos que afectan la pared, membrana plasmática y algunos antifúngicos.
- Kex2 es importante para mantener la virulencia y citotoxicidad de *C. albicans*
- Las *N*- mananas y las  $\beta$  1,3- glucanas son importantes para la producción de citocinas pro y antiinflamatorias.

## IX. Perspectivas

- Determinar el tamaño de las *N*- y *O*- mananas de la pared celular de la cepa mutante de *kex2Δ*.
- Realizar un análisis proteómico de la pared celular de la cepa mutante, para determinar qué tipo de proteínas están presentes.
- Determinar si la ruta de integridad celular PKC-Mkc1 se encuentra activada en la cepa mutante *kex2Δ*

## X. Referencias bibliográficas

- **Arvan, P., Zhang, B.Y., Feng, L., Liu, M., Kuliawat, R. (2002).** Luminal protein multimerization in the distal secretory pathway/secretory granules. *Curr Opin Cell Biol* 14 (4): 448-453.
- **Bader, O., Krauke, Y., Hube, B. (2008).** Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiol* 14 (8): 116.
- **Bader, O., Schaller, M., Klein, S., Kukula, J., Haack, K., Mühlischlegel, F., Korting, H.C., Schäfer, W., Hube, B. (2001).** The *KEX2* gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity. *Mol Microbiol* 41 (6): 1431-1444.
- **Basco, R.D., Cueva, R., Andaluz, E., Larriba, G. (1996).** In vivo processing of the precursor of the major exoglucanase by KEX2 endoprotease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *Biochim Biophys Acta* 1310 (1): 110-118.
- **Bates, S., MacCallum, D.M., Bertram, G., Munro, C.A., Hughes, H.B., Buurman, T., Brown, J.P., Odds, F.C., Gow, N.A. (2005).** *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem* 280 (24): 23408-23415.
- **Bates, S., Hughes, H.B., Munro, C.A., Thomas, W.P.H., MacCallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M., Brown, A.J.P., Odds, F.C., Gow, N.A. (2006).** Outer chain N- glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 281 (1): 90-98.
- **Bates, S., Hall, R.A., Cheetham, J., Netea, M.G., MacCallum, D.M., Brown, A.J.P., Odds, F.C., Gow, N.A. (2013).** Role of the *Candida albicans* *MNN1* gene family in cell wall structure and virulence. *BMC Res Notes* 6: 294.
- **Bowers, K., Stevens, T.H. (2005).** Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1744 (3): 438-454.
- **Brand, A., MacCallum, D.M., Brown, A.J., Gow, N.A., Odds, F.C. (2004).** Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of

*Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot Cell* 3 (4): 900-909.

- **Brown, A.J., Gow, N.A. (1999).** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 7 (8): 333-338.
- **Brown, G.D., Denning, D.W., Levitz, S.M. (2012).** Tackling human fungal infections. *Science* 336 (6082): 647.
- **Chaffin, W.L. (2008).** *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 72 (3): 495-544.
- **Chambers, R.S., Broughton, M.J., Cannon, R.D., Carne, A., Emerson, G.W., Sullivan, P.A. (1993).** An exo-beta-(1,3)- glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *J Gen Microbiol* 139 (2): 325-334.
- **Cole, N.B., Ellenberg, J., Song, J., DiEuliis, D., Lippincott-Schwartz, J. (1998).** Retrograde transport of Golgi- localized proteins to the ER. *J Cell Biol* 140 (1): 1-15.
- **Dean, N. (1995).** Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *PNAS* 92 (5): 1287-1291.
- **de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., Klis, F.M. (2000).** Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2- mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* 146 (9): 2121-2132.
- **Dennehy, K.M., Ferwerda, G., Faro- Trindade, I., Willment, J.A., Taylor, P.R., Kerrigan, A., Tsoni, S.V., Gordon, S., Adema, G.J., Kullberg, B.J., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Mora- Montes, H.M., Gow, N.A., Williams, D.L., Netea, M.G., Brown, G.D. (2008).** Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 38 (2): 500-506.
- **Díaz- Jiménez, D.F., Mora-Montes, H.M., Hernández-Cervantes, A., Luna-Arias, J.P., Gow, N.A., Flores- Carreón, A. (2012).** Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 419 (1): 77-82.

- **Drummond, R.A., Saijo, S., Iwakura, Y., Brown, G.D. (2011).** The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol* 41 (2): 276-281.
- **Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999).** Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286 (5446): 1882-1888.
- **Enderlin, C.S., Ogrydziak, D.M. (1994).** Cloning, nucleotide sequence and functions of XPR6, which codes for a dibasic processing endoprotease from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 10 (1): 67-79.
- **Estrada- Mata, E., Navarro- Arias, M.J., Pérez- García, L.A., Mellado- Mojica, E., López, M.G., Csonka, K., Gacser, A., Mora- Montes, H.M. (2015).** Members of the *Candida parapsilosis* complex and *Candida albicans* are differentially recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Microbiol* 13 (6): 1527.
- **González- Hernández, R.J., Jin, K., Hernández- Chávez, M.J., Díaz- Jiménez, D.F., Trujillo- Esquivel, E., Clavijo- Giraldo, D.M., Tamez- Castellón, A.K., Franco, B., Gow, N.A.R., Mora- Montes, H.M. (2017).** Phosphomannosylation and the functional analysis of the extended *Candida albicans* *MNN4*- like gene family. *Front Microbiol* 6 (8): 2156.
- **Gow, N.A.R., Netea, M.G., Munro, C.A., Ferwerda, G., Bates, S., Mora-Montes, H.M. (2007).** Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* 196 (10): 1565-1571.
- **Gow, N.A.R., Hube, B. (2012).** Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol* 15 (4): 406-412.
- **Graham, L.M., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Williams, D.L., Taylor, P.R., Gordon, S., Dennehy, K., Brown, G.D. (2006).** Soluble dectin-1 as a tool to detect beta-glucans. *J Immunol Methods* 314 (1-2): 164-169.
- **Granger, B.L. (2018).** Propeptide genesis by Kex2- dependent cleavage of yeast wall protein 1 (Ywp1) of *Candida albicans*. *PLoS One* 13 (11): 0207955.
- **Heinsbroek, S.E., Taylor, P.R., Martínez, F.O., Martínez- Pomares, L., Brown, G.D., Gordon, S. (2008).** Stage- specific sampling by pattern recognition during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog* 4 (11): 1000218.

- **Hernández- Cervantes, A., Mora- Montes, H.M., Álvarez- Vargas, A., Jiménez, D.F., Robledo- Ortiz, C.I., Flores- Carreón, A. (2012).** Isolation of *Sporothrix schenckii* MNT1 and the biochemical and functional characterization of the encoded  $\alpha$ 1,2-mannosyltransferase activity. *Microbiology* 158 (9): 2419-2427.
- **Hernández, N.V., López- Ramírez, L.A., Díaz- Jiménez, D.F., Mellado-Mojica, E., Martínez-Dunker, I., López, M.G., Mora-Montes, H.M. (2017).** *Saccharomyces cerevisiae* *KTR4*, *KTR5* and *KTR7* encode mannosyltransferases differentially involved in the *N*- and *O*- linked glycosylation pathways. *Res Microbiol* 168 (8): 740-750.
- **Hernández- Chávez, M.J., Franco, B., Clavijo- Giraldo, D.M., Hernández, N.V., Estrada- Mata, E., Mora- Montes, H.M. (2018).** Role of protein phosphomannosylation in the *Candida tropicalis*- macrophage interaction. *FEMS Yeast Res* 18 (5).
- **Herscovics, D., Orlean, P. (1993).** Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J* 7 (6): 540-550.
- **Hobson, R.P., Munro, C.A., Bates, S., MacCallum, D.M., Cutler, J.E., Heinsbroek, S.E.M., Brown, G.D., Odds, F.C., Gow, N.A.R. (2004).** Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *Journal Biol Chem* 279 (38): 39628-39635.
- **Holyoak, T., Wilson, M.A., Fenn, T.D., Kettner, C.A., Petsko, G.A., Fuller, R.S., Ringe, D. (2003).** A resolution crystal structure of the prototypical hormone-processing protease Kex2 in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor. *Biochemistry* 42 (22): 6709-6718.
- **Hube, B., Naglik, J. (2001).** *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147 (8): 1997-2005.
- **Kiyoura, Y., Tamai, R. (2015).** Innate immunity to *Candida albicans*. *JDSR* 51 (3): 59-64.
- **Komano, H., Fuller, R.S. (1995).** Shared functions *in vivo* of a glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, *Mkc7*, and the proprotein processing protease *Kex2* in yeast. *PNAS* 92 (23): 10752-10756.

- **Kopecká, M., Gabriel, M. (1992).** The influence of Congo red on the cell wall and (1-3)-  $\beta$ - D- glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 158: 115-126.
- **Lacasa, E.C., Mazuelos, E.M., Espinel- Ingroff, A. (2007).** Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Rev Iberoam Micol* 15.
- **Linton, C.J., Borman, A.M., Cheung, G., Holmes, A.D., Szekely, A., Palmer, M.D., Bridge, P.D., Campbell, C.K., Johnson, E.M. (2007).** Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United kingdom mycology reference laboratory. *J Clin Microbiol* 45 (4): 1152-1158.
- **Lozoya- Pérez, N.E., Casas-Flores, S., Fogaca de Almeida, JR., Martínez- Álvarez, J.A., López-Ramírez, L.A., Pereira-Jannuzzi, G., Trujillo-Esquivel, E., Estrada- Mata, E., Almeida, S.R., Franco, B., Lopes-Bezerra, L.M., Mora- Montes, H.M. (2019).** Silencing of *OCHI* unveils the role of *Sporothrix schenckii* N-linked glycans during the host–fungus interaction. *Infect Drug Resist* 12: 67-85.
- **Marakalala, M.J., Vautier, S., Potrykus, J., Walker, L.A., Shepardson, K.M., Hopke, A., Mora- Montes, H.M., Kerrigan, A., Netea, M.G., Murray, G.I., Maccallum, D.M., Wheeler, R., Munro, C.A., Gow, N.A., Cramer, R.A., Brown, A.J., Brown, G.D. (2013).** Differential adaptation of *Candida albicans* *in vivo* modulates immune recognition by dectin-1. *PLoS Pathog* 9 (4): 1003315.
- **Martínez- Álvarez, J.A., Pérez- García, L.A., Flores- Carreón, A., Mora- Montes, H.M. (2014).** The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. *Rev Iberoam Micol* 31 (1): 62-66.
- **Miura, N & Ueda, M. (2018).** Evaluation of unconventional protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Cells* 7 (9): 128.
- **Mizutani, O., Nojima, A., Yamamoto, M., Furukawa, K., Fujioka, T., Yamagata, Y., Abe, K., Nakajima, T. (2004).** Disordered cell integrity signaling caused by disruption of the *kexB* gene in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell* 3 (4): 1036-1048.



- **Monod, M., Togni, G., Hube, B., Sanglard, D. (1994).** Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13 (2): 357-368.
- **Mora- Montes, H.M., Bates, S., Netea, M.G., Díaz-Jiménez, D.F., López-Romero, E., Zinker, S., Ponce- Noyola, P., Kullberg, B.J., Brown, A.J., Odds, F.C., Flores-Carreón, A., Gow, N.A. (2007).** Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot Cell* 6 (12): 2184-2193.
- **Mora- Montes, H.M., Bates, S., Netea, M.G., Castillo, L., Brand, A., Buurman, E.T., Díaz- Jiménez, D.F., Kullberg, B.J., Brown, A.J., Odds, F.C., Gow, N.A. (2010).** A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host- fungus interactions. *J Biol Chem* 285 (16): 12087- 12095.
- **Mora- Montes, H.M., Netea, M.G., Ferwerda, G., Lenardon, M.D., Brown, G.D., Mistry, A.R., Kullberg, B.J., O'Callaghan, C.A., Sheth, C.C., Odds, F.C., Brown, A.J., Munro, C.A., Gow, N.A. (2011).** Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* 79 (5): 1961-1970.
- **Mora- Montes, H.M., Ponce-Noyola, P., Villagómez- Castro, J.C., Gow, N.A.R., Flores- Carreón, A., López- Romero, E. (2009).** Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol* 4 (9): 1167-1183.
- **Moyes, D.L., Wilson, D., Richardson, J.P., Mogavero, S., Tang, S.X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R.L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Bader, O., Hube, B. (2016).** Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* 532 (7597): 64-68.
- **Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, H.B., Maccallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A., Bain, J.M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L.M., Brown, A.J., Odds, F.C., Gow, N.A. (2005).** Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem* 280 (2): 1051-1060.

- **Naglik, J.R., Challacombe, S.J, Hube, B. (2003).** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (3): 400-428.
- **Navarro- Arias, M.J., Defosse, T.A., Dementhon, K., Csonka, K., Mellado- Mojica, E., Dias-Valerio, A., González- Hernández, R.J., Courdavault, V., Clastre, M., Hernández, N.V., Pérez- García, L.A., Singh, D.K., Vizler, C., Gácsér, A., Almeida, R.S., Noël, T., López, M.G., Papon, N., Mora- Montes, H.M. (2016).** Disruption of Protein Mannosylation Affects *Candida guilliermondii* Cell Wall, Immune Sensing, and Virulence. *Front Microbiol* 2 (7): 1951.
- **Netea, M.G., Gow, N.A.R., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., Jacobs, L., Buurman, E.T., Gijzen, K., Williams, D.L., Torensma, R., McKinnon, A., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Van der Meer, J.W.M., Brown, A.J.P., Kullberg, B.J. (2006).** Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll- like receptors. *J Clin Invest* 116 (6): 1642-1650.
- **Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., Gow, N.A.R. (2008).** An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6 (1): 67-78.
- **Newport, G., Agabian, N. (1997).** KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. *J Biol Chem* 272 (46): 28954-28961.
- **Newport, G., Kuo, A., Flattery, A., Gill, C., Blake, J.J., Kurtz, M.B., Abruzzo, G.K., Agabian, N. (2003).** Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 278 (3): 1713-1720.
- **Pakdel, M., Blume, J. (2018).** Exploring new routes for secretory protein export from the *trans*- Golgi network. *Mol Biol Cell* 29 (3): 235-240.
- **Pérez- García, L.A., Csonka, K., Flores- Carreón, A., Estrada- Mata, E., Mellado- Mojica, E., Németh, T., López- Ramírez, L.A., Toth, R., López, M.C., Vizler, C., Marton, A., Tóth, A., Nosanchuk, J.D., Gácsér, A., Mora- Montes, H.M. (2016).** Role of Protein Glycosylation in *Candida parapsilosis* Cell Wall Integrity and Host Interaction. *Front Microbiol* 7: 306.

- **Pérez- García, L.A., Diaz- Jimenez, D.F., Lopez- Esparza, A., Mora- Montes, H.M. (2011).** Role of the cell wall polysaccharides during recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *J Glycobiology* 1 (1): 102.
- **Plato, A., Hardison, S.E., Brown, G.D. (2015).** Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol* 37 (2): 97-106.
- **Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H.M., McKinnon, A., Gow, N.A., Gaillardin, C., Munro, C.A., Richard, M.L. (2008).** Functional analysis of *Candida albicans* GPI- anchored proteins: Roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol* 45 (10): 1404-1414.
- **Prill, S.K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schröppel, K., Ernst, J.F. (2005).** *PMT* family of *Candida albicans*: Five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* 55 (2): 546-560.
- **Ram, A.F., Klis, F.M. (2006).** Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor White and Congo red. *Nat Protoc* 1 (5): 2253-2256.
- **Redding, K., Brickner, J.H., Marschall, L.G., Nichols, J.W. (1996).** Allele-Specific suppression of a defective trans- Golgi network (TGN) localization signal in *Kex2p* identifies three genes involved in localization of TGN transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* 16 (11): 6208-6217.
- **Reid, D.M., Gow, N.A.R., Brown, G.D. (2009).** Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol* 21 (8): 30-37.
- **Richardson, J.P., Mogavero, S., Moyes, D.L., Blagojevic, M., Verma, A.H., Coleman, B.M., Wilson, D., Bader, O., Hube, B. (2018).** Processing of *Candida albicans* Ece1p is critical for Candidalysin maturation and fungal virulence. *mBio* 9 (1): 02178-17.
- **Roelants, F.M., Torrance, P.D., Bezman, N., Thorner, J. (2002).** Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol Biol Cell* 13 (9): 3005-3028.

- **Ruiz- Herrera, J., Elorza, M.V., Valentín, E., Sentandreu, R. (2006).** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 6 (1): 14-29.
- **Sheth, C.C., Hall, R., Lewis, L., Brown, A.J., Odds, F.C., Erwig, L.P., Gow, N.A. (2011).** Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol* 49 (5): 513-524.
- **Spampinato, C., Leonardi, D. (2013).** Candida infections, causes, targets and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int* 2013 (20423): 13.
- **Spang, A. (2013).** Retrograde traffic from the Golgi to the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (6): 013391.
- **Staab, J.F., Ferrer, C.A., Sundstrom, P. (1996).** Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine- rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 271 (11): 6298-6305.
- **Spiro, R.G. (2000).** Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with *N*- linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 275 (46): 35657-35660.
- **Staniszewska, M., Bondaryk, M., Wieczorek, M., Estrada- Mata, E., Mora- Montes, H.M., Ochal, Z. (2016).** Antifungal effect of novel 2-bromo-2-chloro-2-(4-chlorophenylsulfonyl)- 1- phenylethanone against *Candida* strains. *Front Microbiol* 7: 1309.
- **Sudbery, P.E. (2011).** Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* 9: 737-748.
- **Turner, S.A., Butler, G. (2014).** The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4 (9): 019778.
- **van de Veerdonk, F.L., Joosten, L.A., Devesa, I., Mora- Montes, H.M., Kanneganti, T.D., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W., Gow, N.A., Kullberg, B.J., Netea, M.G. (2009).** Bypassing pathogen- induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1 $\beta$  production by the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Infect Dis* 199 (7): 1087-1096.

- **Wheeler, R.T., Fink, G.R. (2006).** A drug- sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* 2 (4): 35.
- **Zhao, S.B., Suda, Y., Nakanishi, H., Wang, N., Yoko-o. T., Gao, X.D., Fujita, M. (2019).** Yeast Dop1 is required for glycosyltransferase retrieval from the *trans*-Golgi network. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1863 (6): 1147-1157.
- **Zheng, N.X., Wang, Y., Hu, D.D., Yan, L., Jiang, Y.Y. (2015).** The role of pattern recognition receptors in the innate recognition of *Candida albicans*. *Virulence* 6 (4): 347-361.
- **Zhu, W., Filler, S.G. (2010).** Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* 12 (3): 273-282.