

Mecanismos de adaptación de levaduras patógenas al huésped y desarrollo de nuevas terapias antifúngicas

Óscar Zaragoza Hernández, Irene García Barbazán, Nuria Trevijano Contador y Ainhize Curiel Iglesias.



Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.



(De izquierda a derecha: Nuria Trevijano Contador, Ainhize Curiel Iglesias, Irene García Barbazán y Óscar Zaragoza Hernández)

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares que se dividen por gemación, fisión o septación. Existen muchas especies de levaduras, algunas de ellas de gran interés como modelo de investigación o en biotecnología. El ejemplo más claro es *Saccharomyces cerevisiae*, ya que debido a su función en la producción del pan, vino, se ha convertido desde hace décadas en uno de los organismos más utilizados en investigación para entender múltiples procesos biológicos, como metabolismo, ciclo celular y respuesta a estrés. Otro ejemplo es la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, que por su peculiar manera de dividirse, ha sido uno de los modelos utilizados para descubrir las bases moleculares que regulan el ciclo celular en eucariotas. Otras levaduras, como

Pichia pastoris o *Yarrowia lypolytica* son consideradas pequeñas fábricas para producir proteínas heterólogas y son ampliamente usadas en biotecnología.

Pero la importancia de las levaduras va más allá de la biotecnología y producción de alimentos, ya que algunas especies pueden causar enfermedad en humanos. En particular, hay dos géneros de interés clínico, que son *Candida* y *Cryptococcus*. Estas dos levaduras se diferencian ampliamente en la evolución, siendo *Candida* levaduras ascomicetas y *Cryptococcus* basidiomicetas. Además, desde un punto de vista clínico, difieren también muy significativamente en los mecanismos de virulencia, la ruta de entrada en los humanos, y el cuadro clínico que causan. Sin embargo,

ambas tienen en común que son capaces de causar enfermedades graves y diseminadas en pacientes inmunodeprimidos, por lo que son consideradas levaduras patógenas oportunistas.

La gran mayoría de las levaduras del género *Candida* son comensales humanos, encontrándose en la microbiota del intestino, mucosas y piel. La especie más relevante es *C. albicans*, la cual puede causar enfermedades en las mucosas o diseminadas. *C. albicans* es uno de los agentes causantes más frecuentes de la vaginitis, la cual afecta a millones de mujeres en el mundo. También causa infecciones orofaríngeas en pacientes VIH+. El cuadro clínico más grave son aquellas enfermedades en las que las levaduras se diseminan por todo el

cuerpo e invaden diferentes órganos, siendo los riñones uno de los sitios donde se *C. albicans* se aloja preferencialmente. Las enfermedades diseminadas están muy asociadas a pacientes inmunodeprimidos, sobre todo aquellos que sufren cirugía intestinal y precisan de tratamientos inmunosupresores. En estos casos, el origen más frecuente de la infección son las levaduras que forman parte de la microbiota del intestino, y que son capaces de atravesar los tejidos y diseminarse por la sangre. Estas enfermedades tienen una alta tasa de mortalidad, y son una causa de infección nosocomial muy frecuente. Otras especies del género *Candida* que son agentes causantes de enfermedad son *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*. Además, en los últimos años, hay otra especie, *C. auris*, que ha emergido como un patógeno preocupante, ya que causa brotes hospitalarios de difícil control y eliminación.

Las enfermedades causadas por *Cryptococcus* son diferentes a las causadas por *Candida*, y tienen un cuadro clínico muy característico. Las levaduras del género *Cryptococcus* tienen una característica fenotípica muy típica, que es una cápsula de polisacárido que rodea a la célula y que no se encuentra en otras levaduras. Esta cápsula es fácilmente visible tras la suspensión de las levaduras en tinta china, apareciendo como un halo blanco alrededor de la célula. La cápsula es necesaria para la virulencia, ya que se ha descrito que tiene múltiples efectos deletéreos sobre la respuesta inmune.

La principal especie patógena de este género es *Cryptococcus neoformans*. Esta especie se encuentra en múltiples nichos en el ambiente, y se cree que se adquieren por inhalación, siendo el pulmón el primer órgano que colonizan. Aunque normalmente las levaduras son controladas y eliminadas por el sistema inmune del pulmón, existen evidencias de que *C. neoformans* también puede permanecer en este órgano durante mucho tiempo, causando infecciones crónicas asintomáticas. El cuadro clínico más grave se produce cuando las levaduras son capaces de diseminarse desde el pulmón a otros órganos, siendo el cerebro el órgano donde se alojan preferentemente, y lo cual se produce en enfermos con bajo recuento de linfocitos CD4+, sobre todo VIH+. Por ello, el cuadro clínico más característica es meningoencefalitis que tiene una mortalidad asociada muy alta (alrededor del 20%). Las

enfermedades causadas por *C. neoformans* tienen una alta incidencia, sobre todo en regiones en vías de desarrollo, como el África Subsahariana, donde causa más de cien mil muertes anualmente.

El tratamiento de las enfermedades fúngicas invasoras sigue siendo un reto. Hay tres familias de antifúngicos usados en clínica para tratar estas enfermedades: polienos (anfotericina B), azoles (fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol e isavuconazol) y candinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina y rezafungina). Estos antifúngicos presentan varias limitaciones. Muchos tienen efectos secundarios, como la anfotericina y azoles. En otros casos, el espectro de acción es limitado. El antifúngico más activo frente a la mayoría de hongos es la anfotericina, siendo el resto activos frente a un número limitado de levaduras. Por ejemplo, los azoles tienen actividad reducida frente a *C. glabrata* y *C. auris*. En el caso de las candinas, tienen actividad limitada frente a *C. parapsilosis* y no son activas frente a *C. parapsilosis*. Otro problema asociado a la administración de los antifúngicos es la selección de resistencias. Estos fármacos se administran de manera frecuente como tratamiento profiláctico o empírico, es decir, sin tener la certeza de que existe una infección probada. Así pues, el uso masivo de antifúngicos en las últimas décadas ha producido una selección de especies que presentan sensibilidad reducida o resistencia intrínseca a determinados antifúngicos, como es el caso de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* o *C. auris*. Por último, el precio de la mayoría de los antifúngicos es alto, lo que limita su administración. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para disminuir el impacto de estas enfermedades en nuestra sociedad.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN DESARROLLADAS

El grupo está interesado en elucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedades por levaduras patógenas, principalmente *C. neoformans*. Además, en los últimos años ha iniciado otras líneas cuyo objetivo es identificar nuevas terapias basadas en el reposicionamiento de fármacos no sometidos a patentes (off-patent drug repurposing).

1) Mecanismos de adaptación de *Cryptococcus neoformans* al huésped. Papel de las células titanes

Entre todos los hongos patógenos, *C. neoformans* ofrece un modelo único de investigación. Además de que es una levadura que causa un gran número de muertes al año, *C. neoformans* posee múltiples mecanismos de adaptación al huésped que hacen que pueda evadir la respuesta inmune de manera muy efectiva. La cápsula de polisacárido protege a las levaduras frente a los factores de estrés que induce el sistema inmune, como radicales libres o péptidos antimicrobianos. Pero el polisacárido de la cápsula también puede actuar como factor de virulencia e interferir con la respuesta inmune. Otra característica de esta levadura es su capacidad de sobrevivir dentro de células fagocíticas, por lo que se comporta como un patógeno intracelular facultativo.

Nuestro grupo está interesado en otro de los mecanismos que permiten a *C. neoformans* sobrevivir en el huésped, que es la formación de las denominadas células titanes. Dichas células se forman por un crecimiento masivo tanto de la cápsula como del cuerpo celular (delimitado por la pared). El tamaño normal de las levaduras en condiciones de laboratorio es de 5-7 micras. Sin embargo, en modelos animales, hemos encontrado que hay una población de células que puede alcanzar más de 40 micras de diámetro (ver figura 1).

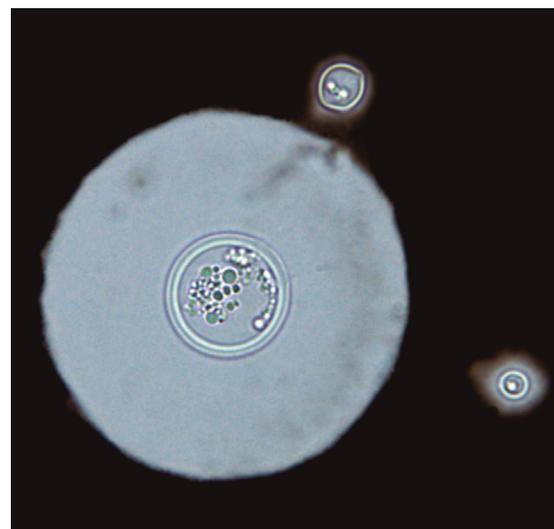


Figura 1. Célula titan de *C. neoformans*, junto a dos células de tamaño regular.

Para entender el papel de estas células en la virulencia de *C. neoformans*, estamos llevando a cabo diferentes aproximaciones (ver figura 2).

- Estudios *in vivo*. Para averiguar los factores del huésped que regulan la formación de células titanes, estamos utilizando diferentes modelos animales que tienen una diferente polarización en la respuesta inmune (ratones KO, administración de citoquinas, anticuerpos bloqueantes, etc). Nuestros resultados indican que en condiciones en la que la principal respuesta inmune es de tipo Th2 hay una mayor proporción de células titanes en los pulmones. Estos estudios pueden ayudar a comprender los factores de susceptibilidad de determinados pacientes a desarrollar enfermedades causadas por *C. neoformans*, pero también ayudar a predecir la efectividad de tratamientos antifúngicos.
- Mecanismos moleculares que regulan la formación de células titanes. Recien-

temente, nuestro grupo ha sido capaz de describir medios de laboratorio (limitación de nutrientes con suero y CO₂) en los que *C. neoformans* aumenta de tamaño significativamente (diámetro alrededor de 30 micras). Aunque estas células no tienen el tamaño que se observa *in vivo*, las hemos denominado "titan-like" y consideramos que ofrecen un modelo óptimo para investigar los procesos que desencadenan este proceso morfológico. Hemos llevado a cabo varios abordajes, como RNAseq, que nos han permitido identificar nuevos elementos que regulan este proceso. Recientemente, usando la estrategia del reposicionamiento de fármacos (ver más adelante), también hemos identificado fármacos que inhiben el crecimiento celular en *C. neoformans*, lo que nos permitirá por un lado identificar nuevos elementos reguladores tras identificar la diana de estas drogas, y también evaluar su potencial terapéutico.

2) Mecanismo de acción de antifúngicos

El grupo también está interesado en la mejora de los tratamientos antifúngicos. De las familias descritas anteriormente, el antifúngico que presenta la mayor actividad fungicida es la Anfotericina B (AmB), aunque también es de los que tiene mayor toxicidad asociada. Clásicamente, el mecanismo de acción de este antifúngico se ha basado en su unión al ergosterol, principal esteroide de la membrana de los hongos, favoreciendo la formación de poros y muerte celular. Estudios recientes han mostrado que existen además otros mecanismos por los que la AmB ejerce su función, como son el secuestro de ergosterol e inducción de estrés oxidativo. En cuanto al primero, la AmB se une al ergosterol, apartándolo de la membrana y causando daño celular. En cuanto al estrés oxidativo, la AmB favorece el aumento de especies reactivas de oxígeno, llevando a alteraciones en la estructura de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y causando daño en las células. Por lo tanto, la AmB provo-

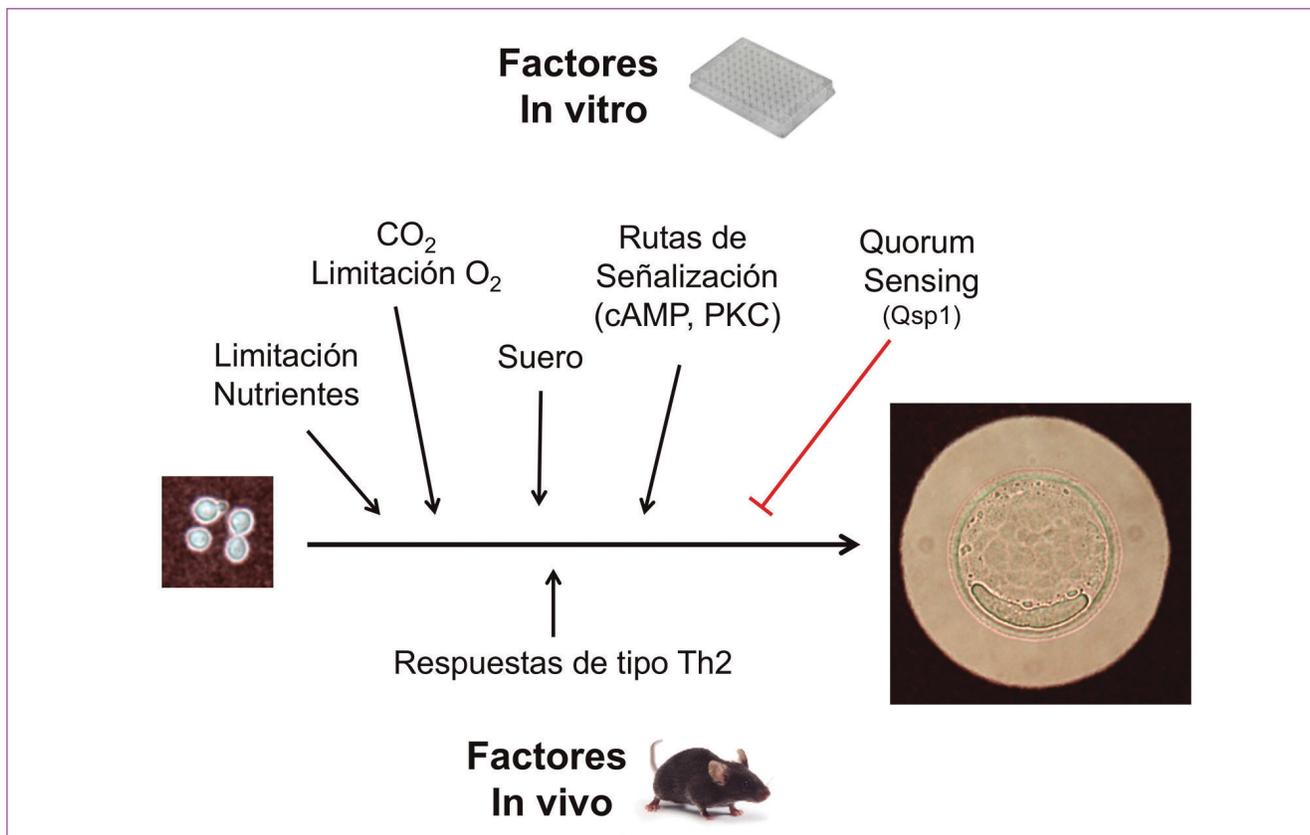


Figura 2. Resumen de los principales factores que regulan la formación de células titanes.

ca daño tanto a nivel de membrana como a nivel intracelular, por lo que es necesario seguir investigando la función de los radicales libres en la acción de esta molécula para poder diseñar terapias más eficaces y con menor toxicidad.

3) Reposicionamiento de fármacos

Para intentar solucionar los problemas que presentan los fármacos citados anteriormente, en los últimos años se está trabajando en estrategias basadas en el reposicionamiento de fármacos no sometidos a patente (“off-patent drug repurposing”). Con ello se pretende buscar nuevas actividades de fármacos ya comercializados que puedan mejorar las terapias actuales y reducir el coste y la toxicidad del tratamiento. Se han encontrado fármacos, como el antibiótico eritromicina, que aumentan la efectividad de la AmB, lo cual abre la puerta a plantear nuevas estrategias terapéuticas basadas en nuevas combinaciones de fármacos.

En paralelo, hemos utilizado esta estrategia para encontrar fármacos que presenten actividad frente a hongos patógenos emergentes, como es el caso de *Candida auris*, la cual se ha convertida en una levadura de especial preocupación por ser causa de múltiples brotes hospitalarios a nivel mundial en los últimos años.

COLABORACIONES

Jesús Pla. Facultad de Farmacia. UCM, Madrid.

Toni Gabaldón. IRB, Barcelona.

Francisco Lozano. IDIBAPS, Barcelona.

Joaquín Ariño. UAB, Barcelona.

Jesús Pérez Gil. Facultad de Biología, UCM, Madrid.

Juan Carlos Argüelles. Universidad de Murcia.

Arturo Casadevall. John Hopkins University, USA.

Maria Jose Mendes Giannini. USP, Brasil.

Guilhem Janbon. Instituto Pasteur, Paris, Francia.

Liise-anne Piroski, Albert Einstein College of Medicine, Nueva York, USA.

María Luisa Gaspar y Belén de Andrés. CNM, ISCIII.

Emilia Mellado Terrado. Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología. CNM, ISCIII.

PUBLICACIONES

Rossi SA, de Oliveira HC, Agreda-Mellon D, Lucio J, Mendes-Giannini MJS, García-Camero JP, Zaragoza O. Identification of Off-Patent Drugs That Show Synergism with Amphotericin B or That Present Antifungal Action against *Cryptococcus neoformans* and *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64(4):e01921-19.

de Oliveira HC, Monteiro MC, Rossi SA, Pemán J, Ruiz-Gaitán A, Mendes-Giannini MJS, Mellado E, Zaragoza O. Identification of Off-Patent Compounds That Present Antifungal Activity Against the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 2;9:83.

Trevijano-Contador N, de Oliveira HC, García-Rodas R, Rossi SA, Llorente I, Zaballos Á, Janbon G, Ariño J, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. *PLoS Pathog.* 2018; 14(5):e1007007.

Rueda C, Puig-Asensio M, Guinea J, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O; CANDIPOP Project from GEIH-GEMICOMED (SEIMC) and REIPI. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23(1):49.e1-49.e8.

Mesa-Arango AC, Rueda C, Román E, Quintin J, Terrón MC, Luque D, Netea MG, Pla J, Zaragoza O. Cell Wall Changes in Amphotericin B-Resistant Strains from *Candida tropicalis* and Relationship with the Immune Responses Elicited by the Host. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(4):2326-35.

García-Barbazán I, Trevijano-Contador N, Rueda C, de Andrés B, Pérez-Tavárez R, Herrero-Fernández I, Gaspar ML, Zaragoza O. The formation of titan cells in *Cryptococcus neoformans* depends on the mouse strain and correlates with induction of Th2-type responses. *Cell Microbiol.* 2016; 18(1):111-24.

Trevijano-Contador N, Herrero-Fernández I, García-Barbazán I, Scorzoni L, Rueda C, Rossi SA, García-Rodas R, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015;6(1):66-74.

Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, Argüelles JC, Pla J, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O.

The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(11):6627-38.

García-Rodas R, Cordero RJ, Trevijano-Contador N, Janbon G, Moyrand F, Casadevall A, Zaragoza O. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. *mBio.* 2014; 5(3):e00945-14.

Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1071-83.

Zaragoza O, García-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez- Tudela JL, Casadevall A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* 2010. 6(6):e1000945.