

Mecanismos de virulencia de levaduras patógenas y mecanismo de acción de antifúngicos

Rocío García Rodas, Ana Cecilia Mesa Arango, Nuria Trevijano Contador, Luis Ros Vidal, Cristina Rueda Hernández y Oscar Zaragoza Hernández
 Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.
 Majadahonda, Madrid



De izquierda a derecha: Cristina Rueda Hernández, Nuria Trevijano Contador, Rocío García Rodas, Suélen Rossi, Óscar Zaragoza Hernández, Ana Cecilia Mesa Arango, Luis Ros Vidal.

NÚMERO 55

46

SEM@FORO

JUN.
2013

Nuestro grupo se encuentra en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. El grupo está liderado por el Dr. Oscar Zaragoza Hernández, y cuenta con cuatro becarios predoctorales (Rocío García Rodas, Nuria Trevijano Contador, Ana Cecilia Mesa Arango y Luis Ros Vidal) y una contratada postdoctoral (Cristina Rueda Hernández). Además, el grupo ha recibido a estudiantes extranjeros, principalmente de Brasil (Liliana Scorzoni, Fernanda Sangalli-Leite y Suélen Rossi).

Nuestro trabajo se centra en levaduras patógenas oportunistas. Nuestras actividades se dividen en dos líneas: 1) Investigación de mecanismos de adaptación al huésped; y 2) Estudio de mecanismos de acción de antifúngicos. Además, el grupo ha dedicado un esfuerzo para poner a punto modelos de huéspedes no mamíferos para estudiar la virulencia fúngica.

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE VIRULENCIA Y ADAPTACIÓN AL HUÉSPED DE LEVADURAS PATÓGENAS

En el laboratorio estamos usando la levadura patógena *Cryptococcus neoformans* como modelo para estudiar la virulencia fúngica. Este patógeno afecta principalmente a enfermos VIH y tiene particular incidencia en regiones en vías de desarrollo, donde causa más de 650.000 muertes anuales. *Cryptococcus* tiene una cápsula de polisacárido la cual es necesaria para la virulencia. Además, *Cryptococcus* ha desarrollado mecanismos de adaptación al huésped y de evasión de la respuesta inmune. Entre ellos, se incluyen cambios morfológicos, que afectan principalmente al tamaño de la cápsula y al tamaño total de la célula. Durante las primeras horas de infección en ratones, *Cryptococcus* aumenta

el tamaño de la cápsula, lo que la protege de factores de estrés y de la muerte por macrófagos. *Cryptococcus* también puede aumentar el tamaño total de la célula, incluyendo tanto la cápsula como el cuerpo celular, formándose lo que hemos denominado «células gigantes o titanes», que pueden alcanzar un diámetro de 100 micras (ver figura 1). Estas células aparecen al cabo de 2-3 semanas. Las células gigantes/titanes son resistentes a factores de estrés, y contribuyen a evadir la respuesta inmune permitiendo al patógeno perdurar en el huésped. En los últimos años, el grupo ha investigado estos dos fenómenos para entender su función durante la infección. Además, hemos desarrollado diferentes estrategias para identificar los mecanismos moleculares que permiten la aparición de estas células. Creemos que estos cambios morfológicos son importantes durante la infección, ya que resultan en la aparición de diferentes tipos de células que permiten la evasión de la respuesta inmune y por lo tanto, contribuyen al desarrollo de la enfermedad y persistencia en el huésped.

INVESTIGACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN Y DE ADAPTACIÓN A LOS ANTIFÚNGICOS

El tratamiento de las infecciones fúngicas se basa en el uso de fármacos antifúngicos, que pertenecen principalmente a tres familias: polienos (anfotericina B), azoles y equinocandinas. Aunque es necesario el desarrollo de nuevos antifúngicos, es complicado que en un futuro próximo vayan a aparecer nuevos fármacos para tratar estas infecciones, por lo que es prioritario entender tanto los mecanismos de acción de los antifúngicos disponibles, como los mecanismos de resistencia que producen la adaptación a estos antifúngicos. En particular, nuestros estudios se centran en dos fármacos, la anfotericina B y la caspofungina.

La anfotericina B es el antifúngico que más se ha utilizado para tratar las infecciones causadas por levaduras patógenas. La anfotericina B tiene actividad fungicida y un amplio espectro de acción, aunque su precio y toxicidad son factores limitantes en su utilización. Aunque se ha descrito que este fármaco se une al ergosterol y forma poros, otros estudios ponen en duda que este sea su principal mecanismo de acción. En este sentido, se ha descrito que la anfotericina B también induce acumulación de radicales libres. Nuestro grupo se ha centrado en la importancia del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de la anfotericina B. Nuestros resultados sugieren que la acumulación de radicales libres es un mecanismo necesario para que la anfotericina cause la muerte celular, y que la resistencia a este antifúngico se correlaciona con defectos en la acumulación de radicales libres o con un aumento de enzimas antioxidantes. Por ello, pensamos que nuestro trabajo contribuirá a diseñar nuevas estrategias que mejoren la efectividad de la anfotericina.

La caspofungina es una equinocandina que tiene actividad fungicida frente a *Candida* ya que inhibe la enzima β -1,3-glucano sintasa. Aunque el principal mecanismo de resistencia es la aparición de mutaciones en la diana (codificada por los genes *FKS*), se han descrito situaciones en las que las levaduras son capaces de tolerar altas concen-

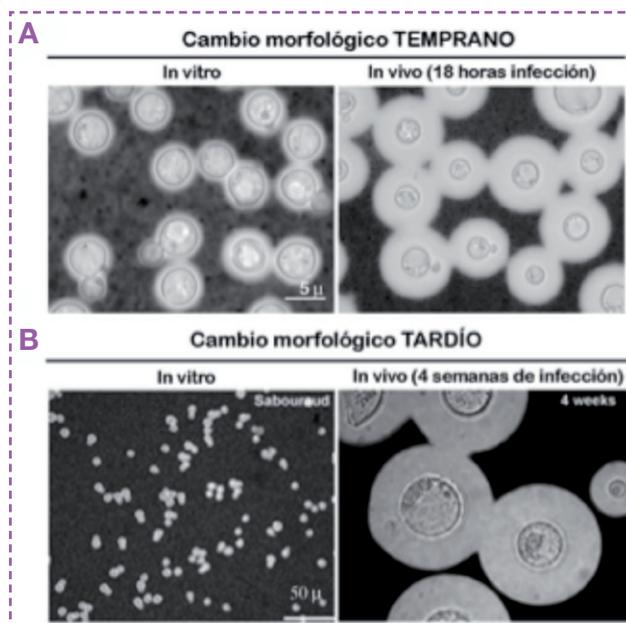


Fig. 1. Cambios morfológicos en *C. neoformans*.

Suspensión de las células en tinta china, que permite visualizar la cápsula como un halo blanco alrededor de la célula. **A.** Aumento del tamaño de la cápsula (cambio temprano). Izquierda, células in vitro (cápsula pequeña); derecha, células aisladas de un ratón infectado durante 18 horas (cápsula grande). Ambas fotos tienen la misma magnificación. **B.** Células gigantes. Izquierda, células in vitro, derecha, células aisladas de un ratón infectado durante 4 semanas. Barra de magnificación en panel izquierdo aplica a ambos paneles.

traciones de antifúngico. Nuestro grupo ha estudiado los mecanismos involucrados en el crecimiento paradójico, el cual se define como el crecimiento de las levaduras a altas concentraciones de antifúngico, pero no a concentraciones intermedias. Este efecto es particularmente importante en presencia de caspofungina, ya que se da en alrededor de un 40% de cepas de *Candida albicans*. Nuestros resultados revelan que este efecto se debe a la inducción de mecanismos que resultan en la reestructuración de la pared celular y que causan una disminución de la virulencia de las levaduras. En la actualidad, estamos investigando las posibles implicaciones clínicas de estos mecanismos de adaptación.

USO DE HUÉSPEDES ALTERNATIVOS Y APLICACIÓN DE LA REGLA DE LAS «3RS»

Las actividades del grupo implican la utilización de modelos animales. Aunque los ratones constituyen el modelo más utilizado, nuestro grupo ha realizado un esfuerzo para reducir el número de animales utilizados y con ello cumplir

con la regla de las «3Rs» (reducir, reemplazar y refinar) para minimizar los problemas bioéticos asociados a la experimentación animal. Una alternativa es reemplazar los modelos de mamífero por otros organismos que tengan un sistema neuronal poco desarrollado. Por ello, hemos implantado de manera rutinaria el modelo del lepidóptero *Galleria mellonella*, que permite utilizar un gran número de individuos por experimento, tienen bajo coste y son fáciles de manipular. *Galleria mellonella* es un modelo óptimo para investigar factores de virulencia y mecanismos de adaptación al huésped (por ejemplo, la morfogénesis de *Cryptococcus*), para evaluar la virulencia de levaduras patógenas que presentan baja virulencia en ratones y para determinar la eficacia de antifúngicos *in vivo*. Además, algunos aspectos de la inmunidad innata están conservados entre lepidópteros y mamíferos, lo que nos ha permitido investigar aspectos de la fagocitosis de levaduras patógenas. La implantación de este modelo ha multiplicado el número de experimentos *in vivo* realizados en el laboratorio. Además, el uso de este modelo ha permitido realizar experimentos que no están justificados usando ratones, como por ejemplo el rastreo de colecciones de mutantes para identificar genes involucrados en virulencia.

Por último, también hemos comenzado a utilizar como modelo de huésped el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual ofrece como principal ventaja la disponibilidad de gusanos «knockout» y así poder investigar la función de elementos del huésped en la interacción con levaduras patógenas.

COLABORACIONES

- Toni Gabaldón** (Centro de Regulación Genómica, Barcelona).
Juan Carlos Argüelles (Universidad de Murcia).
Jesus Pla (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid)
Arturo Casadevall (Albert Einstein College of Medicine, Nueva York, Estados Unidos).
Eleftherios Mylonakis (Brown University, Providence, Estados Unidos).
Josh Nosanchuk (Albert Einstein College of Medicine, Nueva York, Estados Unidos).
Guilhem Janbon (Institut Pasteur, París, Francia).
Maria Jose Mendes-Gianinni (Universidade Estadual Paulista de São Paulo, Araraquara, Brasil).
Carlos P. Taborda (Universidad de Sao Paulo, Brasil).
Enrique Herrero (Universidad de Lleida, España).
Encarnación Lozano (Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Madrid).

BIBLIOGRAFÍA

- Zaragoza O, Nielsen K.** (2013) Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol.* En prensa.
García-Rodas R, Cordero R, Zaragoza O. (2013) *Cryptococcus*. En *Human Pathogenic Fungi: New technologies and new insights*. Horizon Scientific Press.
Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, Mendes-Gianinni MJ, Zaragoza O. (2013) Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. *PLoS One* 8: e60047.
Thomaz L, García-Rodas R, Guimarães AJ, Taborda CP, Zaragoza O, Nosanchuk JD (2013). *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence* 15: 139-46.



Fig. 2. *Galleria mellonella*.

- Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O.** (2012) The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol.* En prensa.
Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. (2012) It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol.* 3: 286.
Rodríguez, ML, Casadevall, A, Zaragoza O. (2012) The architecture and antigenic composition of the polysaccharide capsule with emphasis on events and structure outside the cell membrane. En *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. ASM Press.
García-Rodas R, Zaragoza O. (2012) Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 64: 147-61.
García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. (2011) *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One.* 6: e24485
González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza O, Argüelles JC. (2011) Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 1810: 777-83.
García-Rodas R, González-Camacho F, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. (2011) The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. *Infect Immun.* 79: 2136-44.
Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Gianinni MJ, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. (2011) Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect.* 13: 457-67.
Zaragoza O, García-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Casadevall A. (2010) Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* 17 6: e1000945.
Zaragoza O, Rodríguez ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. (2009) The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 68: 133-216.
Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Casadevall A. (2008) Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol.* 10: 2043-57.