

# PAPEL DE LA GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA FORMACIÓN DE BIOPEÍCULAS DE *Candida albicans*

Pérez López Luz Adriana (1), Clavijo Giraldo Diana Marcela (2), Mora Montes Héctor Manuel (3)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [la.perezlopez@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato]  
| [diamar438@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [hmora@ugto.mx]

## Resumen

Las Biopelículas son comunidades microbianas asociadas a la superficie con un impacto médico y ambiental relevante ya que pueden formarse en superficies naturales y artificiales, con consecuencias significativas tanto para la industria como para la salud humana. La formación de biopelículas de *C. albicans* puede emplear productos y mecanismos génicos distintos, sin embargo, la glicosilación de proteínas, en específico de las manoproteínas de pared celular, es de extrema importancia ya que los componentes de la pared celular son determinantes para la interacción del patógeno con la célula huésped. Por ello, en el presente trabajo se analizó la capacidad de formar biopelículas de tres mutantes de *C. albicans*, por medio del método espectrofotométrico en microplacas de poliestireno. Los resultados indicaron que la mutante *mns1* y *rot2* son estadísticamente significativos cuando se comparan con la cepa silvestre, por lo que la delección del gen correspondiente no es relevante para la producción de manoproteínas que conforman la pared celular y por ende la formación de Biopelículas. Además la mutante *och1*, tuvo un comportamiento similar a la cepa silvestre.

## Abstract

Biofilms are microbial communities associated to the surface with a relevant medical and environmental impact as they can be formed on natural and artificial surfaces, with significant consequences for both industry and human health. The formation of biofilms of *C. albicans* can employ different gene products and mechanisms, however, glycosylation of proteins, specifically cell wall mannoproteins, is of extreme importance since the components of the cell wall are determinants for the interaction of the pathogen with the host cell. Therefore, the present work analyzed the ability to form biofilms of three mutants of *C. albicans*, using the spectrophotometric method in polystyrene microplates. The results indicated that the mutant *mns1* and *rot2* are statistically significant when compared to the wild-type strain, so deletion of the corresponding gene is not relevant for the production of mannoproteins that make up the cell wall and therefore the formation of Biofilms. In addition the mutant *och1*, had a behavior similar to the wild strain.

### Palabras Clave

Biopelículas; *Candida*; Glicosilación; mutante.

## INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* es un hongo dimórfico que puede ser comensal o un patógeno oportunista con la capacidad de causar una variedad de infecciones, desde superficiales hasta amenazantes para la vida. Los factores que predisponen a *C. albicans* para causar una infección incluyen pacientes inmunocomprometidos, tratamiento con antibióticos, el uso de dispositivos como catéteres intravenosos, infección por el VIH, diabetes y vejez. Diferentes manifestaciones clínicas de infecciones producidas por *C. albicans* están asociadas con la formación de biopelículas en la superficie de los biomateriales utilizados en la práctica clínica. Las células que forman parte de estas biopelículas exhiben fenotipos diferentes en comparación con las células planctónicas crecidas en condiciones típicas de laboratorio (cultivos líquidos), tales como la elevada resistencia hacia los agentes antimicrobianos y protección contra las defensas del huésped [1]. Para que esto ocurra cuando una comunidad microbiana se une irreversiblemente a un sustrato y está embebida en una matriz extracelular autoproducida, sus células muestran un fenotipo alterado con respecto a su velocidad de crecimiento y transcripción genética. Esta asociación que logra una comunidad microbiana se conoce como biopelícula, que puede estar formada por una sola especie bacteriana o fúngica, o por una comunidad derivada de múltiples especies microbianas [2]. Debido a lo anterior los componentes de la pared celular de *C. albicans* juegan un papel importante en la interacción hongo-huésped; la pared celular es la estructura que primero entra en contacto con las células epiteliales del huésped y con las células del sistema inmune, por lo cual es responsable de la adherencia del patógeno a las superficies del huésped y otros microorganismos, y es de vital importancia para el reconocimiento inmunológico y la activación tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa [3].

Las proteínas de adhesión de la superficie celular, conocidas genéricamente como adhesinas, exhiben características similares a las de las

lectinas e integrinas. Estas proteínas participan en el apareamiento, la morfogénesis, la formación de biopelículas y las interacciones con los huéspedes mamíferos. Las adhesinas y otros componentes de la superficie celular pueden ser atacados por anticuerpos opsonizantes, receptores inmunes y algunos fármacos antifúngicos para interferir con la función de adhesión o con su anclaje en la pared celular. Esta interferencia puede interrumpir las redes sociales entre los hongos y así prevenir la formación de biopelículas y reducir la colonización en catéteres y otros focos de infección [4].

Por esta razón las funciones de las glicoproteínas de pared fúngica incluyen el mantenimiento de la integridad de la pared celular y su remodelación, la adhesión homotípica y heterotípica, la formación de biopelículas, la adquisición de hierro y esteroides, la degradación de proteínas y hacer frente al estrés oxidativo [5]. Sin embargo, debido a su glicosilación compleja y variable, las glicoproteínas de pared fúngica son difíciles de analizar usando enfoques proteómicos tradicionales. Los recientes avances en espectrometría de masas han permitido la rápida y sensible identificación y cuantificación de las glicoproteínas que se encuentran en la pared del hongo. Estos enfoques serán particularmente útiles para estudiar la dinámica del subproteoma de glicoproteínas de pared fúngica, y para el desarrollo de nuevas vacunas y herramientas de diagnóstico [6].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas y condiciones de cultivo

En la tabla I se indican las cepas del organismo empleado. Se realizaron cultivos de *C. albicans* en medio YPD (extracto de levadura 1% [p/v], peptona de gelatina al 2% [p/v], dextrosa 2% [p/v], y agua destilada), en tubos falcón de 50 mL, incubados a 28° C por 24 horas en agitación constante.

Posteriormente para realizar los stocks se centrifugaron los tubos falcón que contenían el

hongo en crecimiento, se decantó el medio viejo y la pastilla recuperada se lavó tres veces con fosfato salino PBS, la cual se re suspendió con el tercer lavado de este y se tomaron 750  $\mu\text{L}$  de cada cepa, y se colocaron en un tubo eppendorf aforando a 1 mL con 250  $\mu\text{L}$  de glicerol al 50% (v/v). De estos stocks se tomaron 150  $\mu\text{L}$  para realizar cada uno de los cultivos de cada cepa, una vez que crecieron se centrifugaron los tubos falcon para obtener la pastilla, se decantó el medio viejo y se resuspendió con 1 mL de medio YPD nuevo. De esta nueva suspensión se tomó 1  $\mu\text{L}$  de cada cepa, el cual se transfirió a un tubo eppendorf con 999  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril, para tener una dilución 1:1000 y así iniciar con el conteo de células de cada cepa; para lo cual se utilizó un microscopio de campo claro y una cámara de Nubauer. El conteo celular se hizo con el fin de obtener una suspensión  $1 \times 10^7$ .

**Tabla 1: Cepas mutantes y reintegrantes de *C. albicans* utilizadas.**

Microorganismo	Cepas	Características de las mutantes
<i>C. albicans</i>	WT	Cepa silvestre (wild-type)
	<i>mns 1 <math>\Delta</math></i>	Carece de la $\alpha$ -1,2 manosidasa, de la familia de las glicosilhidrolasas, presente en el retículo endoplásmico [7].
	<i>rot 2<math>\Delta</math></i>	Carece de la subunidad catalítica de la glucosidasa II, necesaria para la N- glicosilación de proteínas y la síntesis normal de la pared celular [8].
	<i>och 1<math>\Delta</math></i>	Carece de la $\alpha$ -1,6manosiltransferasa, que inicia la adición de la cadena externa de las n-glicanas [8].

### Formación de Biopelículas

Se realizaron ensayos de formación de biopelículas utilizando la suspensión previa de  $1 \times 10^7$  células/mL para cada cepa individualmente, se utilizaron placas comerciales de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, nuevas y estériles. En el primer ensayo se

colocaron 100  $\mu\text{L}$  de las suspensiones  $1 \times 10^7$  previamente preparadas de cada cepa en los 12 pozos de la placa. Repitiendo el mismo procedimiento para el ensayo no. 2. En el siguiente orden:

**Tabla 2: Orden de las cepas silvestre, mutantes y reintegrantes en la microplaca.**

A	WT
B	ROT 2 $\Delta$ M
C	ROT 2 $\Delta$ R
D	MNS 1 $\Delta$ M
E	MNS 1 $\Delta$ R
F	OCH 1 $\Delta$ M
G	OCH 1 $\Delta$ R
H	YPD (CONTROL)

Se incubó a 28°C por 4 hrs, para lograr la adhesión de las células al poliestireno. Una vez transcurridas las 4 hrs se retiró de incubación y se lavó con PBS cada pozo para retirar las células que no formarían una biopelícula. Posteriormente a cada pozo se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de medio Sabouraud como medio nutritivo para el crecimiento de hongos (peptona de carne 0.5%(p/v), peptona de caseína 0.5%(p/v), dextrosa 2%(p/v), y agua destilada), el medio se ajustó a un pH de 5.7, se incubó la placa a 28°C por 24hrs. Después se retiró el medio Sabouraud y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de metanol a cada pozo utilizado como surfactante y se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 min.

Después se removió el metanol y se dejó secar al aire libre por 5 min, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  a cada pozo de cristal violeta al 0.02% para teñir las biopelículas formadas y se dejó incubando por 20 min. Transcurrido el tiempo se lavó con agua destilada cada pozo y se adicionó a cada uno de estos 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético al 33% en agua y con este se leyó la absorbancia a 590nm.

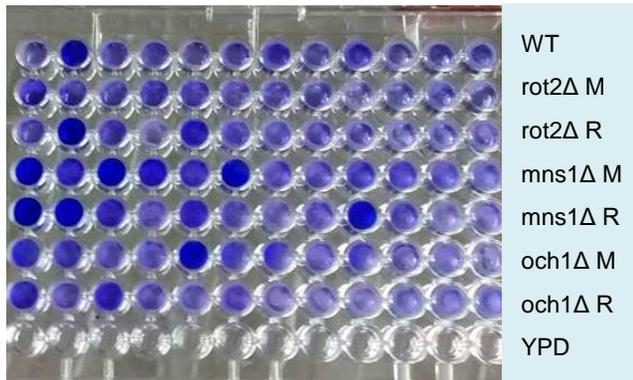
### Análisis estadístico

Las lecturas espectrofotométricas obtenidas de los ensayos (I, II y III), se analizaron mediante una estadística descriptiva (media y desviación estándar) y se analizaron las diferencias entre cada ensayo, comparando los valores de cada cepa y tomando como referencia los datos de la cepa silvestre. Los resultados

de la lectura a 590 nm quedaron expresados en función de la probabilidad asociada a la t de Student.

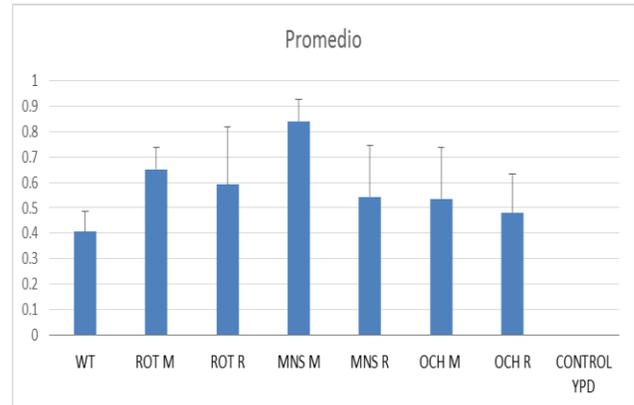
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de analizar el papel que tiene la glicosilación de proteínas en la formación de biopelículas en *C. albicans*. Se observó la capacidad de tres cepas mutantes de *C. albicans* para formar Biopelículas en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Como se muestra en la imagen 1, donde la formación de las Biopelículas se muestra uniforme en el orden siguiente a excepción del control (medio YPD).



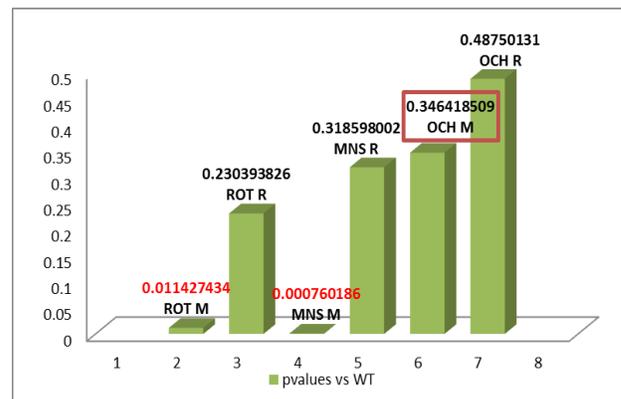
**IMAGEN 1:** Formación de Biopelículas de cada cepa, que se observan a simple vista.

A pesar de que se observó un aparente crecimiento uniforme de una biopelícula en todas las cepas, no se pudieron apreciar las diferencias entre cada una de ellas, por lo cual se tuvo que leer espectrofotométricamente a 590 nm, y así medir el metabolismo celular de cada cepa en cada ensayo y de esta manera obtener la media y la desviación estándar que arrojaran un dato más exacto sobre el crecimiento percibido y con esto comparar los valores de cada cepa con respecto a la cepa silvestre ya que se necesitaba tener un valor cercano al metabolismo celular de cada cepa y así analizar el papel de la Glicosilación de manoproteínas de pared celular en las cepas mutantes y comparar los datos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



**IMAGEN 2:** Promedio de los datos obtenidos de la lectura a 590 nm de la formación de biopelículas en cada cepa.

Con la media de los datos, se obtuvo la desviación estándar de los mismos y posteriormente se compararon los valores del promedio con los de la cepa silvestre y se encontraron las diferencias significativas que fueron las siguientes:



**IMAGEN 3:** Valores de p con respecto a la cepa silvestre

Los valores de p por debajo de 0,05 se consideran significativos y aceptables. Por esta razón se puede inferir que el valor de las mutantes rot2 y mns1 tienen un valor distinto de p al de la cepa silvestre por esta razón se piensa que los genes deletados influyen positivamente en la formación de Biopelículas ya que aun sin estos genes la formación de biopelículas fue mayor, porque gracias a la medida de absorbancia el promedio de los datos de estas cepas se observó el aumento de la cantidad de células gracias a que la lectura indicó un valor alto de la energía absorbida y eso nos muestra que la cantidad de células formando biopelículas fue mayor, sin embargo estudios

anteriores demuestran que las células de levadura de las mutantes *rot2* y *mns1* tienden a agruparse como agregados pequeños y la agregación de estos pudo haber dado un resultado erróneo del supuesto incremento de formación de biopelículas, ya que este aglutinamiento puede deberse a cambios en la hidrofobicidad de la pared celular y ser el resultado de un defecto de separación celular debido a alteraciones en la actividad de las hidrolasas de la pared celular [8]. Por otro lado la cepa *och1* mutante mostró un valor similar al de la cepa silvestre y eso nos dice que la formación de biopelículas a nivel normal no se vió afectada por la delección del gen correspondiente, sin embargo no se realizó un análisis más profundo evaluando las características de la pared celular, ya que la cepa con el gen *och1* deletado debió presentar deficiencias en la formación de pared celular debido a la importancia del procesamiento de *n*-glicanos que es fundamental para el ensamblaje de una estructura de pared celular normal y para que exista virulencia [8].

## CONCLUSIONES

Dado que la actividad metabólica y el crecimiento de las Biopelículas en las cepas *mns1* y *rot2* de *C. albicans* no se vio afectada aparentemente por la delección de los genes correspondientes. Se concluye que dichas cepas muestran una tendencia distinta a la formación de Biopelículas de una forma positiva, aunque no se sabe si eficiente en cuestión de virulencia, ya que tienen un mayor valor de absorbancia en comparación con el control positivo (cepa mutante), estos resultados se pueden ver influidos por que dichas mutantes tienden a agruparse y ello puede provocar cambios en la hidrofobicidad de la pared celular y dar un resultado erróneo al momento de medir su absorbancia. Mientras que la cepa *och1* muestra un comportamiento similar a la cepa silvestre, y por esta razón a pesar de tener una deficiencia en la síntesis de la pared celular no influye en la formación de Biopelículas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato que a través del programa "Veranos de investigación UG", hizo posible mi participación al igual que al Dr. Héctor

Manuel Mora Montes. Y por supuesto a mis padres y a Oscar Jáuregui que gracias a su apoyo y afecto, culminó esta estancia de verano.

## REFERENCIAS

- [1] Ramage, G., Walle, K. V., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, 18(4), 163-170.
- [2] Rivera, L. E. C., Ramos, A. P., & Desgarenes, M. D. C. P. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev. Mex*, 57(5), 350-361.
- [3] Mora-Montes, H. M., Ponce-Noyola, P., Villagómez-Castro, J. C., Gow, N. A., Flores-Carreón, A. & López-Romero, E. (2009). Protein glycosylation in *Candida*. *Future microbiology*, 4(9), 1167-1183.
- [4] Dranginis AM, Rauceo JM, Coronado JE. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007 Jun; 71(2):282-94. Review.
- [5] Nunes, L. R., de Oliveira, R. C., Leite, D. B., da Silva, V. S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M. E. & Travassos, L. R. (2005). Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic cell*, 4(12), 2115-2128.
- [6] Ruiz-Herrera, J., Victoria Elorza, M., Valentin, E & Sentandreu, R. (2005). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS yeast research*, 6(1), 14-29.
- [7] Chaillot J. (2017). Genome-Wide Screen for Haploinsufficient Cell Size Genes in the Opportunistic Yeast *Candida albicans*. G3 (Bethesda). 2017, de pubmed.
- [8] Mora-Montes, H. M., Bates, S., Netea, M. G., Díaz-Jiménez, D. F., López-Romero, E., Zinker, S., & Flores-Carreón, A. (2007). Endoplasmic reticulum  $\alpha$ -glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryotic cell*, 6(12), 2184-2193.