



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA  Facultat de Farmacia

**Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología**

**“Análisis proteómico diferencial de la matriz extracelular  
de biopelículas formadas por aislados clínicos de  
*Candida albicans*”**

**Tesis Doctoral**

**Laura Cabello Murgui**

**Valencia, 2019**





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA [ò\*] Facultat de Farmacia

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**“Análisis proteómico diferencial de la matriz extracelular  
de biopelículas formadas por aislados clínicos de  
*Candida albicans*”**

Memoria para optar al grado de  
Doctor, presentada por:

D<sup>a</sup> Laura Cabello Murgui

Dirigida por:

Dr. D. Eulogio Valentín Gómez

Dra. D. M<sup>a</sup> Amelia Murgui Faubel

Valencia, 2019





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA (Q\*) Facultat de Farmacia

Los abajo firmantes, Dr. Eulogio Valentín Gómez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia (UVEG) y la Dra. M<sup>a</sup> Amelia Murgui Faubel, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia (UVEG).

CERTIFICAN:

Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Análisis proteómico diferencial de la matriz extracelular de biopelículas formadas por aislados clínicos de *Candida albicans*” realizada por la Graduada Dña. Laura Cabello Murgui, para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios de la Sección Departamental de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

Examinado el contenido, consideramos que la presente Memoria reúne las condiciones de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada y defendida ante el Tribunal correspondiente.

Para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente certificación

Dr. E. Valentín

Dra. A. Murgui



*A ti papa*



*“No digas no puedo ni en broma, porque el inconsciente no tiene sentido del humor, lo tomará en serio, y te lo recordará cada vez que lo intentes”. Facundo Cabral*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas que me han apoyado tanto científica como personalmente en la realización de la presente Tesis Doctoral.

A mis directores. Dr. Eulogio Valentín Gómez, por brindarme la oportunidad de poder llevar a cabo este proyecto, quiero agradecer el que me incorporase a su grupo de trabajo, sus enseñanzas, su confianza en mí, su amistad y sobre toda su comprensión en los momentos complicados. A la Dra. Amelia Murgui por sus continuos consejos y por su ánimo. Gracias a los dos por dirigir esta Tesis.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Fe de Valencia por la obtención de los aislados clínicos utilizados en el estudio.

A mi familia, mi hermano Javi por estar siempre cerca, a mi madre por ser un apoyo constante y enseñarme siempre la parte positiva de la vida aun en los momentos mas duros.

A ti Luis por estar siempre a mi lado, pensando siempre en mi bienestar. Gracias de corazón.

A mi padre, al que he querido dedicar esta Tesis. Papa, aunque físicamente hace años que nos dejaste, tu presencia en nosotros es diaria y tu inteligencia, capacidad de trabajo, esfuerzo y cariño sigue intacta entre nosotros. Te quiero.



## ÍNDICE



# ÍNDICE DE MATERIAS

	Pag.
<b>I.INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1. <i>Candida albicans</i> : aspecto generales y taxonomía	3
I.2. <i>Candida albicans</i> como agente patógeno	6
I.3. La pared celular de <i>C. albicans</i> : composición, estructura y funciones biológicas	8
I.3.1. Composición de la pared celular	9
I.3.1.1. Glucano	11
I.3.1.2. Quitina	11
I.3.1.3. Manano	12
I.3.1.4. Glicolípidos	14
I.3.1.5. Proteínas de la pared celular	14
I.3.1.5.1. Proteínas GPI-CWPs	18
I.3.1.5.2. Proteínas Pir-CWPs	19
I.4. Factores de Virulencia de <i>C. albicans</i>	20
I.4.1. Morfogénesis	21
I.4.2. Cambio fenotípico	22
I.4.3. Quorum Sensing (QS)	23
I.4.4. Secreción de enzimas hidrolíticos	24
I.4.4.1. Aspartil proteasas. (Secreted aspartyl proteinases) (Saps)	24
I.4.4.2. Fosfolipasas y lipasas	25
I.4.5. Adhesión	26
I.4.6. Hidrofobicidad de la superficie celular (CSH)	30
I.5. Biopelículas	31
I.5.1. Matriz Extracelular de la biopelícula	37
I.5.2. Naturaleza y funciones biológicas de los componentes de la ME	38
I.5.2.1. Polisacáridos	38

I.5.2.2. Proteínas	39
I.5.2.3. ADN extracelular (ADNe)	42
I.5.2.4. Agua	42
1.5.2.5. Lípidos	43
I.5.3. Desarrollo de las biopelículas de <i>C. albicans</i>	43
I.5.3.1. Interacción célula-sustrato y/o célula-célula	47
I.5.3.2. Desarrollo de hifas	49
I.5.3.3. Biopelículas y cambio fenotípico	50
I.5.3.4. Dispersión	51
I.5.3.5. Resistencia a antifúngicos	52
I.5.3.6. Regulación transcripcional	53
I.6. Objetivos y justificación del trabajo	55
<b>II. MATERIAL Y METODOS</b>	59
	61
II.1. Microorganismos utilizados	
II.2. Medios y condiciones de cultivo	62
II.3. Hidrofobicidad	64
II.4. Formación de biopelículas	64
II. 4.1. Cuantificación de las biopelículas mediante Tinción con Cristal Violeta	65
II.4.2. Estudio de la viabilidad de las biopelículas mediante XTT	66
II.5. Extracción con etanol de las biopelículas	67
II.6. Análisis proteómico de los extractos etanólicos de las biopelículas	67
II.7. Obtención del reintegrante para el gen <i>GLX3</i>	69
II.7.1. Transformación en bacterias	69
II.7.1.1. Transformación en bacterias quimiocompetentes de <i>E.coli</i>	69

II.7.1.2. Transformación de levaduras mediante electroporación	70
II.7.2. Obtención y purificación de ADN	71
II.7.2.1. Obtención del ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	71
II.7.2.2. Obtención del DNA genómico de <i>C.albicans</i>	71
II. 7.3. Electroforesis en gel de agarosa	72
II.7.4. Purificación de fragmentos de ADN	72
II.7.5. Cuantificación de ADN	73
II.7.6. Tratamiento enzimático del ADN	73
II.7.6.1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	73
II.7.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa	73
II.7.7. Reintegración del gen <i>GLX3</i>	74
II. 8. Análisis fenotípico de los mutantes <i>glx3Δ</i> .	75
II. 8. 1. Curva de crecimiento.	75
II. 8.2. Inducción de la formación de tubo germinativo.	75
II. 8. 3.Sensibilidad a Calcoflor Withe, Rojo Congo y Dodecil Sulfato Sodico.	75
II. 8. 4. Sensibilidad al estrés oxidativo	76
II. 8. 5. Sensibilidad a zimoliasa	76
II. 8. 6. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de fármacos antimicóticos	77
II. 8. 7. Sensibilidad al antifúngico Anfotericina B	77
II .8. 8. Pruebas de virulencia en ratones	77

### III. RESULTADOS

III.1. Estudio de la hidrofobicidad	80
III.1.1. Estudio de la hidrofobicidad	81
III.2. Estudio de la adhesión y formación de biopelículas	82

III.2.1. Capacidad de formación de biopelículas de los distintos aislados clínicos	82
III.2.2. Formación de biopelículas e hidrofobicidad	84
III.2.3. Estudio comparativo de la relación entre formación de biopelículas e hidrofobicidad	87
III.3. Análisis Proteómico de la Matriz Extracelular de las biopelículas	90
III.3.1. Proteínas presentes en la ME de los aislados clínicos analizados	91
III.3.2. Análisis de las proteínas comunes en la ME a todas las cepas estudiadas	98
III.4. Reintegración del Gen <i>GLX3</i>	107
III. 4. 1. Obtención del reintegrante	107
III. 4. 2. Análisis fenotípico de los mutantes heterocigoto, homocigoto y del reintegrante para el gen <i>GLX3</i>	112
III. 4.2.1. Cinética de crecimiento	113
III. 4.2.2. Sensibilidad a la temperatura	113
III.4. 2.3. Estudio de la morfología	114
III.4. 2 4. Sensibilidad al Rojo Congo (RC), Calcofluor White (CW), Dodecil Sulfato sódico (SDS), y al estrés oxidativo.	115
III. 4. 2. 5. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de fármacos antimicóticos	120
III. 4. 2. 6. Sensibilidad a Anfotericina B	121
III. 4. 2. 7. Sensibilidad a Zimoliasa	121
III. 4. 2. 8. Formación de Biopelículas	123
III. 4. 2. 9. Gen <i>GLX3</i> y Virulencia	124
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>125</b>
IV.1. Hidrofobicidad y formación de Biopelículas	128
IV.2. Estudios de Proteómica	130
IV.3. Estudios del gen <i>GLX3</i>	135

<b>V. CONCLUSIONES</b>	141
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	145
<b>VII. ANEXOS</b>	173
Anexo I	175
Anexo2	189



# ÍNDICE DE FIGURAS

## I. INTRODUCCIÓN

<b>Figura I. 1.</b> Morfologías de <i>C. albicans</i> : levadura, pseudohifa, clamidospora y micelio.	4
<b>Figura I.2.</b> Representación esquemática de la estructura de la pared celular. La pared celular de <i>C. albicans</i> puede considerarse como una estructura multicapa. Las capas indican zonas de enriquecimiento para un componente o componentes macromoleculares determinados. (Blanes, 2012).	10
<b>Figura I.3.</b> Estructura del manano de <i>C. albicans</i> . <b>M</b> : D-manopiranososa; <b>GlcNAc</b> : N-acetilglucosamina; <b>Asn</b> : residuo de asparagina. (Shibata <i>et al.</i> , 1992).	13
<b>Figura I. 4.</b> Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular en levaduras. Modificado por Valentín <i>et al.</i> , 2000)	15
<b>Figura. I.5.</b> Esquema de los componentes de la pared celular de <i>C. albicans</i> . Las flechas indican la orientación de los polisacáridos desde un extremo no reductor hasta el extremo reductor. Un número relativamente pequeño de cadenas de quitina está relacionado con las moléculas de $\beta$ -1,6-glucano. (Blanes 2012).	17
<b>Figura I. 6.</b> Esquema general de una proteína <b>GPI-CWPs</b> . Man: manosa, $\omega$ : sitio de unión GPI. (Moscardo 2013)	18
<b>Figura I.7.</b> Esquema general de una proteína Pir. (Moscardo, 2013).	19
<b>Figura I.8.</b> Biopelículas mixtas. A) Biopelícula polimicrobiana cultivada en una superficie de acero inoxidable en un reactor de agua potable durante 14 días, teñida con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y observada mediante microscopía de epifluorescencia. La presencia de la matriz extracelular (ME) se detecta claramente (B) Observación por microscopía electrónica de barrido (21,850 x aumentos) que muestra la superficie de una biopelícula madura en la que las células están embebidas en la ME de la biopelícula. (de Donlan, 2002).	33
<b>Figura I.9.</b> Etapas básicas en la formación de las biopelículas. Unión inicial de bacterias planctónicas (vida libre) “células pioneras”, a una superficie es seguida por la proliferación y agregación celular produciendo una capa basal de microcolonias de anclaje. La producción de la ME que recubre las células conduce a la aparición de la biopelícula madura.	34
<b>Figura I.10.</b> Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de la matriz en diferentes dimensiones. <b>(a)</b> Modelo de una biopelícula bacteriana unida a una superficie sólida. La formación de la biopelícula comienza con la unión de una célula a una superficie. Se forma una microcolonia mediante la división de la bacteria, y se inicia la producción de la matriz de la biopelícula. A continuación, se pueden reclutar otras bacterias a medida que la biopelícula se expande debido a la división celular y a la posterior producción de componentes de la matriz. <b>(b)</b> Los principales componentes	36

de la matriz, polisacáridos, proteínas y ADN, se distribuyen entre las células en un patrón no homogéneo, estableciendo diferencias entre regiones de la matriz. **(c)** Las distintas clases de interacciones fisicoquímicas débiles y el enmarañamiento de biopolímeros que dominan la estabilidad de las SPE de la matriz. **(d)** Simulación de la interacción entre el exopolisacárido alginato (derecha) y la enzima extracelular lipasa (izquierda) de *Pseudomonas aeruginosa* en solución acuosa (Flemming y Wingender, 2010).

**Figura. I. 11.** Fases en la formación de biopelículas de *Candida albicans*. **1** Adhesión de las células de levadura a la superficie. **2.** Inicio de la proliferación celular, formación de la capa basal de células unidas. **3.** Maduración, crecimiento de hifas y producción del material extracelular. **4.** Dispersión de células de levadura de la biopelícula a la búsqueda de otras superficies (Novile y Johnson, 2015) 44

**Figura. I.12.** Aspecto morfológico de una biopelícula madura de *C. albicans* observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El crecimiento de las células de levadura parece estar reprimido, el crecimiento de las hifas es elevado y la matriz extracelular envuelve la biopelícula (de Andes *et al.*, 2004). 45

**Figura. I. 13.** Descripción del desarrollo de la biopelícula de *C. albicans*. En la parte superior de la figura se representa una línea de tiempo de formación y dispersión. Las categorías indicadas en el lateral representan procesos importantes o fenómenos biológicos en el desarrollo de la biopelícula; las líneas gruesas negras adyacentes representan la (s) fase (s) durante la cual son importantes para el ciclo de vida de la biopelícula. Las flechas de colores finos dentro de cada categoría representan la (s) fase (s) en las que las proteínas enumeradas o los eventos moleculares contribuyen al respectivo proceso o a los fenómenos biológicos. Las flechas verdes representan un papel positivo de los genes o eventos indicados; la flecha roja indica un papel negativo (de Blankenship y Mitchell, 2006). 47

**Figura I.14.** Proteínas funcionales en el desarrollo de biopelículas en *C. albicans*. En la etapa de adherencia, las células en forma de levadura se adhieren al sustrato. En el paso de iniciación, las células se propagan para formar microcolonias y se forman tubos germinales para producir hifas. En la etapa de maduración, la biomasa de la biopelícula se expande, la matriz extracelular (verde) se acumula y la resistencia a los medicamentos aumenta. En la etapa de dispersión, las células en forma de levadura se liberan para colonizar el medio ambiente circundante. La mitad superior del diagrama representa varias relaciones de ruta conocidas. La mitad inferior incluye proteínas que funcionan en un paso específico, pero que podrían no estar conectadas a una vía conocida. Para simplificar, se han omitido algunas relaciones de ruta conocidas. Las proteínas se presentan más de una vez si tienen funciones en más de un paso del desarrollo de la biopelícula. Las barras discontinuas en forma de T indican represión mediante un mecanismo indirecto. Los símbolos más y menos indican que el gen o estimula (+) o inhibe (-) la expresión del objetivo. (de Finkel y Mitchell, 2011). 48

**Figura I. 15.** Modelo de red reguladora para la formación de biopelículas. Las flechas negras sólidas indican interacciones reguladoras. las flechas grises sólidas indican interacciones de unión directa solamente. La flecha negra discontinua indica una interacción reguladora indirecta solamente. (Nobile *et al.*, 2012). 54

## II. MATERIAL Y METODOS

<b>Figura II. 1.</b> Recogida de la biopelícula de <i>C. albicans</i> formada en frascos de cultivo.	65
<b>Figura II. 2.</b> Etapas del análisis proteómico de los extractos etanolicos de las biopelículas. (Adaptado de Kuster <i>et al.</i> , 2005 por Pérez, 2017).	68

## III. RESULTADOS

<b>Figura III. 1.</b> Distribución de la hidrofobicidad/hidrofilidad de los distintos aislados clínicos.	82
<b>Figura III. 2.</b> Formación de biopelículas de los 448 aislados	83
<b>Figura III. 3.</b> Hidrofobicidad de los 70 aislados catalogados como muy formadores (SA)	84
<b>Figura III. 4.</b> Hidrofobicidad de los 65 aislados catalogados como medianamente formadores (MA)	85
<b>Figura III. 5.</b> Hidrofobicidad de los 137 aislados catalogados como muy poco formadores de biopelículas (WA)	86
<b>Figura III. 6.</b> Hidrofobicidad de los 176 aislados catalogados como muy poco o nada formadores de biopelículas (NA).	86
<b>Figura III 7.</b> Representación de aislados clínicos respecto a la hidrofobicidad	88
<b>Figura III. 8.</b> Relación de la espectancia de los aislados SA+MA y NA+WA con respecto a la hidrofobicidad.	89
<b>Figura III. 9.</b> Relación del número de proteínas con respecto al conjunto de las distintas cepas estudiadas.	94
<b>Figura III. 10.</b> Análisis de la localización celular A, proceso B y función C de las 596 proteínas comunes en los aislados SA.	96
<b>Figura III. 11.</b> Análisis de la localización celular A, proceso B y función C de las 94 proteínas comunes en los aislados MA.	97
<b>Figura III. 12.</b> Análisis de la localización celular A, proceso B y función C de las 71 proteínas comunes en los aislados WA	98
<b>Figura III.13.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de <i>orf19.251</i> -EXT con un tamaño de banda de 2.471 pares de bases.	108

<b>Figura III. 14. A.</b> Mapa del plásmido de integración. <b>B</b> Mapa del plásmido de integración del <i>orf19.251</i> en el vector pEcc120. (D' Enfert <i>et al.</i> , 2009)	109
<b>Figura III. 15.</b> Comprobación de la presencia de la secuencia <i>orf19.251</i> mediante electroforesis de la digestión del plásmido pAEM5N por <i>KpnI</i> y <i>Sall</i> . <b>Calle 1:</b> plásmido sin digerir en su forma normal y superenrollada; <b>calle 2:</b> plásmido digerido, la banda <b>A</b> plásmido sin digerir, <b>B</b> el vector pEcc120 siendo la banda <b>C</b> el inserto ( <i>orf19.251</i> ).	109
<b>Figura III. 16.</b> A) Control negativo Cepa <i>glx3/glx3</i> de <i>C. albicans</i> . B) Colonias de transformantes de <i>C. albicans</i> conteniendo la secuencia <i>orf19.251</i> . Las flechas indican alguna de las 10 colonias que se tomaron para la comprobación de la internalización del plásmido mediante PCR.	110
<b>Figura III. 17.</b> Placa de YPD-nurseotricina. Crecimiento de las 16 colonias seleccionadas.	111
<b>Figura III. 18.</b> Análisis por PCR de 10 de los transformantes. Controles negativos: calles 1 ( <i>glx3/glx3</i> ) y 13 (control negativo de amplificación). Calle 2, control positivo (cepa SC5314). Calles 3 a 12: clones seleccionados para su estudio.	112
<b>Figura III.19.</b> Curva de crecimiento de la cepa parental (SC5314), los mutantes heterocigótico ( <i>GLX3/glx3</i> ), homocigótico ( <i>glx3/glx3</i> ) y el reintegrante ( <i>glx3/glx3</i> , <i>GLX3</i> ) de <i>C. albicans</i> . Se partió de una D.O.600nm= 0,3. Las muestras se tomaron cada hora durante las primeras 10 horas y una última muestra a las 24h.	113
<b>Figura III.20.</b> Sensibilidad a temperatura. Cultivos de las cepas SC5314; <i>GLX3/glx3</i> ; <i>glx3/glx3</i> y <i>glx3/glx3</i> , <i>GLX3</i> crecidos en YPD fueron recogidos por centrifugación. Se hicieron diluciones decimales seriadas hasta $10^{-5}$ , y se sembraron 3 $\mu$ l de cada una en medio sólido YPD a 28°C y 37°C.	114
<b>Figura III. 21.</b> Formación de tubo germinativo. Las células fueron teñidas con calcofluor White y visualizadas en el microscopio con luz UV.	115
<b>Figura III. 22.</b> Estudio de la sensibilidad al Rojo Congo y al Calcofluor White de las cepas SC5314; <i>GLX3/glx3</i> ; <i>glx3/glx3</i> y <i>glx3/glx3</i> , <i>GLX3</i> . Se hicieron diluciones decimales seriadas de cultivos crecidos en YPD. Se sembraron 3 $\mu$ l de cada una de ellas en placas de YPD solido que contenían 50 y 100 $\mu$ g/ml de RC y 12 y15 $\mu$ g/ml de CFW. Las placas se incubaron a 28°C y37°C.	117
<b>Figura III.23.</b> Estudio de la sensibilidad al Dodecil sulfato sódico (SDS) y al estrés oxidativo de las cepas SC5314; <i>GLX3/glx3</i> ; <i>glx3/glx3</i> y <i>glx3/glx3</i> , <i>GLX3</i> . Se hicieron diluciones decimales seriadas de cultivos crecidos en YPD. Se sembraron 3 $\mu$ l de cada una de ellas en placas de YPD solido que contenían SDS 0.015% y 0.025% y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 11mM y 12 mM. Las placas se incubaron a 28°C y 37°C.	119
<b>Figura III. 24.</b> Sensibilidad a Anfotericina B de las cepas SC5314; <i>GLX3/glx3</i> ; <i>glx3/glx3</i> y <i>glx3/glx3</i> , <i>GLX3</i> . Se hicieron diluciones decimales seriadas de cultivos crecidos en YPD. Se sembraron 3 $\mu$ l de cada una de ellas en placas de YPD sólido que contenían 2 y 3 $\mu$ g/ml de Anfotericina B. Las placas se incubaron a 28°C.	121

<b>Figura III. 25.</b> Sensibilidad a Zimoliasa. Cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas SC5314; <i>GLX3/glx3</i> ; <i>glx3/glx3</i> y <i>glx3/glx3</i> , <i>GLX3</i> fueron incubados en presencia de Zimoliasa 20T (100µg/ml, en tampón Tris HCl 10 mM pH 7.5 y la variación D.O. <sub>600nm</sub> fue controlada durante 120 minutos	122
<b>Figura III. 26.</b> Formación de biopelículas. A) Estudio mediante Cristal violeta. B) Estudio mediante XTT-Menadiona.	123
<b>Figura III. 27.</b> Grafica de supervivencia de ratones infectados con las distintas cepas de <i>Candida albicans</i> .	124



# ÍNDICE DE TABLAS

## I. INTRODUCCIÓN

<b>Tabla I.1.</b> Clasificación taxonómica de <i>C. albicans</i> .	3
<b>Tabla I.2.</b> Composición de la pared celular de levaduras de <i>C. albicans</i> (Klis <i>et al.</i> , 2001).	9

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Tabla II.1.</b> Cepas de <i>C. albicans</i>	61
<b>Tabla II .2.</b> Cepa de <i>E. coli</i> empleada	62
<b>Tabla II.3.</b> Plásmidos utilizados	62
<b>Tabla II. 4.</b> Oligonucleótidos empleados en este trabajo	74

## III. RESULTADOS

<b>Tabla III.1.</b> Intervalos de % de hidrofobicidad de los distintos grupos de aislados considerados en rangos de 5 en 5.	87
<b>Tabla III.2.</b> Aislados utilizados en el estudio proteómico	90
<b>Tabla III.3.</b> Número total de proteínas caracterizadas en los extractos etanólicos de cada uno de los aislados. Las proteínas indicadas corresponden al valor obtenido aplicando como límite de corte 2 péptidos	92
<b>Tabla III.4.</b> Número de proteínas en los distintos grupos de aislados.	93
<b>Tabla III. 5.</b> Análisis de los 57 genes comunes en la ME de las biopelículas en todos los aislados estudiados. Datos descritos en el ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genomedatabase.	99
<b>Tabla III.6.</b> Relación de categorías funcionales de las 57 proteínas comunes en los extractos de la ME de las biopelículas de todos los aislados clínicos	102
<b>Tabla III.7.</b> Relación de procesos en los que se encuentran implicados los 57 genes comunes.	104
<b>Tabla III.8.</b> Localización celular de los 57 genes estudiados.	106
<b>Tabla. III.9.</b> Sensibilidad a antifúngicos del mutante homocigotico <i>glx3Δ / glx3Δ</i> y de la cepa salvaje <i>GLX3 / GLX3</i>	120

## VII. ANEXOS

**Anexo I.** Resultados del análisis de hidrofobicidad y capacidad de adhesión de los 448 aislados clínicos estudiados junto a la cepa control *C. albicans* SC 5314. 175

**Anexo II.** Resultados del análisis Proteómico de la ME de la cepa control de *C. albicans* SC 5314 y de los 9 aislados clínicos seleccionados. Se han ordenado alfabéticamente mediante la denominación del gen. El punto de corte en todos los casos fue de la aparición de al menos 2 péptidos. La presencia se marcó con el símbolo (●) y la ausencia (--)

ADNe	Acido desoxirribonucleico extracelular
Als	<i>Agglutinin-Like Sequence</i>
CW	Calcofluor White
CWP	Proteínas de pared celular
EtOH	etanol
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GPI	glicosilfosfatidilinositol
IL-2	Interleuina-2
kb	kilobases
kDa	Kilodaltons
MA	Aislados medianamente formadoras
ME	Matriz Extracelular
ml	mililitro
mM	milimolar
NA	Aislados muy poco o no formadores
NCAC	<i>Candida no albicans</i>
ORFs	marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PIR	Proteínas con repeticiones internas
QS	Quorum Sensing
SA	Aislados muy formadoras
SAP	aspartil proteinasas secretadas
SDS	Dodecil Sulfato sódico
SPE	Sustancias Poliméricas Extracelulares
RC	Rojo Congo
WA	Cepas poco formadoras
XTT	2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil] -2Htetrazolio-5-carboxanilida



# **I. INTRODUCCIÓN**



### I.1. *Candida albicans*: aspecto generales y taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico *Candida albicans* es un hongo diploide que tradicionalmente ha sido clasificado en el *phylum Deuteromycota* (conocidos como hongos imperfectos), dado que la fase sexual de los hongos aquí comprendidos es desconocida. Para poderlos clasificar como ascomicetos era necesario poseer ciclo sexual.

Aunque inicialmente se pensó que *C. albicans* era un organismo asexual, varias evidencias sugirieron que podría tener un ciclo sexual críptico. La similitud en la secuencia de sus ácidos nucleicos, así como la semejanza fenotípica permitió la incorporación de *C. albicans* en el *Phylum Ascomycota* (Deacon, 2006).

Actualmente la clasificación de *C. albicans* es la siguiente:

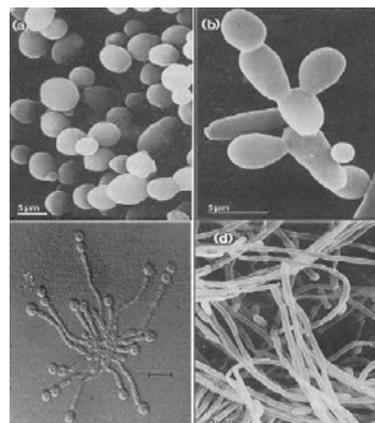
**Tabla I.1.** Clasificación taxonómica de *C. albicans*.

<b>Dominio</b>	<i>Eukarya</i>
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Phylum</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Subphylum</b>	<i>Saccharomycotina</i>
<b>Clase</b>	<i>Saccharomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Candida</i>
<b>Especie</b>	<i>albicans</i>

El *Phylum Ascomycota* representan aproximadamente el 70% de las especies de hongos descritos actualmente e incluye un alto número de especies que no presentan evidencias morfológicas de ciclo reproductivo sexual, pero se encuentran fenotípica y genotípicamente relacionadas, como ocurre con las especies pertenecientes al género *Candida*.

El género *Candida* está constituido por aproximadamente 200 especies, 7 de las cuales son frecuentemente aisladas como agentes causales de infecciones: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* y *C. lusitaniae*. De todas ellas, en términos de patogenicidad, *C. albicans* es la más relevante.

Las distintas especies del género *Candida*, no pueden ser diferenciadas basándose únicamente en criterios morfológicos. Para su identificación se utilizan características fisiológicas (como por ejemplo la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno, fermentación de azúcares y test de inhibición de crecimiento). Estos organismos presentan habitualmente un crecimiento en forma de levaduras, también conocidas como blastosporas, aunque pueden además formar pseudohifas y algunas especies como *C. albicans* pueden formar hifas verdaderas (Gow, 1997; Odds, 1985). Las pseudohifas pueden estar formadas tanto por cadenas cortas de células, como cadenas relativamente largas, que a diferencia de las verdaderas hifas presentan constricciones en sus septos (Merson-Davis y Odds, 1989). En condiciones desfavorables *C. albicans* puede formar Clamydosporas (esporas asexuales) (Kurtz *et al.*, 1988). Por todo ello, *C. albicans* es considerado un hongo pleiomorfo más que dimórfico. (Odds, 1985). Figura I.1.



**Figura I. 1.** Morfologías de *C. albicans*: levadura, pseudohifa, clamidospora y micelio.

*Candida albicans*, en relación a la diversidad de infecciones que puede causar, es único entre los patógenos fúngicos, siendo una de las pocas especies de hongos que causa enfermedades en humanos. Es un miembro de la microbiota comensal en

individuos sanos, colonizando el tracto gastrointestinal, el aparato reproductor, la cavidad oral y la piel (Achkar y Fries , 2010; Ganguly y Mitchell, 2011; Kennedy y Volz, 1985; Kumamoto, 2002, 2011). En individuos con sistemas inmunológicos competentes, *C. albicans* es un comensal inocuo y se mantiene en equilibrio con otros miembros de la microbiota local. Sin embargo, alteraciones en la microbiota del hospedador, cambios en la respuesta inmune del mismo, infección por otro microorganismo o terapia inmunosupresora, así como variaciones en el ambiente local (cambios en el pH o contenido nutricional, etc.), pueden ocasionar que *C. albicans* cause infección. Estas infecciones pueden ir desde el epitelio de las mucosas superficiales como aftas, infecciones vaginales y erupción del pañal, hasta infección sistémicas diseminada hematógicamente con tasas de mortalidad importantes (que se aproximan al 50 % en algunos casos) (Calderone, 2002; Calderone y Fonzi, 2001; Pappas *et al.*, 2004; Wenzel, 1995). Las infecciones por *Candida* son especialmente graves en individuos inmunocomprometidos (como enfermos de SIDA o aquellos sometidos a terapias contra el cáncer o inmunosupresión) y personas sanas con dispositivos médicos implantados (Kullberg y Oude Lashof, 2002). Dentro de este contexto *C. albicans* está considerado como el principal patógeno fúngico de los seres humanos (Calderone, 2002).

Desde el punto de vista genético *C. albicans* es un microorganismo diploide con un genoma de aproximadamente 14.500 kilobases (kb) distribuidas en ocho pares de cromosomas homólogos, que albergan alrededor de 6.100 genes de un tamaño medio de 1.450 pb (Butler *et al.*, 2009). Contiene 6.419 marcos de lectura abiertos (ORFs) de más de 100 codones, de los cuales un 20% no tienen contrapartida conocida en otras secuencias disponibles del genoma. Es un hongo difícil de manipular genéticamente al carecer de un ciclo sexual conocido (Magee y Magee, 2000), y la lectura de su código genético se desvía del código genético universal, dado que el codón CUG se traduce como serina en lugar de leucina (Masey *et al.*, 2003). Uno de los hechos más interesantes del genoma de *C. albicans* es la concurrencia de reordenamientos cromosómicos, como medio de generar diversidad genética, dando cromosomas con polimorfismos (contracción/expansión de repeticiones), translocaciones recíprocas, borrados cromosómicos y trisomía de cromosomas individuales. Estas alteraciones en el cariotipo generan cambios en el fenotipo, que convergen en una adaptación de esta levadura al

medio en el que se encuentra (Butler *et al.*, 2009; Selmecki *et al.*, 2010). Estos mecanismos genéticos están siendo interpretados en la actualidad gracias al análisis completo del genoma de *C. albicans*.

El genoma de *C. albicans* ha podido secuenciarse gracias a la colaboración internacional de distintos grupos de investigación (<http://www.Candidagenome.org>, <http://www-sequence.stanford.edu/group/Candida/>) así como la anotación de sus genes por el Consorcio Europeo Galar Fungail (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>), en el que participó nuestro grupo de investigación (d'Enfert *et al.*, 2005). El actual conocimiento del genoma completo de *C. albicans* y su anotación, supone una excelente fuente para los análisis funcionales del mismo.

El genoma de *C. albicans* contiene la información que permite al hongo desarrollarse en el hospedador en competencia con el sistema inmunológico y con la microbiota comensal. Esta información ha permitido la identificación de genes de *C. albicans* esenciales para el crecimiento de las células fúngicas que no tienen homólogos en humanos, dichos genes son considerados especialmente prometedores en la búsqueda de dianas potenciales para nuevos fármacos antifúngicos con efectos secundarios bajos o nulos en el hospedador, efectos secundarios que se encuentran asociados a la mayoría de las terapias antifúngicas de las que se dispone en la actualidad.

### **1.2. *Candida albicans* como agente patógeno**

Muchos de los hongos que producen infecciones en el ser humano son, en condiciones normales, comensales que viven en equilibrio con las defensas de su hospedador. Sin embargo, existen diferentes factores que pueden alterar este equilibrio de modo que el microorganismo puede invadir tejidos y producir enfermedad (Casadevall *et al.*, 2002; Clemons *et al.*, 2000; Gow *et al.*, 2012).

La infección por *C. albicans* en seres humanos fue descrita por primera vez como candidiasis oral por Hipócrates en el siglo V a C. En 1853, Charles Robin observó microscópicamente células de levadura y micelios en raspados epiteliales, y nombró al hongo *Oidium albicans*. Posteriormente, se utilizaron más de 160 sinónimos, incluyendo

*Monilia albicans*, antes de que *Candida albicans* se convirtiera en el nombre aceptado para esta especie.

Las candidiasis son por lo tanto infecciones causada por especies del género *Candida*, aunque *C. albicans* es el principal responsable, desde hace años se ha incrementado significativamente la frecuencia con la que se han aislado otras especies de *Candida* no *albicans* (NCAC) y especies tales como *C. glabrata*, la segunda especie después de *C. albicans* aislada de candidiasis oral (Luo y Samaranayake, 2002), *C. dubliniensis*, la segunda especie NCAC aislada más comúnmente en individuos infectados por el VIH (Schoofs *et al.*, 1998) y otras especies, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, son también responsables de una serie de casos de candidiasis cuya frecuencia de aparición está aumentando en la actualidad.

*Candida albicans* es pues el patógeno humano fúngico más frecuentemente aislado (Ganguly y Mitchell 2011; Pfaller y Diekema 2007). Este patógeno oportunista es parte de la micoflora humana comensal, pero bajo condiciones de supresión inmune o cualquier alteración en el ambiente del hospedador puede transformarse rápidamente en patógeno, causando distintos tipos de infecciones (Finkel y Mitchell, 2011; Mathe y Van Dijck, 2013). De hecho, *C. albicans* es uno de los agentes identificados con mayor frecuencia en infecciones nosocomiales capaces de invadir cualquier lugar del organismo, desde tejidos y órganos profundos hasta zonas superficiales (Perlroth *et al.*, 2007). Es el tercer patógeno comúnmente aislado en pacientes hospitalizados con una tasa de mortalidad de hasta el 50% (Wisplinghoff *et al.*, 2004, Tournu y Van Dijck 2012, Mathe y Van Dijck, 2013).

Como se ha comentado anteriormente, cualquier modificación del estado inmune o la existencia de diferentes trastornos fisiológicos en el hospedador puede facilitar la proliferación de células de *Candida*, provocando así enfermedades que van desde infecciones mucocutáneas localizadas y generalmente benignas hasta invasiones sistémicas letales. Estas infecciones se clasifican en dos grupos:

**a) Candidiasis superficial**, la cual puede afectar a las superficies epidérmicas y a las mucosas, incluyendo la cavidad bucal, faringe, esófago, intestino, vejiga urinaria y vagina. Este tipo de infecciones suelen responder bien a agentes antifúngicos comunes,

pero en algunos casos pueden ser recurrentes, conduciendo a candidiasis mucocutáneas crónicas. (Ruhnke y Machmeyer, 2002).

**b) Candidiasis Invasiva**, en las que el hongo alcanza el torrente sanguíneo y se propaga por todo el cuerpo causando una infección grave. Este tipo se presenta más frecuentemente en neonatos con bajo peso y en pacientes en condiciones clínicas con su sistema inmunológico deprimido. En este tipo de pacientes *Candida* puede afectar a distintos órganos y tejidos como riñones, hígado, bazo, cerebro, ojos, etc. (Clancy y Neguyem, 2013). Siendo la Candidemia (una forma de candidiasis invasiva), la responsable de una alta mortalidad, así como de una estancia hospitalaria prolongada y un alto coste sanitario (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

### **1.3. La pared celular de *C. albicans*: composición, estructura y funciones biológicas**

La pared celular es esencial para gran parte de los aspectos biológicos y patogénicos de *C. albicans*. Aunque inicialmente se consideró una estructura celular casi inerte que protegía al protoplasto contra las lesiones osmóticas, numerosos estudios han demostrado que se trata de un orgánulo dinámico con una estructura organizada y con una disposición ordenada de sus diferentes componentes. Algunos de ellos están unidos por enlaces covalentes, mientras que otros se retienen dentro del tejido de la propia pared celular mediante enlaces de puentes de hidrógeno, iónicos e interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta organización le confiere a la pared todas sus características y funciones biológicas. Además, la pared celular es una estructura ausente en las células de mamíferos, representando un objetivo excelente para los fármacos antifúngicos, así como para la obtención de posibles vacunas contra el hongo, ya que la mayoría de sus componentes principales y esenciales no se encuentran en las células humanas. (Cassone, 1989; Chaffin, 2008; Chaffin *et al.*, 1998; Domer, 1989; Fukazawa y Kagaya, 1997; Martínez *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1991; Sentandreu *et al.*, 1991; Shepherd, 1987; Shepherd *et al.*, 1985).

La pared celular de *C. albicans* es una estructura compleja, multicapa, ubicada externamente a la membrana plasmática. Es responsable de mantener la forma que caracteriza el crecimiento (levadura e hifas) del hongo. Además de mediar en la

interacción inicial entre el hongo y el medio ambiente, la pared también desempeña papel nutricional y actúa como una barrera de permeabilidad que protege al protoplasto contra lesiones físicas y osmóticas.

### 1.3.1. Composición de la pared celular

Los principales componentes (80-90%) de la pared celular de *C. albicans* son carbohidratos: **(a)** manano o polímeros de manosa asociados covalentemente con proteínas para formar glicoproteínas (también denominadas manoproteínas); **(b)**  $\beta$ -glucanos, que son polímeros ramificados de glucosa que contienen enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6; y **(c)** quitina, que es un homopolímero no ramificado de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) que contiene enlaces  $\beta$ -1,4.

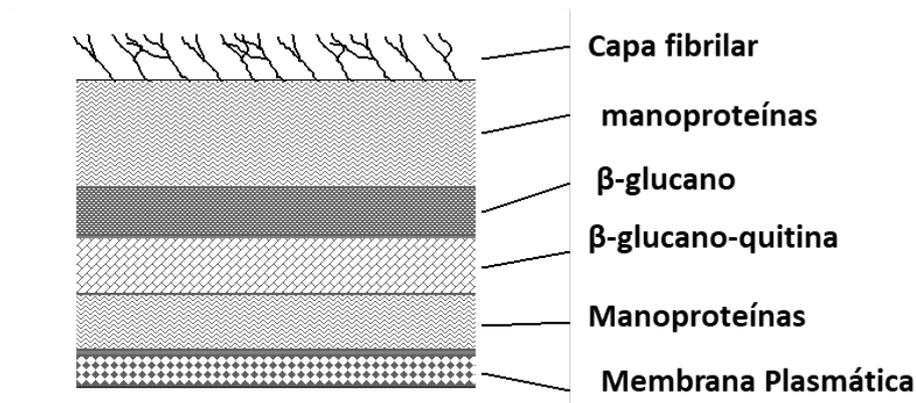
Las proteínas y los lípidos también se encuentran presentes en la pared celular, aunque como componentes minoritarios. Los  $\beta$ -glucanos y la quitina son los componentes estructurales que forman una red microfibrilar rígida, y las proteínas y las manoproteínas están unidas a este esqueleto además de estar presentes en la superficie externa. Los polímeros de manosa (manano) representan aproximadamente el 40% del carbohidrato total de la pared. Aunque el manano no existe como tal en la misma, sino que se asocia covalentemente con proteínas. El término manano también ha sido utilizado para referirse al principal componente inmunodominante presente en la capa externa de la pared de *C. albicans*. Las proporciones relativas de los principales componentes macromoleculares de la pared celular se muestran en la tabla I.2.

**Tabla I.2. Composición de la pared celular de levaduras de *C. albicans* (Klis *et al.*, 2001).**

Macromolécula	Peso seco (%)
Manoproteínas	35-40
$\beta$ -1,6-glucano	20
$\beta$ -1,3-glucano	40
Quitina	1-2

Los diferentes componentes de la pared interactúan entre sí para dar lugar a la arquitectura general de la misma. Los estudios de microscopía electrónica han revelado la existencia en la misma de varias capas, la apariencia de las cuales es variable y parece estar relacionada con la cepa estudiada, las condiciones de crecimiento, la morfología y la preparación de las muestras (Poulain *et al.*, 1978). Por lo tanto, no hay consenso sobre el número de capas presentes en la pared celular. (Bobichon *et al.*, 1990; Cassone, 1989; Poulain, 1978).

Como se muestra en el esquema (Figura I.2.) los polisacáridos microfibrilares ( $\beta$ -glucanos y quitina), parecen estar más concentrados en la capa interna de la pared celular adyacente a la membrana plasmática. Esta capa proporciona una estructura rígida que protege la célula contra los cambios en la presión osmótica y otras agresiones ambientales. La capa fibrilar externa es amorfa y se compone principalmente de complejos de manoproteína y fosfomanoproteína, los cuales confieren hidrofobicidad a las células de *C. albicans* (Chaffin *et al.*, 1998; Cutler, 2001), una propiedad que desempeña un papel sumamente importante en la virulencia de la misma.



**Figura I.2.** Representación esquemática de la estructura de la pared celular. La pared celular de *C. albicans* puede considerarse como una estructura multicapa. Las capas indican zonas de enriquecimiento para un componente o componentes macromoleculares determinados. (Blanes, 2012).

### I.3.1.1. Glucano

El glucano es el componente mayoritario de la pared celular de *C. albicans*, representando cerca del 60% de su peso seco. Este polímero se encuentra constituido por moléculas de D-glucosa con uniones  $\beta$ , siendo el tipo mayoritario el  $\beta$ -1,3, encontrándose también uniones  $\beta$ -1,6 en menor cantidad. El  $\beta$ -1,3 glucano es por lo tanto el componente estructural mayoritario en la pared de *C. albicans*, formando una red tridimensional elástica que rodea a la célula y que actúa como un andamio para la unión de otros componentes macromoleculares. El  $\beta$ -1,6 glucano y la quitina se unen a los extremos no reductores terminales de las cadenas laterales del  $\beta$ -1,3 glucano. (Kollar *et al.*, 1997; Smits *et al.*, 1999).

El glucano es sintetizado por glucano sintetasas, complejo enzimático que se encuentra localizado en la membrana plasmática, catalizando cadenas lineales de moléculas de polisacárido, con una masa molecular media de 240 kDa y un grado de polimerización de unos 1.500 residuos de glucosa. A la cadena lineal formada por las uniones  $\beta$ -1,3, se le unen cada 40 o 50 residuos nuevas unidades de glucosa mediante uniones  $\beta$ -1,6 dando así lugar a una estructura ramificada (Manner *et al.*, 1973). Este tipo de estructura hace que tenga un gran número de extremos no reductores que le permiten unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular (Chauman *et al.*, 2002; Lipke y Ovale, 1998).

El  $\beta$ -1,6-glucano juega un papel importante en la estructura de la pared ya que actúa como interconector entre la red tridimensional del  $\beta$ -1,3 y las proteínas GPI-CWP. Además, una pequeña cantidad de quitina se une directamente al mismo. El  $\beta$ -1,6-glucano es un polímero altamente ramificado con longitudes de cadena de aproximadamente entre 60-600 residuos de glucosa (promedio 300-350) (Kollar *et al.*, 1997).

### I.3.1.2. Quitina

La quitina es un polisacárido lineal formado por más de 2.000 unidades de N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, (Lipke *et al.*, 1998). Estas cadenas se asocian de modo antiparalelo, unidas mediante enlaces de puentes de hidrogeno, formando lo

que se conoce como microfibrillas que pueden estar formadas por entre 20 a 400 cadenas. Este tipo de estructura hace que la quitina sea uno de los polímeros naturales más insolubles que existen y su unión con el  $\beta$ -1,3 glucano forma, como hemos comentado anteriormente, la estructura de la pared celular del hongo al cual se encuentran asociados el resto de componentes de la misma.

De todos los componentes de la pared, la quitina es la que se encuentra en menor cantidad, aunque el porcentaje depende de la morfología del hongo. En la forma de levadura el contenido oscila entre un 1 y 2% del peso seco de la pared, mientras que en el micelio de *Candida*, el contenido puede ser 3 veces superior (Chattaway *et al.*, 1968).

La síntesis de quitina implica una reacción de transglicosilación de residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) del sustrato universal UDP-N-acetilglucosamina a la cadena creciente del polisacárido, esta reacción se encuentra catalizada por la enzima quitina sintasa que se encuentra localizada en el citosol en el interior de microvesículas especializadas denominadas “quitosomas”, las cuales son responsables del transporte de la enzima de su lugar de síntesis a su punto de acción (Ruiz- Herrera *et al.*, 2006).

En *C. albicans* han sido descritos cuatro genes relacionados con la síntesis de quitina: *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* y *CHS8* (Martínez y Gonzalbo, 1994; Munro y Gow, 2001). De todos ellos *CHS1* es el único gen esencial, este gen se encuentra implicado en la síntesis de quitina durante la gemación, la septación de la hifa y el crecimiento de la pared celular, su pérdida es letal. El resto de genes se encuentran implicados en los procesos dinámicos de la pared durante la división y la septación de la hifa, su expresión cambia en esos momentos, pero no afectan a la supervivencia del hongo (Munro y Gow, 2001).

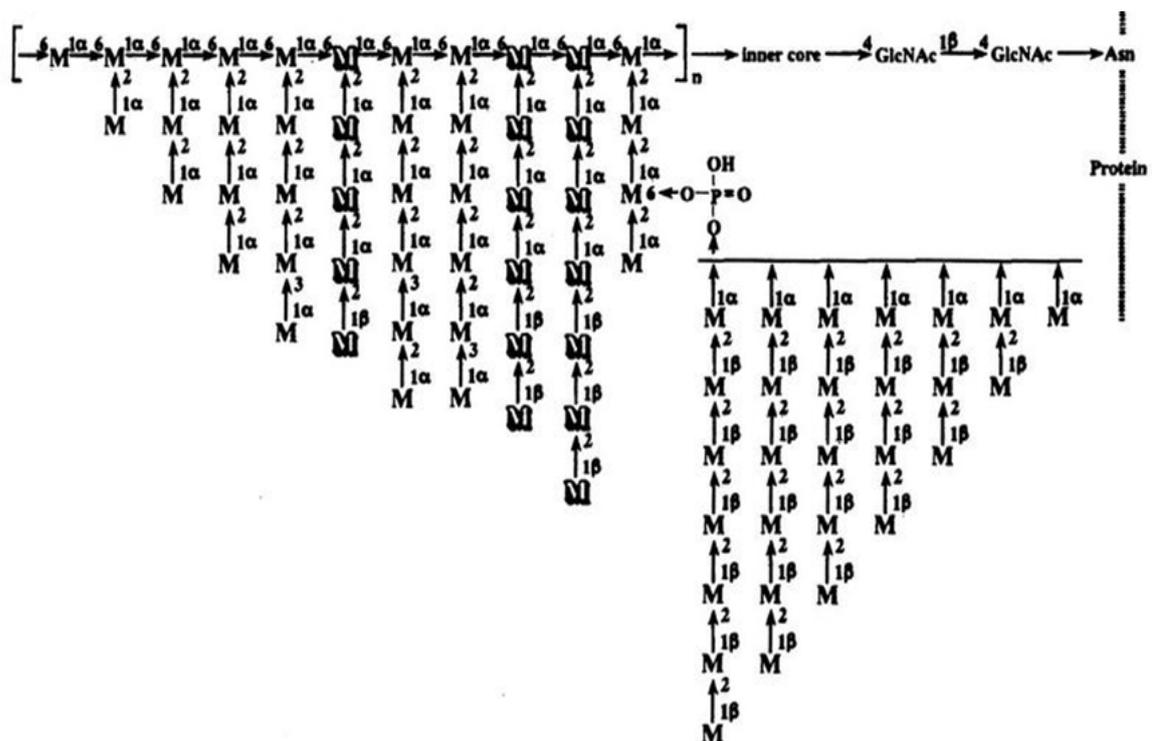
### **I.3.1.3. Manano**

la capa externa de la pared celular de *C. albicans* consiste predominantemente en un complejo sistema de mano-oligosacáridos, que no existen como tales sino en asociación covalente con proteínas (manoproteínas), y constituyen aproximadamente

el 40% del contenido total de polisacáridos de la pared celular del hongo (Chaffin *et al.*, 1998). El termino Manano se refiere solo al componente mano-oligosacárido de las manoproteínas (Chaffin *et al.*, 1998; Chauhan *et al.*, 2002).

El manano de la pared celular no solo es el principal antígeno de *Candida*, responsable de la especificidad de las diferentes reacciones serológicas (Martínez *et al.*, 1998), sino que también juega un papel importante en la adhesión, el reconocimiento del hospedador y la virulencia (Calderone y Fonzi, 2001). Este componente contiene homopolímeros de manosa (como constituyente principal), 3-5% de proteína y 1-2% de fosfato (Reiss *et al.*, 1992). Es también el responsable de la hidrofobicidad de la superficie celular del hongo (Chaffin *et al.*, 1998).

Los polímeros de manosa se unen a las proteínas a través de residuos de asparagina (mediante enlaces N-glicosídico a GlcNAc) y a treonina o serina (mediante enlaces O-glicosídicos) (Figura I.3).



**Figura I.3.** Estructura del manano de *C. albicans*. **M**: D-manopiranososa; **GlcNAc**: N-acetilglucosamina; **Asn**: residuo de asparagina. (Shibata *et al.*, 1992).

Los enlaces N-glicosídicos unen polímeros de manosa altamente ramificados y de alto peso molecular al aminoácido asparagina del péptido, presentando un núcleo altamente conservado (tanto en los hongos como en células animales (Tanner y lehle, 1987). Son los responsables de la inmunodeficiencia observada en el hospedador durante las candidiasis, dado que inhiben la respuesta antígeno-específica de las células T al poseer dominios de unión con la IL-2 (Zanetta *et al.*, 1998). Algunos residuos de manosa pueden encontrarse fosforilados a través de enlaces manosil fosfodiéster (Ballou, 1990).

Los enlaces O-glicosídicos unen los oligomanosidos a residuos de serina y/o treonina formando cadenas lineales cortas que contienen de una a cinco unidades de  $\alpha$ -manosa. Este tipo de enlace se caracteriza por ser sensible al tratamiento con álcali ( $\beta$ -eliminación). La presencia de gran cantidad de restos O-glicosídicos contribuye a que la proteína adopte una conformación extendida (Jentoft, 1990).

#### **I.3.1.4. Glicolípidos**

Aunque el contenido de glicolípidos en la pared celular de *Candida Spp*, es bajo, representan entre un 1 y un 7% de su peso seco, sus funciones son importantes. Actúan generalmente como receptores o antígenos, presentando además un importante papel en la traducción de la señal en la síntesis de la pared celular (Chauhan *et al.*, 2002).

#### **I.3.1.5. Proteínas de la pared celular**

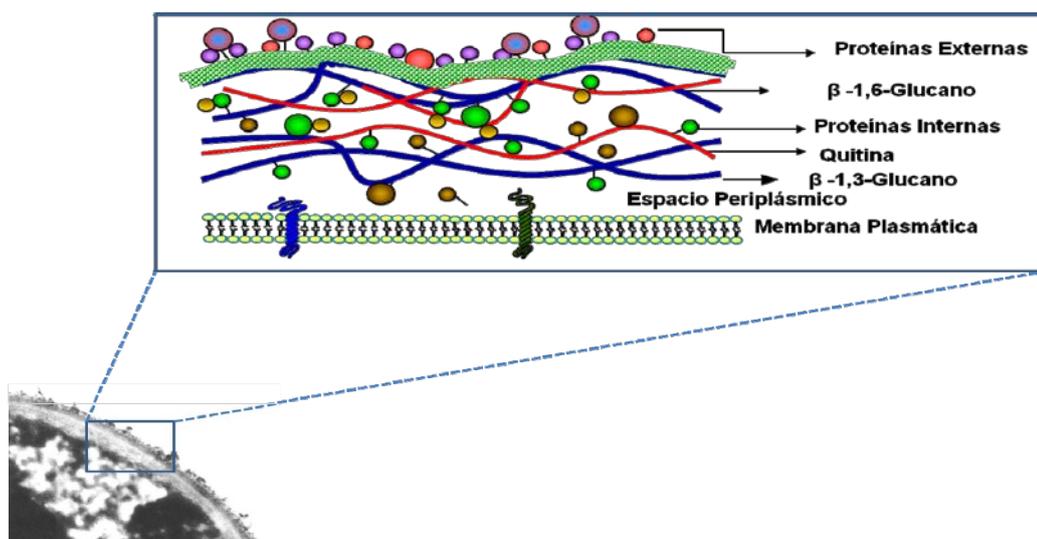
Las proteínas que forman parte de la pared celular están constituidas generalmente por una parte proteica enlazada covalentemente con una cadena de hidratos de carbono, que como hemos comentado con anterioridad son principalmente manosas, de ahí que de un modo genérico se les denomine manoproteínas. Las manoproteínas representan entre un 45-50% del peso seco de la pared, encontrándose distribuidas por toda ella y acumulándose de un modo especial tanto en su superficie como en las proximidades de la membrana plasmática (Chaffin *et al.*, 1998).

Entre las funciones a destacar de las manoproteínas se encuentran:

- Función estructural, formando parte como componentes intrínsecos en la estructura de la pared celular como por ejemplo Hwp1 (Staab y Sundstrom, 1998), Pag13 (Gelis *et al.*, 2012) o Rbt1 y Rbt5 (Braun *et al.*, 2000).
- Actuar como adhesinas, como las proteínas de la familia Als (Hoyer, 2001).
- Promotoras en el reconocimiento e invasión de las células epiteliales del huésped.
- Actividad enzimática, tales como las fosfolipasas (Ibrahim *et al.*, 1995) y las proteasas aspárticas (Sap) (Hube *et al.*, 1997).
- Actuar en los mecanismos de defensa frente al sistema inmune del hospedador
- Promover la formación de biopelículas.

La utilización de estudios tanto bioquímicos como moleculares ha dado un importante empuje en el conocimiento de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans*, se han identificado cientos de ORFs que codifican especies proteicas de la misma.

Las manoproteínas se encuentran distribuidas de un modo amplio, pudiéndolas encontrar tanto secretadas al espacio periplásmico, o como componentes de la pared celular unidas a los polímeros estructurales de la misma (glucanos y quitina). Pueden encontrarse desde las zonas próximas a la membrana plasmática (en las capas más internas de la pared) hasta las zonas más superficiales (Valentín *et al.*, 1987, 2000). (Figura I.4.)

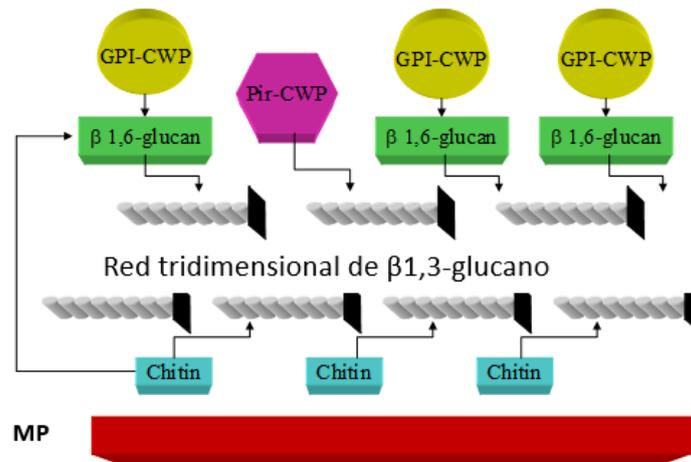


**Figura I. 4.** Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular en levaduras. Modificado por Valentín *et al.*, 2000)

Las proteínas que forman parte de la pared, pueden encontrarse unidas a la misma por diferentes tipos de enlaces, desde uniones débiles no covalentes tales como puentes de hidrogeno y/o interacciones de tipo hidrofóbico proteínas unidas mediante enlaces covalentes por puentes disulfuro (Ruiz herrera *et al.*, 2002); proteínas unidas covalentemente al glucano y liberadas por digestión enzimática del mismo (Garcera *et al.*, 2003; Valentín *et al.*, 1984) estas últimas se pueden diferenciar atendiendo a que polímero se encuentran unidas (Gpi y Pir).

En este contexto de proteínas unidas a la pared, a las que llamaremos CWP “verdaderas” se incluyen solo aquellas que presentan un motivo secretor (péptido señal), son N- y / u O-glicosiladas, y además poseen otras características específicas, tales como un motivo de unión a GPI o repeticiones internas específicas (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). En contraste con estas CWPs, se han encontrado algunas proteínas no glicosiladas en la pared de *C. albicans* (Pitarch *et al.*, 2002), cuya relevancia y mecanismo de retención no están aclarados. Estas incluirán CWPs unidas a través de puentes disulfuro a otras CWPs, (Chaffin, 2008; Chaffin *et al.*, 1998) y enzimas periplásmicos que se liberan porque la pared celular se ha vuelto más permeable como resultado de la rotura de uniones covalentes (de Nobel *et al.*, 1990). Dentro de estas proteínas podemos indicar la proteína Pra1 (Sentandreu *et al.*, 1998) o enzimas de la vía glucolítica localizadas en la superficie celular de *C. albicans* (Chaffin, 2008; Chaffin *et al.*, 1998; Eroles *et al.*, 1997; Gil-Navarro *et al.*, 1997; López-Villar *et al.*, 2006; Monteoliva *et al.*, 2002; Pitarch *et al.*, 2004).

Tal como hemos comentado se han identificado dos tipos principales de CWPs unidas covalentemente, las dependientes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (GPI-CWPs) y las Pir-CWPs (Kapteyn *et al.*, 1999b). Los GPI-CWP, que representan hasta un 88% de todas las CWPs, se encuentran unidas a través de  $\beta$ -1,6-glucano a un extremo no reductor de una molécula de  $\beta$ -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1995, 1996, 1999a; Kollár *et al.*, 1997). Por otro lado, las Pir-CWP se unen directamente al  $\beta$ -1,3-glucano a través de un enlace sensible a los álcalis, sin ninguna interconexión directa con el resto de  $\beta$ -1,6-glucano.



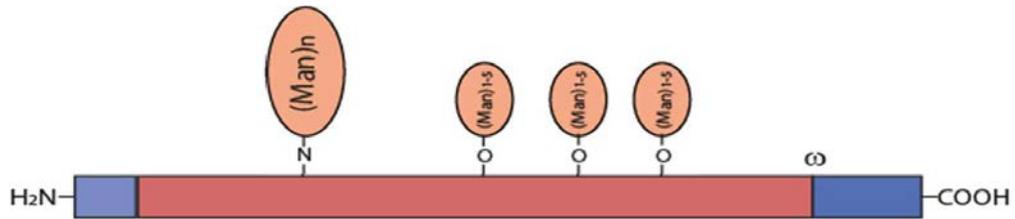
**Figura. I.5.** Esquema de los componentes de la pared celular de *C. albicans*. Las flechas indican la orientación de los polisacáridos desde un extremo no reductor hasta el extremo reductor. Un número relativamente pequeño de cadenas de quitina está relacionado con las moléculas de  $\beta$ -1,6-glucano. (Blanes 2012).

En relación a lo expuesto, en la Figura I.5. se representa un modelo de la arquitectura de la pared celular de *C. albicans* basado, basado en datos de Kapteyn *et al.* (1996, 1999 a); Kollár *et al.* (1995, 1997) y Smits *et al.* (1999), adaptado por Klis *et al.* (2001).

La función particular de las distintas especies de CWPs puede ser variada, pero en muchos casos sus funciones específicas no se conocen. En conjunto, limitan la permeabilidad, protegiendo el esqueleto de la degradación de enzimas externos y a la membrana plasmática de compuestos tóxicos (De Nobel *et al.*, 1990) y así mismo, son las responsables de la hidrofobicidad de la pared celular (Masuoka y Hazen, 1997) y de la antigenicidad de la misma (Chaffin *et al.*, 1998). Algunas CWP están implicadas en la remodelación de la pared, otras pueden tener papel en la adhesión celular, como es el caso de las GPI-CWPs codificadas por la familia de genes *ALS* (secuencia de tipo Aglutininas) a la que pertenecen todas las adhesinas. Con respecto a la función de Pir-CWPs están involucradas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. (Kapteyn *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2004).

### I.3.1.5.1. Proteínas GPI-CWPs

Las GPI-CWPs son ricas en residuos de Ser y Thr y se encuentran altamente glicosiladas mediante enlaces O-glicosídicos. Estas proteínas son especies unidas a lípidos que contienen una secuencia señal C-terminal que permite la unión a GPI. El anclaje de las proteínas unidas a GPI (GpiPs) puede eliminarse mediante la acción de fosfolipasas específicas (Griffith y Ryan, 1999), convirtiendo la proteína en una forma soluble en agua. Este tipo de proteínas unidas por enlaces glicofosfatidilinositol, comparten una serie de características: un péptido señal en la región N-terminal, una secuencia rica en serinas y treoninas que proporcionan los sitios de O-glicosilación y un dominio hidrofóbico C-terminal para la unión transitoria a la membrana del RE, y el llamado sitio  $\omega$ , por donde la proteína se escinde para unirse al anclaje GPI (Thomas *et al.*, 1990, Caro *et al.*, 1997). (Figura I.6.).



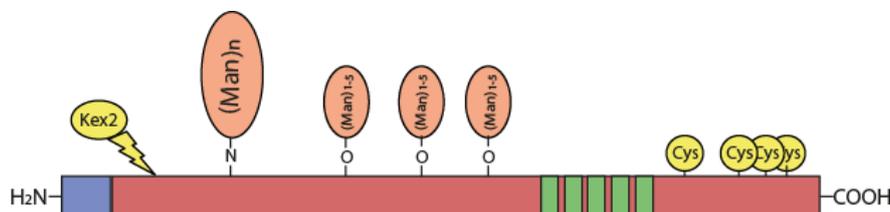
**Figura I. 6.** Esquema general de una proteína GPI-CWPs. Man: manosa,  $\omega$ : sitio de unión GPI. (Moscardo 2013)

El sitio  $\omega$  se localiza 9 a 10 aminoácidos antes del dominio hidrofóbico C-terminal y se ha sugerido que los aminoácidos previos al sitio de unión GPI (sitio  $\omega$ ) sirven como señal para determinar si una proteína GPI se localiza en la pared celular o en la membrana plasmática. Esta señal consiste en una región de aminoácidos hidrofóbicos, seguida de otra región corta de aminoácidos más hidrofílicos y un punto de unión formado por tres residuos de aminoácidos llamados  $\omega$ ,  $\omega + 1$  y  $\omega + 2$ . La escisión de la proteína tiene lugar entre  $\omega$  y  $\omega + 1$ , y el anclaje GPI permanece unido al aminoácido  $\omega$  (Nuoffer *et al.*, 1993). Seguidamente a la síntesis de la proteína en el RE, el anclaje GPI reemplaza a la región transmembranar C-terminal y esta transferencia es catalizada por una GPI-transamidasa.

Las GPI-CWPs representan en *C. albicans* aproximadamente el 88% de todas las proteínas de la pared celular unidas covalentemente. Aunque parecen estar involucradas directa o indirectamente en la virulencia, sus funciones en la adhesión, reconocimiento celular, biosíntesis y remodelación de la pared todavía no se encuentran completamente establecidas.

### I.3.1.5.2. Proteínas Pir-CWPs

Como hemos comentado anteriormente, dentro de las proteínas que se encuentran unidas covalentemente a la pared, encontramos un conjunto de proteínas unidas mediante enlaces álcali sensibles conocidas como ASL-CWPs. A este grupo pertenecen la familia de proteínas Pir –CWPs (**P**roteins with **I**nternal **R**epeats). Se trata de proteínas altamente glicosiladas, caracterizadas por la presencia de un número variable de repeticiones internas. Se encuentran unidas directamente al  $\beta$ -1,3 glucano mediante enlace álcali-sensible, no presentando interconexión con el  $\beta$ -1,6 glucano. (Kaptein *et al.*, 2000). (Figura. 7).



**Figura I.7.** Esquema general de una proteína Pir. (Moscardo, 2013).

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco proteínas de la familia Pir: Pir1p (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsá *et al.*, 1997), Pir2p/Hsp150 (Toh-e *et al.*, 1993; Moukadiri y Zueco, 2001), Pir3p (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsá *et al.*, 1997) y Pir4p (Moukadiri *et al.*, 1999) y Pir5p (Ecker *et al.*, 2006).

Todas las proteínas presentan una serie de características comunes:

- Se extraen de la pared principalmente mediante tratamientos con álcali diluido o mediante tratamiento con  $\beta$ -1,3 glucanasas.
- Presentan cuatro cisteínas en idéntica posición en el extremo C-terminal.

- Todas ellas presentan repeticiones internas variables en su secuencia de aminoácidos, estas repeticiones van desde una en Pir 4 hasta 11 En Pir2 de *S. cerevisiae*.
- Son sintetizadas como preproteínas y procesadas en el aparato de Golgi mediante la proteasa Kex29 que corta a nivel del externo C-terminal en la secuencia –Lys-Arg- o – Arg-Arg- (Toh-e *et al.*, 1993).
- Algunas proteínas Pir, pueden estar unidas a la pared mediante puentes disulfuro, pudiendo ser liberadas de la misma mediante agentes reductores (Moukadiri y Zueco, 2001).
- Algunas proteínas Pir, tales como Pir 2 o Pir 4 de *S. cerevisiae*, pueden ser secretadas al medio de cultivo.

#### **I.4. Factores de Virulencia de *C. albicans***

El termino virulencia se refiere al grado de patogenicidad de un microorganismo, es decir a la capacidad que presenta un microorganismo para causar una enfermedad. En este hecho se encuentran implicados un conjunto de factores tanto del agente patógeno como del hospedador. Dependiendo entre otros del número de organismos infectantes, de la ruta de entrada en el hospedador, de los efectos de los mecanismos de defensa y de las características intrínsecas del microorganismo, dichas características son lo que se conoce como factores de virulencia. La mayoría de patógenos, incluyendo especies de genero *Candida*, han desarrollado un batería de factores y estrategias específicas para ayudar en su capacidad de colonizar los tejidos del hospedador, causar enfermedades y superar de ese modo las defensas del mismo.

Los factores de virulencia expresados y/o requeridos por las especies de *Candida* y en particular por *C. albicans*, pueden variar dependiendo del tipo de infección (superficial o sistémica), del sitio y etapa de la infección, y de la respuesta del hospedador. Conocer los factores de virulencia del microorganismo haría posible determinar cómo se modifica la relación entre éste y su hospedador. Los principales factores asociados a *Candida* están relacionados con la producción de enzimas

hidrolíticos (aspartil proteinasas secretadas SAP, fosfolipasas y lipasas), dimorfismo, cambios fenotípicos, Quorum Sensing (QS), la presencia de moléculas de reconocimiento superficial (adhesinas y receptores de ligandos en tejidos del hospedador, hidrofobicidad y capacidad de formar biopelículas, entre otros. La base molecular y celular, así como el posible papel de los potenciales factores de virulencia han sido estudiados por distintos grupos de investigación. (Calderone y Fonzi, 2001; Chaffin, 2008; Gow, 1997; Gow *et al.*, 2002; Kuppra 2009; Mayer *et al* 2013; Modrzewska y Kurnatowski, 2015; Moyes *et al.*, 2015; Pande *et al.*, 2013; Sundstrom, 2002; Tao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2004).

El fenómeno de virulencia es por lo tanto complejo coexistiendo muchos factores desencadenantes que se encuentran interrelacionados. Seguidamente vamos a comentar algunos de ellos, dedicando un apartado especial a la formación de biopelículas.

#### **I.4.1. Morfogénesis**

*C. albicans* se diferencia de otros hongos por su capacidad para crecer tanto en forma de células de levadura como de micelio bajo diferentes condiciones ambientales, “*in vitro*” esta transición se puede provocar por distintos factores como suero, temperatura de crecimiento a 37 °C, N-acetilglucosamina, pH neutro, 5% de CO<sub>2</sub> e inanición (Buffo *et al.*,1984; Kumamoto y Vincs, 2005).

Además de las formas de levadura y micelio, que son las más habituales, también podemos encontrar, como hemos comentado anteriormente, otros dos tipos de morfologías: pseudohifas, células alargadas que permanecen unidas tras la gemación y clamidosporas, células redondeadas de pared gruesa que se forman en condiciones desfavorables. Vemos pues que podemos encontrar al menos cuatro morfologías definidas (levadura, pseudohifa, clamidospora e hifa) que fueron ya descritas por Winner y Hurley (1964). (Figura I.1.).

La transición morfológica entre células de levadura y micelio, está considerada como un importante factor de virulencia en *C. albicans* (Biswas *et al.*, 2007), sugiriéndose que ambas formas son importantes para su patogénesis (Jacobsen *et al.*,

2012). Las células de levadura parecen jugar un importante papel en la diseminación durante la infección, mientras que las hifas contribuyen a realizar un mayor daño tisular y son más invasivas (Berman y Sudbery, 2002; Jacobsen *et al.*, 2012; Saville *et al.*, 2003). La transición de levadura a micelio se considera importante dado el hecho de que las hifas se encuentran siempre en estados patológicos, mientras que las células de levadura también se pueden encontrar en intestino y vagina de un gran porcentaje de población que no presentan síntomas de enfermedad (Cassone, 2008), pero en tejidos infectados se pueden encontrar ambas formas. Se ha observado que mutantes monomórficos presentan virulencia, considerándose desde hace años que la virulencia no depende de la forma morfológica “*per se*”, sino de la capacidad de realizar el cambio fenotípico (Kruppa, 2009).

La expresión diferencial de genes inducida por los sistemas de traducción de señales que activan la formación de hifas, es responsable de cambios tanto, en el ciclo de división celular como en la composición y en la organización de la pared fúngica que originan el cambio de morfogénesis. Muchos de estos cambios producidos en la expresión génica no se encuentran relacionados con el control de dicho proceso, sino con la respuesta y/o adaptación de la célula a los cambios ambientales, confiriendo a las hifas características particulares (adhesión, hidrofobicidad, enzimas proteolíticos, etc. (Mayer *et al.*, 2013; Sudbery, 2011). Además, las hifas son capaces de presentar un crecimiento direccional en respuesta al contacto con superficies sólidas, conocido como “tigmotropismo”. Esta capacidad hace que *C. albicans* identifique e invada uniones intercelulares, así como pequeñas alteraciones asociadas con la integridad celular (Gow *et al.*, 1994, 2002; Kumamoto y Vincles, 2005).

#### **I.4.2. Cambio fenotípico**

El fenómeno conocido como cambio fenotípico “phenotypic switching” o transición “Blanco-Opaco” (White-Opaque), implica el cambio reversible y hereditario entre dos o más fenotipos genéricos, distinguibles por diferencias en la morfología de las colonias de *C. albicans* (Soll, 1992). Esta variación fenotípica se produce en cepas

---

patógenas de distintos hongos. *C. albicans* presenta esta capacidad de un modo espontáneo, reversible y con una frecuencia elevada ( $10^{-4}$  a  $10^{-2}$ ). Esta estrategia le permite una rápida adaptación en respuesta a distintos desafíos ambientales. La capacidad de crecer en diferentes formas morfológicas es crítica tanto para su estilo de vida comensal como para su existencia como patógeno. (Pande *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2014; Whiteway y Bachewich, 2007).

Junto a las fases blanca y opaca ha sido descrita una fase intermedia “gris”, con lo que actualmente se considera, en *C. albicans*, un cambio fenotípico “Blanco-Gris-Opaco” (Tao *et al.*, 2014).

La cepa WO<sup>-1</sup> fue la primera en la que se identificó la transición entre “Blanco-Opaco”, la cual cambia de forma espontáneamente entre una fase y otra (Soll, 1997; Slutsky *et al.*, 1987). Esta cepa se ha utilizado clásicamente para el estudio de los mecanismos implicados en el cambio fenotípico, utilizándose como modelo experimental (Slutsky *et al.*, 1987). Mediante el empleo de Chips de ADN, se sabe que aproximadamente 400 ORFs varían su nivel de expresión durante el cambio Blanco-Opaco, entre estos genes se encuentran *WHI1* y *EFG1* como específicos de la fase Blanca y genes como *OP4*, *SAP*, *SAP3* y *CDR3* específicos en la Opaca (Lan *et al.*, 2002).

La variabilidad antigénica que presentan los distintos fenotipos, se considera como un mecanismo del hongo para evadir las defensas del huésped. Los anticuerpos desarrollados frente a un primer antígeno no son eficaces frente a las células que hayan sufrido este cambio, y estas células podrán desarrollarse de un modo selectivo frente a las que no hayan sufrido variaciones.

#### **I.4.3. Quorum Sensing (QS)**

*C. albicans* es capaz de modular su cambio morfológico a través de cambios en la densidad celular. Este hecho aparece antes de los cambios de morfología y de la producción de proteasas (Saps). Es un fenómeno que le sirve al hongo para la comunicación de las células del mismo entre sí, desarrollando un comportamiento de tipo cooperativo al que se le dio el nombre de “Quorum Sensing” (QS) (Kuppra 2009).

La base de este control celular dependiente de la densidad, es similar a la que se observa en las células bacterianas que regulan sus actividades a través de la detección de quorum. Se han identificado distintas moléculas que afectan la capacidad de *C. albicans* de sufrir el cambio de levadura a micelio, y tres compuestos: Tyrosol, farnesol, y ácido farnesóico, han demostrado ser moléculas autoinductoras del sistema de QS (Raina *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2007; Gregus *et al.*, 2010).

EL Farnesol y ácido farnesóico bloquean la transición morfológica de la levadura a la forma micelial. Mientras que la molécula de tyrosol, ha sido descrita como una molécula de autorregulación que tiene implicaciones importantes en la dinámica de crecimiento y morfogénesis del hongo, acelerando la formación de los tubos germinales, es decir, favorece el desarrollo filamentoso de esta levadura, pero su efecto depende de la menor presencia del farnesol que sería la molécula reguladora principal (Chen *et al.*, 2004; Devau *et al.*, 2010). Niveles exógenos de farnesol de hasta 300 mM no alteran la tasa de crecimiento, sino que las células crecen como levaduras en lugar de filamentos. El farnesol induce la formación de biopelículas, este mismo autoinductor, es considerado un factor de virulencia durante la infección sistémica y un factor de protección durante la infección de las mucosas (Cugini *et al.*, 2010).

#### **I.4.4. Secreción de enzimas hidrolíticos**

La secreción de proteasas y otras enzimas hidrolíticas, constituyen un importante factor de virulencia puesto que facilitan la progresión del hongo en los tejidos del hospedador. Las principales enzimas secretadas por *C. albicans* son las aspartil proteasas (Saps), fosfolipasas y lipasas.

##### **I.4.4.1. Aspartil proteasas. (Secreted aspartyl proteinases) (Saps)**

En *C. albicans* esta actividad se encuentra formada por una familia de genes de al menos 10 miembros. Ocho de estas proteasas (Sap 1-8) se secretan al espacio extracelular, mientras que Sap 9 y 10 se encuentran unidas a proteínas de membrana. Estas enzimas presentan todas ellas una actividad óptima a pH ácido, presentando una

---

amplia especificidad de sustrato. La secreción de Saps permite a *C. albicans* utilizar proteínas exógenas como única fuente de nitrógeno. A diferencia de otras aspartil proteasas, las de *Candida* pueden degradar colágeno, queratina, mucina, así como degradar inmunoglobulinas y citoquinas (Negi *et al.*, 1984). Estos amplios espectros de sustratos hacen que las Saps jueguen un papel crítico en la patogénesis del hongo.

La presencia de esta familia de genes *SAP* sugiere que distintas Saps pueden presentar diferentes funciones durante el proceso infeccioso y, por lo tanto, pueden jugar papeles cruciales en la patogénesis provocada por *C. albicans*. La producción de Saps parece estar asociada con otros factores de virulencia de *Candida*, tales como la formación de hifas y el cambio fenotípico, y también puede estar involucrado en la adherencia de células fúngicas a diferentes tejidos del hospedador. Las proteasas aspárticas controlan varios pasos en la evasión de la inmunidad innata y degradan las proteínas relacionadas con la defensa inmunológica (anticuerpos, complemento y citoquinas), permitiendo que el hongo escape de la primera línea de defensa del huésped. Las Saps son pues una de las familias de genes de virulencia más versátiles y multifuncionales presentes en *C. albicans* (Hube, 2004, 2006; Hube y Naglik, 2001; Monod, 2002; Naglik *et al.*, 2003, 2004).

La expresión de los distintos genes Saps, depende de las condiciones ambientales, las proteínas Sap1, Sap2 y Sap3 son secretadas solo por levaduras y contribuyen al daño tisular e invasión del epitelio, algunos genes como *SAP4*, *SAP5*, *SAP6* se inducen cuando las células de levadura son fagocitadas por los macrófagos (Borg von Zepelin *et al.*, 1998; Hube, 2000). *SAP4* y *SAP6* se expresan de un modo mayoritario en la fase micelial (Felk *et al.*, 2002; Kortling *et al.*, 2003). Tanto Sap9 como Sap10 tienen secuencias consenso C-terminal típicas para las proteínas GPI lo que implica que están ancladas a la membrana y no se secretan extracelularmente.

#### **I.4.4.2. Fosfolipasas y lipasas**

Estos otros enzimas líticos, se han correlacionado con la capacidad patógena de *C. albicans*, ya en 1995 Ibrahim *et al.*, observaron una correlación entre la producción de estos enzimas y la virulencia del hongo.

La acción de las fosfolipasas consiste en hidrolizar uno o más enlaces éster de glicerol-fosfolípidos. Se han identificado distintas fosfolipasas en *C. albicans* (A, B, C y D, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa-tansacilasa) (Mukherjee y Ghannoum, 2002). Desde hace tiempo se conoce la acción de las fosfolipasas en la penetración de células hospedadoras (Pugh y Cawson, 1977) así como en la adhesión e invasión de células epiteliales (Barrett-Bee *et al.*, 1985; Jayatilake *et al.*, 2005). Estudios realizados mediante la interrupción del gen de la fosfolipasa B de *C. albicans* (*CaPLB1*) demostraron, que las cepas carentes del mismo disminuían mucho su capacidad de penetración en las células del hospedador, mientras que la introducción del gen provocaba la recuperación de la virulencia (Ghannoum, 2000; Mukherjee, *et al.*, 2001).

Finalmente, las lipasas y estererasas se caracterizan por su capacidad de catalizar la hidrólisis de enlaces éster de mono-, di- y triacil-gliceroles o incluso fosfolípidos. El papel y las funciones de las lipasas durante las infecciones por *C. albicans* se asocia a una amplia actividad lipolítica, que puede contribuir a la persistencia y virulencia de *C. albicans* en el tejido humano. Las lipasas secretadas de *C. albicans* están codificadas por una familia de genes con al menos 10 miembros (*LIP1-LIP10*). (Hube, 2000; Schofield *et al.* 2005; Stehr *et al.*, 2004).

### **I.4.5. Adhesión**

La adherencia de *C. albicans* a las células del hospedador, a otros microorganismos y/o a superficies abióticas, se considera sumamente importante tanto en el comensalismo como en la patogenicidad, siendo esencial en la colonización y en la supervivencia. Mientras que el contacto inicial célula-célula está mediado a través de fuerzas pasivas, incluidas las fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, la adhesión es más compleja, en ella se encuentran involucradas tanto moléculas específicas de reconocimiento superficial (adhesinas y receptores de ligandos en tejidos del hospedador), como propiedades físico-químicas superficiales. Se considera que los factores más importantes que median la adhesividad son la presencia de moléculas de adhesina y receptores para ligandos del hospedador, hidrofobicidad de superficie celular

(CHS) y morfogénesis de hifas (Calderone, 1993 a, b; Calderone *et al.*, 2000; Fukazawa y Kagaya, 1997; Hazen y Glee, 1995; Hostetter, 1994; Masuoka, 2004; Sundstrom, 2002).

La adhesión requiere la interacción de adhesinas con receptores de células hospedadoras (Chaffin, 2008; Moyes *et al.*, 2015). Las hifas son consideradas generalmente la morfología más adherente de *C. albicans*, pero la mayor parte de la adhesión inicial es probable que ocurra entre las levaduras y células epiteliales, siendo posteriormente inducida la formación de hifas después del primer contacto con la superficie de la célula hospedadora (Moyes *et al.*, 2015). Una vez que se forman las hifas, las adhesinas se expresan exclusivamente en la superficie de las mismas, adquiriendo gran importancia en los procesos de adhesión posteriores (Moyes *et al.*, 2015).

Una adhesina es una biomolécula que promueve la adherencia a células del hospedador o a ligandos específicos. Se conocen distintos tipos de adhesinas en *C. albicans* tales como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1, las cuales son críticas para la colonización e inducción de enfermedad. (Zhu y Filler, 2010).

Existen otras moléculas de la superficie de *C. albicans* que también son importantes en la adhesión y penetración tales como polisacáridos, glicoproteínas, lípidos y estructuras como las fimbrias (Henriques, *et al.*, 2006; Tronchin *et al.*, 2008).

#### **a) Als (*Agglutinin-Like Sequence*)**

Las Als (secuencia similar a la aglutinina) son el grupo mejor estudiado de adhesinas en *C. albicans* (Mayer *et al.*, 2013). Se han descrito ocho miembros que están codificados por la familia de genes *ALS* (*ALS1-7* y *ALS9*). Mientras *ALS1-4* codifica adhesinas específicas para tubos germinales e hifas, Als5-7 y Als9 pueden encontrarse en la superficie de las células de levadura (Modrzewska y Kurnatowski, 2015).

Las proteínas Als se encuentran distribuidas uniformemente en la superficie celular en lugar de agruparse focalmente. Esta localización es atribuible a sus secuencias hidrofóbicas amino y carboxi terminales, que se demostraron bioquímicamente para funcionar como una secuencia de señal secretora, y un motivo de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), respectivamente (Hoyer, 2001; Hoyer *et al.*, 1998 b;

Kapteyn *et al.*, 2000). En la pared celular de *C. albicans*, las proteínas Als están relacionadas con el  $\beta$ -1,6-glucano y se comportan como una especie unida a GPI (GPI-CWP) (Kapteyn *et al.*, 2000).

Estas proteínas de la pared celular contribuyen de manera importante a las propiedades adherentes de *C. albicans*, actúan como adhesinas convencionales y no convencionales y son potencialmente importantes para la co-adhesión de comunidades microbianas mixtas en biopelículas y superficies mucosas (Klotz *et al.*, 2007).

**b)** Las características comunes de las proteínas GPI-CWPs sugieren que otras proteínas con estas características también podrían actuar como adhesinas, especialmente si presentan expresión específica en hifas dada la adhesividad potenciada mostrada por las mismas en comparación con las células de levadura. En este contexto, dos genes de *C. albicans* que codifican proteínas de clase GPI-CWP con determinantes de anclaje en la pared celular son *CSA1* (Lamarre *et al.*, 2000) e *HYR1* (Bailey *et al.*, 1996). *CSA1* se regula positivamente durante la producción de hifas, pero también se encuentra en las superficies de las yemas en cultivos de levadura en crecimiento exponencial, mientras que *HYR1* es específico de las hifas.

**c) Hwp1(Hyphal wall protein)**

Otra proteína unida a GPI asociada a hifas Hwp1 (Hyphal wall protein) juega también un papel importante en la unión a las células hospedador. Es una manoproteína que se expresa en la superficie de las hifas de *C. albicans*. La región N-terminal de Hwp1 sirve como sustrato a las transglutaminasas asociadas a las células epiteliales, provocando una unión de forma covalente a través de enlaces cruzados de residuos glutamina de la región N-terminal de Hwp1 (Huang, 2012; Lim *et al.*, 2012; Moyes *et al.*, 2015; Staab *et al.*, 1999).

A esta adhesina también se le ha asignado un papel importante en la formación de biopelículas al unirse a Als1 y Als3 mediando en la unión de las hifas entre sí (Nobile *et al.*, 2008; Zhu y Filler, 2010).

---

**d) Otras adhesinas**

**Eap1** (adherencia mejorada al poliestireno), fue identificada originalmente debido a su similitud con una proteína de *S. cerevisiae* unida a GPI y encontrándose que facilita la adhesión de las células fúngicas a poliestireno, a células epiteliales del hospedador, interacciones célula-célula y también parece desempeñar un papel en la formación de biopelículas de *C. albicans* “*in vitro*” e “*in vivo*” (Li y Palecek, 2003, 2008; Li *et al.*, 2007).

**Iff4**, forma parte de una familia de 12 proteínas que se expresan en la superficie celular y apoyan la adherencia a las células epiteliales orales (Zhu y Filler, 2010). Se requiere un nivel correcto de expresión de Iff4 para maximizar la virulencia, ya que niveles muy altos aumentan la susceptibilidad a la muerte por neutrófilos en pacientes inmunocompetentes, pero no en neutrópenicos (Zhu y Filler, 2010).

**Mp65** está involucrada en la adhesión de *C. albicans* mediando la unión a diversos sustratos, pero también contribuye indirectamente a la adhesión modificando la estructura de la pared celular a través de su actividad glucanasa, facilitando así la expresión o función de otras adhesinas (Sandini *et al.*, 2007; Zhu y Filler, 2010).

**Int1**. El gen *INT1* de *C. albicans* codifica una especie de proteína (Int1) que es similar a las adhesinas de leucocitos de vertebrados, se une a proteínas de la matriz extracelular e induce cambios morfológicos en respuesta a señales extracelulares (Calderone, 2002). La eliminación de *INT1* causó fenotipos múltiples, incluida la reducción parcial de la adhesión al epitelio, la pérdida de virulencia y la inhibición de la transición de levadura a micelio (Gale *et al.*, 1998).

**e) Los polisacáridos** de la pared celular de *C. albicans* están implicados en la unión a las células epiteliales. Se conoce desde hace años que el manano desempeña

un papel importante en la adhesión de *C. albicans* a las células endoteliales vasculares (Rotrosen *et al.*, 1985).

#### **I.4.6. Hidrofobicidad de la superficie celular (CSH)**

Como se ha comentado con anterioridad, la adhesión del hongo a los tejidos del hospedador es un paso imprescindible para el inicio de la infección. *C. albicans* es capaz de adherirse no solo a la superficie de las células de distintos tejidos del mismo, sino que también es capaz de adherirse a superficies abióticas como prótesis, catéteres etc.

La adhesión de *Candida* a las distintas superficies, tanto bióticas como abióticas, depende también de enlaces de tipo electrostático, en los que jugaría un papel importante la hidrofobicidad de la pared del hongo. Es conocido que las células hidrofóbicas se adhieren con mayor facilidad a los tejidos, y presentan además una mayor resistencia a la fagocitosis.

Las interacciones hidrofóbicas entre la superficie celular de *C. albicans* y las superficies biológicas o inertes contribuyen de un modo importante a la adherencia, favoreciendo el contacto adhesina-ligando entre el hongo y la superficie en contacto, así como la entrada del hongo a regiones internas del huésped. La hidrofobicidad de su superficie permite a *C. albicans* localizarse y/o crecer en compartimentos no colonizables inicialmente al conferir a las células la capacidad de adaptarse a las condiciones nutricionales fuertemente restrictivas que existen en esos compartimentos (Zajic y Seffens, 1983). La expresión de la hidrofobicidad de la superficie de *C. albicans* es un proceso dinámico, las células pueden modificar el carácter de su superficie en periodos de tiempo cortos (menos de 30 min) (Hazen y Hazen, 1987), lo cual es consubstancial con el mayor carácter invasivo que se le atribuye al micelio. (Mayer *et al.*, 2013).

---

## 1.5. Biopelículas

Zobell describió en el año 1943 que cuando se mantenía agua de mar en una botella de vidrio el número de microorganismo en suspensión disminuía gradualmente y por el contrario el número de microorganismos adheridos a las paredes internas de la botella aumentaba de modo progresivo (Zobell, 1943). Pero no fue hasta 30 años después cuando se aceptó que el modo de vida en forma de biopelículas es lo habitual y no la excepción (Costerton *et al.*, 1995). El concepto de universalidad acerca de la formación de biopelículas, ha evolucionado como consecuencia del interés en el estudio de las mismas. Inicialmente se pensó en la existencia de un reducido número de especies microbianas que tenían la característica de ser buenas formadoras de biopelículas, desde hace años se considera que la formación de biopelículas es una característica universal de los microorganismos (bacterias, hongos e incluso virus) (Kolter, 2005). De modo general se define una biopelícula como una comunidad de células adherentes que presentan propiedades distintas de las células flotantes (planctónicas) (Kolter, 2010).

Actualmente se considera que, para muchos microorganismos, el estado de biopelícula es probablemente el más habitual en sus ambientes “naturales”. Algunos ejemplos de formación de las mismas son: los sedimentos intermareales que contienen biopelículas de cianobacterias, o las biopelículas de algas formadas en estructuras artificiales como tuberías. Las biopelículas también se forman sobre diversos biomateriales (por ej. válvulas cardiacas implantadas, donde se desarrollan biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*), tejidos vegetales (por ej. las raíces de las leguminosas colonizadas por biopelículas de rizobios) y tejidos de mamíferos donde con frecuencia se encuentran biopelículas de *C. albicans*. Los efectos locales de las biopelículas en sus entornos son complejos; pueden ser favorables, dañinos o benignos, e incluso estos efectos pueden cambiar con el tiempo. Se estima que las biopelículas son responsables de un modo u otro de más del 80% de todas las infecciones microbianas en Estados Unidos (Fox y Nobile, 2012).

Las biopelículas tienen un gran impacto en la salud humana. Por ejemplo, son biopelículas la placa dental, la colonización crónica de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística, así como la capa de microorganismos que crece en las superficies de las mucosas en forma de aftas, o la infección vaginal por levaduras (*Candida spp.*).

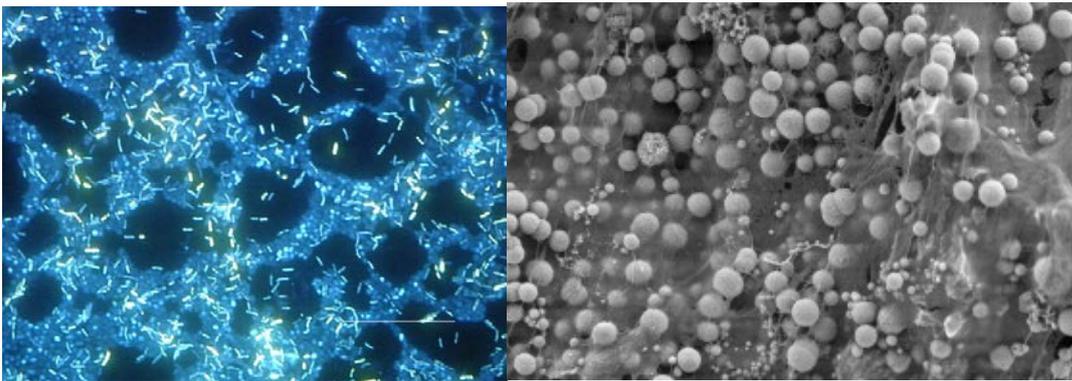
Muchos de los avances en la tecnología médica han proporcionado nuevos y peligrosos nichos para la formación de las mismas. Los dispositivos médicos implantados proporcionan superficies para el crecimiento de la biopelícula, lo que provoca en muchos casos un reservorio de los microorganismos en el hospedador.

¿Qué es pues una biopelícula? Las biopelículas se definen como asociaciones de microorganismos que están unidos a una superficie biótica o abiótica. Están compuestas principalmente de células microbianas que se desarrollaron bien a partir de una sola especie o una comunidad derivada de múltiples especies. Las biopelículas mixtas son la situación habitual en la naturaleza (las biopelículas formadas por una única especie microbiana son raras en entornos naturales y se limitan principalmente al laboratorio). Las biopelículas están constituidas además de por células, por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de origen microbiano y otros materiales particulados, principalmente estructuras celulares y materiales de desecho. Los SPE constituyen la denominada Matriz Extracelular (ME) de la biopelícula en la que se encuentran embebidas las células microbianas. La ME desempeña un papel esencial en las propiedades físicas de la comunidad microbiana dentro de la estructura de la biopelícula.

La formación de las biopelículas puede considerarse como un proceso de etapas múltiples. El primer paso sería la unión o colonización inicial de una nueva superficie por parte de las primeras células ("células pioneras"). Posteriormente se produce la proliferación y agregación celular para producir una capa basal de microcolonias de anclaje. Para las especies microbianas móviles, este proceso a menudo requiere una transición a células inmóviles. En algunas bacterias (por ejemplo, varias especies del género *Pseudomonas*), la interacción inicial célula-superficie se encuentra mediada por la motilidad flagelar, mientras que los pili tipo IV que no son imprescindibles en la unión superficial inicial, parecen ser importantes para la posterior interacción célula-célula. Las bacterias inmóviles tales como estafilococos o células de levadura (por ejemplo, *Candida spp.*) necesitan una unión a la superficie celular distinta, así como mecanismos de interacción célula-célula que todavía no se conocen en su totalidad. Una vez se han asociado un número suficiente de células para formar las microcolonias, dichas células empiezan a producir la ME. La producción de la misma da como resultado una unión

más firme y la aparición de la estructura de la biopelícula madura (Nobile y Mitchell, 2007). La apariencia microscópica de ME se muestra en la figura I.8.

La ME se encuentra implicada en la adhesión, participando tanto en las interacciones célula-célula como entre estas y la superficie sobre las que se adhieren, preservando así la integridad de la arquitectura de la biopelícula. Así mismo desempeña funciones protectoras tales como la unión y/o inactivación de agentes antimicrobianos, así como la evasión a la respuesta del sistema inmunitario del hospedador.



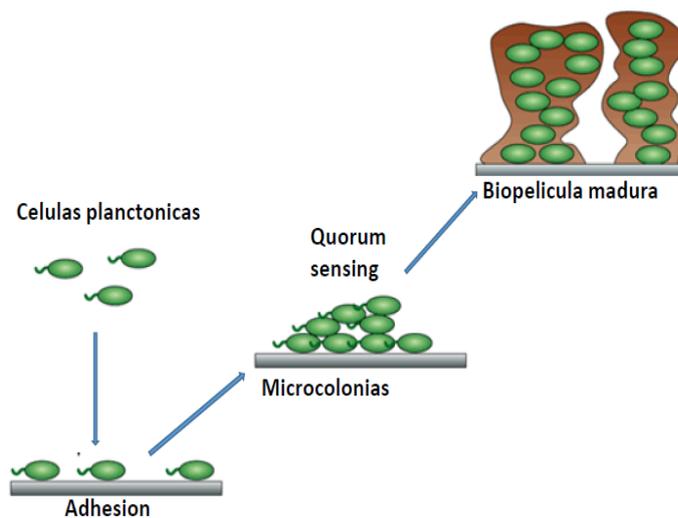
**Figura I.8.** Biopelículas mixtas. A) Biopelícula polimicrobiana cultivada en una superficie de acero inoxidable en un reactor de agua potable durante 14 días, teñida con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y observada mediante microscopía de epifluorescencia. La presencia de la matriz extracelular (ME) se detecta claramente (B) Observación por microscopía electrónica de barrido (21,850 x aumentos) que muestra la superficie de una biopelícula madura en la que las células están embebidas en la ME de la biopelícula. (de Donlan, 2002).

Las células integradas en el ME se comunican entre sí y muestran un comportamiento grupal coordinado modulado por un proceso llamado detección de quórum (Zhang y Dong, 2004). Los procesos de detección de quórum son aquellos en los que los comportamientos microbianos o sus respuestas se rigen por la densidad celular. Dichos comportamientos comunitarios están generalmente determinados por moléculas de señalización, cuya acumulación es una medida de la densidad celular (Keller y Surette, 2006). La detección de quórum tiene un papel fundamental en los distintos tipos de biopelículas (Peleg *et al.*, 2010; Siehnel *et al.*, 2010).

Como se ha comentado anteriormente las biopelículas fuera del laboratorio son multiespecies, su crecimiento y estabilidad en los diferentes entornos (cavidad oral, el tracto urogenital humano y el intestino humano entre otros), requieren interacciones específicas célula-célula entre células genéticamente distintas. Este tipo de

interacciones no son aleatorias. La distancia célula-célula es un factor clave que determina los procesos de señalización y comunicación. La comunicación representa el intercambio de moléculas entre células genéticamente distintas que da como resultado un cambio en el fenotipo o en la expresión génica en el receptor. En el caso de señales que permanecen inmóviles en el interior de la biopelícula, es sumamente importante la yuxtaposición de las células para conseguir una efectiva comunicación entre ellas, en este contexto, la ME presenta un papel esencial en el mantenimiento de la proximidad apropiada entre células (Richard *et al.*, 2008).

Se conocen diversas sustancias utilizadas por las células en la comunicación célula-célula. Por ejemplo, la molécula autoinducer-2 (AI-2) es utilizada entre otras en la comunicación entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Richard *et al.*, 2008; Nobile y Mitchell, 2007). En hongos, se sabe que tanto los alcoholes (farnesol y tirosol) como las feromonas de acoplamiento peptídico funcionan como moléculas de señalización, tanto entre célula-célula interespecies como intraespecie (Alby y Bennett, 2011; de Sordi y Mühlischlegel, 2009; Deveau y Hogan, 2011; Nickerson *et al.*, 2006; Soll, 2011).



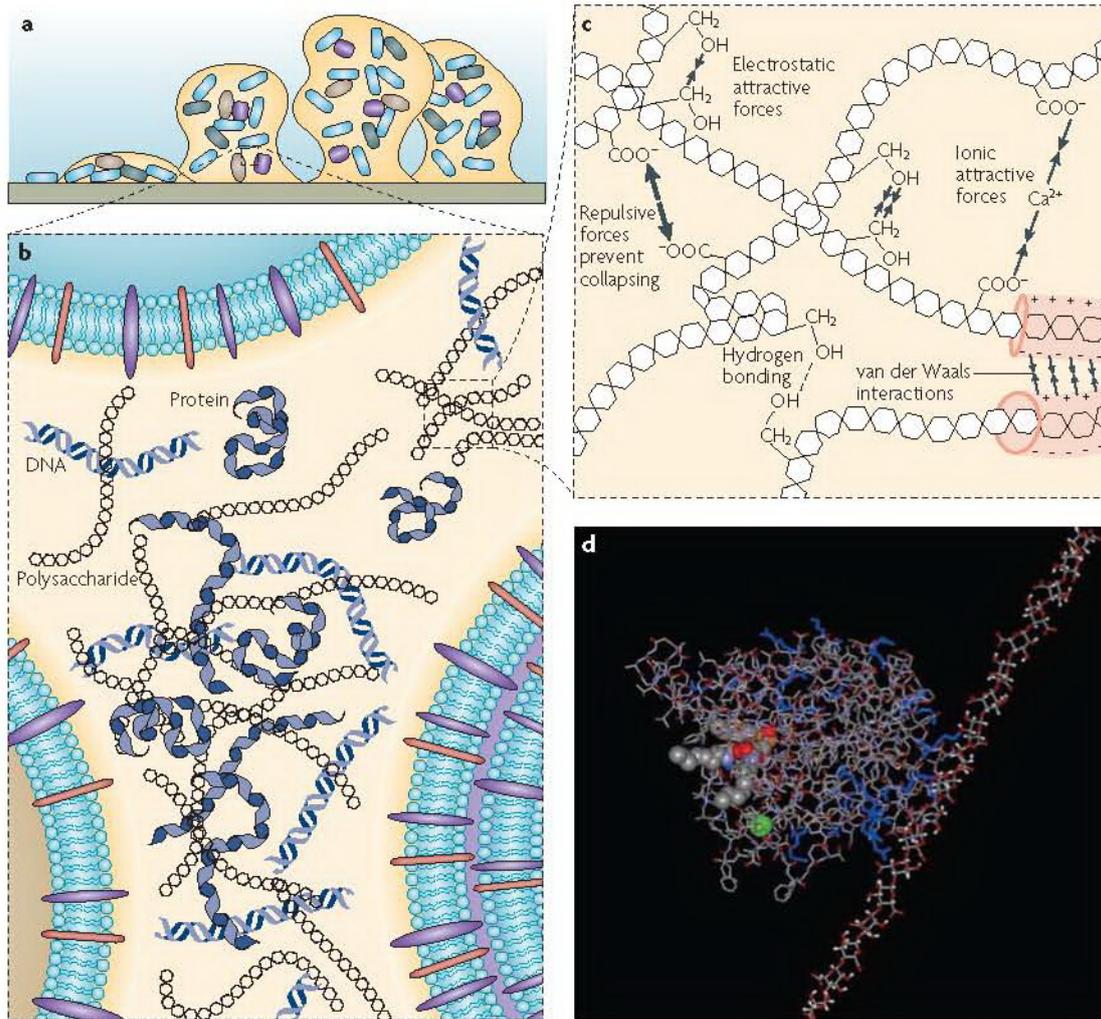
**Figura I.9.** Etapas básicas en la formación de las biopelículas. Unión inicial de bacterias planctónicas (vida libre) “células pioneras”, a una superficie es seguida por la proliferación y agregación celular produciendo una capa basal de microcolonias de anclaje. La producción de la ME que recubre las células conduce a la aparición de la biopelícula madura.

En el 2007 Flemming y colaboradores se refirieron a la SPE como "la materia oscura de las biopelículas" debido tanto a la variedad de componentes biopoliméricos de la ME como a la dificultad para su análisis. La composición tanto cualitativa como cuantitativa de la SPE puede variar mucho entre las biopelículas, dependiendo de los microorganismos que la componen, las fuerzas de unión, la temperatura y/o la disponibilidad de nutrientes. La SPE inicialmente se denominó "polisacáridos extracelulares", pero se cambió dicho nombre debido a que la ME contiene además proteínas, ácidos nucleicos (ADN), lípidos y otros biopolímeros (Allison *et al.* 2003; Wingender *et al.*, 1999).

En la figura I.10. se muestran esquemáticamente los componentes poliméricos extracelulares mayoritarios (SPE) en diferentes dimensiones, así como las diferentes clases de interacciones fisicoquímicas débiles y el enmarañamiento de los biopolímeros que influyen principalmente en estabilidad de la matriz (Flemming y Wingender, 2010).

La capacidad de ciertos microorganismos patógenos de formar biopelículas parece facilitar la supervivencia de estos en el medio ambiente y/o hospedador. Esto podría deberse a la acumulación y dispersión de un número suficiente de células desde la biopelícula madura. Los microambientes heterogéneos que ocurren dentro de las biopelículas pueden promover una población de microorganismos diferenciada tanto fenotípica como genotípicamente que permiten la supervivencia en condiciones ambientales cambiantes y facilitando la infección (Hall-Stoodley y Stoodley, 2005).

Es conocido desde hace años que las células sésiles (asociadas a la biopelícula) son tanto fisiológica como fenotípicamente diferentes a las células no adheridas (planctónicas) y una de las principales propiedades de las células sésiles es su mayor resistencia a los agentes antimicrobianos (Donlan y Costerton, 2002; Mah y O 'Toole, 2001; Stewart y Costerton, 2001). La formación de biopelículas se considera habitualmente la razón subyacente por la que fracasa el tratamiento con un agente antimicrobiano. Entre un 65% y un 80% de todas las infecciones microbianas están relacionadas con la formación de las mismas, por lo tanto, las biopelículas son muy importantes para la salud pública.



**Figura I.10.** Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de la matriz en diferentes dimensiones. **(a)** Modelo de una biopelícula bacteriana unida a una superficie sólida. La formación de la biopelícula comienza con la unión de una célula a una superficie. Se forma una microcolonia mediante la división de la bacteria, y se inicia la producción de la matriz de la biopelícula. A continuación, se pueden reclutar otras bacterias a medida que la biopelícula se expande debido a la división celular y a la posterior producción de componentes de la matriz. **(b)** Los principales componentes de la matriz, polisacáridos, proteínas y ADN, se distribuyen entre las células en un patrón no homogéneo, estableciendo diferencias entre regiones de la matriz. **(c)** Las distintas clases de interacciones fisicoquímicas débiles y el enmarañamiento de biopolímeros que dominan la estabilidad de las SPE de la matriz. **(d)** Simulación de la interacción entre el exopolisacárido alginato (derecha) y la enzima extracelular lipasa (izquierda) de *Pseudomonas aeruginosa* en solución acuosa (Flemming y Wingender, 2010).

### **I.5.1. Matriz Extracelular de la biopelícula**

En la mayoría de las biopelículas, los microorganismos representan menos del 10% del peso seco, mientras que la ME puede representar más del 90% del mismo. La ME forma la estructura para la arquitectura tridimensional de la misma y es responsable de la adhesión a las superficies y de la cohesión. La ME no genera un entorno homogéneo, sino que, por el contrario, la distribución de sus componentes proporciona una estructura física que forma microdominios que conducen a una heterogeneidad espacial y funcional en una escala micrométrica (Lawrence *et al.*, 2007). La formación de una biopelícula permite un estilo de vida completamente diferente del estado planctónico, permitiendo la inmovilización de las células, manteniéndolas en estrecha proximidad, lo que favorece interacciones intensas, incluida la comunicación célula-célula, y la formación de microasociaciones sinérgicas. Ecológicamente, la competencia y la cooperación en el espacio confinado de la matriz conduce a una adaptación constante de la aptitud de la población. Sin embargo, no está claro si la matriz confiere una ventaja ecológica a todas las células de la biopelícula.

Con respecto a las SPEs, se han demostrado una serie de ventajas para el modo de vida de la biopelícula entre ellas caben destacar: a) adhesión, agregación de células microbianas y cohesión de biopelícula, (b) barrera protectora frente a desecación, defensas específicas e inespecíficas del hospedador, agentes antimicrobianos, cationes metálicos, radiación UV, y la mayoría de depredadores protozoarios (polisacáridos y proteínas), (c) retención de agua (polisacáridos hidrófilos y proteínas), (d) adsorción de compuestos orgánicos e iones inorgánicos (cargados y / o polisacáridos hidrofóbicos y proteínas), (e) actividad enzimática (proteínas) , (f) fuentes de nutrientes, (g) acumulación, retención y estabilización de enzimas mediante su interacción con polisacáridos, y (h) transferencia horizontal de genes entre células integrantes de la biopelícula . (Flemming y Wingender, 2010).

## 1.5.2. Naturaleza y funciones biológicas de los componentes de la ME.

### 1.5.2.1. Polisacáridos

En la mayoría de las biopelículas los polisacáridos son una fracción importante de las SPEs. Se conoce la ubicuidad de los mismos dentro de la ME, tanto en biopelículas formadas en ambientes naturales como en las asociadas a infecciones crónicas humanas, así como en biopelículas de cultivo puro en el laboratorio. La mayoría de estos polisacáridos son moléculas largas, lineales o ramificadas, con una masa molecular de  $0.5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  Daltons. Aunque algunos de ellos son homopolisacáridos, la mayoría son heteropolisacáridos, consisten en una mezcla de residuos tanto de azúcares neutros como cargados, que contiene sustituyentes orgánicos y/o inorgánicos que afectan de un modo importante a sus propiedades tanto físicas como biológicas. Por ejemplo, entre los homopolisacáridos, la celulosa es un componente crítico en la ME de las biopelículas de *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* y *Escherichia coli* en los que aporta resistencia a los antimicrobianos. (Zogaj *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2013).

Muchos heteropolisacáridos detectados en SPE son polianiónicos (alginato, xantano) aunque también existen especies policatiónicas, como una adhesina intercelular (PIA) descubierta por primera vez en patógenos bacterianos nosocomiales pertenecientes al género *Staphylococcus* (Jefferson, 2009). Además de la función adhesiva en la matriz de biopelícula, la PIA también tiene una función protectora, ya que la pérdida superficial de la misma aumenta la destrucción de las bacterias por parte de las células inmunitarias del hospedador. En *Pseudomonas aeruginosa*, el cual es uno de los modelos mejor estudiados para la formación de biopelículas, se sabe que al menos tres heteropolisacáridos distintos, alginato, un polisacárido rico en glucosa (PEL) y un polisacárido compuesto por bloques repetitivos de pentasacáridos que contienen D-manosa, D-glucosa y L-ramnosa (PSL) contribuyen al desarrollo y la arquitectura de la biopelícula. El alginato se encuentra involucrado en el establecimiento de microcolonias al comienzo de la formación de la biopelícula, pero también se sabe que es responsable de la estabilidad mecánica de la biopelícula madura, mientras que el PEL es esencial para la formación de biopelículas en las interfases aire-líquido y en las a unidas a una

---

superficie, el PSL participa en la adherencia a superficies abióticas y bióticas y en el mantenimiento de la arquitectura de las mismas (Ryder *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009).

Aunque los estudios más amplios de biopelículas se han realizado en bacterias, se sabe que los polisacáridos también son un componente importante de la matriz de las biopelículas de *C. albicans* actuando frente algunos agentes antimicrobianos y, por lo tanto, contribuyendo a la resistencia intrínseca de la biopelícula (Flemming y Wingender, 2010; Nobile y Mitchell, 2007). Constituyen el 25% de su peso seco (Zarnowki *et al* 2014). Los exopolisacáridos principales son similares a los componentes polisacáridos principales de la pared celular de *C. albicans*, aunque sus proporciones relativas y estructura en el material exopolimérico de la biopelícula son diferentes. Los polisacáridos más abundantes en la matriz de la biopelícula de *C. albicans* (que constituyen aproximadamente el 87%) son mananos, más específicamente,  $\alpha$ -1,2 ramificados y  $\alpha$ -1,6 mananos. Estos polisacáridos se encuentran asociados con glucanos  $\beta$ -1,6 lineales (en oposición a los altamente ramificados encontrados en la pared celular), que constituyen aproximadamente el 13% de todos los carbohidratos en un complejo de manan-glucano, indicando una interacción fisicoquímica entre glucano y residuos de manano. Además, cada componente tiene características estructurales diferentes a los de la pared del hongo; por ejemplo, el manano encontrado en la matriz de la biopelícula existe como una estructura mucho más grande (hasta 12.000 residuos de manosa) en comparación con el manano de la pared celular (aproximadamente 150 residuos) (Chaffin *et al.*, 1998; Zarnowki *et al.*, 2014). Contrariamente a lo que se pensaba anteriormente, el  $\beta$ -1,3 glucano, que representa el polisacárido principal de la pared celular y que desempeña un papel importante en la resistencia de la biopelícula a los fármacos (Nett *et al.*, 2007; 2010 a; 2010 b; Talf *et al.*, 2012), solo representa una pequeña parte del total de carbohidratos de la matriz de la biopelícula (Zarnowki *et al* 2014).

### **I.5.2.2. Proteínas**

La ME de la biopelícula puede contener cantidades importantes de proteínas que, en general, pueden superar con creces el contenido de polisacáridos. Tanto las

proteínas unidas a la superficie celular como las secretadas contribuyen a la composición de la misma y, dependiendo de su función biológica se pueden distinguir diferentes categorías proteicas. En la biopelícula han sido detectados distintos enzimas extracelulares (proteasas, quitinasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -glucuronidasa, lipasas, esterasas y fosfatasas, entre otros), muchos de los cuales están implicados en la degradación de polímeros hidrosolubles (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos) y compuestos insolubles en agua (como celulosa, quitina y lípidos), así como partículas orgánicas que están atrapadas en la biopelícula (Wingender y Jaeger, 2002). Las enzimas extracelulares se retienen eficientemente en la ME de la biopelícula por su interacción con los polisacáridos. Algunas enzimas que degradan SPE pueden producir moléculas pequeñas capaces de ser utilizadas como fuente de carbono y energía por las células, otros enzimas pueden estar involucrados en la degradación de SPE estructurales para promover el desprendimiento de las células de las biopelículas y otras pueden actuar como factores de virulencia durante procesos infecciosos asociados a la formación de las biopelículas (Flemming y Wingender, 2010)

Las proteínas representan aproximadamente el 55% del peso seco de la ME de las biopelículas de *C. albicans* (Zarnowki *et al.*, 2014). Mediante la utilización de técnicas de proteómica se observó que existía una gran similitud entre las proteínas de la ME y los componentes proteicos presentes en los sobrenadantes de cultivos planctónicos (Thomas *et al.*, 2006). Estos resultados indicarían que los materiales secretados durante el crecimiento "artificial" en el laboratorio en condiciones planctónicas terminarán formando parte de la matriz durante el crecimiento como biopelícula, que es el modo de crecimiento más probable durante la infección. Las proteínas que se encuentran en la ME incluyen algunas predichas para formar parte del secretoma (principalmente glicoproteínas), pero también proteínas sin péptido señal, con predominio de enzimas glucolíticas y proteínas de choque térmico (Thomas *et al.*, 2006; Chaffin *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2016; Nombela *et al.*, 2006, Zarnowski *et al.*, 2014). En el estudio realizado por Zarnowski *et al.*, en el 2014, utilizando técnicas de proteómica, se identificaron 565 proteínas diferentes en la ME de la biopelícula incluyendo como hemos comentado anteriormente proteínas predichas para ser secretadas, pero también muchas sin péptido señal. Esto sugiere una vía de secreción no clásica y/o la

acumulación de proteínas después de la muerte celular. Un análisis funcional indicó que se representaron un total de 16 vías metabólicas diferentes, con una preponderancia de enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, y también algunas enzimas potencialmente implicadas en la degradación de la matriz para promover la dispersión de la biopelícula (Zarnowki *et al.*, 2014; Uppluri *et al.*, 2010).

Por todo lo indicado anteriormente, parece obvio que la identificación de componentes proteicos propios de la matriz de biopelícula es un objetivo complicado. Los análisis transcripcionales en *C. albicans* demostraron hace tiempo que existen diferencias en el transcriptoma entre las hifas y las células de levadura y entre los organismos planctónicos y las biopelículas (García-Sánchez *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2005; Yeater *et al.*, 2007). Esto implica cambios cuantitativos en la abundancia de proteínas. En este contexto, se han publicado enfoques globales para la proteómica de la abundancia de proteínas de superficie subcelular en distintas etapas del desarrollo de biopelículas, comparando las biopelículas con un solo cultivo planctónico (Mukherjee *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2006). En un análisis proteómico realizado por Martínez-Gomáriz *et al.* (2009) a fin de evaluar y comparar posibles cambios globales en la abundancia de proteínas en células de levadura, hifas y biopelículas (en donde se pueden encontrar tanto levaduras como hifas), cuantificaron diferencias e identificaron proteínas que se encuentran diferencialmente en la superficie de las tres poblaciones. El análisis tanto del citoplasma como del subproteoma de la superficie celular reveló patrones de abundancia de proteínas únicos para cada condición de crecimiento, ya sean sésiles o planctónicos (Martínez-Gomáriz *et al.*, 2009). En consecuencia, al menos en *C. albicans*, todavía no se ha identificado una composición polipeptídica cualitativa específica de la ME, aunque los hallazgos experimentales indican que las diferencias entre los perfiles de polipéptidos unidos a biopelículas (SPE y células sésiles) o a células planctónicas son de tipo cuantitativa y no cualitativa. Aunque posiblemente tales diferencias pueden ser lo suficientemente significativas para determinar muchas, si no todas, de las características estructurales y funcionales de las biopelículas.

### **I.5.2.3. ADN extracelular (ADNe)**

Aunque inicialmente el ADNe se consideró como material residual de células lisadas, es cada vez más evidente que no es solo una parte integrante de la ME, sino que además también es responsable de algunas características intrínsecas del modo de vida de la biopelícula (Flemming y Wingender, 2010; Martins *et al.*, 2010). En el *C. albicans* su proporción en la matriz es de aproximadamente de un 5%. (Zarnowki *et al.*, 2010).

El ADNe en las biopelículas de *P. aeruginosa* funciona como un conector intercelular y por ejemplo en las de *Bacillus cereus* el ADNe es utilizado como adhesina (Vilain *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2007). En general, en muchas especies microbianas, se cree que el ADNe juega un importante papel en la estabilización de la matriz manteniendo unidas las biopelículas. Sin embargo, Berne *et al.* (2010) indicaron que en las biopelículas de *Caulobacter crescentus* promueve la dispersión celular al inhibir la incorporación de nuevas células en la biopelícula

El origen del ADNe presente en las biopelículas parece diferir entre las especies. Los mecanismos propuestos implicados en la liberación de ADNe en la matriz incluyen lisis celular, detección de quórum y excreción de vesículas que contienen ADN (Martins *et al.*, 2010). El ADN presente en la ME de la biopelícula de *C. albicans* está compuesto en gran parte por secuencias aleatorias no codificantes (Zarnowki *et al.*, 2014). En cualquier caso, las células lisadas no parecen ser la única fuente de ADNe, y no se puede excluir la excreción activa del mismo (Flemming y Wingender, 2010). El ADN extracelular también tiene actividad antimicrobiana, causando lisis celular por cationes quelantes que estabilizan el lipopolisacárido y la membrana externa bacteriana (Mulcahy *et al.*, 2008).

### **I.5.2.4. Agua**

Desde un punto de vista cuantitativo, el componente principal de las biopelículas es el agua, que puede representar hasta más del 90% del peso húmedo de la biopelícula. Por lo tanto, las biopelículas se consideran hidrogeles. La ME proporciona un entorno altamente hidratado que se seca más lentamente que su entorno y, por lo tanto, protege

---

las células de la biopelícula contra las fluctuaciones en la disponibilidad de agua. La mayoría de los componentes de la misma son higroscópicos (polisacáridos, proteínas y ADN son moléculas hidrofílicas capaces de retener agua en ausencia de mecanismos específicos de unión a la misma (Flemming y Wingender, 2010).

#### 1.5.2.5. Lípidos

Aproximadamente el 15% del peso seco de la ME de *C. albicans* lo constituyen los lípidos (Zarnowki *et al.*, 2014). El perfil de los lípidos asociado a la ME incluye predominantemente glicerolípidos (99.5%), con una proporción mucho menor de esfingolípidos (0.5%). La matriz está enriquecida en glicerolípidos neutros (89.2%), mientras que los glicerolípidos polares son menos abundantes (10.4%). Diferentes ácidos grasos también se encuentran presentes como los ácidos oleico y linoleico en los glicerolípidos neutros. Los ácidos palmitoleico, palmítico, esteárico y mirístico están presentes en cantidades más pequeñas. La fosfatidiletanolamina es la clase más abundante de glicerolípidos polares. El ergosterol, el esteroles principal en las membranas de las células fúngicas, parece ser el único esteroles detectado en la matriz de la biopelícula (Zarnowki *et al.*, 2014).

#### 1.5.3. Desarrollo de las biopelículas de *C. albicans*

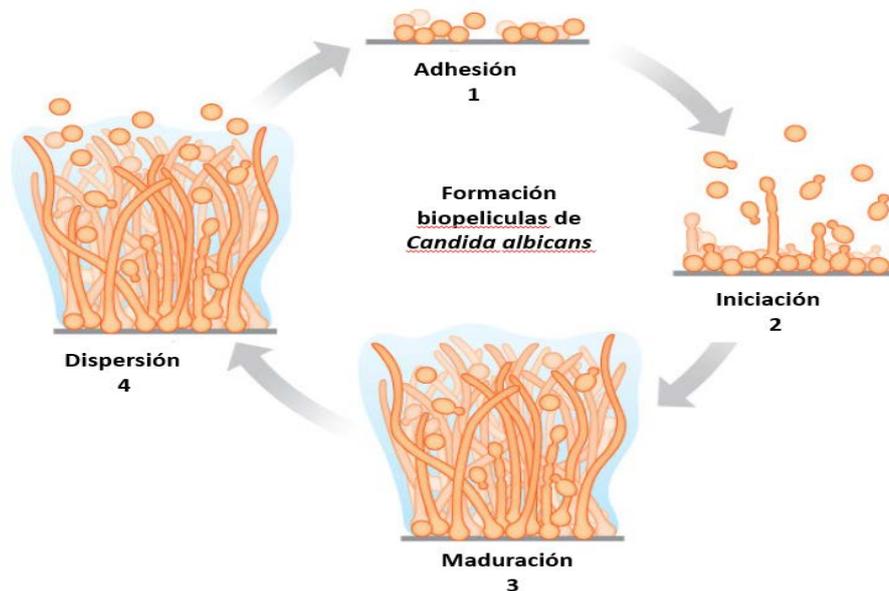
Aunque las biopelículas bacterianas y su papel en la enfermedad han sido investigado con detalle desde hace años, el estudio de las biopelículas de hongos médicamente relevantes ha llegado a la vanguardia en los últimos 15 años.

Las especies del género *Candida*, y en particular *C. albicans*, forman fácilmente biopelículas que de forma similar a las biopelículas bacterianas, son asociaciones de células que forman una comunidad organizada con una compleja arquitectura tridimensional envuelta por la ME y unida a un sustrato sólido (Chandra *et al.*, 2001; Douglas, 2003; Douglas, 2002; Fox y Novile, 2012; Kumamoto, 2002; Ramage *et al.*, 2006; Ramage *et al.*, 2009; Verstrepen y Klis, 2006). La mayoría de las manifestaciones clínicas de la candidiasis tanto a nivel sistémico como en las mucosas se asocian de una

manera u otra con la formación de biopelículas sobre material inerte o biológico. Además, las biopelículas de *Candida* han ganado notoriedad por su capacidad para resistir los agentes antifúngicos más comúnmente utilizados. (d'Enfert, 2006; Kojic y Darouiche, 2004; Pfaller y Dickema, 2007; Ramage *et al.*, 2006).

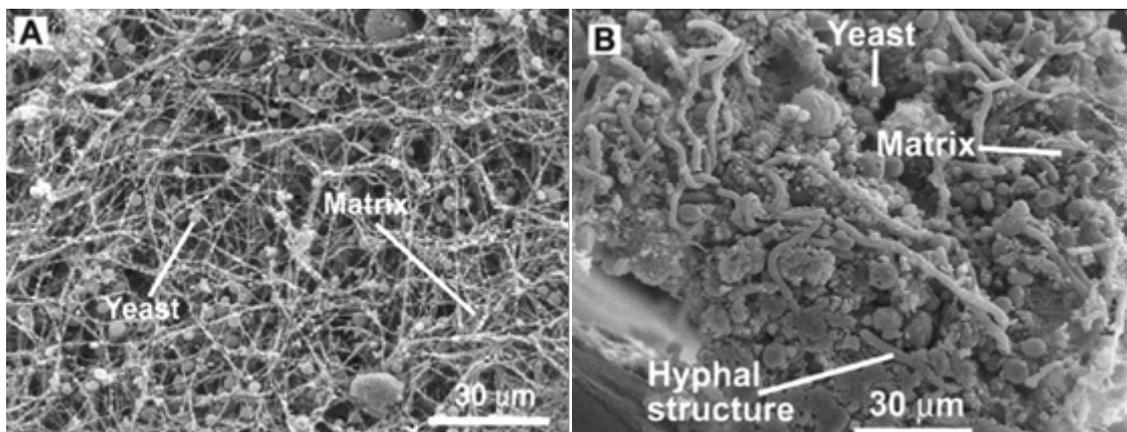
Se ha demostrado que la formación de biopelículas de *C. albicans* tiene lugar en cuatro fases de desarrollo distintas (Baillie *et al.*, 1999; Chandra *et al.*, 2001; Douglas, 2003; Hawser y Douglas, 1994; Nobile y Mitchell, 2006; Uppuluri *et al.*, 2010):

**1.-** adherencia a una superficie (células de levadura esféricas), **2.-** proliferación para formar una capa basal de anclaje de células, **3.-** crecimiento de pseudohifas (células elipsoidales unidas de extremo a extremo) e hifas (cadenas de células cilíndricas) concomitantes con la producción de material de matriz extracelular, y **4.-** dispersión lenta de células en forma de levadura de la biopelícula para iniciar en nuevas ubicaciones. En el laboratorio, las biopelículas de *C. albicans* pueden desarrollarse sobre distintos sustratos y en muchos tipos de medios, lo que indica una robustez inherente del desarrollo de la biopelícula a los cambios en las condiciones externas. (Figura I.11.).



**Figura I. 11.** Fases en la formación de biopelículas de *Candida albicans*. **1.** Adhesión de las células de levadura a la superficie. **2.** Inicio de la proliferación celular, formación de la capa basal de células unidas. **3.** Maduración, crecimiento de hifas y producción del material extracelular. **4.** Dispersión de células de levadura de la biopelícula a la búsqueda de otras superficies (Novile y Johson, 2015).

La estructura detallada de una biopelícula madura de *C. albicans* producida “in vitro” después de una incubación de 48 horas, consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas, atrapadas en una ME densa formada por SPE (Figura. I.12.). Esta simultaneidad de levaduras, hifas y material de matriz no se observa cuando se realiza el cultivo en medio líquido o sobre agar, lo que sugiere que la morfogénesis se desencadena cuando un organismo entra en contacto con una superficie y que la capa de células basales tiene un papel importante en el anclaje de la biopelícula a la superficie. “In vivo” se encuentran a menudo en las biopelículas bacterias junto a *Candida*, lo que indica que probablemente se produzcan interacciones entre especies (Chandra *et al.*, 2001; Douglas, 2003; Andes *et al.*, 2004; Ramage *et al.*, 2001, 2006). La complejidad estructural de la biopelícula puede crear un gradiente de condiciones ambientales en el cual las células de *C. albicans* entran a estados fisiológicos distintos. Uno de estos estados puede ser equivalente al de las células de levadura planctónicas de fase estacionaria, y, en particular, las células de levadura fundadoras en la superficie del substrato pueden dejar de crecer.

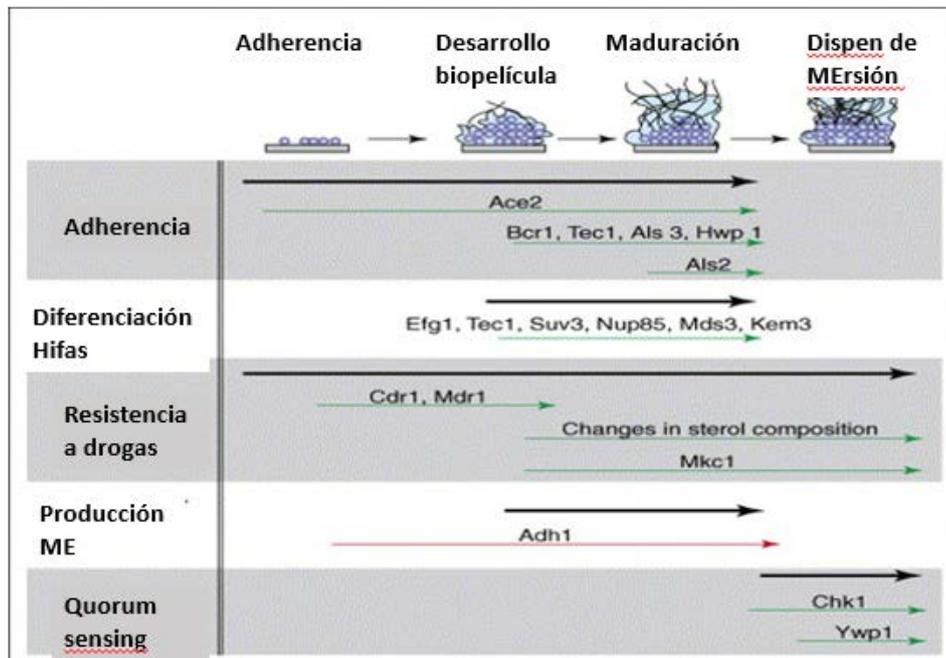


**Figura. 12.** Aspecto morfológico de una biopelícula madura de *C. albicans* observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El crecimiento de las células de levadura parece estar reprimido, el crecimiento de las hifas es elevado y la matriz extracelular envuelve la biopelícula (de Andes *et al.*, 2004).

Como se ha comentado, las especies del género *Candida* y de un modo especial *C. albicans*, son la cuarta causa más frecuente de infecciones del torrente sanguíneo en

entornos clínicos y son las especies fúngicas predominantes aisladas en infecciones de dispositivos médicos (Dominic *et al.*, 2007; Pfaller y Diekema, 2007; Wisplinghoff *et al.*, 2004). Los catéteres venosos urinarios y centrales, los marcapasos, las válvulas mecánicas del corazón, las prótesis articulares, las lentes de contacto y las dentaduras postizas son todos susceptibles a las biopelículas de *C. albicans* (Cauda, 2009; Donlan y Costerton, 2002; Kojic y Darouiche, 2004; Seddiki *et al.*, 2013). Una vez que se forma en un dispositivo médico implantado, una biopelícula de *Candida* tiene el potencial de producir infecciones sanguíneas diseminadas y de provocar infecciones sistémicas invasivas de tejidos y órganos. (Kojic y Darouiche, 2004; NNIS, 2001). La infección por biopelículas ocurre en más del 50% de estos catéteres. Responsables anualmente de aproximadamente 100,000 muertes y \$ 6.5 billones en exceso de gastos solo en los Estados Unidos, estas infecciones tienen por lo tanto serias consecuencias económicas y para la salud. Debido a que las biopelículas fúngicas son en gran medida resistentes a los fármacos antimicóticos actuales, generalmente se requieren altas dosis de antifúngicos junto con la extracción del dispositivo médico colonizado (Andes *et al.*, 2012; Cornely *et al.*, 2012; Lepak y Andes, 2011). La extracción de algunos dispositivos (por ejemplo, válvulas cardíacas y articulaciones artificiales) es costosa y, en algunos casos, peligrosa, y la administración de altas dosis de agentes antifúngicos (típicamente administrados intravascularmente) puede causar complicaciones, que incluyen daño renal y hepático. A menudo, estos tratamientos no son posibles, ya que muchos pacientes se encuentran en estado crítico y serían incapaces de tolerarlos.

Es sumamente importante idear nuevas estrategias para tratar las infecciones asociadas a las biopelículas de *Candida*, siendo un requisito esencial obtener una mejor comprensión de la biología de las mismas. En los últimos años, los estudios moleculares han comenzado a aportar datos sobre la transición al modo de crecimiento de la biopelícula, sin embargo, la comprensión actual de los mecanismos que controlan la formación de las mismas a nivel molecular todavía es limitada. Los procesos implicados en las diferentes etapas del desarrollo de la biopelícula son varios y todos ellos esenciales (interacción célula-sustrato y la adherencia célula-célula, desarrollo de hifas, resistencia a fármacos, detección de quórum y producción de matriz extracelular), dichos procesos ya fueron resumidos en 2006 por Blankenship y Mitchell. Figura. I. 13.

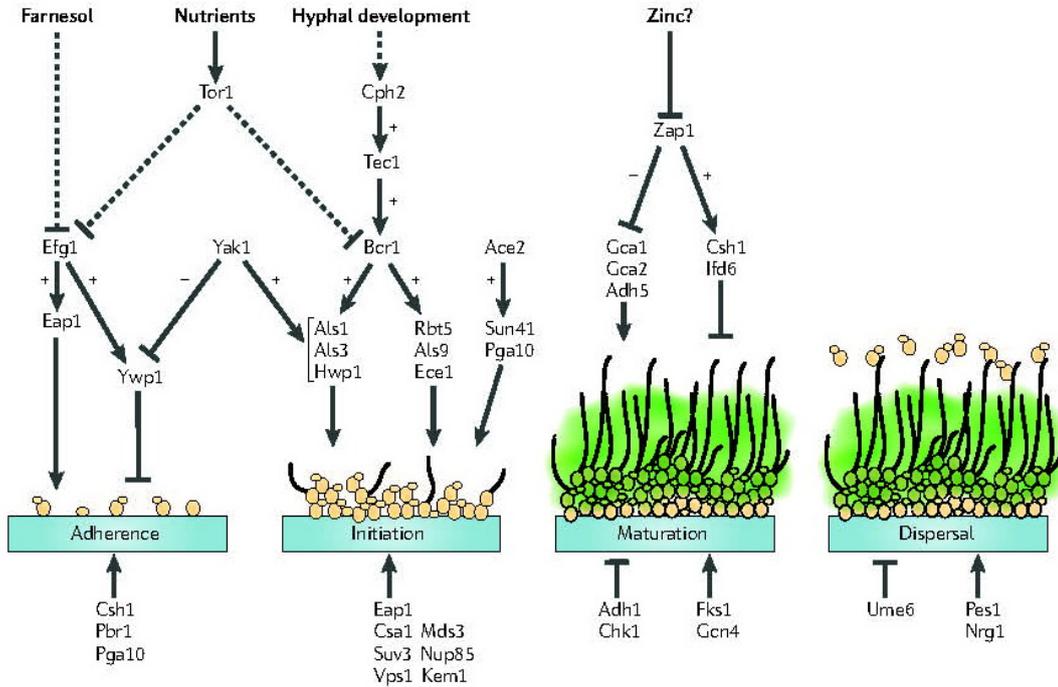


**Figura. I. 13.** Descripción del desarrollo de la biopelícula de *C. albicans*. En la parte superior de la figura se representa una línea de tiempo de formación y dispersión. Las categorías indicadas en el lateral representan procesos importantes o fenómenos biológicos en el desarrollo de la biopelícula; las líneas gruesas negras adyacentes representan la (s) fase (s) durante la cual son importantes para el ciclo de vida de la biopelícula. Las flechas de colores finos dentro de cada categoría representan la (s) fase (s) en las que las proteínas enumeradas o los eventos moleculares contribuyen al respectivo proceso o a los fenómenos biológicos. Las flechas verdes representan un papel positivo de los genes o eventos indicados; la flecha roja indica un papel negativo (de Blankenship y Mitchell, 2006).

### I.5.3.1. Interacción célula-sustrato y/o célula-célula

La adherencia de las células de *C. albicans* tanto a los sustratos sólidos como a otras células es un paso esencial y necesario para la formación de la biopelícula. El crecimiento se inicia cuando *C. albicans* se adhiere a una superficie y las uniones célula-célula permiten que las biopelículas se conviertan en biomásas diferenciadas en capas. En este contexto, las proteínas Als (para secuencias de tipo aglutinina) han sido consideradas durante mucho tiempo excelentes candidatas para la adhesión de las biopelículas. La expresión de varios genes *ALS* se encuentra regulada positivamente durante la formación de la biopelícula y se ha demostrado que algunas proteínas Als

específicas, por ejemplo, Als2p, parecen desempeñar un papel importante en la formación de la misma (Klotz *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005).



**Figura I.14.** Proteínas funcionales en el desarrollo de biopelículas en *C. albicans*. En la etapa de adherencia, las células en forma de levadura se adhieren al sustrato. En el paso de iniciación, las células se propagan para formar microcolonias y se forman tubos germinales para producir hifas. En la etapa de maduración, la biomasa de la biopelícula se expande, la matriz extracelular (verde) se acumula y la resistencia a los medicamentos aumenta. En la etapa de dispersión, las células en forma de levadura se liberan para colonizar el medio ambiente circundante. La mitad superior del diagrama representa varias relaciones de ruta conocidas. La mitad inferior incluye proteínas que funcionan en un paso específico, pero que podrían no estar conectadas a una vía conocida. Para simplificar, se han omitido algunas relaciones de ruta conocidas. Las proteínas se presentan más de una vez si tienen funciones en más de un paso del desarrollo de la biopelícula. Las barras discontinuas en forma de T indican represión mediante un mecanismo indirecto. Los símbolos más y menos indican que el gen o estimula (+) o inhibe (-) la expresión del objetivo. (de Finkel y Mitchell, 2011).

El análisis de los reguladores transcripcionales de las biopelículas resaltaron el papel de las proteínas Als y otras adhesinas en la formación de las mismas en *C. albicans*. Dos factores transcripcionales Bcr1p y Tec1p, fueron identificados en un screening de mutantes de factores de transcripción que presentaron defectos en las biopelículas (Nobile y Mitchell, 2005; Finkel y Mitchell, 2011). El defecto de biopelícula asociado con el mutante nulo *bcr1Δ* se debe a la inactivación de adhesinas de superficie celular, como Hwp1p (proteína de pared hifal) y Als3p, que pueden proporcionar las interacciones necesarias para soportar la integridad de la biopelícula, indicando un defecto funcional

y no estructural de elementos de las hifas producido por la cepa mutante. Por lo tanto, las adhesinas dependientes de Bcr1p parecen jugar un papel crítico en la formación y desarrollo de las biopelículas de *C. albicans* “*in vitro*” e “*in vivo*”. Nobile *et al.* (2006 a) demostraron que la vía Bcr1p funciona “*in vivo*” para promover la formación de biopelículas, y que la adherencia mediada por Als3p es una propiedad fundamental bajo el control de Bcr1p (Nobile *et al.*, 2006; Nobile y Mitchel, I 2005; Nobile *et al.*, 2006 b, 2008; Zhao *et al.*, 2006).

Otras adhesinas conocidas como Hwp1p también contribuyen a la formación de biopelículas, al igual que la proteína Ece1p (Nobile *et al.*, 2006 a). Hwp1p es una proteína de superficie celular de *C. albicans* bien caracterizada, expresada solo en hifas, que media la unión a las células epiteliales orales. Nobile *et al.* (2006 b) estudiaron el papel de Hwp1p en la formación de biopelículas de *C. albicans* utilizando diferentes modelos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” y encontraron que Hwp1p es crítico para la adhesión de la biopelícula. Este hallazgo fue de suma importancia ya que Hwp1p es la primera proteína de superficie celular que se sabe necesaria para la formación de biopelículas de *C. albicans* “*in vivo*” y, en consecuencia, se considera un importante objetivo potencial para nuevos fármacos antimicóticos específicos.

### **I.5.3.2. Desarrollo de hifas**

*C. albicans* se distingue de otras muchas especies de hongos por su capacidad para formar tanto células de levadura como hifas en distintas condiciones ambientales. Aunque se forman fácilmente en cultivos planctónicos, las hifas son un componente estructural importante de las biopelículas; por lo tanto, no es sorprendente que los genes requeridos para el crecimiento de hifas en cultivos en suspensión también sean necesarios para la formación adecuada de biopelículas. Estos incluyen los reguladores transcripcionales Efg1, Tec1, Ndt80 y Rob1 (Nobile *et al.*, 2012; Ramage *et al.*, 2002). Las hifas en las biopelículas contribuyen a la estabilidad arquitectónica general de la misma, actuando como soporte tanto para las células de levadura como para otras hifas. Por lo tanto, la capacidad de formar hifas y la capacidad de estas para adherirse unas a otras y a las células de levadura son fundamentales para el desarrollo y mantenimiento normal

de la biopelícula. De hecho, el regulador maestro Bcr1 no es necesario para la formación de hifas “*per se*”, pero es necesario la adherencia entre ellas en la biopelícula (Nobile y Mitchell, 2006).

De hecho, el mutante *bcr1Δ* forma hifas de apariencia normal en condiciones de crecimiento de vida libre pero funcionalmente anormales en el contexto de una biopelícula, lo que indica que las células de hifas están especializadas para presentar moléculas de adherencia que soportan la integridad de la misma y la necesidad de hifas en el crecimiento de la biopelícula se debe, al menos en parte, al papel de estas proteínas asociadas a las hifas, más que al papel mecánico simple de las hifas en sí mismas (Nobile y Mitchell, 2005). En este contexto, los análisis de microarrays indicaron que el defecto en la biopelículas asociado con el mutante nulo *bcr1Δ* se debe a la inactivación de las adhesinas de la superficie celular, como Hwp1p y Als3p, que pueden proporcionar las interacciones necesarias para soportar la integridad de la biopelícula.

### **I.5.3.3. Biopelículas y cambio fenotípico**

Jin *et al.* (2005) indicaron que el cambio fenotípico en las biopelículas de *Candida* es diferente del que ocurre en el crecimiento planctónico y afecta a múltiples propiedades biológicas de las células. Dicho cambio parece tener importancia en la diferenciación de la biopelícula al provocar la generación de células de levadura con un metabolismo de carbohidratos, filamentación, tasas de crecimiento y capacidad de colonización determinados. Sin embargo, la contribución del cambio fenotípico en la diferenciación de la biopelícula de *C. albicans* parece no ser clara debido a su baja tasa de ocurrencia (menos del 1%). En este contexto, Daniels *et al* (2006) indicaron una perspectiva muy interesante de los mecanismos implicados en la formación de biopelículas en *C. albicans* mientras estudiaban procesos de apareamiento entre células de fenotipos de cambio "blanco" y "opaco". Estos autores observaron que un número muy reducido, el 1%, de células "opacas" mezcladas con el 99% de células "blancas" duplicaron el grosor de la posterior biopelícula de células "blancas". Las células "opacas" también parecían causar un aumento en la formación de hifas en la región media de las biopelículas de células "blancas" mayoritarias. La estimulación se produjo solo cuando

---

las células minoritarias "opacas" se derivaron de las cepas de apareamiento  $a/a$  y  $\alpha/\alpha$ , lo que sugiere que era necesario que las células  $a/a$  "opacas" y  $\alpha/\alpha$  se estimularan mutuamente para liberar eficazmente niveles de feromonas. Dichos autores plantearon la hipótesis de que en la naturaleza aparecían células "opacas" raras en la superposición de poblaciones "blancas"  $a/a$  y  $\alpha/\alpha$ , y que las feromonas que liberaban estimulaban células "blancas" de tipo de apareamiento opuesto para formar una biopelícula que facilitaba el quimiotropismo mediante la protección de gradientes de feromonas solubles. Alby y Bennet (2011) confirmaron que las células "blancas" respondían a las feromonas mediante la expresión de genes de adhesión que promueven la formación de biopelículas.

#### **I.5.3.4. Dispersión**

La capacidad de ciertas células dentro de una biopelícula de *C. albicans* para dispersarse en el medio ambiente es quizás la fase de la que menos se conoce en el ciclo de vida de la biopelícula. Las células se dispersan continuamente durante la formación de la misma, y se cree que son principalmente (si no exclusivamente) en la forma de levadura (Uppuluri *et al.*, 2010). Aunque las células dispersadas se parecen morfológicamente a las células de levadura en crecimiento planctónico, presentan características distintas. Estas incluyen (en relación con las células planctónicas) el aumento de las propiedades de adherencia, la capacidad de formar biopelículas de manera más eficiente y presentan una mayor virulencia en los modelos de ratón infectados (Uppuluri *et al.*, 2010 a). Se han identificado dos reguladores transcripcionales de la dispersión de la biopelícula de *C. albicans*, Nrg1 y Ume6; la sobreexpresión transcripcional de cualquiera de estos los reguladores aumenta el número de células liberadas de la biopelícula (Uppuluri *et al.*, 2010 a y b). Nrg1 probablemente actúa a través de Set3, un complejo de modificación de la cromatina (Hnisz *et al.*, 2012; Nobile *et al.*, 2014). De hecho, las cepas mutantes de los miembros individuales del complejo Set3 formaron biopelículas extra fuertes que eran incapaces de una dispersión normal y especialmente resistentes a la alteración mecánica (Nobile *et al.*, 2014). Los dobles mutantes Nrg1 y Set3 son hiperfilamentosos, incapaces de crecer en forma de levadura (Hnisz *et al.*, 2012; Uppuluri *et al.*, 2010 b).

La chaperona molecular Hsp90 también se ha visto implicada en la dispersión de la biopelícula de *C. albicans*, ya que la reducción de Hsp90 reduce notablemente el número de células dispersas de una biopelícula (Robbins *et al.*, 2011). La pérdida de Hsp90 induce la filamentación al disminuir la represión mediada por Hsp90 de la ruta de señalización de cAMP-PKA (Shapiro *et al.*, 2009). La proteína de la pared celular Ywp1 también es importante para la dispersión de la biopelícula, ya que la eliminación de *YWP1* conduce a una menor dispersión de la biopelícula y a una mayor adhesividad de la misma (Granger *et al.*, 2005, 2012). Es posible que cualquier mutación que favorezca a las células filamentosas sobre las células en forma de levadura reduzca la dispersión de la biopelícula. Por lo tanto, se requieren ambos tipos de células para la formación de biopelículas completamente funcionales. (Nobile y Johnson, 2015).

### **I.5.3.5. Resistencia a antifúngicos**

La resistencia inherente de las biopelículas de *C. albicans* a los agentes antimicrobianos es una característica clave del modo de crecimiento de la biopelícula. Esta resistencia se debe a la regulación al alza de las bombas de flujo, la presencia de la ME y la presencia de células persistentes recalcitrantes. En *C. albicans*, principalmente son dos las clases de bombas de flujo que modulan la exportación de fármacos: la superfamilia del transportador de casetes de unión a ATP (incluidos *CDR1* y *CDR2*) y la principal clase de facilitadores (incluido *MDR1*) (Cowen, 2008, Ramage *et al.*, 2002). En las células planctónicas, estas bombas de flujo de salida se regulan positivamente en respuesta a los fármacos antifúngicos; en las biopelículas, sin embargo, se regulan positivamente en las primeras horas de contacto con la superficie y permanecen reguladas al alza durante el desarrollo de la biopelícula, esté o no presente un fármaco antifúngico (Mateus *et al.*, 2004; Nett *et al.*, 2009; Nobile *et al.*, 2012). Esta regulación aparentemente automática de las bombas contribuye claramente a la resistencia de las biopelículas al tratamiento con agentes antifúngicos.

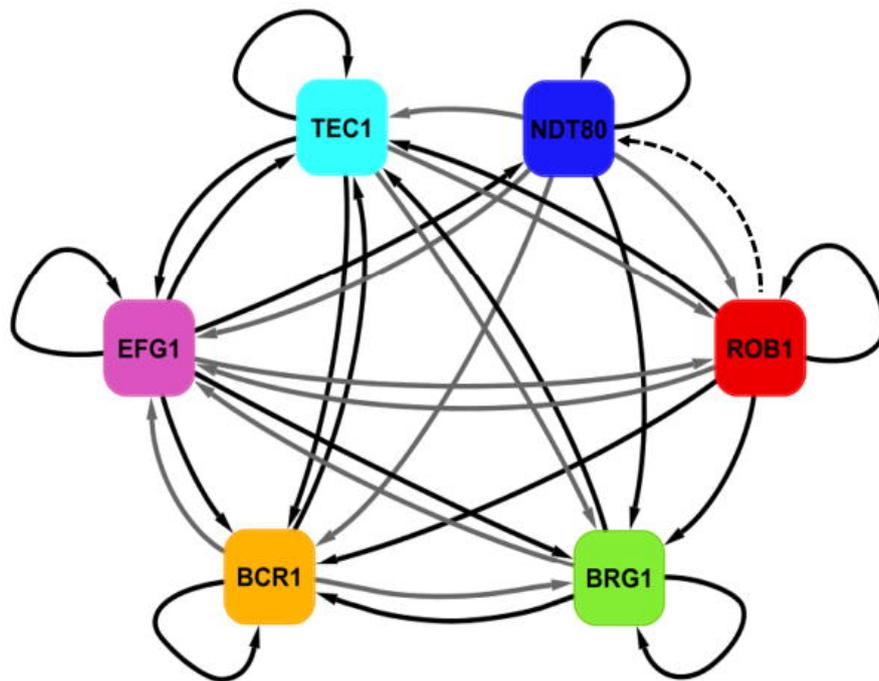
La ME también contribuye a la resistencia farmacológica de las biopelículas, actuando como una barrera física a la penetración del fármaco y contribuyendo directamente a la integridad estructural general de la biopelícula (Al-Fattani *et al.*, 2006;

Ballie y Douglas, 2000; Nett *et al.*, 2010 b; Nett *et al.*, 2007). El polisacárido  $\beta$ -1,3-glucano contribuye directamente a la resistencia a fármacos, por lo que el tratamiento de las biopelículas con  $\beta$ -1,3-glucanasa aumenta la susceptibilidad de las mismas a fluconazol (Nett *et al.*, 2007), y la adición de  $\beta$ -1,3-glucanos exógenos aumenta la tolerancia de las células planctónicas al fluconazol (Mitchel *et al.*, 2013). Los genes implicados en la producción y administración de  $\beta$ -1,3-glucanos incluyen el gen codificador de sintasa *FKS1* y los genes *BGL2*, *XOG1* y *PHR1*, que codifican proteínas implicadas en la modificación y transporte de  $\beta$ -glucanos (Nett *et al.*, 2010 a, Taff *et al.*, 20012). Finalmente, el ADN extracelular presente en la matriz en *C. albicans*, contribuye probablemente de un modo indirecto, a la resistencia a los fármacos (Martins *et al.*, 2010). Un estudio realizado por Martins *et al.*, 2012 indico que el tratamiento de biopelículas con DNAsa potenciaba la actividad de Caspofungina y Anfotericina B al alterar las biopelículas maduras de *C. albicans*.

#### **I.5.3.6. Regulación transcripcional**

En 2012, se describió una gran red de transcripción que controla el desarrollo de las biopelículas de *C. albicans* (Nobile *et al.*, 2012). Esta red consta de seis reguladores maestros de la transcripción (Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Brg1 y Rob1), cada uno de los cuales es necesario para el desarrollo de biopelículas en modelos de catéter de rata tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Nobile *et al.*, 2012). Cada regulador controla así mismo la expresión de otros reguladores maestros, lo que conlleva una red compleja y entrelazada. En conjunto, estos seis reguladores principales se unen directamente a los promotores y muy probablemente regulan la expresión de aproximadamente 1.000 genes diana, algunos de los cuales son reguladores transcripcionales adicionales. Los reguladores de la transcripción forman una red transcripcional elaborada e interconectada, cada regulador controla los otros cinco y la mayoría de los genes diana están controlados por más de un regulador. El circuito parece estar basado en gran parte, si no exclusivamente, en la regulación positiva. Teniendo en cuenta todos los genes diana de los seis reguladores, la red de biopelículas comprende aproximadamente el 15% de los genes en el genoma (Figura I. 15.). El estudio realizado tanto en condiciones planctónicas como en biopelículas indico que varios genes diana desempeñan funciones

en la formación de hifas, adhesión, resistencia a los fármacos y producción de ME (Fox y Nobile, 2012). Sin embargo, la mayoría de los genes diana identificados recientemente en la red de biopelículas aún no han sido estudiados y muchos no tienen similitud con otros genes caracterizados. El mapeo indica que el conjunto completo de genes diana está significativamente enriquecido para genes "jóvenes", lo que sugiere que la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas es relativamente recientemente con respecto a las escalas de tiempo evolutivas. Este hecho proporciona una explicación de por qué *C. albicans* y especies estrechamente relacionadas son algunas de las pocas especies de hongos capaces de formar biopelículas en un hospedador de mamífero. Con el esquema de la red de biopelículas (que sin dudas es incompleto), ahora es posible estudiar sistemáticamente el papel de los genes diana no reguladores en el desarrollo de biopelículas. (Fox y Nobile, 2012).



**Figura I. 15.** Modelo de red reguladora para la formación de biopelículas. Las flechas negras sólidas indican interacciones reguladoras. las flechas grises sólidas indican interacciones de unión directa solamente. La flecha negra discontinua indica una interacción reguladora indirecta solamente. (Nobile *et al.*, 2012).

## I.6. Objetivos y justificación del trabajo

La incidencia por infecciones fúngicas se ha visto incrementada de un modo notable en los últimos 20 años (Dadar *et al.*, 2018; Pappas *et al.*, 2009; Pfaller y Diekema, 2010), siendo *Candida albicans* la principal especie causante de micosis tanto sistémicas como superficiales en el ser humano (Pfaller y Diekema, 2010). En individuos sanos, *C. albicans* se comporta como un comensal inocuo que en determinadas ocasiones puede originar lesiones superficiales en la piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal y vagina. Sin embargo, en pacientes con patologías o condiciones que debiliten su sistema inmunitario, pacientes trasplantados o sometidos a tratamientos antibióticos intensivos o quimioterapia oncológica, *C. albicans* puede ocasionar infecciones sistémicas que ponen en peligro la vida del paciente (Pfaller y Diekema, 2010). La conversión de comensal en patógeno depende de la rotura del equilibrio existente entre el sistema inmunitario del hospedador y el hongo, es por lo que a *C. albicans* se le considera un patógeno oportunista.

Los Institutos Nacionales de la Salud en Estados Unidos estiman que el 80% de las infecciones en humanos son consecuencia de biopelículas formadas por patógenos (<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-99-084.html>). Las biopelículas son como sabemos, comunidades de microorganismos formadas sobre superficies bióticas o abióticas, que están recubiertas por una matriz extracelular (ME) formando una estructura tridimensional compleja. Clínicamente, las infecciones en las que se forman biopelículas suponen un problema importante dado que los microorganismos que las forman son más resistentes, no solo a los agentes antimicrobianos sino también a las defensas del hospedador (Harriot y Noverr, 2011). La mayoría de las candidiasis, tanto mucocutáneas como sistémicas, se consideran directamente relacionadas con la formación de biopelículas en materiales médico-quirúrgicos (prótesis, catéteres, válvulas cardíacas, lentes intraoculares, sondas urinarias...).

La primera estructura de *C. albicans* que interacciona con las células del hospedador y con el entorno es la pared celular, siendo esta estructura esencial en la formación de las biopelículas capaces de actuar como fuente de diseminación del hongo y por tanto de la patología que provoca. El conocimiento de la biología de la superficie celular, así como de ME de las biopelículas es de gran interés para el posible desarrollo

de vacunas contra *C. albicans*. La obtención de las mismas además de prevenir o mejorar las posibles candidemias diseminadas, supondría un importante ahorro económico en los costes directos ocasionados por estos pacientes, tales como los derivados de su ingreso hospitalario (presentan estancias hospitalarias prolongadas) y costes indirectos derivados de los posibles efectos adversos originados por algunos antifúngicos.

Nuestro grupo de investigación lleva trabajando durante años en el estudio de la pared celular de levaduras, en especial de *C. albicans*, y en la formación de biopelículas y componentes de la ME de las mismas. En la mayoría de las biopelículas, los microorganismos representan menos del 10% de su peso, mientras que prácticamente el 90% restante está constituido por la ME, de ahí su importancia tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo. Respecto al componente proteico de la ME de las biopelículas se tiene todavía poca información, conociéndose muy poco acerca de su papel en la patogenicidad y virulencia del hongo.

Dentro del conjunto de factores de virulencia descritos para *C. albicans*, la hidrofobicidad y la formación de las biopelículas son dos características consideradas de gran importancia. El estudio de estas dos propiedades en un número elevado de aislados clínicos podría aportar datos interesantes acerca de las infecciones sistémicas producidas por dicho hongo. Así mismo, el conocimiento de las especies proteicas presentes en la ME y su funcionalidad presentaría un interés potencial tanto biológico como farmacológico.

Actualmente la aplicación de las técnicas de proteómica al estudio de las proteínas que constituyen la ME puede aportar resultados interesantes debido a la sensibilidad de dicha técnica y poder conocer así mismo su implicación en distintos procesos celulares, así como su ubicación celular.

Un estudio proteómico comparativo de la ME de las biopelículas de distintos aislados clínicos podría permitir la posible identificación de proteínas con importancia en la formación y estabilidad de las mismas, así como en el desarrollo de una posible terapia inmunológica.

Además, en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Blanes, 2012), se obtuvo un mutante nulo para la *orf19.521* que codifica una proteína de 29 kDa cuya función biológica es entre otras ligar IgE humana. Dicha proteína está codificada por el gen *GLX3* contenido en *C3\_02610C*. En dicho estudio se observaron alteraciones funcionales del mutante posiblemente relacionadas con la estructura de la pared.

Como objetivos específicos en el presente trabajo se han propuesto los siguientes:

**1.-** Estudio de la hidrofobicidad de los 448 aislados clínicos de *C. albicans*, procedentes de candidiasis sistémicas.

**2.-** Análisis de la capacidad de adhesión de los aislados clínicos en estudio y su posible correlación con la hidrofobicidad

**3.-** Caracterización de los componentes proteicos presentes en los extractos de la matriz extracelular de biopelículas formadas por distintos aislados clínicos y por *C. albicans* SC5314. En el presente objetivo se pretende, mediante análisis proteómico, la identificación de proteínas específicas de la ME y/ o con posible interés en la misma.

**4.** Reintegración del gen *GLX3*. Estudio fenotípico de los mutantes homocigótico, heterocigótico y del reintegrante para dicho gen.



## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**



## II.1. Microorganismos utilizados

En el presente trabajo hemos utilizado como control la cepa SC 5314 de *Candida albicans*. Así mismo se han utilizado 448 aislados clínicos de *C. albicans* de pacientes con candidiasis sistémicas. Los aislados fueron testados, clasificados y obtenidos por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario la Fe de Valencia. La nomenclatura utilizada para los mismos en el presente trabajo fue el número de orden asignado por dicho servicio.

En el estudio del reintegrante de *GLX3*, se han utilizado las cepas que se indican en la tabla II.1.

**Tabla II.1.** Cepas de *C. albicans*

Cepa	Genotipo	Parental	Referencia
SC5314	<i>C3_02610C/C3_02610C</i>		Gillum <i>et al.</i> , 1984
<i>GLX3/glx3Δ</i>	<i>C3_02610C-1Δ::FRT/C3_02610C</i>	SC5314	Blanes, 2012
<i>glx3Δ/glx3Δ</i>	<i>C3_02610C-1Δ::FRT/C3_02610C-2Δ::FRT</i>	<i>GLX3/glx3Δ</i>	Blanes, 2012
<i>glx3Δ/glx3Δ</i> , <i>GLX3</i>	<i>C3_02610C-1Δ::FRT/C3_02610C-2Δ::FRT,RP10/rp10::pEAM5N</i>	<i>glx3Δ/glx3Δ</i>	Este trabajo

Las características de la cepa de *E. coli* empleada en este trabajo se detallan en la tabla II.2.

Tabla II .2. Cepa de *E. coli* empleada

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5 $\alpha$	<i>F, <math>\phi</math>80, lac4M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, (rk-, mk-), supE44, relA1, deoR, <math>\Delta</math> (lacZYA-argF) U169</i>	Hanahan, 1985

El plásmido empleado como herramienta de trabajo y el vector de clonación se encuentran detallados en la tabla II.3.

Tabla II.3. Plásmidos utilizados

Nombre	Descripción	Referencia
pECC120	Resistente a ampicilina. Incluye el gen <i>RP10</i> , y <i>SAT1</i> como marcador de resistencia. Posee numerosos sitios de clonación y carece de un origen de replicación para <i>C. albicans</i> .	D'Enfert, 2009
pEAM5N	pECC120 conteniendo la secuencia de la <i>orf19.251</i>	

## II.2. Medios y condiciones de cultivo

**Medio YPD** (*Yeast extract Peptone Dextrose*): es un medio rico que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras, incluyendo vitaminas y sales minerales. Su composición es:

- Extracto de levaduras.....1%
- Peptona.....2%
- Glucosa.....2%

**Medio YNB** (*Yeast Nitrogen Base*): es un medio mínimo, Su composición es:

- Yeast Nitrogen Base (YNB) sin aminoácidos
- y sin Sulfato amónico .....0.17 %
- Sulfato Amónico ..... 0.5%
- Glucosa .....2%

**Medio YPM** (*Yeast extract Peptone Maltose*):

- Extracto de levadura.....1%
- Peptona.....2%
- Maltosa .....2%

**Medio LB**

- Extracto de levaduras.....0.5%
- Triptona.....1%
- NaCl .....0.5%

Este medio se suplementó con ampicilina (100mg/ml) cuando se requirió.

**Medio RPMI-1640** (*Roswell Park Memorial Institute medium*) (Sigma®). Este medio es un medio de cultivo comercial que se encuentra formado por una mezcla enriquecida de aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular. Este medio se utilizó para la formación de biopelículas.

El medio RPMI-1640 es un polvo altamente higroscópico y debe ser protegido de la humedad. No recomendándose la preparación de concentraciones mayores a las especificadas debido a la posibilidad de formar precipitados.

El medio utilizado fue RPMI 1640 tamponado con 0.165 mol/ de MOPS.

10.4 g de medio en polvo RPMI (con glutamina y rojo de fenol y sin bicarbonato)

34,53 g de MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) tampón.

Para su realización se disolvió en primer lugar el RPMI en 900 ml de H<sub>2</sub>O posteriormente se añadió la cantidad correspondiente de MOPS, hasta la completa disolución de ambos. El pH del medio se ajustó a 7.0 a 25 °C mediante NaOH 1M y posteriormente se ajustó el volumen a 1 L. La esterilización del medio se realizó mediante filtración a través de filtros de un tamaño de poro de 0.22 µm. A continuación, se guardó a 4°C hasta su uso.

### II.3. Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de *C. albicans* se midió como se describe por Rosenberg *et al.*, 1983. Básicamente consiste en la adherencia de las levaduras a hidrocarburos, tales como ciclohexano o xileno. En nuestro caso el hidrocarburo utilizado fue el ciclohexano.

Las distintas cepas en estudio se cultivaron en 5 ml de medio YPD a 28 °C. Posteriormente se lavaron con PBS y se concentraron hasta obtener una  $DO_{600nm} = 1$ . Se añadieron 300  $\mu$ l de ciclohexano a 3 ml de la suspensión de células. La muestra se mezcló vigorosamente durante 1 min. con la ayuda de un vórtex y se dejó en reposo durante 20 min. a temperatura ambiente, a fin de que se separen la fase acuosa y la orgánica. Se midió la absorbancia a 600 nm de la fase acuosa ( $A_1$ ) y se comparó con la obtenida para las mismas células antes del procedimiento ( $A_0$ ), permitiendo estimar de la hidrofiliidad (hidrofiliidad=  $[DO_{600nm} \text{ inicial} / DO_{600nm} \text{ final}] \times 100$ ). Como los datos obtenidos corresponden a la hidrofiliidad de las células de *C. albicans*, y nuestro objetivo de estudio es la hidrofobicidad se calculó la diferencia sobre 100 de los resultados, con lo que obtuvimos los porcentajes de hidrofobicidad para cada cepa estudiada.

### II.4. Formación de biopelículas

La capacidad de formación de las biopelículas (estudios de adhesión) de las diferentes cepas y aislados clínicos de *C. albicans*, se evaluó utilizando el método descrito por Ramage *et al.* (2001) con ligeras modificaciones (Pérez *et al.*, 2006; Blanes 2012). Las células se crecieron durante la noche en medio YPD líquido a 28°C, se recogieron por centrifugación y se lavaron tres veces con PBS estéril. Se resuspendieron en tampón PBS, y a continuación se realizó un conteo de células mediante el contador BIO-RAD TC20™ Automated cell counter con una dilución 1:100 a fin de que la suspensión celular estuviese en el rango de detección del aparato. Seguidamente, se realizó una suspensión en medio RPMI a una concentración de  $10^6$  células/ml.

Para su estudio en placas de microtitulación de 96 pocillos, se depositaron 100  $\mu$ L de la suspensión celular estandarizada por pocillo, incubándose a continuación a 37°C durante 24 horas con agitación suave en ambiente húmedo. Pasado este tiempo se

eliminó el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con PBS, a fin de eliminar las células no adheridas. Todo ello realizado con sumo cuidado, a fin de no arrastrar la biopelícula formada.

Para los estudios en los que se necesitaron cantidades mayores de biopelícula (estudios de proteómica) se utilizaron frascos de cultivo de tejido celular de fondo plano de 500 ml ((Nalge Nunc International, Dinamarca). A estos frascos se les añadió un volumen de 75 ml de la suspensión de  $10^6$  células/ml en medio RPMI. Los frascos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con agitación suave (65-70 rpm) durante 48 horas. Para la obtención de las biopelículas se retiró el medio de cultivo por aspiración con sumo cuidado. Las biopelículas adheridas a la superficie del frasco se separaron mediante raspado añadiendo 50 ml de PBS estéril, dicho material se recogió por filtración sobre un filtro de  $0,2\ \mu\text{m}$  y se lavó con 50 ml de PBS. El material recogido sobre el filtro se dispuso para su análisis posterior. (Figura II.1).



**Figura II.1.** Recogida de la biopelícula de *C. albicans* formada en frascos de cultivo.

#### **II. 4.1. Cuantificación de las biopelículas mediante Tinción con Cristal Violeta**

La visualización de las biopelículas obtenidas en las placas de microtitulación, se llevó a cabo mediante tinción con cristal violeta siguiendo el método descrito por Pérez *et al.*, 2006; Blanes, 2012.

Una vez lavados los pocillos y eliminado el exceso de PBS, las placas se secaron durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . A continuación, se procedió a la fijación de las biopelículas formadas

adicionando 100  $\mu$ l de metanol absoluto durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado este intervalo de tiempo se eliminó el metanol y se dejó secar la placa durante 15 min a 37°C. Se añadieron 100  $\mu$ l de una solución de cristal violeta al 0,05% en cada uno de los pocillos y se incubó a 37°C durante 20 min. Posteriormente se eliminó la solución y se lavó tres veces con agua dejándose secar durante 15 min a 37°C. Las células de la biopelícula se resuspendieron en 200  $\mu$ l de ácido acético al 33% y se transfirieron a una nueva placa para su lectura. La lectura de las absorbancias fue realizada a 580 nm en un lector BIO-RAD iMark™ Microplate Reader.

#### **II. 4.2. Estudio de la viabilidad de las biopelículas mediante XTT**

La medida semicuantitativa de la viabilidad de las biopelículas se determinó utilizando el método descrito por Blanes (2012) mediante la reducción del reactivo XTT (2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil] -2tetrazolio-5-carboxanilida) con Menadiona. El XTT se preparó como una solución saturada a una concentración de 0,5 mg / ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m y se dividió en alícuotas que se mantuvieron almacenadas a -80 °C hasta su utilización (máximo 6 meses).

La Menadiona (2-metil-1,4naftoquinona) actúa como dador de electrones para acelerar y facilitar la reducción de la sal de tetrazolio (XTT) a formazán. La menadiona se preparó a una concentración de 10 mM en acetona.

Con anterioridad a cada ensayo y de manera extemporánea se preparó el reactivo XTT-Menadiona, para ello a una alícuota de 12 ml de XTT se le añadieron 1,2  $\mu$ l de menadiona 10 mM, obteniendo una concentración final de 1  $\mu$ M.

Una vez obtenidas las biopelículas en las placas de microtitulación y lavadas con tampón PBS, se les añadió 100  $\mu$ l por pocillo de la solución de XTT-Menadiona. Las placas se incubaron durante 2 h a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura del formazan formado en un lector BIO-RAD iMark™ Microplate Reader a 492 nm.

## II.5. Extracción con etanol de las biopelículas

La biomasa de las biopelículas maduras (48 h de incubación) obtenidas en los frascos de cultivo de tejidos según se indica en el apartado II.4 de este capítulo, se resuspendió en un volumen de etanol al 60% (v/v) equivalente a 2 ml por gramo de peso de biopelícula húmeda, dicha suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación (70 rpm). A continuación, se centrifugó a 4°C (4.000 x g, 10 min) para separar el material extraído de la biopelícula. El sobrenadante se concentró mediante liofilización, dicho material se resuspendió en el mínimo volumen posible de agua destilada, se dividió en alícuotas y se congeló (-85°C) para su posterior estudio.

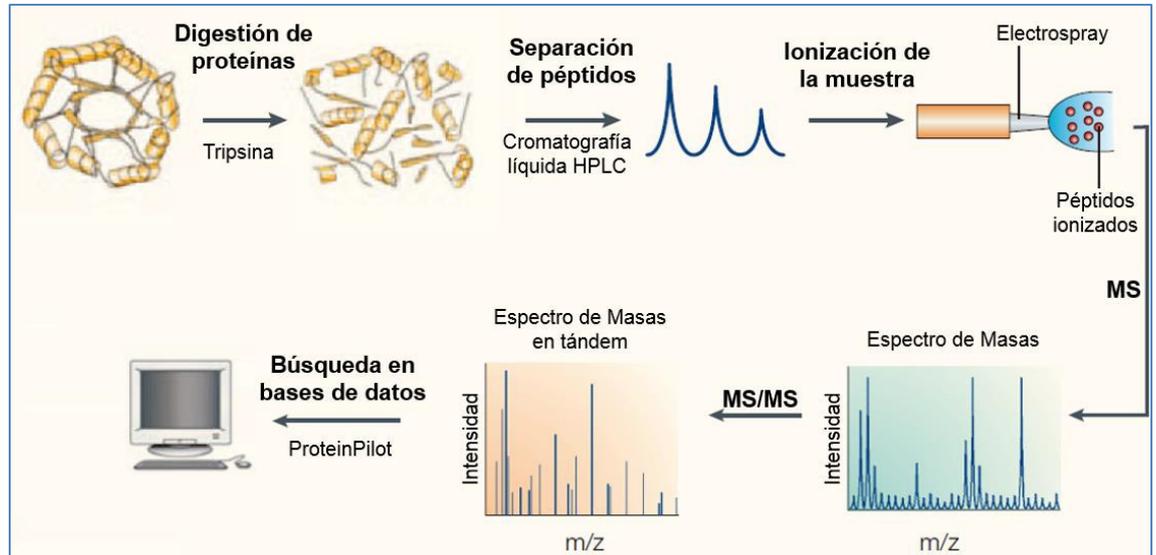
## II.6. Análisis proteómico de los extractos etanólicos de las biopelículas

El análisis proteómico de los extractos etanólicos obtenidos de las biopelículas de las distintas cepas en estudio, fue realizado por el Servicio de Proteómica de la Universitat de Valencia SCSIE, que forma parte de ProteoRed, PRB2-ISCI, con apoyo del programa PT13/0001.

Los extractos etanólicos de las biopelículas se sometieron a un proceso de digestión controlada, sin reducción ni alquilación, con tripsina modificada, de grado de secuenciación (Promega®), según el procedimiento descrito por Shevchenko *et al.* (1996). La tripsinización se llevó a cabo empleando 10 µg de tripsina en 500 µl de solución de bicarbonato de amonio, dejando reaccionar 30 min a 37°C. La digestión se detuvo precipitando con ácido tricloroacético (10 % de concentración final), y se dejó durante la noche a 5°C. Transcurrido este tiempo la muestra se centrifugó a 16500 x g a 5°C durante 1 h, retirándose el sobrenadante que contiene los péptidos tripticos y desecándola en un "speed-vac".

Las mezclas peptídicas obtenidas fueron procesadas mediante LC, MS/MS (cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en modo tándem) la cual permite el análisis e identificación de muestras complejas de proteínas (Figura II.2). Un volumen de 5 µl de muestra se cargó en una columna trampa (NanoLC, 3µ C18-CL, 350

$\mu\text{m} \times 0.5 \text{ mm}$ ; Eksigen). La eliminación del contenido salino se realizó con ácido trifluoroacético al 0.1%, con un flujo constante de  $3 \mu\text{l} / \text{min}$  durante 5 min.



**Figura II.2.** Etapas del análisis proteómico de los extractos etanolicos de las biopelículas. (Adaptado de Kuster *et al.*, 2005 por Pérez, 2017).

Los péptidos se cargaron en una columna analítica (LC, 3 C18-CL,  $75\mu\text{m} \times 12 \text{ cm}$ , Nikkyo) equilibrada con acetonitrilo al 5% y ácido fórmico 0.1%. La elución se realizó en gradiente lineal, variando desde el 5 al 35% de B en A durante 120 min (A: 0,1% ácido

fórmico; B: acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico), a una velocidad de flujo constante de  $300 \text{ nL/min}$ . Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSciex).

La muestra se ionizó aplicando 2.8 kV en un nebulizador de electrospray. La obtención de datos del primer espectrómetro de masas (MS1), fue de  $350\text{-}1250 \text{ m/z}$  durante 250 ms. La resolución del cuadruplo se ajustó para el segundo espectro de masas (MS2), de modo que la adquisición de datos fue de  $100\text{-}1500 \text{ m/z}$  durante 50 ms en el modo de "alta sensibilidad". Utilizando los parámetros de carga: 2+ a 5+, intensidad mínima, 70 cuentas por segundo (cps), se seleccionaron hasta 50 iones de fragmentación en cada exploración.

Los picos obtenidos en el espectro de masas, se utilizaron como parámetros de entrada en la búsqueda en bases de datos de proteínas “Expasy” (v. 01-2016) y de *C. albicans* ORFs, utilizando el programa “ProteinPilot” (v. 5.0, motor de búsqueda ABSciex, rev.2768), que emplea el algoritmo ParagonTM (Shilov *et al.*, 2007). El sistema realiza una agrupación de proteínas formando conjuntos entre las que comparten evidencias físicas. A diferencia del análisis de secuencias de alineación de proteínas, en que se compara la longitud total de la secuencia completa, la formación de grupos de proteínas es guiada únicamente por los péptidos que aparecen experimentalmente en los espectros de masas, por lo que se puede considerar que la agrupación de proteínas es realmente un proceso guiado por los espectros obtenidos. (Pérez, 2017).

Los *orf.* obtenidos por el servicio de proteómica fueron estudiados mediante *the Candida Genome* (<http://www.candidagenome.org>).

## **II.7. Obtención del reintegrante para el gen *GLX3***

### **II.7.1. Transformación en bacterias**

La transformación de células competentes de *E. coli* se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Hanahan (1985), según el cual se requiere un tratamiento previo en el que las células de *E. coli* de partida se hacen quimio-competentes para la incorporación de moléculas de ADN exógeno.

#### **II.7.1.1. Transformación en bacterias quimiocompetentes de *E. coli***

Para la transformación se utilizaron las células competentes DH5 $\alpha$ [F,  $\Phi$ 80, *lac4M15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*<sup>-</sup> 1, (*rk*<sup>-</sup>, *mk*<sup>-</sup>), 126 *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) *U169*]. Se tomaron 50  $\mu$ l de células DH5 $\alpha$  y se les añadieron 5  $\mu$ l de DNA plasmídico y se agitó suavemente. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las células fueron sometidas a un choque térmico para que internalizaran el DNA exógeno. Se llevaron durante 20 seg. a un baño de agua a 45°C e inmediatamente

después, se volvieron a colocar en hielo durante 2 min. A continuación, se añadieron a los tubos 950  $\mu$ l de medio LB precalentado y se incubaron a 37°C y 225 rpm durante 1h. De este modo, se favoreció que las células transformadas expresaran la resistencia a los antibióticos para su selección, en nuestro caso, la resistencia a ampicilina. Por último, se sembraron en placas precalentadas de LB Ampicilina. Se incubaron a 37°C durante 12h.

### II.7.1.2. Transformación de levaduras mediante electroporación

Para la transformación integrativa en *C. albicans* se utilizó el método de Reuss *et al.* (2004) modificado por Sanchez-fresneda *et al.* (2015).

A partir de un precultivo en medio YPD crecido durante 20h, se tomaron 16  $\mu$ l y se inocularon en 20 ml de medio YPD fresco, se llevó a incubar a 28°C hasta obtener una densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) de entre 1.6-2.2. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de agua estéril. Se añadió a la suspensión celular 1ml de tampón TE 10X (Tris-HCl 100mM, EDTA 10mM, pH 7,5) y 1 ml de acetato de litio 1 M. La suspensión se incubó durante 1 h a 30°C en agitación (150 rpm). Posteriormente, se adicionaron 250  $\mu$ l de ditioneitol 1M (DTT) previamente esterilizado por filtración incubándose durante 30 min. en idénticas condiciones. Posteriormente las células se recogieron y se lavaron tres veces con agua en frío. Se realizó un último lavado con 5 ml de sorbitol 1 M en frío. Seguidamente se recogieron las células electrocompetentes y se resuspendieron con 50  $\mu$ l de sorbitol frío 1M, manteniéndose las células en hielo. Se añadió el fragmento a integrar a 40  $\mu$ l de la suspensión de células (cortado con los enzimas de restricción pertinentes y purificado por electroforesis y elución en columna).

Finalmente, se llevó a cabo el proceso de electroporación en una cubeta de 0'2 cm de BioRad® a 1.8 kV. Se utilizó un electroporador modelo GenePulser de BioRad®. Tras la electroporación, las células se lavaron con 1 ml de sorbitol 1M y resuspendidas en 1 ml de YPD. Se incubaron durante 4h a 28°C con agitación suave, para que de este modo exprese la resistencia a nourseotricina.

A continuación, las células fueron sembradas en placas de YPD conteniendo 200 $\mu$ l /ml de nourseotricina e incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias (72h).

## II.7.2. Obtención y purificación de ADN

### II.7.2.1. Obtención del ADN plasmídico de *E. coli*

La obtención de ADN plasmídico de *E. coli* en pequeñas cantidades se realizó incubando la cepa de interés en 5 ml de medio LB, adicionado de 10 µl de ampicilina (marcador de resistencia que posee el vector) durante 12 h. se obtuvo el ADN mediante la utilización del kit comercial genejet<sup>tm</sup> plasmid miniprep kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La extracción de plásmidos a gran escala (a partir de 50 ml de cultivo) se realizó empleando el QIAGEN Plasmid midi-Kits (Qiagen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico eluido fue utilizado para las transformaciones.

### II.7.2.2. Obtención del DNA genómico de *C. albicans*

El ADN cromosómico de *C. albicans* se aisló mediante el método Nobile y Mitchell (2009) ligeramente modificado.

Se inocularon células del mutante homocigótico de *C. albicans* en 5 ml de medio YPD y se incubaron a 28°C en agitación a 150 rpm durante la noche. Se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en 500 µl de TENTS estéril (1% SDS, 2% Tritón X-100, 0,1 M NaCl en TE 1×). A continuación, se transfirió la suspensión a un nuevo tubo eppendorf estéril, que contenía 200 µl de perlas de vidrio de 0,45 mm de diámetro, y se añadieron 500 µl de fenol/cloroformo/isoamil alcohol en proporción 25:24:1 (V/V/V). Posteriormente, la suspensión fue sometida a 5 periodos de agitación, de 20 seg cada uno, en un homogeneizador FastPrep FP120 Cells disrupter (Thermo Electron®). Posteriormente se centrifugo a 12.000xg durante 10 min. La fase acuosa del sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf estéril y se añadió 1 ml de etanol al 100%, se homogeneizó y se mantuvo a -20°C durante 1 h. Se centrifugó a 12.000xg durante 15 min, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 µl de TE 1×. Se añadieron 5 µl de RNasa (1 mg/ml) y se dejó 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 40 µl de NH<sub>4</sub>OAc, 500 µl de etanol absoluto frío y se

mezcló por inversión para precipitar el ADN. La mezcla se mantuvo a -20°C durante 30 min. A continuación, se centrifugó a 12.000  $\times g$  durante 15 min y el *pellet* lavó con 1 ml de etanol frío al 70%. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se decantó para eliminar el sobrenadante. Para secar el *pellet*, se llevó a una bomba de vacío durante 15 min. Finalmente, se resuspendió en 50  $\mu$ l de TE y se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

### **II. 7. 3. Electroforesis en gel de agarosa**

Para la separación de los distintos fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas y PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en el tampón Tris-acetato 40 mM, pH 8,3; EDTA 1 mM (TAE) y se introdujo en una cubeta donde se sumergió en el mismo tampón, a la que se le aplicó una corriente constante entre 60 y 90 V.

La muestra se preparó previamente en proporción 1:6 con una solución de carga 6X *Loading Buffer*, con azul de bromofenol al 0,003% que actúa como marcador, xileno cianol FF al 0,03% y glicerol al 60% en tampón TAE, de modo que facilitamos la visualización del frente de electroforesis y se dota de mayor densidad a la muestra. Se hizo correr paralelamente un marcador de peso molecular conocido ADN del fago  $\lambda$ gt11 digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

Una vez realizada la electroforesis se procedió a la tinción del gel sumergiéndolo en una solución del fluoróforo RedSafe® (Nucleic Acid Staining Solution de Thermo Scientific®) a una dilución de 1:20.000 en TAE para visualizar las bandas de ADN en el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (360 nm).

### **II.7. 4. Purificación de fragmentos de ADN**

La purificación de los fragmentos de ADN se realizó tras la electroforesis y la identificación de los diferentes fragmentos visualizados con el equipo de luz UV. Una vez determinadas las bandas de interés, se procedió a recortarlas del gel, de forma rápida para que no sufrieran alteraciones por la luz UV. A continuación, siguiendo las

instrucciones del fabricante, se eluyeron las bandas utilizando el kit de extracción GenJet™ (Gel Extraction Kit).

### II.7.5. Cuantificación de ADN

Para el cálculo de la concentración y pureza de las muestras de ADN se empleó un espectrofotómetro GeneQuant II de General Electric Healthcare®. Dicho aparato mide las densidades ópticas a 260 nm y 280 nm simultáneamente, y realiza automáticamente el cálculo de la concentración, empleando la fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) = A_{260 \text{ nm}} \times \text{factor de conversión}$$

El factor de conversión depende del tipo de muestra, siendo 50 para ADN de doble cadena (40 para el ARN). Asimismo, el aparato estima la pureza de la muestra mediante el cálculo de la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Muestras puras de ADN presentan valores cercanos a 1,8.

### II.7.6. Tratamiento enzimático del ADN

#### II. 7. 6. 1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones se realizaron según las recomendaciones del fabricante (Fermentas®), utilizándose en cada caso el tampón suministrado por la casa comercial. En el caso de las dobles digestiones con dos enzimas de restricción como *Sall* y *KpnI*, se necesitaron dos concentraciones diferentes del tampón, por lo que las reacciones se realizaron de forma secuencial, añadiendo la concentración de tampón necesaria para cada enzima, en primer lugar, la que necesitaba menos concentración.

#### II. 7. 6. 2. Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por *Polymerase Chain Reaction*) utilizando oligonucleótidos específicos flanqueantes de la zona que se quería amplificar (Tabla II. 4).

Tabla II. 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5' →3' (nt)	Sitio de restricción
GLX3F-FUSB	<u>GGATCC</u> GATGGTCAAAGTTTTACTCGCTC	<i>KpnI</i>
GLX3R-FUSB	GTCGAC <u>ATTAC</u> ATTCAAAGCAGCAATTAC	<i>Sall</i>

Los sitios de restricción se muestran subrayados.

La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf®. A cada tubo eppendorf se añadieron 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* con su tampón correspondiente, proporcionado por el fabricante (Biotools®). Las concentraciones de los demás componentes fueron 2 mM para cada uno de los dNTPs, y los oligonucleótidos cebadores eran de 10 mM cada uno. Se utilizaron cantidades de ADN molde de entre 10 y 100 ng. El volumen final de reacción fue de 25 µl.

## II.. 7. 7. Reintegración del gen *GLX3*

Con el fin de recuperar la actividad *Glx3* en la cepa mutante nula *glx3Δ / glx3Δ*, se construyó el vector pEAM7B. Se usaron los cebadores GLX3PF (5'-GGTACCTGACCAATACTGCTCACTACTAG-3') y GLX3PR (GTCGACTGTGTGATGTGTGTGTTGAGTGG -3') que contiene sitios de restricción para *KpnI* y *Sall* respectivamente, en las posiciones de nucleótidos -935 a 1536 y un ADN polimerasa de alta fidelidad (KAPA HiFi ADN polimerasa, de KAPA Biosystems, Londres, UK). Se obtuvo un amplicón de 2471bp, se clonó en el vector pJET1.2 / BLunt (Fermentas, Ottawa, Canadá) y se verificó por secuenciación.

El plásmido pEAM7B se digirió con *KpnI* y *Sall* y se clonó en el plásmido ClpSAT2 (Moreno-Ruiz *et al.*, 2009) produciendo el plásmido pEAM5N (ClpSAT2 :: *GLX3*) un derivado del plásmido Clp10 (Murad *et al.*, 2000) donde el gen *URA3* fue sustituido por el marcador CaSAT1 que confiere resistencia a nourseotricina (Reuss *et al.*, 2004). El plásmido pEAM5N se linealizó con *BstBI* y se utilizó para la transformación del mutante nulo *glx3Δ / glx3Δ*.

La transformación de *C. albicans* y la selección de transformantes se realizó según el método descrito por Sánchez-Fresneda *et al.*, (2014). Los transformantes correctos fueron seleccionados por PCR usando el par de cebadores GLX3F-fusb (ATGGTCAAAGTTTTACTCGCTC) y GLX3R-fusb (ATTACATTCAAAGCAGCAATTAC) que producen un amplicón de 768 pb.

## **II. 8. Análisis fenotípico de los mutantes *glx3Δ*.**

### **II. 8. 1. Curva de crecimiento**

Para la realización de este ensayo, se partió de cultivos crecidos durante toda la noche de las diferentes cepas en estudio. Se tomó la cantidad de células necesarias para obtener una  $D.O._{600nm} = 0,3$  en 25 ml de YPD. Los cultivos se incubaron con agitación (150 rpm) a 28°C y a 37°C durante 24h, tomando alícuotas cada hora durante las primeras 12 horas y a las 24 horas para determinar la variación de D. O. a 600nm.

### **II. 8. 2. Inducción de la formación de tubo germinativo**

Los ensayos de formación del tubo germinativo se llevaron a cabo siguiendo básicamente el método descrito por Guirao-Abad *et al.*, (2013). Para lo cual, células en crecimiento exponencial se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua destilada. Estas células se resuspendieron a una  $D. O_{600 nm}$  de 0.3 en medio YPD precalentado a 37°C, conteniendo 10% (v/v) de suero humano esterilizado por filtración. Las muestras se tomaron a tiempo 0 y 2 horas y se tiñeron con Calcofluor Withe (CW) para ser observadas al microscopio con luz UV.

### **II. 8. 3. Sensibilidad a Calcofluor Withe, Rojo Congo y Dodecil Sulfato Sodico**

La sensibilidad a Calcofluor Withe (CW), Rojo Congo (RC) y Dodecil Sulfato Sodico (SDS), se realizó en placas que contenían diferentes concentraciones de estas sustancias siguiendo el método descrito por Van der Vaart *et al.* (1995). Los cultivos de las distintas cepas en estudio, crecidos en YPD durante toda la noche fueron recogidos por

centrifugación, y se ajustó la D.O. a 600nm a 1.0 y a continuación se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$ . Se depositaron gotas de 3  $\mu$ l de cada dilución en distintas placas de YPD sólido que contenían:

- Rojo Congo: 50 y 100  $\mu$ g/ml
- Calcoflúor White: 12 y 15  $\mu$ g/ml
- SDS: 0,015 y 0,025 %

Posteriormente se incubaron a 28°C y 37°C durante 48-72h a fin de monitorizar el efecto de dichos compuestos sobre el crecimiento

#### **II. 8. 4. Sensibilidad al estrés oxidativo**

La sensibilidad al estrés oxidativo se realizó de modo similar a lo descrito en el apartado anterior. El estudio se realizó por goteo de las distintas diluciones de cultivos crecidos durante toda la noche de las diferentes cepas en estudio. Las placas de YPD sólido contenían distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (11-12 mM). Dichas placas se incubaron a 28°C y 37°C monitorizando su crecimiento durante 48-72h.

#### **II. 8. 5. Sensibilidad a Zimoliasa**

La sensibilidad a la Zimoliasa se realizó siguiendo el método descrito por Laforet *et al.* (2011) con ligeras modificaciones.

Los cultivos de la cepa SC5314, los mutantes heterocigótico y homocigótico, así como el reintegrante en fase exponencial se centrifugaron y ajustaron a D.O.<sub>600nm</sub> = 0,5-0,6 (que corresponderían aproximadamente a  $4 \times 10^6$ /ml células) en tampón Tris- HCl 10 mM pH 7,5 conteniendo Zimoliasa 20T a una concentración de 100  $\mu$ g/ml. Los cambios de D.O.<sub>600nm</sub> fueron monitorizadas tomando muestras a distintos tiempos intermedios, durante un periodo de 120 min.

### **II. 8. 6. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de fármacos antimicóticos**

Los valores mínimos de concentración inhibitoria (CMI) de los fármacos antimicóticos clínicos (fluconazol, voriconazol, posaconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina, anfotericina B) se determinaron siguiendo las pautas del CLSI (2008).

Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se realizaron diluciones seriadas de los distintos antifúngicos en medio RPMI. cada pocillo fue inoculado con una suspensión de células procedentes de un cultivo de 24 horas en YPD líquido ajustando la D.O.600 final a 0.5. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28 °C. Las CMI se calcularon con respecto al control sin antifungicos.

### **II. 8. 7. Sensibilidad al antifúngico Anfotericina B**

Se realizaron, como en el apartado II.8.3 diluciones decimales seriadas de cultivos crecidos en YPD. Se sembraron 3 µl de cada una de ellas en placas de YPD solido que contenían 2 y 3 µg/ml de Anfotericina B. Las placas se incubaron a 28°C.

### **II .8. 8. Pruebas de virulencia en ratones**

Las pruebas de virulencia en ratones se llevaron a cabo en el laboratorio de la doctora Concepción Martínez-Esparza del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. Para ello se procedió como se indica a continuación.

Ratonas BALB /c inmunocompetentes, de entre seis y ocho semanas de vida y con un peso de aproximadamente 20 g, se inocularon por vía intravenosa con células de *C. albicans* procedentes de un cultivo en fase exponencial en caldo de Sabouraud a 28°C. Las células de levadura se recogieron, se lavaron dos veces con PBS estéril y se resuspendieron en PBS para obtener una suspensión  $5 \times 10^6$  CFU/ml.

Se utilizaron grupos de diez ratones para cada experimento, que fueron inyectados con 200 µl de la suspensión de células indicada a través de la vena lateral de la cola. La supervivencia se controló durante un período de 30 días, y los tiempos medios

de supervivencia (MST) se calcularon utilizando el método de Kaplan-Meier. Los valores de los diferentes grupos se compararon usando el test de log rank.

Todos los experimentos se realizaron respetando las directrices de ética del cuidado de los animales sometidos a experimentación

### **III. RESULTADOS**



---

Tanto la hidrofobicidad de las células de *C. albicans* como su capacidad de formar biopelículas, han sido considerados como dos importantes factores de virulencia en este hongo (Pierce *et al.*, 2017, Klis *et al.*, 2009; Rajendran *et al.*, 2016). Por ello, el presente trabajo se ha centrado en el estudio de estos dos factores en 448 aislados clínicos de *C. albicans*, procedentes todos ellos de pacientes con candidiasis sistémicas, testados, clasificados y obtenidos del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Fe de Valencia. La nomenclatura utilizada para ellos fue numérica, con un número de orden indicado en el anexo I. Así mismo se ha utilizado la cepa SC 5314 de *Candida albicans*, empleada clásicamente como cepa de referencia en numerosos estudios.

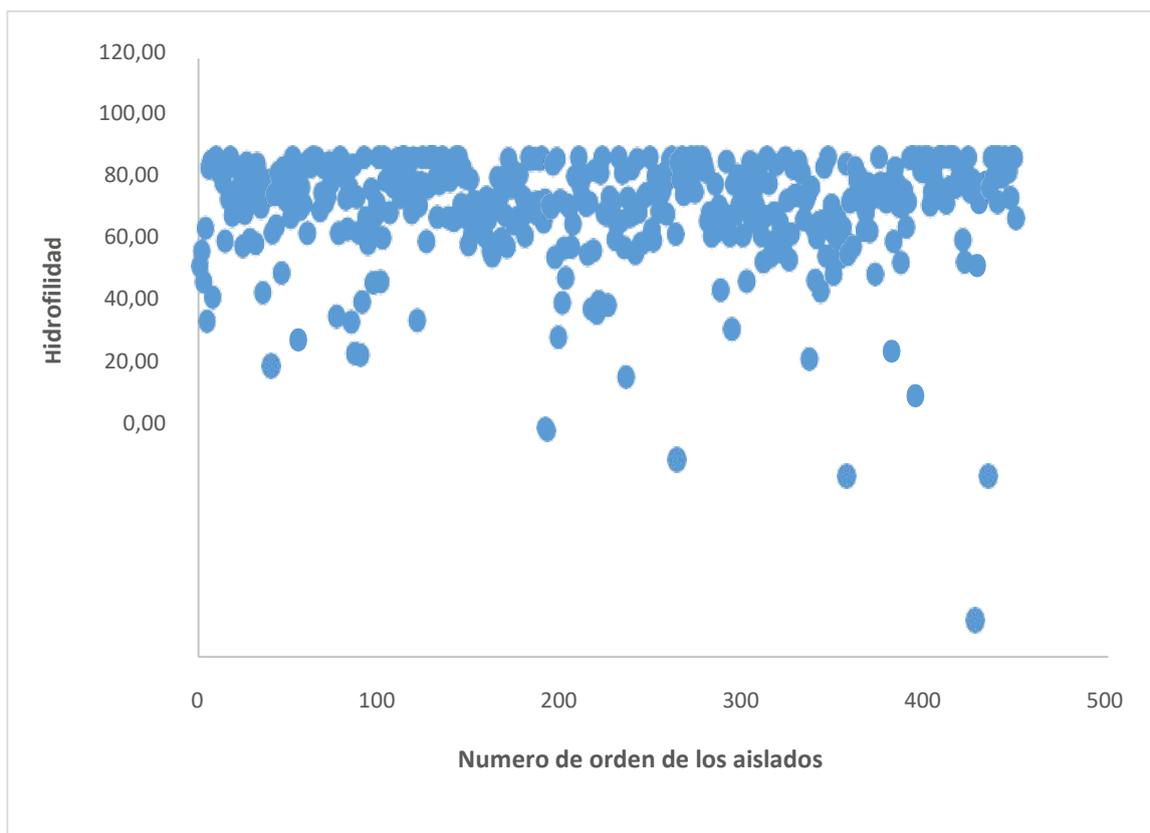
### III.1. Estudio de la hidrofobicidad

El primer estudio llevado a cabo fue el análisis de la hidrofobicidad de los distintos aislados clínicos. Para ello se procedió a la utilización del protocolo indicado en el apartado II.3. de Material y Métodos.

Mediante la fórmula utilizada del estudio de porcentaje  $\text{Abs } T_{20} \times 100 / \text{Abs } T_0$ , lo que realmente medimos es la hidrofilidad, ya que la absorbancia obtenida a  $T_{20}$  corresponde a las células que permanecen en la fase acuosa, siendo por tanto el dato de hidrofobicidad la diferencia entre 100 y el valor obtenido con la fórmula citada.

Los datos obtenidos para cada uno de los 448 aislados estudiados se encuentran indicados en el Anexo I de la presente memoria.

Como podemos observar en la Figura III.1, en la que se representa la distribución de los distintos aislados con respecto a su hidrofilidad, la gran mayoría se encuentran dentro de un rango muy semejante. Aproximadamente el 88% de los mismos se encuentran entre el 80% y el 100%, mientras que entre el 60% y el 80% solo encontramos un 9.5%, y siendo muy minoritarios, el 2.5% restantes, los poco hidrofílicos. Entre estos últimos solo un aislado presenta una hidrofobicidad cercana al 100%



**Figura III. 1.** Distribución de la hidrofobicidad/hidrofilidad de los distintos aislados clínicos.

La cepa SC5314, utilizada como control, presento una hidrofilidad del 80%. La gran mayoría de los aislados estudiados presentaron por lo tanto una hidrofilidad muy similar a dicha cepa.

### III.2. Estudio de la adhesión y formación de biopelículas

#### III.2.1. Capacidad de formación de biopelículas de los distintos aislados clínicos

En el siguiente estudio se planteó el análisis del comportamiento de los distintos aislados con respecto a la adherencia y/o formación de biopelículas. Al igual que otros microorganismos patógenos, *C. albicans* tiene la capacidad de adherirse y formar biopelículas en dispositivos médicos implantados.

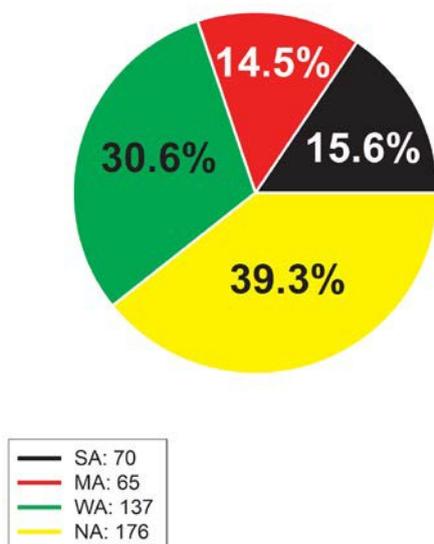
Para el estudio de adhesión se utilizó el método de cristal violeta indicado en apartado II.4. de Material y Métodos. El experimento se llevó a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada aislado se analizó en tres experimentos diferentes y por triplicado cada vez. Los datos utilizados fueron las medias de los tres experimentos.

Los resultados de adhesión obtenidos para cada uno de los aislados se encuentran indicados en la tabla del Anexo I. Las medias de las absorbancias de todos ellos se normalizaron con respecto a la cepa control SC 5314 ( $R = \text{Abs muestra} / \text{Abs control}$ ). De modo que al control se le dio el valor de 1,0.

Obtenidos los distintos valores se procedió a la clasificación de los aislados según los intervalos marcados del siguiente modo.

- Aislados muy formadores (SA):  $> 0,7$ .
- Aislados medianamente formadores (MA):  $0,5-0,7$ .
- Aislados poco formadores (WA):  $0,2-0,5$ .
- Aislados muy poco o nada formadores (NA):  $< 0,2$ .

En relación a este criterio obtuvimos los siguientes resultados:



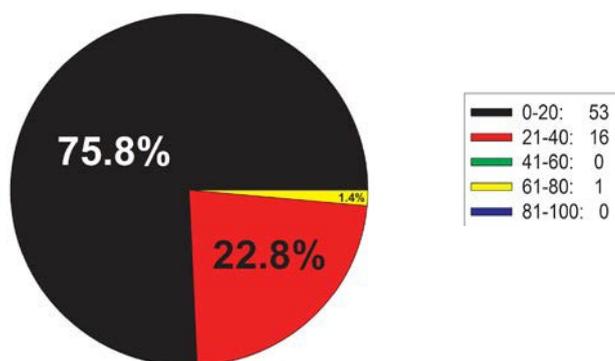
**Figura III.2.** Formación de biopelículas de los 448 aislados

A partir de los resultados obtenidos respecto a la formación de biopelículas, y teniendo presente que todos los aislados procedían de candidiasis sistémicas, se puede comprobar como la gran mayoría de los mismos fueron, en nuestras condiciones de estudio, poco o muy poco formadores de biopelículas. En estos dos grupos se encuentran un total de 313 aislados, que constituyen aproximadamente el 70% de los aislados estudiados, y más de la mitad de ellos (39%) apenas presentaron capacidad de formación

de biopelículas. Los aislados con capacidad formadora fueron por tanto solo un 30% del total. (Figura III.2).

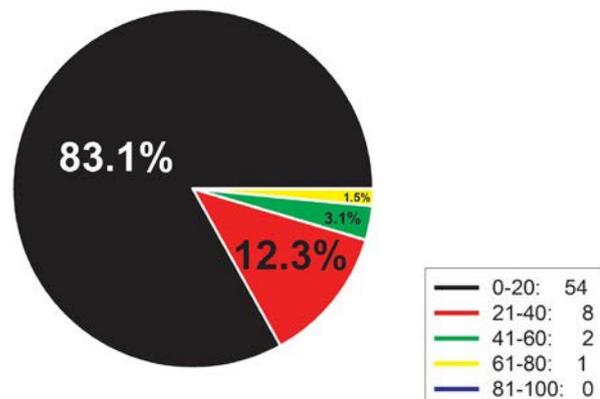
### III.2.2. Formación de biopelículas e hidrofobicidad

Tras los estudios de hidrofiliad/hidrofobicidad y de formación de biopelículas se procedió a la clasificación de los distintos aislados partiendo de su capacidad de formación de biopelículas y evaluando adicionalmente en cada caso su hidrofobicidad. Esta clasificación se realizó atendiendo a los intervalos de:0-20, 21-40, 41-60, 81-100 % de hidrofobicidad.



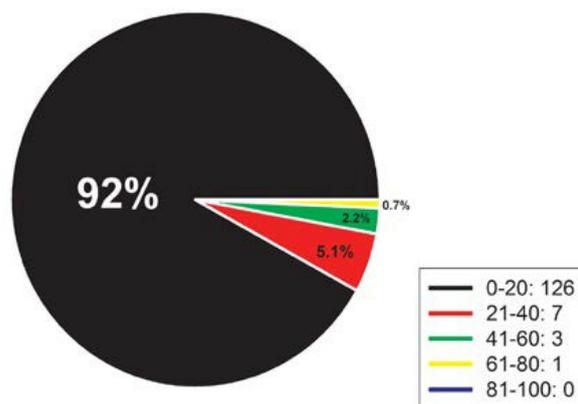
**Figura III. 3.** Hidrofobicidad de los 70 aislados catalogados como muy formadores (SA).

Como podemos observar en la Figura III.3, dentro de los 70 aislados considerados como muy formadores de biopelículas (SA) la mayor parte, el 75,8%, presentaron un grado de hidrofobicidad muy semejante a la cepa control. En el siguiente rango de hidrofobicidad (21-40), el porcentaje disminuye de un modo importante (22.8%), presentando gran parte de ellos una hidrofobicidad cercana al 21%, por lo que están en su mayoría próximos al grupo anterior. Solo uno de los aislados considerados muy formadores presentó una hidrofobicidad en el rango entre 61% y 80%. Este aislado fue el número 364, con una hidrofobicidad de 64.75%.



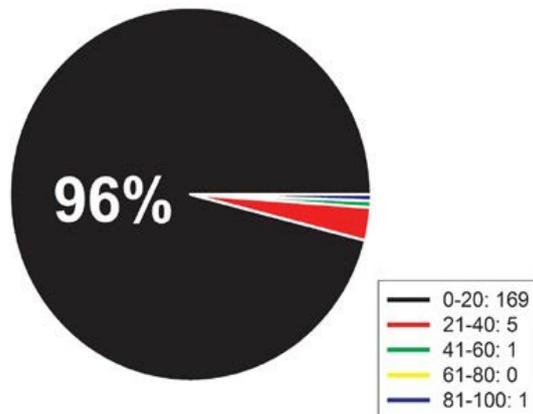
**Figura III. 4.** Hidrofobicidad de los 65 aislados catalogados como medianamente formadores (MA)

En cuanto al comportamiento con respecto a la hidrofobicidad del conjunto de aislados considerados medianamente formadores de biopelícula (MA), en cuyo grupo se encuentran un total de 65 aislados, se observó que en su gran mayoría (83.1%) presentaron una hidrofobicidad en el intervalo comprendido entre 0 y 20%. (Figura III.4). Siendo el número de aislados con hidrofobicidades mayores muy bajo.



**Figura III. 5.** Hidrofobicidad de los 137 aislados catalogados como muy poco formadores de biopelículas (WA).

Los aislados poco formadores de biopelículas (WA), un total de 137, presentaron prácticamente todos ellos una hidrofobicidad semejante a la cepa control, dentro del rango de entre 0-20%, ya que 126 de los 137 (92%) se encontraban dentro de este rango (Figura III.5).



**Figura III. 6.** Hidrofobicidad de los 176 aislados catalogados como muy poco o nada formadores de biopelículas (NA).

Los aislados clasificados como muy poco o nada formadores de biopelículas (NA) presentaron un comportamiento muy semejante a los anteriores, dado que de los 176 aislados que forman el presente grupo, 169 (96%) presentaron una hidrofobicidad similar a la cepa control. En este grupo se encuentra el aislado 437, con una hidrofobicidad en el rango de 81 a 100, concretamente del 93,27 %. (Figura III.6).

### III.2.3. Estudio comparativo de la relación entre formación de biopelículas e hidrofobicidad

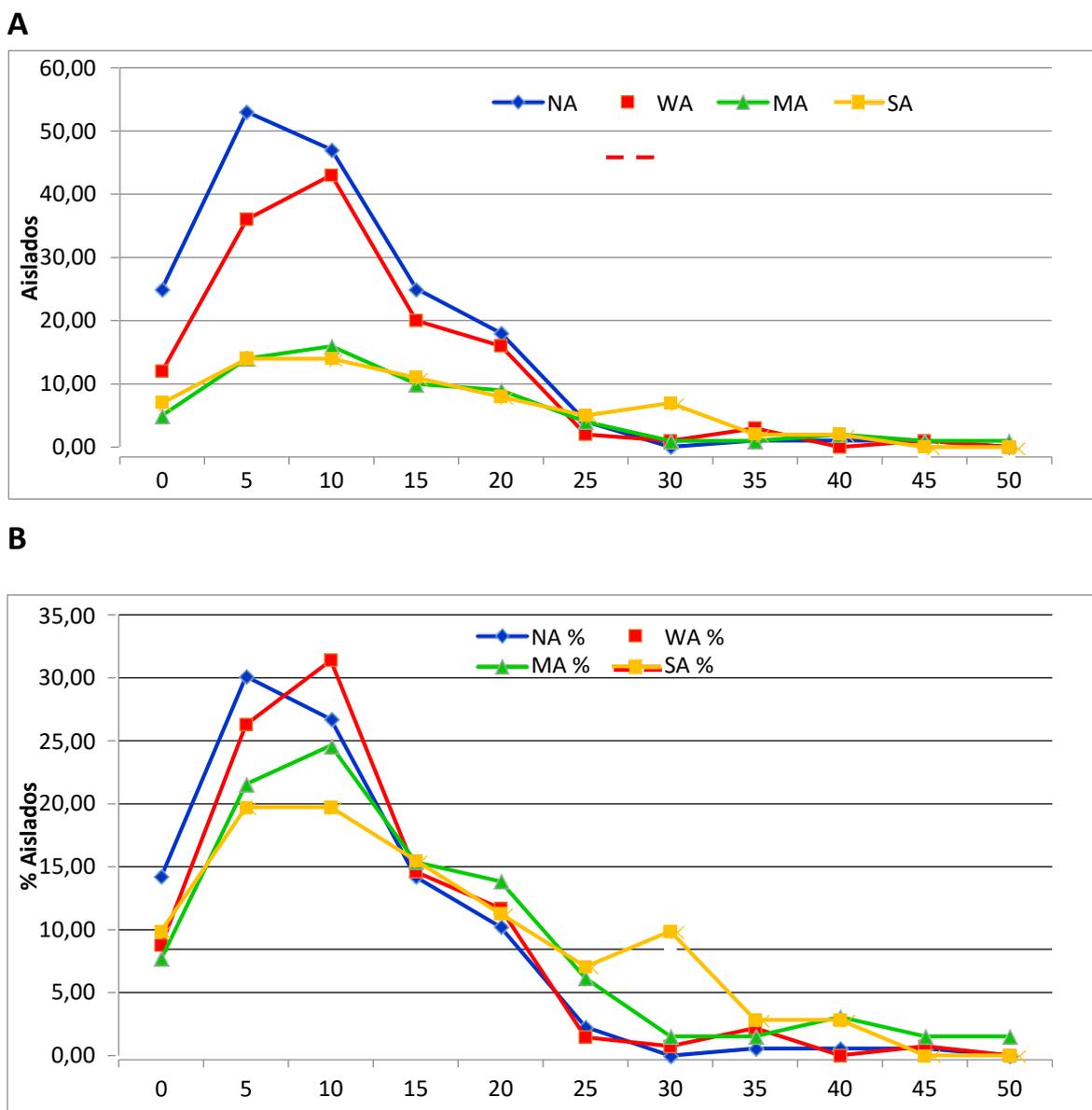
En la tabla III.1. se compararon los cuatro grupos de aislados conforme a la formación de biopelículas (NA, WA, MA Y SA) en relación a la hidrofobicidad. Para ello se tomaron intervalos de 5 en 5 y se calculó el porcentaje de aislados en cada rango para cada uno de los grupos.

**Tabla III.1.** Intervalos de % de hidrofobicidad de los distintos grupos de aislados considerados en rangos de 5 en 5.

Intervalos	NA	NA %	WA	WA %	MA	MA %	SA	SA %
0	25,00	14,20	12,00	8,76	5,00	7,69	7,00	9,86
5	53,00	30,11	36,00	26,28	14,00	21,54	14,00	19,72
10	47,00	26,70	43,00	31,39	16,00	24,62	14,00	19,72
15	25,00	14,20	20,00	14,60	10,00	15,38	11,00	15,49
20	18,00	10,23	16,00	11,68	9,00	13,85	8,00	11,27
25	4,00	2,27	2,00	1,46	4,00	6,15	5,00	7,04
30	0,00	0,00	1,00	0,73	1,00	1,54	7,00	9,86
35	1,00	0,57	3,00	2,19	1,00	1,54	2,00	2,82
40	1,00	0,57	0,00	0,00	2,00	3,08	2,00	2,82
45	1,00	0,57	1,00	0,73	1,00	1,54	0,00	0,00
50	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,54	0,00	0,00
55	0,00	0,00	2,00	1,46	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
65	0,00	0,00	1,00	0,73	1,00	1,54	1,00	1,41
70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
95	1,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

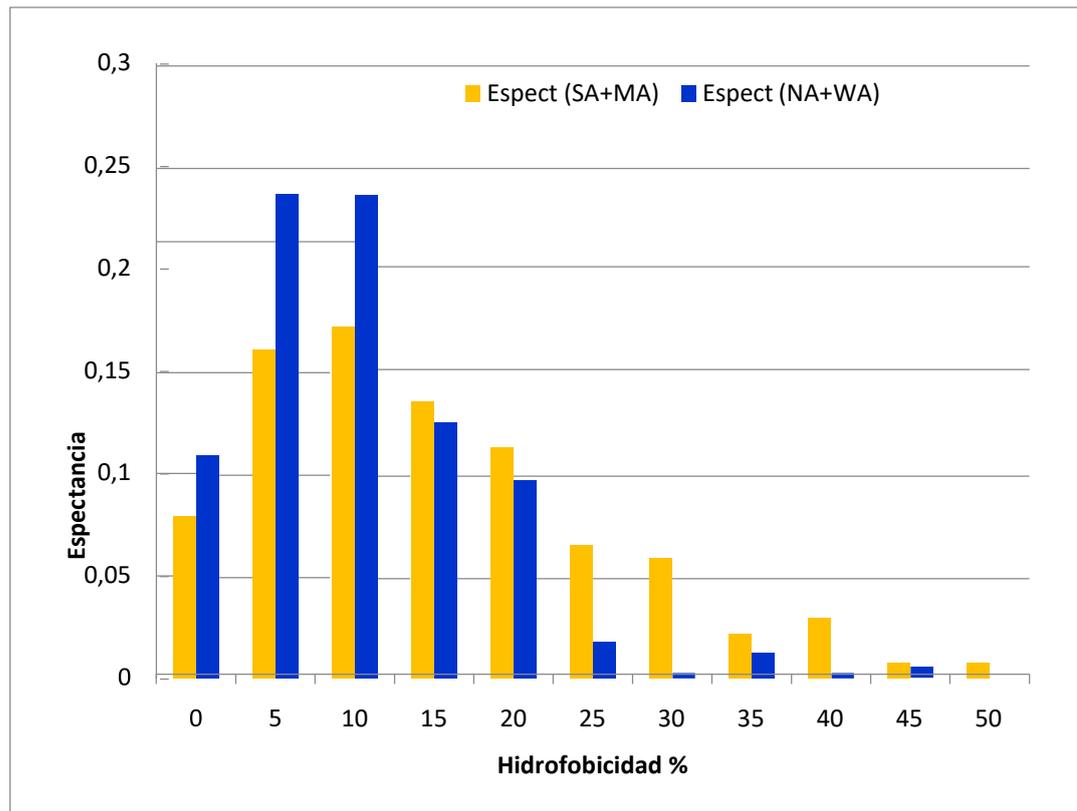
Podemos observar como fenómeno general que la mayoría de los aislados, independientemente de su capacidad de formar en mayor o menor grado biopelículas, se encuentra en un rango de entre el 5 y el 20% de hidrofobicidad (Figura III.7 A y B). En la Figura III.7 B, en la cual se analizó el porcentaje (el dato más informativo, dado que el número

de aislados es distinto para cada grupo), se puede observar que existe una tendencia similar en todos los grupos, independientemente de su capacidad de formación de biopelículas, y que además esta tendencia se puede dividir en dos grandes bloques. Uno de ellos se encontraría formado por los aislados NA+WA, que constituyen el 70% del conjunto de aislados, presentando un rango de hidrofobicidad más acotado, hasta un 20 %, y el grupo MA+SA, que presentó una mayor dispersión, llegando a valores de hidrofobicidad de hasta el 40%.



**Figura III.7.** Representación de aislados clínicos respecto a la hidrofobicidad agrupados con respecto de formación de biopelículas. En el panel **A** se representa el número de aislados con respecto a la hidrofobicidad. En el panel **B** se representa en % de aislados con respecto a la hidrofobicidad.

Si realizamos un estudio de la espectancia de los dos bloques analizados Se observó claramente que los aislados menos formadores de biopelículas presentaron una espectancia muy marcada en el intervalo de hidrofobicidad entre el 0 y el 15%, mientras que en el caso de los aislados con mayor capacidad de formar biopelículas (SA+MA), la tendencia fue más dispersa. Figura III.8.



**Figura III.8.** Relación de la espectancia de los aislados SA+MA y NA+WA con respecto a la hidrofobicidad.

### III.3. Análisis Proteómico de la Matriz Extracelular de las biopelículas

Una vez clasificados los 448 aislados clínicos tanto con respecto a su hidrofobicidad, así como a su capacidad de formación de biopelículas, se procedió al estudio proteómico de la Matriz Extracelular (ME) de las mismas. Para ello fueron seleccionados 9 aislados atendiendo a su capacidad en la formación de biopelículas, descartando por razones obvias el grupo de las muy poco o nada formadoras (NA). Los aislados analizados fueron en el caso de los muy formadores (SA): 270, 359 y 456. De los medianamente formadores (MA) se estudiaron el 286, 318 y 394. Del conjunto de los poco formadores (WA), se seleccionaron los aislados 208, 317 y 329. Como cepa control, tal como se indicó anteriormente, fue utilizada la cepa SC 5314. En lo que respecta a la hidrofobicidad de los mismos, tal como se muestra en la tabla III.2., vemos que difieren entre ellos a fin de observar si este dato podría ser relevante en el caso de los estudios proteómicos.

**Tabla III.2.** Aislados utilizados en el estudio proteómico

Nº de Aislado	Formación de Biopelículas	Rango de adherencia	Hidrofilidad %	Hidrofobicidad %
SC5314	SA	1,00	80,00	20,00
270	SA	1,00	86,90	13,10
359	SA	1.25	78,16	21,40
456	SA	1,09	93,60	6,40
286	MA	0,64	100,00	0,00
318	MA	0,65	81,47	18,50
394	MA	0,52	79,84	20,16
208	WA	0,44	83,91	16,09
317	WA	0,49	83,94	16,06
329	WA	0,46	82,78	17,22

La ME juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad de las biopelículas, así como en la protección de las células que forman parte de la misma frente a factores externos adversos como pueden ser tanto los antifúngicos como el propio sistema inmunitario del hospedador o situaciones de estrés. A fin de conocer de un modo detallado las especies proteicas presentes en la matriz extracelular de las mismas y poder comparar el posible interés de algunas de ellas en la formación y/o mantenimiento de las biopelículas, se procedió a la obtención del material proteico de la ME de cada uno de los aislados estudiados.

El estudio de proteómica se realizó con el extracto etanólico (EtOH al 60%) de biopelículas maduras de 48 horas obtenidas según se indica los apartados II.4 y II.5. de Material y Métodos de la presente memoria. La elección de este método de obtención del material proteico de la ME de la biopelícula frente a otros descritos en la bibliografía, fue debido a que, aunque presente un poder de solubilización inferior a otros agentes, como por ejemplo el SDS o la sonicación de las biopelículas, hace que se minimice la contaminación debida a componentes de las células presentes en la estructura de la misma. El hecho de preservar la integridad de la biopelícula permite que la mayoría de las proteínas presentes en el extracto sean propias de la ME de las mismas (Blanes, 2012).

Los experimentos se realizaron en todos los casos por duplicado. Se obtuvo biomasa de biopelículas de 48 h procedente de 6 frascos en cada caso (Material y métodos II.4). Los extractos etanólicos obtenidos mediante el tratamiento de las biopelículas con EtOH al 60% durante 60 min. fueron liofilizados y sometidos a análisis proteómico. El análisis de Proteómica se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Valencia SCSCIE, el cual forma parte de ProteoRed, PRB<sup>2</sup>-ISCIII, con apoyo del programa PT13/0001.

### **III.3. 1. Proteínas presentes en la ME de los aislados clínicos analizados**

El número de proteínas totales para cada uno de los aislados estudiados se indica en la tabla III.3. Para ello se ha utilizado como límite de corte la presencia en el estudio de al menos 2 péptidos. El total de proteínas encontradas fue de 905, considerándose

el 100%. Los muy formadores, junto con la cepa control SC 5314, la cual también se encontraría dentro de este grupo, fueron aquellos en los que se encontró un mayor número de proteínas, existiendo ciertas variaciones entre ellos con respecto al total, pero con una media de 708. En el caso de los aislados medianamente formadores y los poco formadores, el número de proteínas totales en los análisis estuvo muy por debajo de las encontradas en los anteriores. Entre estos dos grupos hubo una gran similitud con respecto al número total, presentando una media de 148 proteínas en el caso de los medianamente formadores, y de 163 en los poco formadores.

Posiblemente, la notable diferencia con respecto al número de proteínas presentes en la ME de los aislados SA con respecto al resto, sea debido a que los primeros presentaron a las 24 horas de incubación unas biopelículas fuertes, recubriendo toda la superficie de adhesión del frasco. Por su parte, las WA y NA presentaron a las 24h biopelículas muy finas sin recubrir por completo la superficie del frasco. A las 48 h, las SA presentaron películas fuertes y adherentes, que si se separaban lo hacían en fragmentos grandes. El resto continuaron siendo en todos los casos menos consistentes. Este hecho pudo provocar que, tras 48 h de incubación, las biopelículas de los SA se encontraran más envejecidas y la mayor masa de células provocara la liberación de una mayor cantidad de material proteico hacia la ME.

**Tabla III.3.** Número total de proteínas caracterizadas en los extractos etanólicos de cada uno de los aislados. Las proteínas indicadas corresponden al valor obtenido aplicando como límite de corte 2 péptido

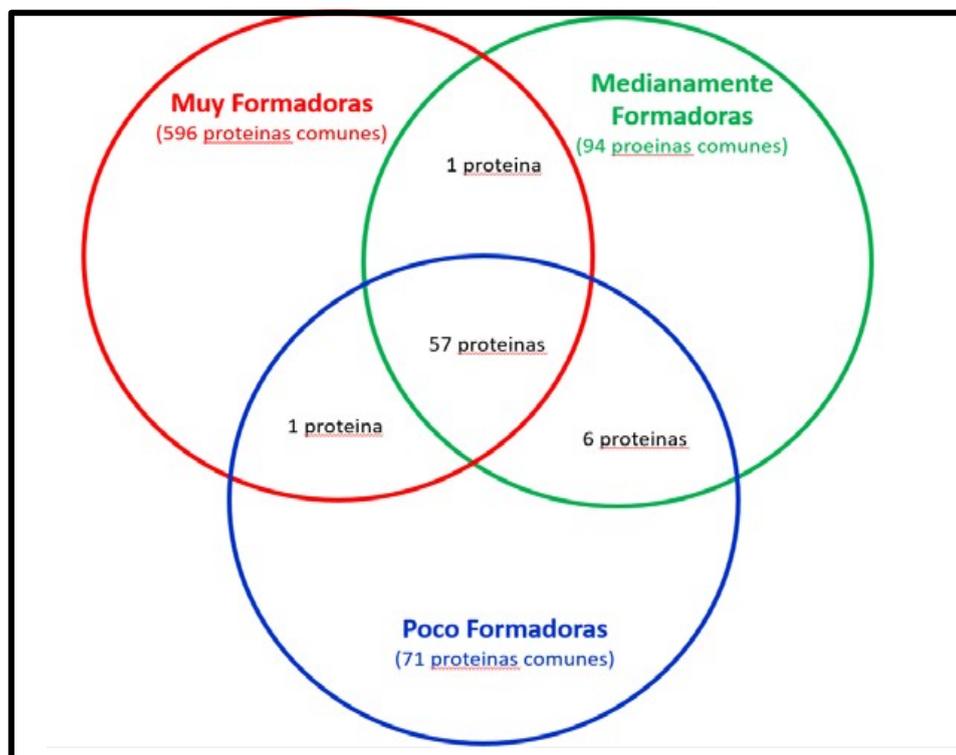
Cepa/Aislado	Proteínas
Número total proteínas	905
SC5314	651
270	787
359	791
456	603
286	121
318	162
394	162
208	282
317	100
329	106

Del total de proteínas encontradas en el caso de los muy formadores, 596 eran comunes a todos ellos, considerando también en este grupo la cepa control SC5314. En los aislados medianamente formadores, las proteínas comunes fueron 94, mientras que los poco formadores tuvieron 71 proteínas comunes entre ellos. En lo que respecta a proteínas que aparecen solo en uno de los grupos, el único número llamativo fue el de los muy formadores, hecho que posiblemente se encuentre relacionado con la gran cantidad de proteínas totales encontradas en estos aislados. (Tabla III.4). (Figura III.9).

**Tabla III.4.** Número de proteínas en los distintos grupos de aislados.

Proteínas	
<b>Número total de proteínas</b>	905
<b>Comunes en Muy formadores</b>	596
<b>Comunes en Poco formadores</b>	71
<b>Comunes en Medianamente formadores</b>	94
<b>Comunes en Todas</b>	57
<b>Solo en Muy formadoras</b>	576
<b>Solo en Medianamente formadores</b>	6
<b>Comunes Muy/Poco formadores</b>	1
<b>Comunes Muy/Medianamente formadores</b>	1
<b>Comunes Poco/Medianamente formadores</b>	6

El número de proteínas comunes en todos los aislados estudiados, junto con la cepa control, fue de 57. Número relativamente bajo en comparación con el conjunto total de las proteínas encontradas, pero muy significativo con respecto al número total de proteínas en los aislados WA y NA en los que serían aproximadamente el 38%.



**Figura III. 9.** Relación del número de proteínas con respecto al conjunto de las distintas cepas estudiadas.

En Anexo II de la presente memoria se relacionan las 905 proteínas totales encontradas en el estudio de las ME para cada uno de los 9 aislados clínicos y de la cepa SC5314. En dicha tabla se enumeraron por orden alfabético los genes correspondientes, en los casos en los que se conoce el nombre estándar del gen. En aquellos casos en los que no se conoce el nombre estándar, se utilizó el nombre sistemático. Estos datos fueron obtenidos a partir de los ORFs correspondientes en la base de datos de GenomeDatabase de *Candida*.

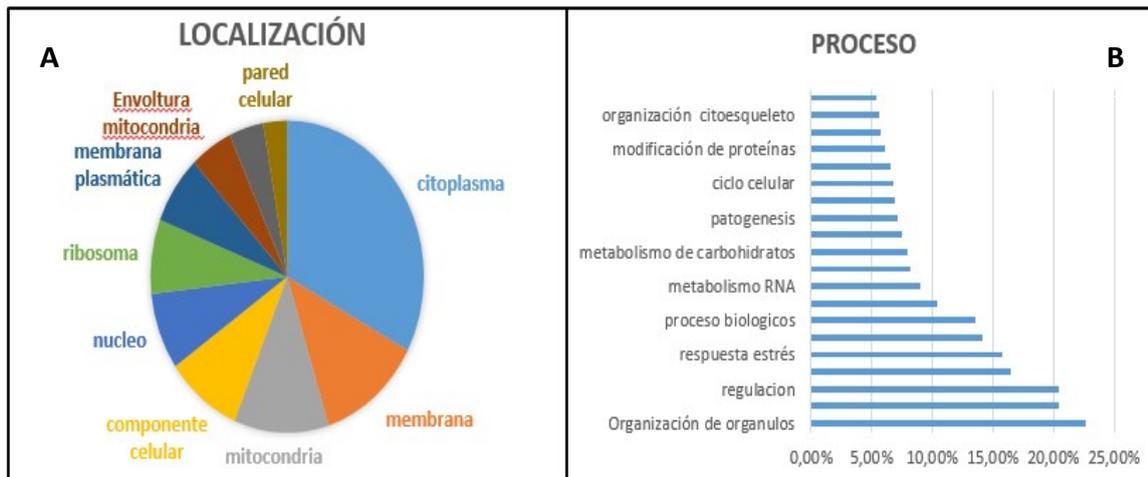
Mediante los datos obtenidos en la base de datos Genome Database de *Candida*, encontramos que este total de proteínas (905), se encuentran implicadas en 248 procesos celulares. Así mismo el número de funciones encontradas es de 63. Los datos

obtenidos fueron muy amplios debido al gran número de proteínas analizadas. La gran mayoría de las mismas presentan función hidrolasa (17,2%), oxidoreductasa (15,2%), unión a proteínas (14,4%), transferasa (11,8%), así como función estructural (11,5%), presentando en menor grado funciones de unión a distintas moléculas, así como de regulación enzimática entre otras. Dentro de los procesos en los que se encuentran implicadas se incluyen principalmente la regulación de procesos biológicos (23,6%), el transporte (20,9%), la respuesta al estrés (17,6%), crecimiento filamentoso (11,2%), patogénesis respuesta a drogas, así como en el metabolismo de carbohidratos, entre otros (cada uno de estos últimos, entre un 7 y un 10%). La función de las proteínas analizadas en muchos casos es ubicua pudiendo encontrarse en distintas categorías GO.

La gran mayoría de estas proteínas (61,8%) presentarían una localización citoplasmática. Su presencia en la membrana, en el núcleo, en la región extracelular, mitocondria y pared celular, también es importante pero más minoritaria (entre un 10 y un 20%).

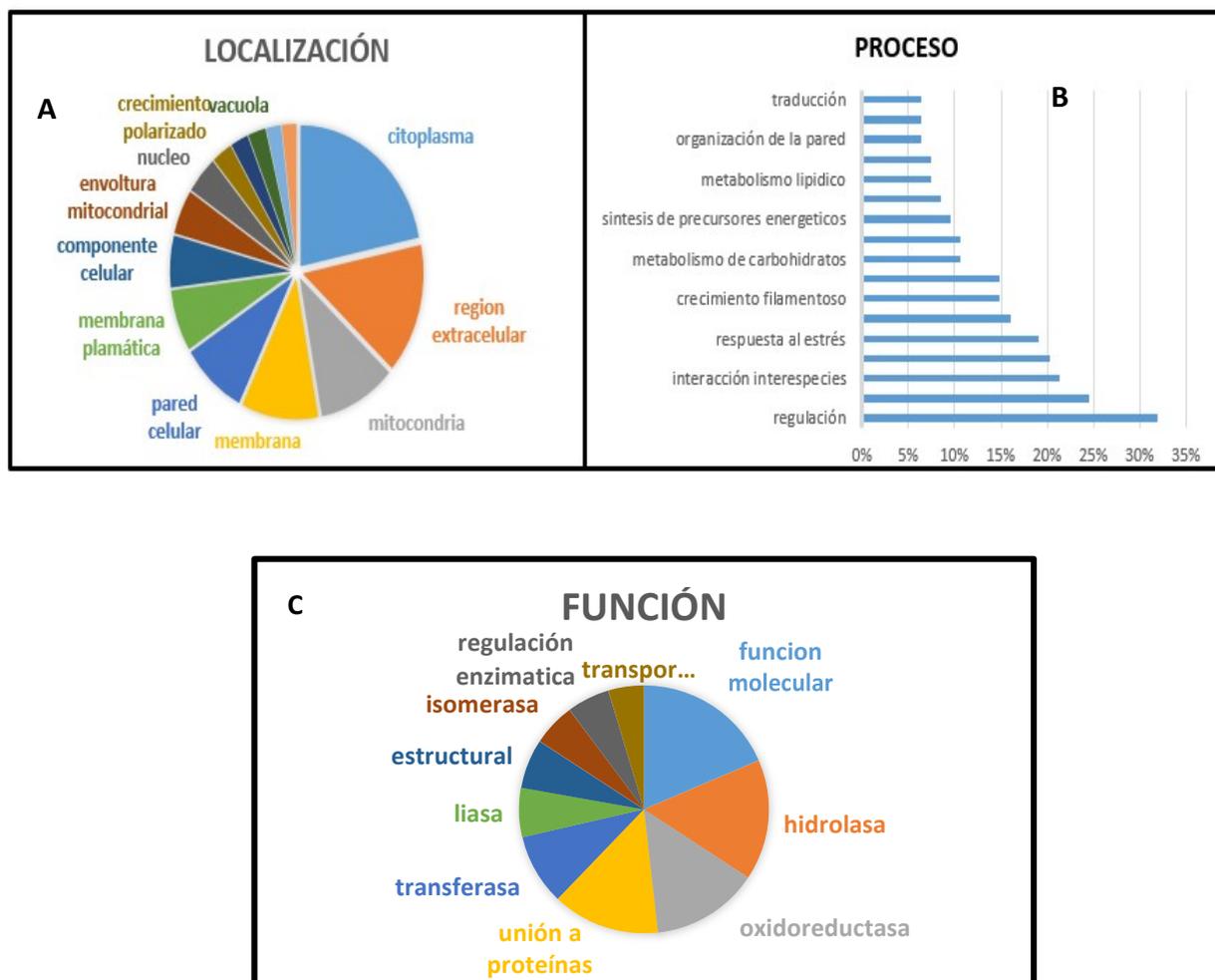
En el estudio de las proteínas comunes correspondientes a cada uno de los grupos, se observó que con respecto a los muy formadores presentaban, como hemos comentado anteriormente, un elevado número (596), las cuales representan aproximadamente el 84 % de la media de proteínas encontradas en este grupo.

En el estudio de los procesos, función y localización en los que se encuentran implicadas las 596 proteínas comunes de los aislados SA, observamos que se mantienen desde un punto de vista relativo los resultados obtenidos para el conjunto del total de las proteínas. En la figura III.10 se observa un resumen de estos procesos considerando los datos obtenidos para valores en los que el número de proteínas implicadas fue superior al 5% con respecto a los 596 comunes, consideradas el 100%. En lo que respecta a la localización y procesos en los que se encuentran implicadas, como se ha comentado anteriormente es muy semejante al conjunto de proteínas totales. En cuanto a su función, principalmente encontramos proteínas con actividad oxidoreductasa, estructural, hidrolasa, transferasa y de unión a proteínas. (Figura III.10).



**Figura III. 10.** Análisis de la localización celular A, proceso B y función C de las 596 proteínas comunes en los aislados SA.

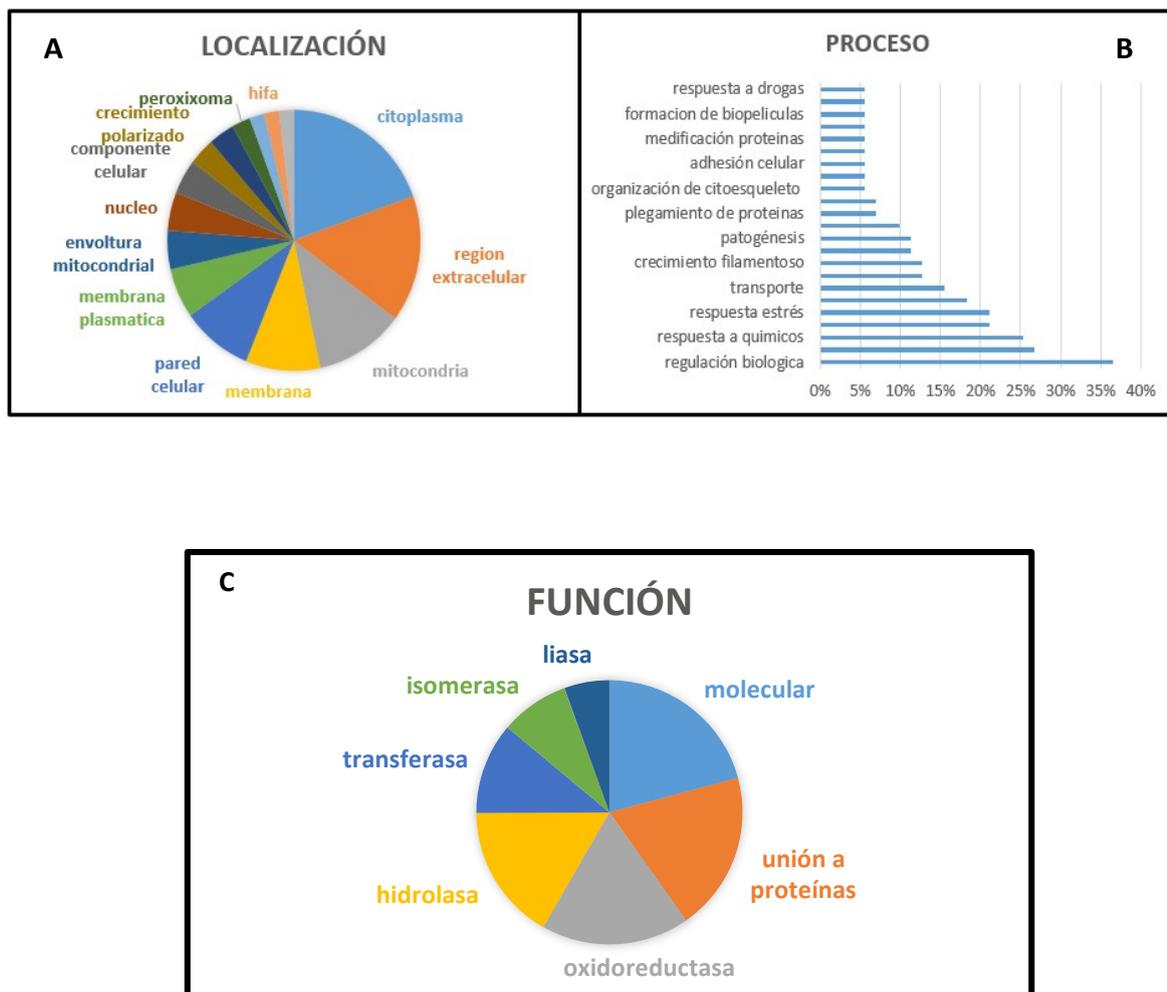
Las proteínas comunes en los aislados MA, como indicamos en la tabla III.4. fueron 94, el 43 % del total de las proteínas encontradas en la media de este grupo. En el análisis se observó un comportamiento muy semejante a las comunes en los aislados SA. Con respecto a los procesos en los que se encuentran implicados, podemos observar un número importante de proteínas con interacción interespecies., procesos metabólicos, y respuesta al estrés, y funciones relacionadas. (Figura III. 11).



**Figura III. 11.** Análisis de la localización celular A, proceso B y función C de las 94 proteínas comunes en los aislados MA.

En lo que respecta a las proteínas comunes entre aquellos aislados cuya capacidad de formar biopelículas fue baja WA, encontramos 71 proteínas. En el estudio de localización, función y procesos en los que se encuentran implicadas, se obtuvieron resultados muy semejantes al obtenido en el resto de aislados estudiados. Con respecto a su localización, el mayor porcentaje fue citoplasmático (57%), seguidas por las de región extracelular, membrana y mitocondria.

En cuanto a su función, continúa siendo muy importante la actividad oxidorreductasa, pero en este grupo encontramos la función de unión a proteínas con una mayor relevancia, así como las implicadas en la respuesta a agentes químicos (Figura III.12).



**Figura III. 12.** Análisis de la localización celular A, proceso B y función C de las 71 proteínas comunes en los aislados WA.

### III.3.2. Análisis de las proteínas comunes en la ME a todas las cepas estudiadas

Como se puede observar en el apartado anterior, independientemente del número de proteínas encontradas en cada uno de los grupos, observamos que, con pequeños matices, el comportamiento es muy parecido. Podemos encontrar a nivel individual especies moleculares distintas, pero todas ellas pertenecientes a familias con función similar. Observamos en el conjunto diferencias a nivel cuantitativo pero muy semejantes a nivel cualitativo. Consideramos pues importante el análisis detallado de las proteínas comunes a todos los grupos de aislados.

En el presente apartado nos centramos en el estudio y caracterización de las proteínas comunes en el extracto etanólico de la ME de los 9 aislados clínicos analizados

junto con la cepa control. Los péptidos encontrados en el análisis proteínico aparecieron con valores significativamente altos en todos los casos.

Los genes correspondientes a estas 57 proteínas, su nombre sistemático, nombre de la proteína, así como la función biológica de las mismas, la presencia o no de péptido señal y el índice medio de hidropatía, se encuentran indicados en la tabla III.5. El orden el que se encuentran en la tabla se ha realizado atendiendo al orden alfabético del gen.

**Tabla III. 5.** Análisis de los 57 genes comunes en la ME de las biopelículas en todos los aislados estudiados. Datos descritos en el ensamblaje 22 de *Candida* Genomedatabase.

GEN	Nombre sistemático	Proteína	Función biológica <sup>a</sup>	Índice medio de hidropatía <sup>b</sup>	Péptido señal
<b>AAT1</b>	C2_05250C_A	Aat1p	Aspartato aminotrasferasa	-0,35	no
<b>ACB1</b>	C7_00750W_A	Acb1p	Prot. Similar a acyl-CoA	-1,05	no
<b>ACH1</b>	C5_02000C_A	Ach1p <sup>1</sup>	Acetyl-coA hidrolasa	-0,34	no
<b>ACO1</b>	CR_08210C_A	Aco1p	Aconitasa	-0,28	no
<b>ADE12</b>	C1_09640W_A	Ade12p	Adenylosuccinate sintasa	-0,34	no
<b>ADH1</b>	C5_05050W_A	Adh1p	Alcohol deshidrogenasa	0,01	no
<b>APR1</b>	C2_07400C_A	Apr1p	Proteasa aspartica vacuolar	-0,07	si
<b>ARF2</b>	C3_04950W_A	Arf2p	Factor ADP- ribosilación (putativo)	-0,2	no
<b>ASR3</b>	C2_03790C_A	Asr3	Respuesta al estrés	-1,14	no
<b>BLP1</b>	C1_12850W_A	Blp1p	Desconocida	-0,86	no
<b>CA0668</b>	C1_05180C_A	C1_05180cp	NADH-ubiquinona	-0,77	no
<b>CMD1</b>	C4_06030W_A	Cmd1p	Calmodulina	-0,52	no
<b>COI1</b>	C1_07900W_A	Coi1p1	Proteína de secreción	-0,37	si
<b>COX12</b>	C6_04250W_A	C6_04250w	Citocromo-c oxidasa	-0,67	no
<b>COX17</b>	C2_01180W_A	Cox17p	Metalchaperona	-0,92	no
<b>CPR3</b>	C2_02320C_A	Cpr3p	Peptidilprolyl cis-trans isómerasa	-0,37	no
<b>CYP1</b>	C7_02380C_A	Cyp1p	Peptidil-prolyl cis-trans isomerasa	-0,23	no
<b>DDR48</b>	CR_01020C_A	Cr_01020cp	Desconocida	-1,41	no
<b>ENO1</b>	C1_08500C_A	Eno1p	Enolasa	-0,19	no

RESULTADOS

<b>GLO1</b>	C1_00500C_A	Glo1p	Glioxalasa (putativa)	-0,69	no
<b>GLX3</b>	C3_02610C_A	Glx3p	Glioxalasa	-0,25	no
<b>GPM1</b>	C2_03270W_A	Gpm1p	Fosfoglicerato mutasa	-0,38	no
<b>HBR2</b>	C6_04220C_A	Hbr2p	aminotrasferasa	-0,06	no
<b>HSP12</b>	C5_02110W_A	C5_02110wp_	Shock térmico	-0,86	no
<b>HSP21</b>	C2_04010C_A	Hsp21p	Proteína de Shock térmico	-0,86	no
<b>HSP70</b>	C1_13480W_A	Hsp70p	Chaperona	-0,36	no
<b>IDI1</b>	C4_02280W_A	Idi1p	Isomerasa	-0,38	no
<b>LDG8</b>	C6_02100W_A	C6_02100wp_	Proteína de secreción	-0,27	si
<b>MLS1</b>	C1_09690W_A	Mls1p	Malato sintasa	-0,33	no
<b>orf19.1862</b>	C2_07630C_A	C2_07630cp	Proteína de estrés	-0,4	no
<b>orf19.2426</b>	CR_03020C_A	Cr_03020cp_a	Fosfohidrolasa	-0,42	no
<b>orf19.3226</b>	CR_01280C_A	Cr_01280cp_a	Transporte de esteroides	0,07	si
<b>orf19.4952.1</b>	C1_13260W_A	C1_13260wp_a	Peptidil-prolyl cis- trans	-0,15	si
<b>ORF1</b>	C1_08060W_A	Ofr1p	regulación Blanco- opaco	-0,43	no
<b>orf19.5201.1</b>	C1_04360C_A	C1_04360cp_a	Inhibidor ATPasa	-1,02	no
<b>orf19.913.2</b>	C3_04080W_A	C3_04080wp_a	Sub. 6 citocromo-c reductasa	-1,2	no
<b>PMU1</b>	C3_06920W_A	C3_06920wp_	Fosfomutasa	-0,64	no
<b>PGK1</b>	C6_00750C_A	Pgk1p	Fosfoglicerato quinasa	-0,21	no
<b>PST1</b>	C2_06870C_A	Pst1p	Flavodoxina	-0,05	si
<b>PST2</b>	C2_08640C_A	Pst2p	Flavodoxina	-0,18	si
<b>PST3</b>	CR_05390W_A	Pst3p	Flavodoxina	-0,02	no
<b>RBP1</b>	C7_02570C_A	Rbp1p	Isomerasa	-0,34	no
<b>RCT1</b>	C3_05710W_A	Rct1p	Inducida por	-1,62	no
<b>RIP1</b>	C3_04430W_A	Rip1p	Citocromo-c reductasa	-0,19	si
<b>SOD1</b>	C4_02320C_A	Sod1p	Superoxido dismutasa	-0,51	no
<b>TAL1</b>	CR_03720W_A	Tal1p	Transaldolasa	-0,25	no
<b>TDH3</b>	C3_06870W_A	Tdh3p	Triosa-fosfato-deshidrogenas	-0,04	no
<b>TEF1</b>	C2_08370C_A	Tef1p	Factor de elongación	-0,33	no
<b>TFS1</b>	C5_00930C_A	Tfs1p	Carboxipeptidasa	-0,6	no
<b>TIM9</b>	C7_03630C_A	Tim9p	Membrana mitocondrial	-0,81	no
<b>TPM2</b>	CR_08460W_A	Tpm2p	Tropomiosina	-1,33	no
<b>TRX1</b>	CR_10350C_A	Trx1p	Tioredoxina	0,21	no
<b>UBI3</b>	C4_07180W_A	Ubi3p	Ubiquitina	-0,64	si
<b>WH11</b>	C2_05180W_A	Wh11p	fase blanca	-1,02	no
<b>YCP4</b>	CR_05380C_A	Ycp4p	Flavodoxina	-0,31	no

<b>YPT1</b>	C1_03500W_A	Ypt1p	Secreción de proteínas	0,31	no
<b>YWP1</b>	C2_08590W_A	Ywp1p	Pared celular	0,05	si

<sup>a</sup> Función biológica de la proteína producto del gen indicado

<sup>b</sup> Datos obtenidos de la página *Candida Genome DB*. Los valores positivos indican una proteína relativamente hidrofóbica, siendo los negativos correspondientes a proteínas relativamente hidrofílicas. El índice medio de hidropatía se calcula sumando los valores de hidropatía de **Kyte y Doolittle (1982)** de todos los aminoácidos de la proteína y dividiéndolo por el número de aminoácidos que forman la cadena peptídica.

En la predicción de la presencia de péptido señal mediante su análisis en la página *Candida Genome DB*, se observó que, de las 57 proteínas, solo 10 presentan péptido señal, dato que se encuentra en concordancia con el encontrado por nuestro grupo en el estudio proteico de los extractos de EtOH de las biopelículas de la cepa CA14-URA3 de *C. albicans* (Martínez *et al.*, 2016). La presencia de proteínas con estas características, sin péptido señal, en la ME se encuentra apoyada por el hecho de haber sido descritas vías secretoras no clásicas tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*, las cuales podrían ser responsables, al menos en parte, de la presencia de gran variedad de componentes citosólicos en la ME de biopelículas de *C. albicans* (Monteoliva *et al.*, 2002; Nombela *et al.*, 2006, Chaffin 2008; Gil-Bona *et al.*, 2015; Gomez-Molero *et al.*, 2016). Este tipo de proteínas pueden representar especies “multifuncionales” que presentan diferentes funciones dependiendo de su ubicación subcelular. Actualmente se ha sugerido que puede existir una relación entre estas proteínas y factores de virulencia, así como a la respuesta al estrés oxidativo, la adhesión de las células fúngicas a los tejidos del hospedador y a la propia formación de las biopelículas (Serrano-Fujarte *et al.*, 2016).

En lo que respecta al índice medio de hidropatía (Kyte y Doolittle, 1982), 53 de las 57 presentan índices negativos. Las biopelículas se pueden considerar como hidrogeles, y el hecho de encontrar estos índices sería concomitante con el entorno altamente hidrofílico de la ME de la biopelícula. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Martínez *et al.* (2016), en cuyo trabajo el 96 % de los polipéptidos identificados en los extractos etanólicos e la ME de las biopelículas presentaron índices negativos, siendo en nuestro caso el valor de 93%.

La presencia de estas 57 proteínas comunes en todos los casos sugiere que podrían desempeñar un papel funcional importante en la biología de las biopelículas. Para ello realizamos una clasificación de las mismas atendiendo a su función y procesos en los que se encuentran implicados. (Tablas III.6, III.7).

**Tabla III.6.** Relación de categorías funcionales de las 57 proteínas comunes en los extractos de la ME de las biopelículas de todos los aislados clínicos

Categoría GO <sup>a</sup>	Frecuencia de la categoría GO <sup>b</sup>	Genes <sup>c</sup>
<b>Función molecular</b> GO: 0003674	21.1%	<i>YWP1, OFR1, HSP21, WH11, ASR3, C6_02100W_A, HSP12, COI1, BLP1, CR_01280C_A, C2_07630C_A, RCT1</i>
<b>Oxidoreductasa</b> GO:0016491	21.1%	<i>SOD1, TRX1, C3_04080W_A, RIP1, TDH3, YCP4, PST1, ADH1, PST3, C6_04250W_A, PST2, C1_05180C_A</i>
<b>Unión a proteínas</b> GO: 0005515	21.1%	<i>TPM2, ENO1, C1_13260W_A, HSP70, TIM9, TDH3, CMD1, TEF1, GPM1, ADH1, YPT1, PGK1</i>
<b>Hidrolasa</b> GO:0016787	15.8%	<i>ARF2, CR_03020C_A, DDR48, TEF1, ACH1, IDI1 C3_06920W_A, APR1, YPT1</i>
<b>Transferasa</b> GO:0016740	14.0%	<i>ENO1, MLS1, ACH1, ADH1, TAL1, PGK1, HBR2, AAT1</i>
<b>Isomerasa</b> GO:0016853	10.5%	<i>C1_13260W_A, CPR3, CYP1, GPM1, IDI1, RBP1</i>
<b>Liasa</b> GO:0016829	7.0%	<i>ENO1, GLX3, GLO1, ACO1</i>
<b>Unión DNA</b> GO:0003677	3.5%	<i>ADE12, ACO1</i>
<b>Transportadora</b> GO:0005215	3.5%	<i>TIM9, C6_04250W_A</i>

<b>Regulador enzimático</b> <b>GO:0030234</b>	3.5%	<i>C1_04360C_A, TFS1</i>
<b>Unión RNA</b> <b>GO:0003723</b>	3.5%	<i>TDH3, TEF1</i>
<b>Unión a lípidos</b> <b>GO:0008289</b>	1.8%	<i>TFS1</i>
<b>Ligasa</b> <b>GO:0016874</b>	1.8%	<i>ADE12</i>
<b>Peptidasa</b> <b>GO:0008233</b>	1.8%	<i>APR1</i>
<b>Proteína estructural</b> <b>GO:0005198</b>	1.8%	<i>UBI3</i>
<b>Fosfatasa</b> <b>GO:0016791</b> <b>GO:00</b>	1.8%	<i>C3_06920W_A</i>
<b>Otras</b>	3.5%	<i>COX17, ACB1</i>

Finder de la base de datos de *Candida* Genome DB. <sup>a</sup> Número de acceso a la categoría GO. <sup>b</sup> Frecuencia de aparición en la categoría GO. Este cálculo se realiza dividiendo el número de genes clasificados en cada categoría GO entre el número de genes identificados. <sup>c</sup> Los nombres de los genes siguen la nomenclatura propuesta en la base de datos *Candida* Genome DB. Algunos genes se encuentran asociados a más de una categoría GO.

En la tabla III.6 se presenta una clasificación de las 57 proteínas comunes atendiendo a sus categorías funcionales GO (<http://www.Candidagenome.org>). Se agruparon del siguiente modo: el 21,1% pertenecen a la categoría GO: 0003674 (función molecular); un porcentaje idéntico (21,1%) a la categoría GO: 0016491 (oxidoreductasa); otro 21% a GO: 0005515 (unión a proteínas); un 15,8% a GO: 0016787 (hidrolasa); el 14% a GO: 0016740 (transferasa); 10,5% pertenecen a la categoría GO: 0016853 (isomerasa); y un 7% son GO: 0016829 (liasa). Encontramos otras 10 categorías, indicadas en la tabla, cuyos porcentajes se encuentran por debajo del 4%, las cuales hemos considerado menos representativas. El total de los porcentajes obtenidos es superior a 100; este hecho es debido a que algunos de los genes se encuentran en más de una categoría GO.

Estos datos son semejantes a los obtenidos por nuestro grupo para las proteínas del extracto de la ME de las biopelículas de la cepa CAI-URA3 de *C. albicans* (Martínez et al., 2016). De los datos obtenidos resulta destacable que un alto porcentaje de las proteínas presentan actividad oxidoreductasa, de lo que se deduce una importante actividad antioxidante en la ME, un hecho que conllevaría a la resistencia a los agentes antifúngicos. Así mismo se encontró un número importante de genes implicados en la unión a proteínas.

En el análisis de los distintos procesos en los que se encontrarían relacionados los genes en estudio (Tabla III.7), podemos observar que la gran mayoría de ellos se encuentran implicados en procesos de regulación. Un importante porcentaje, (28%) actúan en respuesta a agentes químicos, así como en la respuesta al estrés. En estos grupos aparecen repetidos varios genes, como por ejemplo *SOD1* (superóxido dismutasa), *ENO1* (enolasa), *HPS21* y *HPS70* que codifican para proteínas de shock térmico y *GLX3* (glioxalasa), entre otras.

Dentro de estos procesos, se puede apreciar la importancia de los 57 genes comunes tanto para la defensa frente a ataques químicos o biológicos, así como su implicación en el transporte y metabolismo.

**Tabla III.7.** Relación de procesos en los que se encuentran implicados los 57 genes comunes.

PROCESO	FRECUENCIA	GENES
<b>Regulación biológica</b>	42,10%	<i>SOD1 OFR1 TPM2 C1_04360C_A ARF2 TRX1 ENO1 TFS1 HSP70 RIP1 TIM9 TDH3 YCP4 CMD1 HSP12 PST1 CYP1 ADH1 PST3 ACO1 PST2 YPT1 PGK1 RBP1</i>
<b>Respuesta agentes químicos</b>	28,10%	<i>SOD1 HSP21 ARF2 TRX1 GLX3 ADE12 HSP70 DDR48 YCP4 CMD1 PST1 ACH1 PST3 PST2 YPT1 RBP1</i>
<b>Relación interespecies</b>	28,10%	<i>YWP1 SOD1 HSP21 ENO1 HSP70 WH11 TDH3 YCP4 TEF1 PST1 GPM1 ADH1 PST3 ACO1 PST2 PGK1</i>
<b>Organización de orgánulos</b>	22,80%	<i>TPM2 COX17 TRX1 TIM9 CMD1 TEF1 CYP1 UBI3 PST3 ACO1 C6_04250W_A YPT1 RBP1</i>
<b>Respuesta al estrés</b>	22,80%	<i>SOD1 HSP21 TRX1 GLX3 HSP70 DDR48 WH11 YCP4 HSP12 PST1 PST3 APR1 PST2</i>

<b>Transporte</b>	17,50%	<i>COX17 ARF2 TRX1 HSP70 TIM9 TDH3 CMD1 TEF1 CR_01280C_A YPT1</i>
<b>Obtención de metabolitos</b>	14,00%	<i>COX17 ENO1 C3_04080W_A RIP1 TDH3 GPM1 ACO1 PGK1</i>
<b>Crecimiento filamentosos</b>	14,00%	<i>SOD1 TPM2 HSP21 ARF2 TRX1 ENO1 DDR48</i>
<b>Procesos biológicos</b>	14,00%	<i>CR_03020C_A ASR3 C6_02100W_A COI1 BLP1 C3_06920W_A RCT1 C1_05180C_A</i>
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>	12,30%	<i>HSP21 ENO1 TDH3 MLS1 GPM1 TAL1 PGK1</i>
<b>Patogénesis</b>	12,30%	<i>SOD1 HSP21 WH11 YCP4 PST1 PST3 PST2</i>
<b>Metabolismo de lípidos</b>	10,50%	<i>SOD1 CMD1 MLS1 ACH1 IDI1 ACB1</i>
<b>Plegado de proteínas</b>	8,80%	<i>C1_13260W_A HSP70 CPR3 CYP1 RBP1</i>
<b>Respiración celular</b>	7,00%	<i>COX17 C3_04080W_A RIP1 ACO1</i>
<b>Modificación de proteínas</b>	7,00%	<i>TRX1 CPR3 CYP1 UBI3</i>
<b>Respuesta a drogas</b>	7,00%	<i>ARF2 CMD1 YPT1 RBP1</i>
<b>Señal de traducción</b>	7,00%	<i>ARF2 CMD1 YPT1 RBP1</i>
<b>Organización del citoesqueleto</b>	5,30%	<i>TPM2 CMD1 TEF1</i>
<b>Ciclo celular</b>	5,30%	<i>TPM2 CMD1 CYP1</i>
<b>Conjugación</b>	5,30%	<i>TPM2 CMD1 RBP1</i>
<b>Formación de biopelículas</b>	5,30%	<i>YWP1 WH11 ADH1</i>
<b>Desarrollo celular</b>	5,30%	<i>RIP1 CMD1 CYP1</i>
<b>Metabolismo RNA</b>	5,30%	<i>UBI3 C2_07630C_A YPT1</i>
<b>Transporte mediado por vesículas</b>	5,30%	<i>TRX1 CMD1 YPT1</i>
<b>Traducción</b>	3,50%	<i>TEF1 UBI3</i>
<b>Homeostasis celular</b>	3,50%	<i>SOD1 TRX1</i>
<b>Citoquinesis</b>	1,80%	<i>TPM2</i>
<b>Adhesión celular</b>	1,80%	<i>TDH3</i>
<b>Organización pared celular</b>	1,80%	<i>SOD1</i>
<b>Organización del núcleo</b>	1,80%	<i>CMD1</i>
<b>Síntesis de Ribosomas</b>	1,80%	<i>UBI3</i>
<b>Crecimiento de Pseudohifas</b>	1,80%	<i>TPM2</i>
<b>Catabolismo proteico</b>	1,80%	<i>APR1</i>
<b>Crecimiento celular</b>	1,80%	<i>CMD1</i>
<b>Crecimiento celular en cadena</b>	1,80%	<i>TPM2</i>
<b>Metabolismo de DNA</b>	1,80%	<i>DDR48</i>
<b>Otros</b>	5,30%	<i>GLO1 HBR2 AAT1</i>

Los porcentajes se refieren al número de genes presentes en ese apartado con respecto al total de los 57 genes estudiados.

En el estudio de la localización de los productos de los distintos genes observamos que un gran número de ellos (66%) presentan localización citoplasmática. Así mismo el porcentaje de localización mitocondrial, en membrana y en pared

también son importantes. En algunos observamos claramente su ubicuidad, como en el caso de SOD1, ENO1, ACH1 y HSP70, entre otros (Tabla III.8).

**Tabla III.8.** Localización celular de los productos de los 57 genes estudiados.

LOCALIZACION	FRECUENCIA	GENES
Citoplasma	66,70%	SOD1 TPM2 C1_04360C_A COX17 ARF2 TRX1 ENO1 TFS1 GLX3 ADE12 C3_04080W_A HSP70 RIP1 CPR3 WH11 TIM9 TDH3 YCP4 CMD1 HSP12 TEF1 MLS1 CYP1 GPM1 ACH1 ADH1 UBI3 PST3 TAL1 CR_01280C_A ACO1 APR1 C6_04250W_A YPT1 PGK1 C1_05180C_A HBR2
Mitocondria	38,60%	SOD1 C1_04360C_A COX17 TRX1 ENO1 C3_04080W_A RIP1 CPR3 TIM9 TDH3 TEF1 CYP1 GPM1 ACH1 ADH1 ACO1 C6_04250W_A YPT1 PGK1 C1_05180C_A HBR2 AAT1
Membrana	29,80%	ENO1 TFS1 C3_04080W_A HSP70 RIP1 TIM9 TDH3 YCP4 TEF1 PST1 ADH1 PST3 C6_04250W_A PST2 YPT1 RCT1 PGK1
Pared celular	26,30%	YWP1 ENO1 GLX3 HSP70 DDR48 WH11 TDH3 HSP12 TEF1 CYP1 GPM1 ADH1 TAL1 PST2
Membrana plasmática	19,30%	ENO1 HSP70 RIP1 TDH3 YCP4 PST1 ADH1 PST3 PST2 YPT1 PGK1
Envoltura mitocondrial	17,50%	SOD1 COX17 TRX1 C3_04080W_A RIP1 TIM9 CYP1 GPM1 C6_04250W_A YPT1
Núcleo	15,80%	SOD1 TRX1 ENO1 C3_04080W_A HSP70 HSP12 CYP1 TAL1 ACB1
Región extracelular	15,80%	YWP1 SOD1 ENO1 TEF1 COI1 ADH1 UBI3 CR_01280C_A ACB1
Componente celular	12,30%	CR_03020C_A C1_13260W_A ASR3 C6_02100W_A GLO1 BLP1
Vacuola	10,50%	TRX1 ENO1 TFS1 TEF1 CR_01280C_A APR1
Peroxisoma	8,80%	ARF2 TDH3 MLS1 CYP1 ACH1
Punto de crecimiento	5,30%	TPM2 CMD1 YPT1
Ápice de la hifa	5,30%	TPM2 CMD1 YPT1
Sistema membranoso	5,30%	ARF2 CMD1 YPT1
Aparato de Golgi	3,50%	ARF2 YPT1
Citoesqueleto	3,50%	TPM2 CMD1
Yema	3,50%	TPM2 CMD1
Cromosoma	3,50%	CYP1 PST3
Ribosoma	1,80%	UBI3
Retículo endoplásmico	1,80%	YPT1
Cortex celular	1,80%	TPM2
Microtúbulos	1,80%	CMD1
Otros	8,80%	OFR1 HSP21 C3_06920W_A C2_07630C_A RBP1

### III.4. Reintegración del Gen *GLX3*

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se identificó una proteína producto de la secuencia *orf19.251*. Esta proteína de 29 kDa, se encontró de forma consistente en el estudio proteómico de los extractos etanólicos de ME de las biopelículas (Blanes, 2012), así como en el presente estudio, siendo una de las proteínas más abundantes entre los 57 comunes a todos los aislados analizados, así como en la cepa control.

El *orf19.251*, en su análisis en <http://www.candidagenome.org/>, indica que corresponde al gen *GLX3*, que codifica para una proteína Glx3 con actividad glioxalasa III, con actuación en procesos de catabolismo, así como frente a estrés oxidativo. Es capaz de unirse a Inmunoglobulina E humana. Se encuentra aumentada en la fase estacionaria, así como en la formación de biopelículas. Ha sido localizada tanto en la ME de las biopelículas como en la pared de hifas y levaduras. Así mismo, con respecto a su localización celular, se encuentra también en el citosol.

En el estudio mencionado anteriormente (Blanes, 2012) se obtuvo un mutante heterocigoto y otro homocigoto para dicho gen, indicando que la falta del mismo podría afectar a la formación de la pared célula. En dicho trabajo no se realizó la reintegración del gen, el cual se ha abordado en el presente trabajo dado que es sumamente importante conocer si realmente el efecto indicado en el estudio realizado por Blanes, era debido a la falta de la proteína Glx3 o por alteraciones producidas en la obtención de los mutantes.

#### III. 4. 1. Obtención del reintegrante

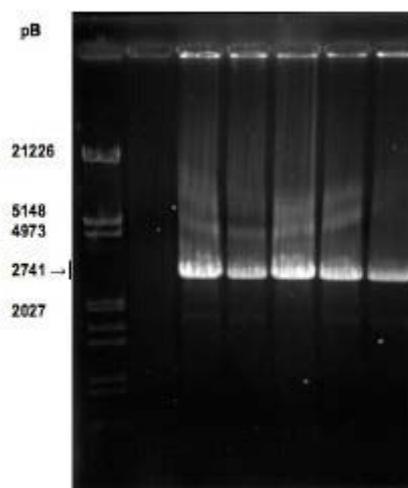
Para la obtención de la cepa reintegrante para el gen *GLX3*, nos basamos en la metodología del *cassete SAT1 flipper*, utilizando un casete que contiene un marcador dominante para resistencia a nurseotricina, adaptado a *C. albicans* para la selección de los transformantes integrativos.

La secuencia *orf19.251* se amplificó por PCR, utilizando como molde DNA genómico de la cepa SC5314 de *C. albicans*. Se utilizaron los oligonucleótidos cebadores purificados por HPLC, GLX3PF y GLX3PR para amplificar tanto el gen como parte de la

zona promotora y terminadora (1000 pares de bases por arriba y 800 por abajo).

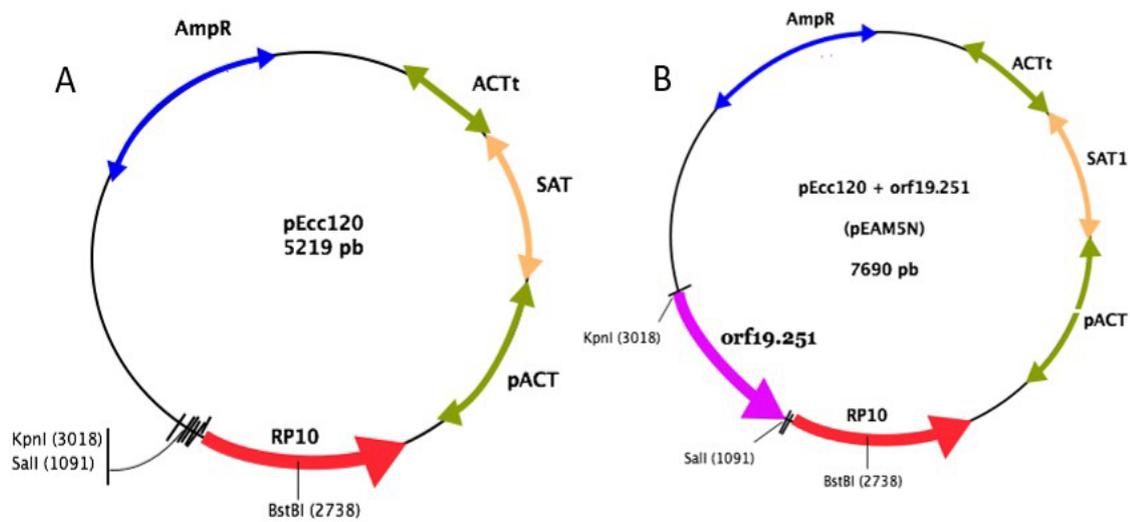
A fin de obtener la amplificación de la secuencia sin errores, se realizó una PCR de “alta fidelidad” utilizando la polimerasa KAPA HiFi™, la cual requiere unos parámetros óptimos de utilización, siendo la temperatura el parámetro crítico. Utilizamos una temperatura de hibridación de 68°C, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se comprobó el tamaño de amplicones de la *orf19.251* mediante electroforesis en gel de agarosa y las bandas correspondientes se purificaron mediante el kit comercial GeneJet Gel Kit (Thermo Scientific®) (Figura III.13).



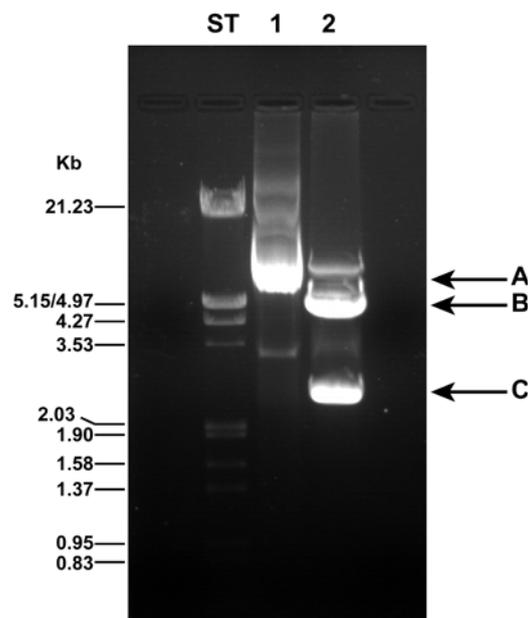
**Figura III.13.** Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de *orf19.251*-EXT con un tamaño de banda de 2.471 pares de bases.

La clonación del amplificado se realizó en el vector pJet1.2/blunt, se procedió a la construcción del *cassete* de integración en el vector pEcc120 y, finalmente, transformación de la cepa DH5α de *E. coli* (Blanes, 2012). A partir de esta cepa de *E. coli* que posee el plásmido pAEM5N (vector pEcc120 conteniendo la secuencia *orf19.251*) (Figura III.14), se procedió a la obtención del ADN plasmídico de la bacteria mediante la utilización del kit GeneJET® Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific®), siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Figura III. 14. A.** Mapa del plásmido de integración. **B** Mapa del plásmido de integración del *orf19.251* en el vector pEcc120. (D' Enfert *et al.*, 2009)

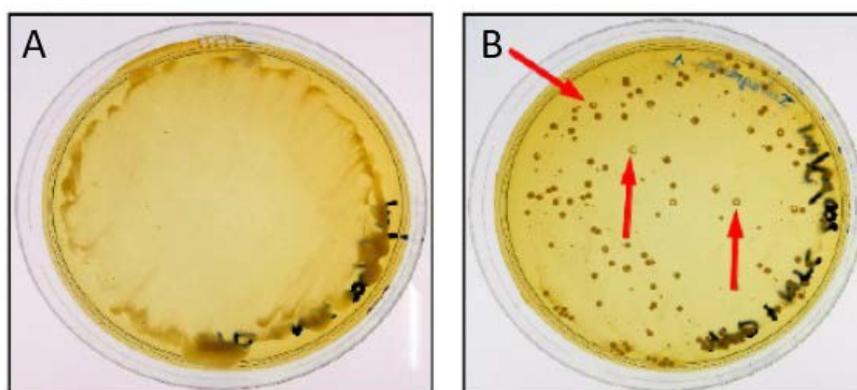
Para la comprobación de la presencia de la secuencia *orf19.251*, el plásmido pAEM5N fue digerido con *KpnI* y *Sall*, y a continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa en la que se analizó el plásmido pAEM5N sin digerir y digerido (Figura III.15).



**Figura III. 15.** Comprobación de la presencia de la secuencia *orf19.251* mediante electroforesis de la digestión del plásmido pAEM5N por *KpnI* y *Sall*. Calle 1: plásmido sin digerir en su forma normal y superenrollada; calle 2: plásmido digerido, la banda **A** plásmido sin digerir, **B** el vector pEcc120 siendo la banda **C** el inserto (*orf19.251*).

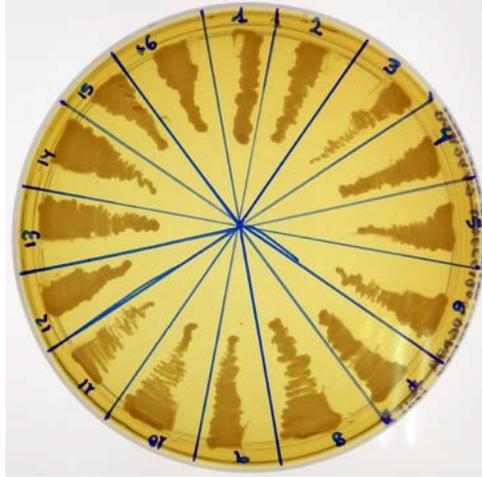
Una vez comprobada la presencia de la secuencia *orf19.251*, el plásmido se linealizó digiriéndolo con la enzima *BstBI*, cuyo lugar de corte es la región *RP10* del vector pEcc120, y posteriormente fue purificado utilizando el kit de extracción GenJet® (Gel Extraction Kit de Thermo Scientific®).

El ADN una vez linealizado y purificado se utilizó para transformar la cepa homocigota *glx3/glx3* (cepa H29Δ2). La transformación mediante electroporación se llevó a cabo utilizando el método de Reuss *et al.* (2004) ligeramente modificado. Se utilizaron colonias de la cepa H29Δ2 preincubadas durante toda la noche a 28°C en medio YPD. Tras llevar a cabo la transformación por electroporación y pasadas 4 horas de incubación a fin de que se expresase la resistencia a nurseotricina, las células se sembraron en placas de YPD que contenían 200µg/ml de nurseotricina y se incubaron a 28°C durante 48 horas. (Figura III.16).



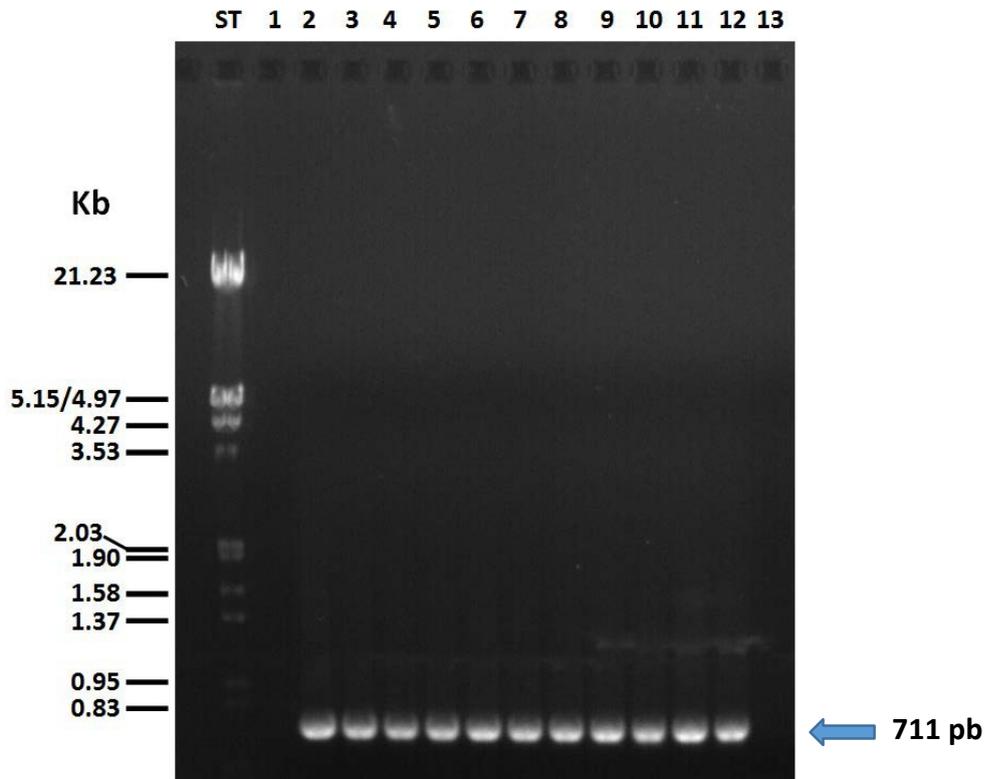
**Figura III. 16.** A) Control negativo Cepa *glx3/glx3* de *C. albicans*. B) Colonias de transformantes de *C. albicans* conteniendo la secuencia *orf19.251*. Las flechas indican alguna de las 10 colonias que se tomaron para la comprobación de la internalización del plásmido mediante PCR.

De entre las colonias de los transformantes obtenidos se seleccionaron 16 colonias que fueron resembradas en una placa de YPD-nurseotricina (200µg/ml). (Figura III. 17).



**Figura III. 17.** Placa de YPD-nurseotricina. Crecimiento de las 16 colonias seleccionadas.

Para el análisis de los transformantes por PCR, se seleccionaron los 10 primeros y se obtuvo el ADN por el método de Nobile y Mitchell (2009), realizando una PCR a fin de comprobar la internalización del plásmido. Los oligonucleótidos utilizados para realizar la comprobación fueron GLX3F-FUSB y GLX3R-FUSB. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Figura III. 18), observándose una banda de 711 pb que corresponde al *orf19.251* en el control positivo (SC5314) (calle 2) y en los 10 clones seleccionados (calles 2 a 12). En el control negativo (*glx3/glx3*), calle 1, no se observó la banda de 711 pb.



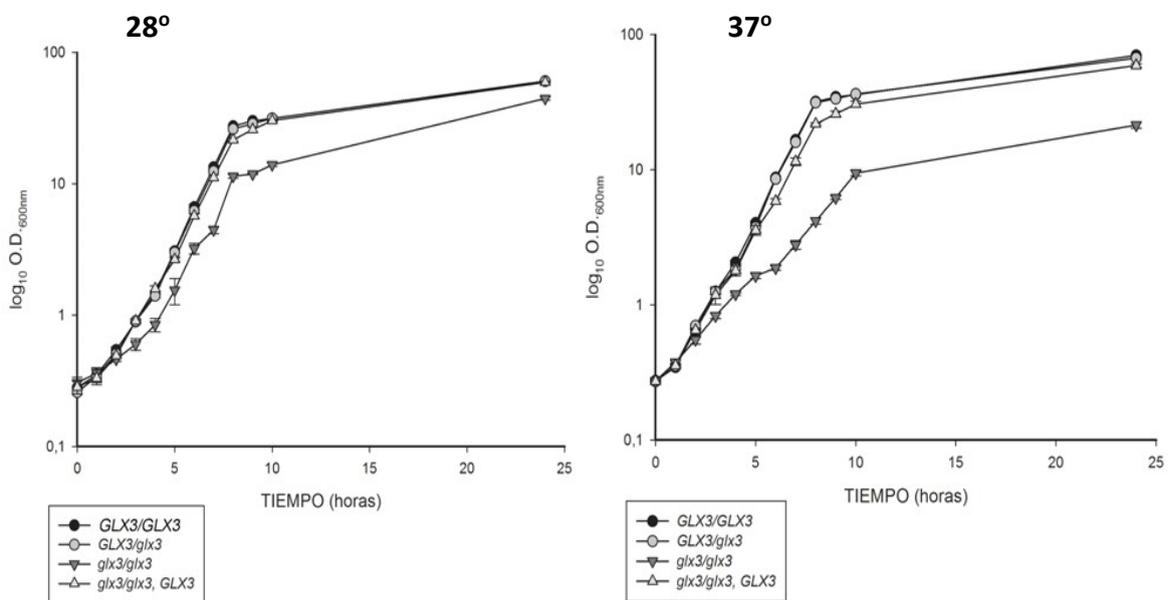
**Figura III. 18.** Análisis por PCR de 10 de los transformantes. Controles negativos: calles 1 (*glx3/glx3*) y 13 (control negativo de amplificación). Calle 2, control positivo (cepa SC5314). Calles 3 a 12: clones seleccionados para su estudio.

### III. 4. 2. Análisis fenotípico de los mutantes heterocigoto, homocigoto y del reintegrante para el gen *GLX3*

Para poder determinar las posibles funciones de la proteína Glx3, se realizó un análisis fenotípico de las cepas mutantes indicadas en el apartado anterior, *GLX3/glx3*, *glx3/glx3* y el reintegrante *glx3/glx3*, *GLX3*. Realizamos estudios tanto de viabilidad como de integridad de la pared celular. En todos los casos utilizamos como cepa control la cepa parental SC5314 (*GLX3/GLX3*).

### III. 4.2.1. Cinética de crecimiento

En la Figura III. 19, se observa la cinética de crecimiento a 28°C y a 37°C, tanto de la cepa control como de los mutantes. Para ello las células se crecieron en medio YPD durante 24h a las temperaturas indicadas. Como se puede observar, a 28°C, tanto el mutante heterocigótico como el reintegrante no presentaron diferencias de crecimiento con respecto a la cepa control. Sin embargo, en el mutante homocigótico, el crecimiento fue algo inferior. Cuando el estudio se realizó a 37°C, la cinética de crecimiento del mutante homocigótico se observó con una mayor afectación.

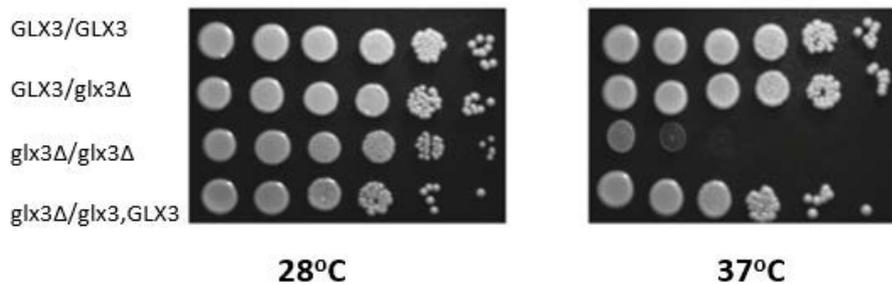


**Figura III.19.** Curva de crecimiento de la cepa parental (SC5314), los mutantes heterocigótico (*GLX3/glx3*), homocigótico (*glx3/glx3*) y el reintegrante (*glx3/glx3, GLX3*) de *C. albicans*. Se partió de una D.O.600nm= 0,3. Las muestras se tomaron cada hora durante las primeras 10 horas y una última muestra a las 24h.

### III. 4. 2. 2. Sensibilidad a la temperatura

El análisis del efecto de la temperatura se realizó en placas de YPD sembradas por goteo de cada una de las cepas a estudiar, incubándose posteriormente a 28°C y a 37°C. Como podemos observar en la Figura III. 20, el mutante heterocigótico no presentó

diferencias significativas con respecto al control, y el reintegrante recuperó el fenotipo parental. En lo que respecta al mutante homocigótico, se observa que es un mutante termosensible, no encontrando diferencias en el crecimiento a 28°C, pero sí un crecimiento muy bajo a 37°C.

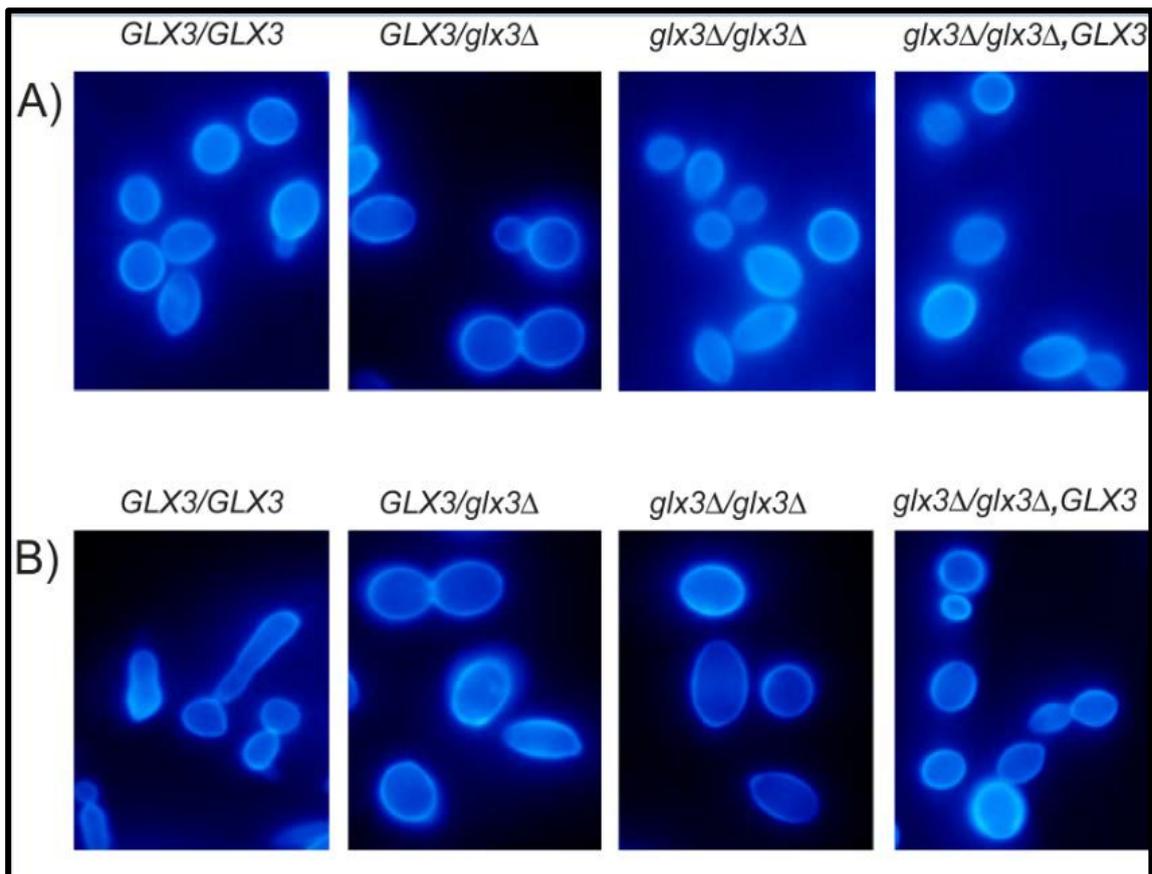


**Figura III.20.** Sensibilidad a temperatura. Cultivos de las cepas SC5314; *GLX3/glx3*; *glx3/glx3* y *glx3Δ/glx3*, *GLX3* crecidos en YPD fueron recogidos por centrifugación. Se hicieron diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-5}$ , y se sembraron 3  $\mu$ l de cada una en medio sólido YPD a 28°C y 37°C.

### III.4. 2. 3. Estudio de la morfología

Se analizó la inducción de la filamentación por suero humano a fin de determinar si la falta del gen *GLX3* influía en la transición de levadura a micelio. En la Figura III.21 el panel A) corresponde a las células a tiempo 0 h y el panel B) transcurridas dos horas de incubación a 37°C en presencia de suero humano. Las células se visualizaron mediante tinción con Calcofluor White y se observaron al microscopio con luz UV.

Como podemos observar, la cepa salvaje SC5314 (*GLX3/GLX3*) es la única que presentó capacidad de formación de hifas. En los mutantes tanto homocigótico como heterocigótico no se observó esta capacidad. El reintegrante no recuperó en dichas condiciones la capacidad de filamentación.



**Figura III. 21.** Formación de tubo germinativo. Las células fueron teñidas con Calcofluor White y visualizadas en el microscopio con luz UV.

#### III. 4. 2. 4. Sensibilidad al Rojo Congo (RC), Calcofluor White (CW), Dodecil Sulfato sódico (SDS), y al estrés oxidativo.

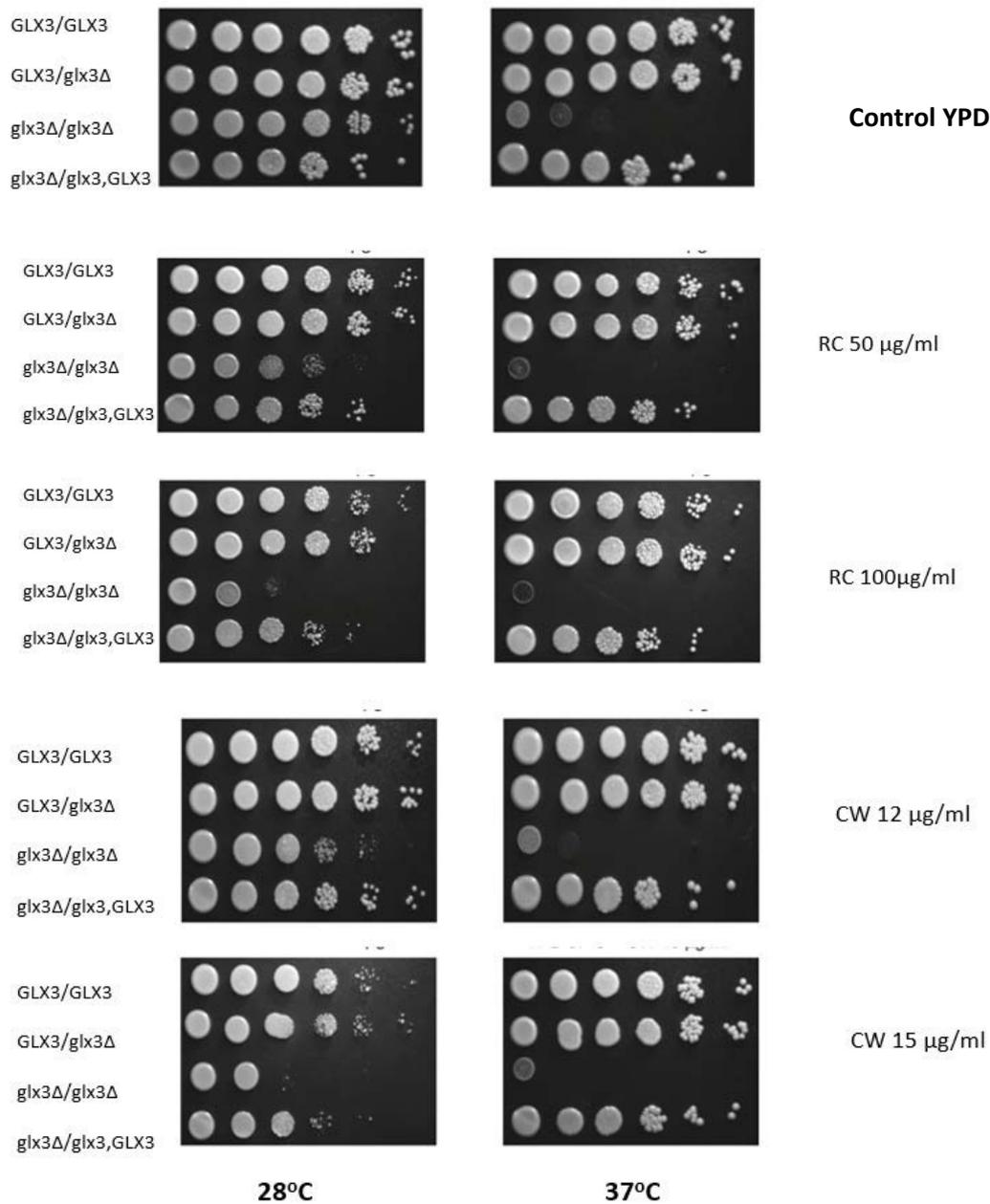
A fin de conocer el efecto de la presencia o no del gen *GLX3* en la biogénesis de la pared celular de *C. albicans*, se realizaron pruebas de sensibilidad a diferentes compuestos que alteran el correcto ensamblaje de los componentes macromoleculares de dicha estructura.

Se estudió la sensibilidad al Rojo Congo (RC), sustancia que interfiere en la formación de las microfibrillas de  $\beta$ -1,3-glucano (Kopecka y Gabriel, 1992) y al Calcofluor White (CW), molécula dipolar que se une a la quitina distorsionando el ensamblaje de los diferentes componentes de la pared (Elorza *et al.*, 1983, Murgui *et al.*, 1985, Ram *et al.*, 1994).

En la Figura III. 22, observamos el efecto de distintas concentraciones tanto de RC como de CFW. Se observó una clara disminución del crecimiento a 28°C para ambos compuestos en el caso del mutante homocigótico *glx3/glx3* en comparación con la cepa parental SC5314, mientras que en el mutante heterocigótico no se observaron diferencias. El reintegrante *glx3/glx3*, *GLX3* recuperó el fenotipo parental.

A 37°C, el crecimiento del mutante homocigótico se encontró muy afectado debido a un efecto aditivo de la temperatura junto con el RC o el CW. El mutante heterocigoto y el reintegrante se comportaron de modo semejante a la cepa control.

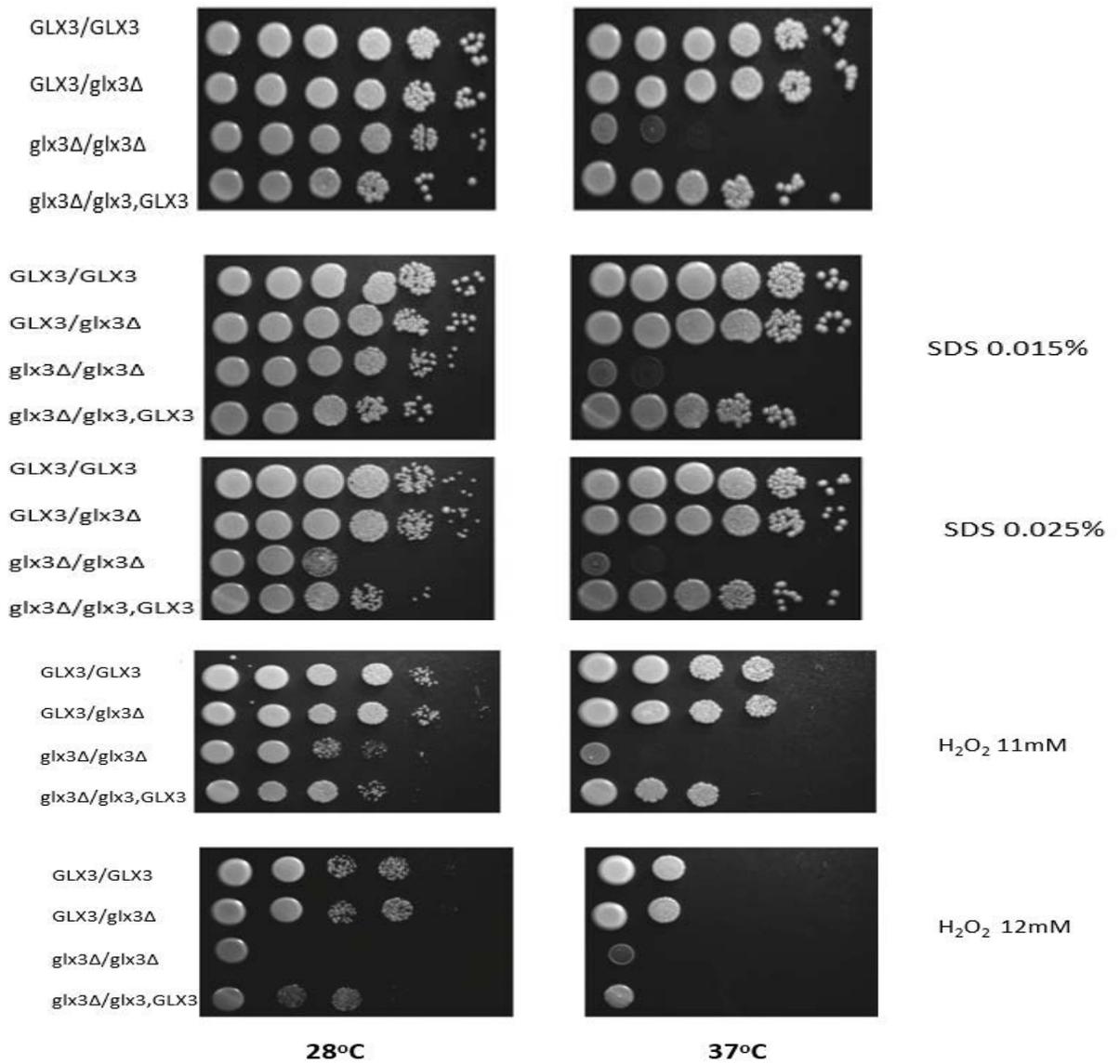
Todo ello indicaría que los efectos observados se deben a la falta de la proteína Glx3, que deriva por lo tanto en una alteración de la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*, dado que el reintegrante recupera el fenotipo parental.



**Figura III. 22.** Estudio de la sensibilidad al Rojo Congo y al Calcofluor White de las cepas SC5314; *GLX3/glx3*; *glx3/glx3* y *glx3/glx3*, *GLX3*. Se hicieron diluciones decimales seriadas de cultivos crecidos en YPD. Se sembraron 3 µl de cada una de ellas en placas de YPD solido que contenían 50 y 100 µg/ml de RC y 12 y 15 µg/ml de CFW. Las placas se incubaron a 28°C y 37°C.

El SDS es un detergente que afecta a la estabilidad de la membrana plasmática y así mismo a la construcción de la pared celular. En el estudio del efecto de las dos concentraciones de SDS empleadas (0.0150% y 0.025%), se observó que el mutante homocigótico presentó una importante una afectación del crecimiento. En el mutante heterocigótico no se observó afectación. El reintegrante recuperó el fenotipo parental tanto a 28°C como a 37°C. A esta última temperatura, el mutante homocigótico presentó una disminución de crecimiento muy marcada, debido a la suma del efecto del SDS junto con la temperatura. (Figura III. 23)

En el estudio del estrés oxidativo exógeno, representado por la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo (11 mM y 12 mM), se observó que el comportamiento era muy semejante al observado en los casos anteriores. El mutante homocigótico fue el que presentaba una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno, observando una baja viabilidad (principalmente en la concentración de 12mM), mientras que en el mutante heterocigótico y en el reintegrante apenas presentaron afectación, comportándose de un modo muy semejante entre ellos y con respecto a la cepa control (Figura III. 23).



**Figura III.23.** Estudio de la sensibilidad al Dodecil sulfato sódico (SDS) y al estrés oxidativo de las cepas SC5314; *GLX3*/*glx3*; *glx3*/*glx3* y *glx3*/*glx3*, *GLX3*. Se hicieron diluciones decimales seriadas de cultivos crecidos en YPD. Se sembraron 3  $\mu$ l de cada una de ellas en placas de YPD solido que contenían SDS 0.015% y 0.025% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11mM y 12 mM. Las placas se incubaron a 28°C y 37°C.

**III. 4. 2. 5. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a fármacos antimicóticos**

Se determinaron las CIM de los fármacos de uso comercial Anfotericina B, Fluconazol, Posaconazol, Voriconazol, Caspofungina, Micafungina, y Anidulafungina para el mutante homocigoto *glx3Δ / glx3Δ* y la cepa salvaje *GLX3 / GLX3* (Tabla III. 9).

No se encontraron diferencias importantes entre el mutante homocigótico y el tipo salvaje, excepto en el caso de la Anfotericina B. El homocigoto *glx3Δ / glx3Δ* mostró una sensibilidad ocho veces mayor a este fármaco en comparación con la cepa control (Tabla III.9.). También se observaron pequeños cambios (dos veces) en los valores de MIC para fluconazol (aumento) y caspofungina (aumento).

**Tabla. III.9.** Sensibilidad a antifúngicos del mutante homocigótico *glx3Δ / glx3Δ* y de la cepa salvaje *GLX3 / GLX3*

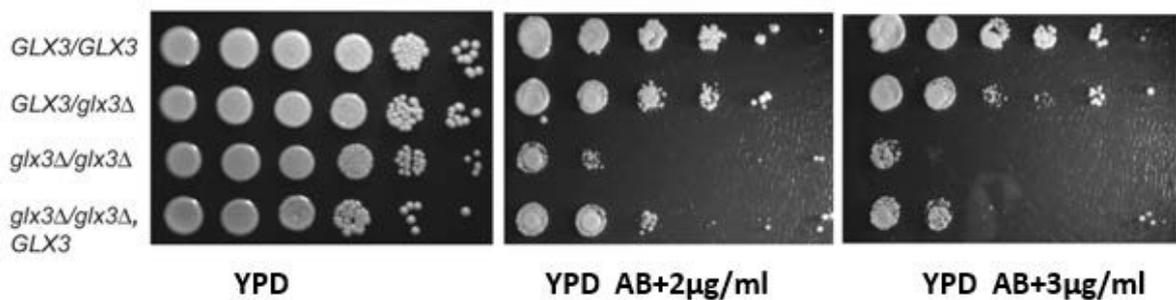
Antifúngico	CMI (µg /ml)	
	<i>GLX3/GLX3</i>	<i>glx3Δ/glx3Δ</i>
Fluconazol	0.250	0.500
Voriconazol	0.016	0.016
Posaconazol	0.016	0.016
Caspofungina	0.125	0.250
Micafungina	0.016	0.016
Anidulafungina	0.016	0.016
Amphotericina B	0.400	0.050

Los valores representan la media de tres experimentos independientes

### III. 4. 2. 6. Sensibilidad a Anfotericina B

Dentro del conjunto de pruebas en la caracterización fenotípica de losmutantes y del reintegrante del gen *GLX3*, evaluamos la sensibilidad frente al antifúngico Anfotericina B el cual demostró su efecto de modo muy marcado en el estudio de la CMI en el mutante homocigótico.

La Anfotericina B es un macrólido poliénico que forma poros hidrofílicos en la membrana plasmática al unirse a los esteroides de la misma, deteriorando su integridad. Se observó una afectación muy importante en el mutante nulo mientras que el heterocigótico y el reintegrante se comportaron de modo semejante entre ellos y con la cepa control. (Figura III.24)



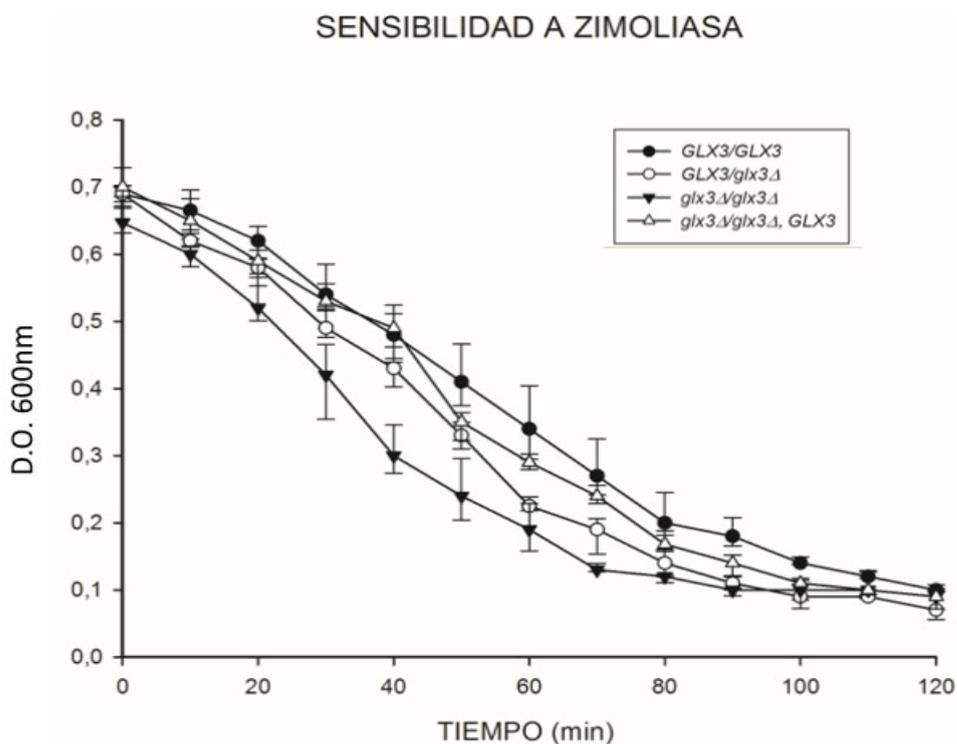
**Figura III. 24.** Sensibilidad a Anfotericina B de las cepas SC5314; *GLX3/glx3*; *glx3/glx3* y *glx3Δ/glx3Δ, GLX3*. Se hicieron diluciones decimales seriadas de cultivos crecidos en YPD. Se sembraron 3 μl de cada una de ellas en placas de YPD sólido que contenían 2 y 3 μg/ml de Anfotericina B. Las placas se incubaron a 28°C.

### III. 4. 2. 7. Sensibilidad a Zimoliasa.

Clásicamente se ha utilizado la sensibilidad a la Zimoliasa (complejo enzimático con actividad β-1,3-glucanasa) en el análisis de posibles cambios tanto en la composición como en la organización de la pared celular de *C. albicans* (Ram *et al.*, 1994; Van der Vaar *et al.*, 1995). Tal como se indica en el apartado II.8.5. de Material y Métodos, se realizó el estudio en cultivos en fase exponencial tanto de la cepa parental SC5314, como de los

mutantes homocigótico y heterocigótico, así como del reintegrante.

En la Figura III. 25, podemos observar que las D.O de los dos mutantes, *glx3/glx3* y *GLX3/glx3*, descendieron más rápidamente que en la cepa control SC5314 (*GLX3/GLX3*), lo que indicaría que el  $\beta$ -1,3-glucano se encuentra más accesible a la Zimoliasa o bien es más sensible a la acción de esta. El reintegrante (*glx3/glx3*, *GLX3*) recuperó de forma parcial el fenotipo parental, aunque la D.O. en su caso fue ligeramente más baja que en la cepa parental pero mayor que en el caso de los mutantes homocigótico y heterocigótico.

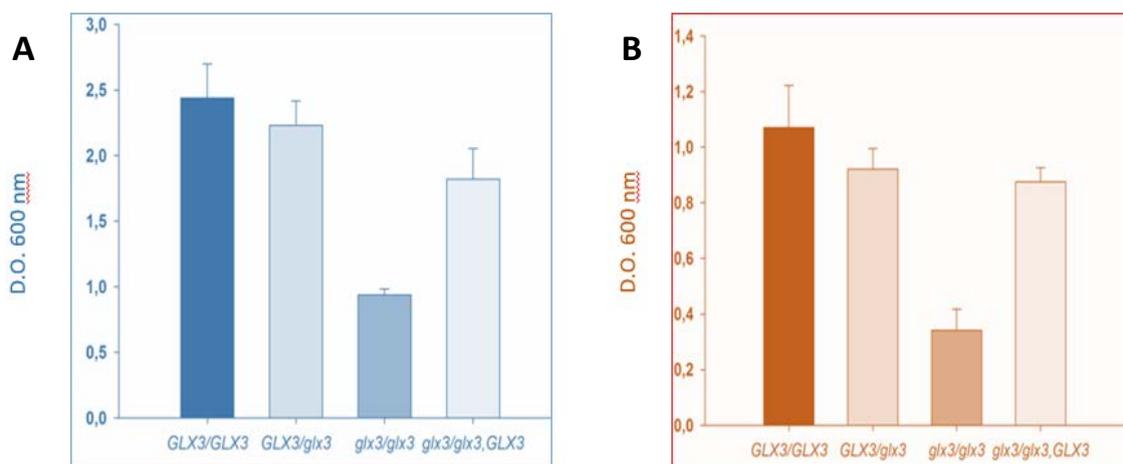


**Figura III. 25.** Sensibilidad a Zimoliasa. Cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas SC5314; *GLX3/glx3*; *glx3/glx3* y *glx3/glx3*, *GLX3* fueron incubados en presencia de Zimoliasa 20T (100 $\mu$ g/ml, en tampón Tris HCl 10 mM pH (7'5) y la variación D.O.<sub>600nm</sub> fue controlada durante 120 minutos.

### III. 4. 2. 8. Formación de Biopelículas

En el estudio de la capacidad de formación de Biopelículas, se utilizó tanto el método del Cristal Violeta (Figura III. 26. Panel A) con el cual se valora la formación de biomasa de la biopelícula, así como el ensayo XTT-Menadiona, que indica la cantidad de células metabólicamente activas (Figura III.26. Panel B).

En los resultados obtenidos se observó que la mayor capacidad de formación de biopelículas (tanto en biomasa como en lo que respecta a células metabólicamente activas) correspondió a la cepa parenteral, SC5314), seguida por el mutante heterocigótico. El mutante homocigoto presentó una marcada disminución en la formación de las biopelículas. El reintegrante recuperó parte de la capacidad de formación de biopelículas, pero no en su totalidad, presentando un comportamiento próximo al heterocigótico, aunque algo inferior.



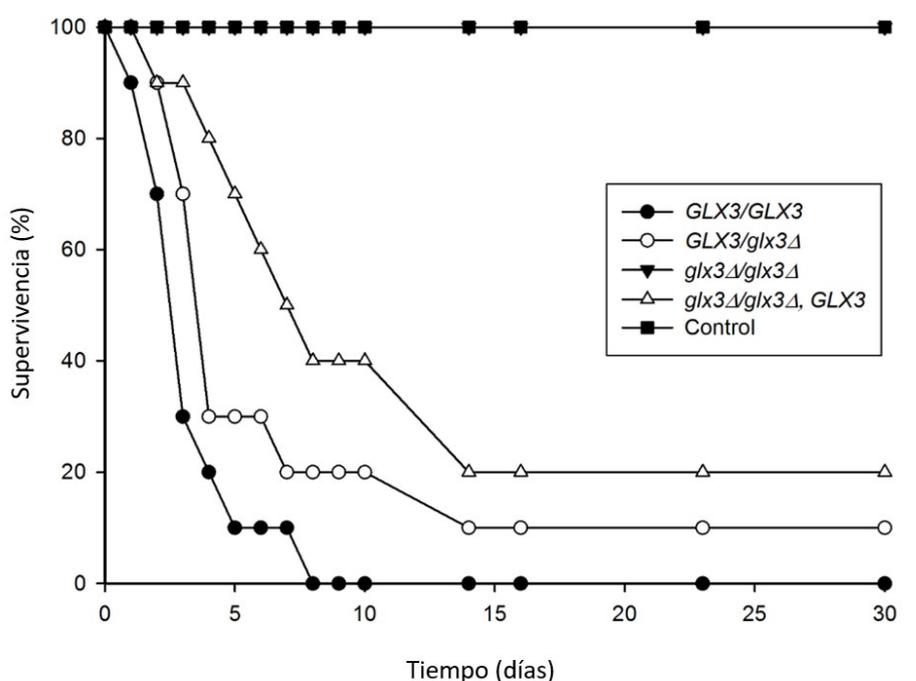
**Figura III. 26.** Formación de biopelículas. A) Estudio mediante Cristal violeta. B) Estudio mediante XTT-Menadiona.

### III. 4. 2. 9. Gen *GLX3* y Virulencia

A fin de conocer la posible implicación del gen *GLX3* en la virulencia de *C. albicans*, se realizó un ensayo de infección en ratones BALB, en el laboratorio de la doctora

Martínez Esparza, en la Universidad de Murcia.

El estudio se llevó a cabo tanto con la cepa parental (*GLX3/GLX3*), como con los mutantes homo y heterocigótico, y el reintegrante siguiendo las pautas indicadas en el apartado II.8.7. de Material y Métodos. Como podemos comprobar en los resultados indicados en la figura III. 27, el seguimiento de la supervivencia de los ratones se realizó durante 30 días. Transcurridos los 8 primeros días, todos los ratones infectados con la cepa parental habían muerto mientras que el 25% de los ratones infectados con la cepa heterocigótica (*glx3* / *GLX3*) permanecieron con vida. En el caso del reintegrante, transcurrido este mismo espacio de tiempo, fueron el 40 % de los ratones los que permanecieron vivos. Los ratones infectados con el mutante homocigótico presentaron una supervivencia del 100% transcurridos los 30 días que duró el experimento, presentando el mismo comportamiento que el control que se realizó inyectando suero salino. Al final del experimento, transcurridos 30 días después de la infección, los ratones infectados con el mutante heterocigoto presentaron una supervivencia del 12%, siendo del 33% en el caso del



**Figura III. 27.** Grafica de supervivencia de ratones infectados con las distintas cepas de *Candida albicans*.

## **IV. DISCUSIÓN**



Entre los distintos factores de virulencia indicados para *C. albicans*, la hidrofobicidad y la formación de biopelículas han sido y son considerados en la actualidad como dos factores muy destacables. En el presente trabajo nos hemos centrado de modo particular en estas dos propiedades analizándolas en 448 aislados clínicos de *C. albicans*, todos ellos procedentes, como se ha indicado, de pacientes con candidiasis sistémicas

La capacidad de formar biopelículas por parte de *C. albicans* en dispositivos médicos implantados, tales como catéteres, válvulas cardíacas, prótesis, etc., contribuye de modo importante a la virulencia del hongo (Kojiic y Darouiche, 2004; Ramage *et al.*, 2006; Uppuluri *et al.*, 2009; Kniemeyer *et al.*, 2011), siendo considerada actualmente esta capacidad como el factor de virulencia más importante en la patogénesis de las especies del género *Candida* (Araújo *et al.*, 2017, Mithcell *et al.*, 2016 a, b). Las células de *C. albicans* que forman parte de las biopelículas (células sésiles) presentan una mayor capacidad de resistencia a los antifúngicos que las células libres (planctónicas), el microambiente que genera la biopelícula permite la aparición de un comportamiento cooperativo de tipo multifactorial (Ramage *et al.*, 2002, 2012; Al-Fattani y Douglas, 2006; LaFleur *et al.*, 2006; Perumal *et al.*, 2007; Bonhomme y d'Enfert, 2013; Desai *et al.*, 2014; Van Acker *et al.*, 2014). Las células sésiles se encuentran en el interior de la biopelícula embebidas por una matriz extracelular que se describe detalladamente en la introducción, dicha ME se encuentra formada por un conjunto de materiales poliméricos, producidos por las distintas células constituyentes de la biopelícula. Dichos materiales envuelven toda la estructura confiriendo protección frente a los distintos factores ambientales (Mitchell *et al.*, 2016 b). La matriz extracelular (ME) representa la característica definitoria del estilo de vida de la biopelícula, siendo en los últimos 20 años un importante objeto de estudio.

La matriz de la biopelícula presenta en muchos aspectos una importancia crítica asociada con el crecimiento de la misma, interviene en las interacciones de adhesión (adhesivas y cohesivas) proporcionando estabilidad mecánica y controlando la dispersión de las células que la forman. Así mismo actúa como un sistema digestivo que

proporciona una fuente de nutrientes para las células presentes en la misma. De un modo especial cabría destacar las importantes implicaciones clínicas debido a la protección de las células frente al tratamiento con antifúngicos, así como frente al sistema inmune. En todas estas acciones merecen especial interés el estudio de las proteínas que forman parte de la ME de las biopelículas, debido entre otros motivos tanto al efecto enzimático que pueden presentar como el de actuar como dianas de reconocimiento para o por otras moléculas.

#### **IV.1. Hidrofobicidad y formación de Biopelículas**

Se conoce desde hace décadas que la superficie hidrofóbica de *C. albicans* contribuye a su patogénesis, siendo capaz el hongo de regular la hidrofobicidad de su superficie dependiendo de la fase de crecimiento y de las condiciones de cultivo (Hazen *et al.*, 2001). La hidrofobicidad es una propiedad intrínseca de las capas externas de la pared celular de *Candida spp.* que induce a su agregación, esta propiedad permite mantener una distancia óptima entre las moléculas de adhesión y los receptores del hospedador, lo que provoca una unión covalente fuerte a la mucosa o a otros sustratos tanto bióticos como abióticos. Dado que la adherencia es el paso inicial en la formación de la biopelícula, la hidrofobicidad podría ser un factor sumamente importante en la formación de las mismas.

Inicialmente se realizó el estudio de la hidrofobicidad de los 448 aislados clínicos junto con la cepa control. De los aislados estudiados, tal como se observa en la figura III.1 el 88% de los mismos presentaron hidrofobicidades semejantes dentro de un rango próximo al 20%, cercano al encontrado para la cepa control SC5314. El resto de aislados un 12 % presentaron hidrofobicidades más dispersas y de un modo especial el aislado nombrado como 437 presentó una hidrofobicidad de aproximadamente el 100%. El comportamiento de los distintos aislados fue por lo tanto en lo que respecta a la hidrofobicidad muy semejante, este dato en principio no sería sorprendente y estaría dentro de lo que inicialmente cabría esperar.

En los estudios de adherencia observamos que el comportamiento es muy distinto, no existiendo una correlación entre la hidrofobicidad y la capacidad de adhesión. Aproximadamente el 70% de los aislados estudiados fueron poco o nada adherente en nuestras condiciones de estudio en el laboratorio, y sin embargo presentaron hidrofobicidades muy semejantes al resto. Los aislados con capacidad adherente, WA y SA, fueron por lo tanto un número muy inferior (el 30%), y aunque en su mayoría presentaron hidrofobicidades próximas al 20% encontramos en estos dos grupos una mayor dispersión que en el resto de aislados.

De los resultados obtenidos con respecto a las dos propiedades conjuntas no se encontró una correlación entre la hidrofobicidad de la superficie de las células estudiadas y su capacidad adherente (formación de biopelículas). Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Muadcheingka y Tantivitayakul (2015) y Borghi *et al.*, (2011). En el estudio de aislados de *C. albicans* y no *albicans* (NAC) procedentes de la cavidad oral, y de candidiasis sistémicas, estos autores observaron que en el caso de *C. albicans* no se podía establecer una correlación entre la hidrofobicidad y su capacidad de formar biopelículas. Hecho que si ocurría con especies NAC, estas especies (tales como *C. glabrata*, *tropicalis* o *parapsilosis* entre otras), presentan un mayor grado de hidrofobicidad. La hidrofobicidad media obtenida por estos autores, el caso de *C. albicans*, fue semejante a la obtenida en el presente estudio, siendo aproximadamente entre un 17 y un 20%. Para los aislados NAC estos autores encontraron una alta hidrofobicidad (con valores de entre el 40% y el 50%) mostrando en estos casos una correlación positiva con la formación de biopelículas.

Los resultados obtenidos indicarían que, aunque la hidrofobicidad *C. albicans* es relativamente baja con respecto a otras especies NAC, su capacidad de formar biopelículas fuertes podría explicarse por la gran variedad de adhesinas que presenta y su capacidad de adaptación a las distintas condiciones del ambiente en el que se encuentra. La hidrofobicidad podría ser por lo tanto la responsable del inicio del proceso de adhesión, pero posteriormente pasaría a desempeñar un papel menor en la formación de las biopelículas de este hongo.

La gran mayoría de los aislados no formadores al igual que los poco formadores presentan un rango de hidrofobicidades acotado en el intervalo de 0 a 20%, presentando el máximo cercano al 10%. En el caso de medio y muy formadores (WA, SA) aunque los máximos se encuentran de igual modo próximos al 10% observamos una mayor dispersión de los mismos. Inicialmente este dato puede ser llamativo porque cabría esperar una mayor relación entre la hidrofobicidad de la célula y su adhesión a materiales abióticos. Pero realmente en lo que respecta a los experimentos “*in vitro*”, posiblemente lo que ocurra sea que las proteínas de adhesión (Adhesinas, hidrofobinas, etc.) sean moléculas cuya expresión aparezca en la pared en el momento del contacto y sean las hidrofobinas las que le dan este carácter hidrofóbico en el punto de anclaje para el inicio de la adhesión. A partir de dicho punto existiría un aumento de las moléculas responsables de la adhesión y del crecimiento de la biopelícula.

Los mecanismos utilizados por *C. albicans* para adherirse a las diversas superficies biológicas o inertes, son múltiples. Como conocemos la virulencia y la adhesión varían en función de numerosos factores como pueden ser la cepa estudiada, las condiciones ambientales, la vía de penetración del hongo en el hospedador, el estadio del proceso infeccioso, la naturaleza de la respuesta inmune por parte del hospedador, etc., De ahí la complejidad de su estudio y la necesidad de profundizar en dichos aspectos.

#### **IV.2. Estudios de Proteómica**

En las últimas décadas algunos autores han sugerido la posible relación entre el material que las células plantónicas de *C. albicans* excretan al medio de cultivo y la composición polipeptídica de la ME de las biopelículas (Thomas *et al.*, 2006). Sorgo *et al.*, (2010) realizaron un estudio del “secretoma” de *C. albicans* en diferentes condiciones de cultivo mediante cromatografía líquida en tándem y espectrometría de masas. En dicho estudio encontraron un total de 79 especies proteicas diferentes y de ellas 44 son proteínas de secreción y 28 proteínas de origen citosólico carentes de péptido señal. Parte de estas proteínas podrían alcanzar el espacio extracelular debido

---

a lisis celular, pero este no sería el único modo por el que las proteínas podrían alcanzar dicha ubicación fuera de la membrana plasmática, también podrían utilizar vías secretoras no canónicas o ser exportadas mediante exosomas (Chaffin, 2008; Gil-Bona *et al.*, 2015; Gómez-Molero *et al.*, 2016; Nimrichetcher *et al.*, 2016; Nombela *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2015; Wolf y Casadevall, 2014).

En el análisis proteómico de los extractos etanólicos de la ME de los 9 aislados clínicos analizados en el presente trabajo (3 del grupo SA, 3 MA y 3 WA) así como de la cepa control SC5314, encontramos un total de 905 especies proteicas. La gran mayoría de ellas se encontraron presentes solo en los aislados muy formadores y cepa control, presentando una media entre todos ellos de 708 proteínas. En los otros aislados MA y WA la cantidad de especies proteicas encontradas fue significativamente más baja, una media de 148 en las MA y de 143 en las WA. Esta notable diferencia en el número total de especies proteicas en los extractos etanólicos de la ME de las biopelículas, posiblemente sea debido al hecho de que tanto los aislados clínicos muy formadores como la cepa control forman biopelículas muy fuertes y resistentes tras 24 h de cultivo. Estas biopelículas son muy maduras a las 48 horas pudiendo ocurrir por ello que las condiciones en el interior de la misma sean complicadas para las células que la forman, provocando una mayor muerte celular, así como un comportamiento hacia una mayor defensa de las células presentes en interior de la matriz. En el resto de aislados, aunque el comportamiento en lo que respecta al crecimiento de las biopelículas es relativamente distinto inicialmente, a las 24 horas las medianamente formadoras inician una biopelícula muy lábil y las poco formadoras presentan solo zonas de inicio de adhesión. A las 48 h, tanto unas como otras recubren prácticamente la superficie de las botellas, pero se comportan como biopelículas frágiles y con una gran tendencia a separarse de la superficie

En el estudio del total de estas proteínas (<http://www.candidagenome.org/>) observamos que se encuentran implicadas en un alto número de procesos celulares, en nuestro estudio las encontramos en un total de 248, de ellos la gran mayoría están relacionados con la organización de orgánulos celulares, regulación metabólica, y respuesta al estrés. En el análisis de sus funciones las encontramos clasificadas en 63 categorías, presentando principalmente funciones metabólicas como hidrolasa,

oxidoreductasa y transferasa, presentando también interés la unión a proteínas y la regulación enzimática.

En estudio de proteínas comunes para cada grupo de aislados por separado, pudimos encontrar que los comportamientos obtenidos son de modo general muy semejante en todos los casos, aunque podamos encontrar algunas matizaciones. En el caso de las muy formadoras su comportamiento es muy parecido a las proteínas totales, lo cual cabría esperar dado que el 84% de las proteínas encontradas en el análisis proteómico se encuentran presentes en este grupo de aislados.

En el estudio de localización, función y proceso de proteínas comunes en los aislados MA y WA, se observó que el comportamiento entre estos dos grupos es muy semejante, y se mantienen prácticamente los datos generales. Las actividades oxidoreductasa, hidrolasa y de transporte, así como de defensa a estrés, aparecen de modo constante en todos los casos.

Esta semejanza que encontramos en todos los aislados es, de modo general, la encontrada por diversos autores (Sorgo *et al.*, 2010, 2013; Martínez *et al.*, 2016; Martínez-Gomáriz *et al.*, 2009). Datos que comentaremos más adelante.

El hecho de encontrar un gran número de especies proteicas distintas pero pertenecientes a familias con función semejante hizo pensar que el estudio de las proteínas comunes en todos los aislados junto con la cepa control, podría aportar mayor información sobre las proteínas y la ME. En este caso se observó un número reducido de especies proteicas, fueron 57. En el análisis detallado de estas proteínas, observamos que las funciones se mantienen de un modo claro, siendo sumamente importante la función oxidoreductasa, junto a la adhesión, así mismo encontramos proteínas con actividades hidrolasa, transferasa e isomerasa. Estos datos son importantes considerando la protección y defensa que el entorno de la ME proporciona a las células que forman la biopelícula con respecto a los agentes antifúngicos y al estrés, así como a la unión a proteínas y a la obtención de metabolitos.

Podemos observar dentro de las 57 proteínas, que gran parte de ellas no solo se encuentran de modo ubicuo en distintos compartimentos celulares, sino que además se

---

encuentran implicadas en distintos procesos, serían pues proteínas “multifunción” que actuarían dependiendo de su localización en la célula. Nombela *et al.*, en 2006 ya describieron que enzimas glicolíticas presentes en la pared de *C. albicans* podían también actuar como adhesinas. Como ejemplo de estas proteínas multifunción entre los 57 comunes podemos destacar entre otras Sod1 (superóxido dismutasa), Eno1 (enolasa) proteínas de Shock térmico como Hps21 y Hps70, Aco 1 (aconitasa), Tdh3 (triosa fosfato deshidrogenasa), Adh1 (alcohol deshidrogenasa), Ywp1 (Pared celular), Glx3 (Glioxalasa).

En un estudio anterior realizado por nuestro grupo ( Martínez *et al.*, 2016), se encontraron un total de 71 polipéptidos en los extractos etanólicos de la ME de *C. albicans* CA14-URA3, de ellos 19 ( Aco1, glx3, eno1, adh1, pgk1, tal1, Pmu1, Cpr3, Rbp1, Pst3, Cyp1, Trx1, Hsp70, Hbr2, Ypt1, Tdh3, Gpm1, C2\_07630, Orf1) se encuentran entre las 57 comunes en nuestro estudio, el resto de especies aunque no se encontraron entre estas sí que las encontramos en el estudio de proteómica total, principalmente entre las muy formadoras. De estas 71, Guk 1, Ade 8, Mms2, Uga 1, Nit 3, fueron las únicas proteínas que no encontramos en nuestro estudio, número muy bajo y explicable tanto por la cepa utilizada como por las condiciones del análisis. El número de especies proteicas tan elevado encontrado en el presente trabajo tendría su explicación en el hecho de que, aunque las condiciones de obtención de las biopelículas y de los extractos fue idéntico al de Martínez *et al.*, (2016), la técnica utilizada para el análisis proteómico es muy sensible, lo que explicaría este mayor número de proteínas encontradas. Así mismo la cepa control utilizada fue distinta y como observamos en todos los estudios realizados existen variaciones dependiendo de las cepas en estudio.

Comparando las especies proteicas encontradas en el presente trabajo con otros análisis proteómicos de *C. albicans*, como en el caso de Sorgo *et al.*, (2010), en donde estos autores analizaron sobrenadantes de medio de cultivo en diferentes condiciones, encontrando proteínas con funciones principalmente hidrolíticas y de remodelación de la pared celular. En el estudio proteómico de sobrenadantes de medio de cultivo del hongo (secretoma) analizaron de un modo detallado 51 proteínas, la gran mayoría de ellas se encuentran presentes en el total de proteínas de nuestro estudio, y claramente en los aislados muy formadores. En el secretoma de hifas encontraron principalmente

Als3, Csa2, Coi1, Rbt4, Ubi3 encontradas en nuestro estudio y Sap4 y Sap 6 que no se encuentran en nuestro estudio. La única especie Sap encontrada en los extractos de las muy formadoras y control fue Sap5, proteasa descrita en la formación de biopelículas (Winter, *et al.* 2016.) En el secretoma de levadura estos autores encontraron principalmente Bg12, Cht3, Eng1, Rbe11, Sim1, y Xog1, Ywp1 encontradas en nuestro estudio principalmente en las muy formadoras, y proteínas como Dag7 (proteína de secreción que se activa en la formación de clamidosporas) y Pir 1 (reprimida en la formación de biopelículas) que no se encuentran en nuestro estudio.

Dentro de las proteínas comentadas, Ywp1, Coi1 y Ubi3 las encontramos entre las 57 proteínas comunes en todos los aislados de nuestro estudio, son proteínas de secreción presentando péptido señal. Ywp1p Juega un papel importante en la diseminación de las células por el torrente sanguíneo, los mutantes de esta proteína presentan una mayor adhesión de las biopelículas (Granjer *et al.*, 2005). Coi1p es una proteína (ciclopirox olamine induced) que se encuentra conservada solo en *C. albicans*, *C. dublinensis*, *C. tropicalis*, y *Lodderomyces elongisporus* y en todos los casos se considera implicada en infecciones sanguíneas en humanos (Sorgo *et al.*, 2010, 2013).

*C. albicans* necesita sobrevivir en condiciones muy diversas, lo que le hace desarrollar diferentes capacidades de virulencia que rápidamente se adaptan a las condiciones locales de crecimiento y a los mecanismos de defensa del hospedador (Sorgo *et al.*, 2013). Esto hecho conlleva la secreción de un importante número de proteínas que se encuentran involucradas en la formación de biopelículas, adhesión, invasión de tejidos, evasión del sistema inmune, mantenimiento de la pared celular y adquisición de nutrientes. Todo ello explicaría las diferencias encontradas dependiendo de las condiciones de estudio.

Martínez-Gomáriz *et al.*, (2009), identificaron 36 polipéptidos en el subproteoma de proteínas unidas a la superficie de células sésiles, en el estudio anterior de nuestro grupo (Martínez *et al.*, 2016) de estas encontramos 16, en el estudio actual todas ellas se encuentran presentes en los extractos de las muy formadores y de modo común en todos los aislados analizados encontramos Eno 1, Pgc1, Adh1, Tal 1, tfs1, Tpm2, Cpr3, Sod1, Rbp1, Glx3. Este dato de cerca del 18% de proteínas comunes, es interesante,

debido que a pesar de la gran variedad de proteínas encontradas estas se mantienen. Estas proteínas podrían presentar un papel esencial en la biología de las biopelículas. Teniendo presente que no solo las condiciones de cultivo y las cepas estudiadas son distintas, sino que además el modo de extracción es diferente. En el caso de Martínez Gomáriz *et al.*, (2009), utilizaron B-mercaptoetanol.

Zanowski *et al.*, (2014) encontraron mediante técnicas de proteómica un total de 565 proteínas diferentes en la ME de las biopelículas de *C. albicans*. De todas ellas 458 proteínas, implicadas en procesos metabólicos son coincidentes con lo encontrado en nuestro trabajo. En el estudio que estos mismos autores realizaron “*in vivo*”, encontraron 16 proteínas Tdh3, Eno1, Atp2, Pgc1, Hsp70, Cit1, Ald5, Mdh1, Tal1, Atp1, Ssb1, Pma1, Hxk2, Acs1, Msh1, Gpm1. Todas ellas fueron encontradas en el total de nuestro estudio, aunque no en todos los aislados.

Entre los distintos trabajos observamos diferencias en cuanto al número total de proteínas encontradas en la ME. Este hecho es debido a que tanto el secretoma de *Candida*, como las biopelículas presentan un comportamiento dinámico y va a depender tanto de las condiciones de cultivo como de la situación de estrés a las que estén sometidas las células, así como de la cepa utilizada. De igual modo los métodos de extracción y la metodología de análisis hacen patente la diferencia en la obtención de material. Las biopelículas son un hidrogel por lo que las proteínas presentes en las mismas están en un ambiente altamente hidrofílico, la utilización por lo tanto de distintos métodos de extracción de las mismas influirá de un modo claro en la cantidad y tipo de material proteico que encontremos. De igual modo los métodos de análisis empleados en los distintos estudios son distintos y en nuestro caso presenta un alto grado de sensibilidad.

### **IV.3. Estudios del gen *GLX3***

En estudios previos realizados por nuestro grupo, así como por otros grupos de investigación, en los perfiles proteómicos obtenidos tanto de los extractos de la Matriz Extracelular de las biopelículas (Martínez *et al.*, 2016) como de paredes celulares aisladas (Castillo *et al.*, 2008, Gil-Bona *et al.*, 2015), se observó que una de las proteínas

presentes de modo abundante y común en todos los casos fue Glx3. Esta proteína es una proteína “pluriempleo” con actividad glicosilasa glutatión independiente (Hasim *et al.*, 2014), capaz de unirse a IgE humana, que podría estar relacionada con afecciones de tipo alérgico en humanos, tales como asma bronquial, rinitis alérgica o dermatitis atópica (Savolainen *et al.*, 1993, Akiyama *et al.*, 1994). Ortólogos de Glx3 han sido identificados en otras especies del género *Candida* como *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*.

En un estudio anterior realizado por nuestro grupo (Blanes, 2012), se obtuvo un mutante homocigótico y otro heterocigótico para el gen *GLX3*, observando en los estudios fenotípicos realizados que la delección de dicho gen afectaba a la integridad de la pared celular, así como a la patogenicidad de *C. albicans*. En el estudio indicado los análisis fenotípicos se realizaron con ambos mutantes, homocigótico y heterocigótico, no habiéndose obtenido el reintegrante para el gen *GLX3*. La obtención del mismo y su estudio fenotípico comparativo es de sumo interés a fin de poder confirmar si los efectos fenotípicos encontrados eran debidos a la falta de proteína Glx3 o producidos por alteraciones provocadas en la obtención de los mutantes. Dicho reintegrante ha sido obtenido en el presente trabajo, sometiendo al mismo (*glx3Δ /glx3Δ*, *GLX3*), a los mutante homocigótico (*glx3Δ / glx3Δ*) y heterocigótico (*GLX3/glx3Δ*), así como a la cepa control SC5314 (*GLX3/GLX3*) a distintos estudios fenotípicos comparativos.

En lo que respecta a la cinética de crecimiento tanto el mutante heterocigotico como el reintegrante presentaron un comportamiento muy semejante entre ellos y con respecto a la cepa control SC5314, tanto a 28°C como a 37°C. El mutante nulo *glx3Δ / glx3Δ*, si presento afectación, a 28°C la diferencia es poco marcada, pero si en su cinética de crecimiento a 37°C, a dicha temperatura a partir de las 5 horas de cultivo ya se observaron diferencias notables y a las 24 horas se obtuvo una disminución de crecimiento del 75%. Dada la termosensibilidad del mutante homocigótico gran parte de los experimentos se realizaron a 28°C.

En el estudio de la formación de biopelículas, el mutante nulo fue el que presentó una menor capacidad de formación, prácticamente un 60 % menos que la cepa control en lo que se refiere a la cantidad de biomasa de biopelícula formada (medida por el método del cristal violeta). El comportamiento fue semejante cuando se procedió a la medida de la actividad metabólica en la biopelícula (determinada por el método XTT). En el mutante heterocigótico la disminución fue poco marcada, una única copia del gen hace que se mantenga de modo importante la capacidad de formación de biopelículas. En lo que respecta al reintegrante, la capacidad de formación de biopelículas se recuperó solo en parte. Estos resultados indican por tanto que la afectación que presenta el mutante nulo en la formación de biopelículas es claramente debido a la falta del gen *GLX3*.

La capacidad de filamentación por un inductor, como es la presencia de suero humano al medio de cultivo y la temperatura a 37°C, solo la presentó la cepa control, ni los mutantes, ni el reintegrante presentaron dicha capacidad en las condiciones estudiadas.

En el presente estudio hemos demostrado que la falta de la proteína Glx3 causa fenotipos que sugieren que dicha proteína se encuentra involucrada en la arquitectura de la pared celular. La sensibilidad a Calcofluor White (CW) y al Rojo Congo (RC) mostrada por el mutante nulo *glx3Δ / glx3Δ* indica que dicha estructura se encuentra afectada; CW y RC son compuestos que interfieren en el ensamblaje correcto de quitina y 1,3-β-glucano respectivamente (Cabib y Bowers, 1971; Kopecka y Gabriel, 1992). El efecto a 28°C, se observó muy marcado en el mutante homocigótico, en el análisis a 37°C el efecto fue todavía mayor en dicho mutante, pero aquí hay que tener presente la suma del efecto de los agentes estudiados y la termosensibilidad del mismo. El reintegrante recupera el fenotipo inicial de la cepa control comportamiento también muy semejante en el mutante heterocigótico, indicando por lo tanto que los efectos observados son debidos a la pérdida del gen *GLX3*.

En lo que respecta al efecto del detergente SDS (compuesto que afecta a la estabilidad de la membrana plasmática y de modo indirecto a la construcción de la pared celular) y al estrés oxidativo. El efecto se encuentra en sintonía al encontrado en los

casos anteriores, a mayor concentración del agente estudiado mayor efecto, observándose la recuperación de fenotipo por parte del reintegrante.

En el estudio de la sensibilidad a la Zimoliasa ( complejo enzimático que contiene actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa) el mutante homocigoto presenta una mayor sensibilidad a dicho agente, el reintegrante presento un comportamiento muy semejante al control, aunque no recupero totalmente el fenotipo. Este comportamiento indico una clara alteración en la pared celular ante la falta del gen *GLX3* en lo que respecta bien a la formación del  $\beta$ -1,3-glucano de la misma, que lo haría mas sensible a la Zimoliasa o bien que dicho glucano se encuentre mas accesible y sea por tanto más fácil su degradación.

En los estudios de sensibilidad a antifúngicos es interesante destacar que el fluconazol que afecta a la membrana plasmática y la caspofungina que afecta a la síntesis de  $\beta$  1-3 glucano, el mutante homocigótico es menos sensible que la cepa control, hecho posiblemente debido a la alteración que presentaría la pared celular y que posiblemente como ocurre en otros mutante de pared, también se encuentre afectada la biosíntesis e integridad de la membrana plasmática. Con respecto a la Anfotericina B sin embargo el mutante heterocigótico presenta una sensibilidad muy alta y sin embargo el mutante heterocigótico y el reintegrante presentan una menor afectación en su crecimiento. En ambos la presencia de *Glx3* mantendría en mayor grado la integridad de la pared celular.

En los estudios de virulencia, los resultados obtenidos demostraron que el gen *GLX3* juega importante un papel en la virulencia de *C. albicans*. El mutante nulo *glx3Δ / glx3Δ* no afecto a la supervivencia en un modelo en ratón de candidiasis diseminada, mientras que el mutante heterocigótico, aunque disminuida con respecto a la parental sí que presento afectación. El reintegrante es más virulento, pero no recupero la virulencia de la cepa control.

La correcta formación de la pared celular, la transición morfológica junto con la capacidad de formación de biopelículas, son importantes factores de virulencia. Como hemos demostrado la proteína *Glx3* presenta un importante papel en la integridad de la pared celular, así como en la formación de las biopelículas. En el mutante nulo estas propiedades y la integridad de la pared se encuentran muy afectadas, siendo

posiblemente muy sensible a las defensas del hospedador. En el caso del mutante heterocigótico en el que solo tendríamos una copia del gen *GLX3* y en el caso del reintegrante, encontramos una reducción de la virulencia con respecto a la cepa control, estos datos podrían deberse a la disminución en su capacidad de formación de biopelículas y no presentar capacidad de miceliación. Observando estos efectos podría proponerse en estudios posteriores el uso del mutante nulo *glx3Δ* / *glx3Δ* como una posible herramienta inmunológica.



## **V. CONCLUSIONES**



- 1.- La hidrofobicidad es una propiedad altamente conservada, presentando el 88% de los aislados una hidrofobicidad semejante a la cepa control.
  
- 2.- Entre la hidrofobicidad y la capacidad de formación de biopelículas no existe correlación.
  
- 3.- El análisis proteómico de la matriz extracelular de las biopelículas demostró la existencia de un alto número de proteínas totales, 905. La gran mayoría se encuentran presentes en los aislados muy formadores. En los poco y medianamente formadores encontramos solo un 17 % del total. Indicando que el número de proteínas encontradas está relacionado con la consistencia de la biopelícula y con el envejecimiento de la misma.
  
- 4.- El estudio funcional del total de proteínas analizadas reveló principalmente funciones metabólicas, unión a proteínas y de defensa. Las diferencias encontradas en los distintos grupos de aislados fueron de tipo cuantitativo, indicando la importancia que presenta la ME como barrera protectora.
  
- 5.- El número de proteínas comunes a todos los aislados es de 57, sugiriendo la importancia de las mismas en la biología de la biopelícula. El 93 % de ellas presentan índices de hidropatía negativos siendo concomitantes con el hecho de que las biopelículas se consideran hidrogeles.
  
- 6.- De las 57 proteínas comunes solo 10 presentan péptido señal, indicando que la mayoría no llegan a la ME por vías de secreción clásicas. Son proteínas multifunción, pudiéndose encontrar en distintas ubicaciones celulares y así mismo actuando en distintos procesos, corroborando que las funciones de defensa, reconocimiento y metabólicas son cruciales en el entorno de la biopelícula.

**7.-** Una de las proteínas mayoritarias encontradas en el presente estudio es la Glx3. La ausencia del gen *GLX3* demostró una serie de efectos sobre la integridad de la pared celular produciendo una alta sensibilidad a agentes que alteran el ensamblaje de los componentes de la misma, así como a la acción de la Zimoliasa y al estrés oxidativo. Con la reintegración del gen estos efectos se recuperan parcialmente. Indicando por tanto la importancia de esta proteína en la integridad de dicha estructura.

**8.-** La falta del gen *GLX3* modifica la sensibilidad a antifungicos siendo el mutante nulo menos sensible a fluconazol y caspofungina y muy sensible a anfotericina B.

**9.-** Los estudios fenotípicos realizados con la disrupción y reintegración del gen *GLX3* han demostrado la importancia del mismo en la correcta formación de la pared celular y en su virulencia en modelos murinos.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- Achkar, J.M., and B.C Fries.** 2010. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin.Microbiol. Rev.* 23: 253–273.
- Akiyama, K., T. Shida, H. Yasueda, H. Mita, T. Yamamoto and H. Yamaguchi.** 1994. Atopic asthma caused by *Candida albicans* acid protease: case reports. *Allergy.* 49: 778-781.
- Alby, K., and R.J. Bennett.** 2009. Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 20: 3178–3191.
- Al-Fattani, M.A., and L.J. Douglas.** 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J. Med.Microbiol.* 55: 999-1008.
- Allison, D. G., I. W. Sutherland, and T. R. Neu.** 2003. EPS: what's an acronym? p. 381-387. In A. McBain, D. Allison, M. Brading, A. Rickard, J. Verran, and J. Walker (ed.), Biofilm communities: order from chaos? BioLine, Cardiff, United Kingdom.
- Andes, D., J. Nett, P. Oschel, R. Albrecht, K. Marchillo, and A. Pitula.** 2004. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. Immun.* 72: 6023-6031.
- Andes D.R., N. Safdar, J.W. Baddley, G. Playford, A.C. Reboli, J.H. Rex, J.D. Sobel, P.G. Pappas and B.J. Kullberg.** 2012. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin. Infect Dis.* 54: 1110–1122.
- Araújo, D., M. Henriques and S. Silva.** 2017. Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends. Microbiol.* 25: 62-75.
- Bachmann S.P., K. VandeWalle, G. Ramage, T.F. Patterson, B.L. Wickes, J.R. Graybill and J.L. López-Ribot.** 2002. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 3591-3596.
- Bailey, D. A., P. J. Feldmann, M. Bovey, N. A. Gow, and A. J. Brown.** 1996. The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J. Bacteriol.* 178: 5353-5360.
- Baillie, G.S. and L.J. Douglas.** 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 48: 671–679.
- Ballou, C.E.** 1990. Isolation, characterization and properties of *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* mutants with non-conditional protein glycosylation defects. *Methods. Enzymol.* 185: 440-470.
- Barrett-Bee, K., Y. Hayes, R. G. Wilson, and J. F. Ryley.** 1985. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1217-1221.

**Bennett, R.J., and A.D. Johnson.** 2005. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 233–255

**Berman, J., and P. E. Sudbery.** 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* 3: 918-930.

**Berne, C., D.T. Kysela and Y.V. Brun.** 2010. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Mol. Microbiol.* 77:815-829.

**Biswas, S., P. Van Dijck and A. Datta.** 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol.Mol Biol .Rev.* 71: 348-376.

**Blanes, R.** 2012. Análisis proteómico de la matriz extracelular de las biopelículas formadas por *Candida albicans*. Identificación de posibles determinantes de virulencia. Tesis doctoral. Universitat de València/Estudi general. Valencia España.

**Blankenship, J. R., and A. P. Mitchell.** 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 588-594.

**Bobichon, H., V. Bussy, J. F. Angiboust, M. Manfait, P. Bouchet, and J. C. Jardillier.** 1990. *Candida albicans* adriamycin interactions: ultrastructural and spectrofluorometric study of whole yeasts and spheroplasts. *Biol. Cell.* 70: 53-59.

**Bonhomme, J., and C. d'Enfert.** 2013. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Curr Opin Microbio.* 16: 398-403.

**Borg von Zepelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard and M. Monod.** 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinase Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murinemacrophages. *Mol Microbiol.* 28: 543-554.

**Borghi, E., R. Sciota, C. Biassoni, D. Cirasola, L. Cappelletti, L. Vizzini, P. Boracchi, and G. Morace.** 2011. Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates?. *J. Med. Microbiol.* 60: 689-690.

**Borneman, A.R., J.A. Leigh-Bell, H. Yu, P. Bertone, M. Gerstein and M. Snyder.** 2006. Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes Dev.* 20: 435–448.

**Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Wang, and A. D. Johnson.** 2000. Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics.* 156: 31-44.

**Buffo, J., M.A. Herman and D.R. Soll.** 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 85: 21-30.

**Butler, G., M.D. Rasmussen, M.F. Lin, M.A. Santos, S. Sakthikumar, C.A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, J.L. Reedy, I. Agrafioti, M.B. Arnaud, S. Bates, A.J.**

Brown, S. Brunke, M.C. Costanzo, D.A Fitzpatrick, P.W.de Groot, D. Harris, L.L. Hoyer, B. Hube, F.M. Klis, C. Kodira, N. Lennard, M.E. Logue, R. Martin, A.M. Neiman, E. Nikolaou, M.A. Quail, J. Quinn, M.C ,Santos, F.F. Schmitzberger, G. Sherlock, P. Shah, K.A. Silverstein M.S. Skrzypek, D. Soll, R. Staggs, I. Stansfield, M.P. Stumpf, P.E. Sudbery, T. Srikantha, Q. Zeng, J. Berman, M. Berriman, J. Heitman, N.A. Gow, M.C. Lorenz, B.W. Birren, M. Kellis, and C.A. Cuomo. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 459: 657-662.

**Cabib, E. and B. Bowers.** 1971. Chitin and yeast budding. Localization of chitin yeast bud scars. *J. Biol. Chem.* 246: 152-159.

**Calderone, R. A.** 1993a. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch. Med. Res.* 24: 275-279.

**Calderone, R. A.** 1993b. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol.* 1: 55-58.

**Calderone, R.A.** 2002. *Candida* and Candidiasis, 1<sup>st</sup> Ed. ASM Press, Washington, D.C., USA.

**Calderone, R.A. and W. A Fonzi.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9: 327–335.

**Calderone, R., S. Suzuki, R. Cannon, T. Cho, D. Boyd, J. Calera, H. Chibana, D. Herman, A. Holmes, H. W. Jeng, H. Kaminishi, T. Matsumoto, T. Mikami, J. M. O'Sullivan, M. Sudoh, M. Suzuki, Y. Nakashima, T. Tanaka, G. R. Tompkins, and T. Watanabe.** 2000. *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *Med. Mycol.* 38: 125-137.

**Caro, L. H., H. Tettelin, J. H. Vossen, A. F. Ram, H. van den Ende, and F. M. Klis.** 1997. In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13: 1477-1489.

**Casadevall, A., M. Feldmesser and L. A. Pirofski.** 2002. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 386-391.

**Cassone, A.** 1989. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr. Top. Med. Mycol.* 3: 248-314.

**Cassone, A.** 2008. Fungal vaccines real progress from real challenges. *The lancet. Infect. Dis.* 8: 114.124.

**Castillo L, E. Calvo, A.I. Martínez, J. Ruiz-Herrera, E. Valentin, J.A. López and R. Sentandreu.** 2008. A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics.* 8: 3871-3881.

**Cauda, R.** 2009. Candidaemia in patients with an inserted medical device. *Drugs.* 69: 33–38.

**Chaffin, W. L.** 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*72: 495-544.

**Chaffin, W. L., J. L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martínez.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 130-180.

**Chandra, J., D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick and M.A. Ghannoum.** 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183: 5385-5394.

**Chattaway, F.W., M.R. Holmes and J.E. Barlow.** 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 51: 367-376.

**Chauhan, N., Li, D., Singh, P., Calderone, R., and Kruppa, M.** 2002. The cell wall of *Candida* spp., pp. 159-175. In R.A. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1<sup>st</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.

**Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy and G.R. Fink.** 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 5048-5052.

**Clancy, C.J., and M.H. Nguyen.** 2013. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin. Infect. Dis.* 56: 1284-1292.

**Clemons K.V., V.L. Calich, E. Burger, S.G. Filler, M., Graziutti J. Murphy, E. Roilides, A. Campa, M.R. Dias, J.E. Edwards Jr, Y. Fu, G. Fernandes-Bordignon, A. Ibrahim, H. Katsifa, C.G. Lampaignere, L.H. Meloni-Bruneri, J. Rex, C.A. Savary and C. Xidieh.** 2000. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med. Mycol.*38 1: 99-111.

**Cornely O.A., M. Bassetti, T. Calandra, J. Garbino, B.J. Kullberg, O. Lortholary, W. Meersseman, M. Akova, M.C. Arendrup, S. Arikian-Akdagli, J. Bille, E. Castagnola, M. Cuenca-Estrella, J.P. Donnelly, A.H. Groll, R. Herbrecht, W.W. Hope, H.E. Jensen, C. Lass-Flörl, G. Petrikkos, M.D. Richardson, E. Roilides, P.E. Verweij, C. Viscoli and A.J. Ullmann.** 2012. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 7-19.

**Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber and H.M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.

**Cowen, L.E.** 2008. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 187-198.

**Cugini, C., D. K. Morales and D.A. Hogan.** 2010. *Candida albicans* produced farnesol stimulates *Pseudomonas* quinolone signal production in LasR-defective *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microbiology.* 156: 3096-3107.

**Cutler, J. E.** 2001. N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 39: 75-86

**d'Enfert, C., S. Goyard , S. Rodriguez-Arnaveilhe , L. Frangeul , L. Jones , F. Tekaia , O. Bader , A. Albrecht , L. Castillo , A. Domínguez , J.F. Ernst , C. Fradin , C. Gaillardin , S. Garcia-Sanchez , P. de Groot , B. Hube , F.M. Klis , S. Krishnamurthy , D. Kunze , M.C. Lopez , A. Mavor , N. Martin , I. Moszer , D. Onésime , J. Pérez Martin , R. Sentandreu, E. Valentín and A..J Brown .** 2005. CandidaDB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics. *Nucleic. Acids. Res.* 33(Database issue): D353-357.

**d'Enfert, C.** 2006. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr. Drug Targets* 7: 465-470.

**d'Enfert, C.** 2009. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:358-364.

**Dadar M, R. Tiwari, K .Karthik, S. Chakraborty, Y. Shahali and K. Dhama.** 2018. *Candida albicans*: Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb. Pathog.* 117: 128–138.

**Daniels, K.J., T. Srikantha, S.R. Lockhart, C. Pujol, and D.R. Soll.** 2006. Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *EMBO J.* 25: 2240-2252.

**de Nobel, J. G., F. M. Klis, J. Priem, T. Munnik, and H. van den Ende.** 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 6: 491-499.

**De Sordi, L., and F.A. Mühlshlegel.** 2009. Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEM.S Yeast -Res.* 9: 990-999.

**Deacon, J. W.** 2006. FUNGAL BIOLOGY 4th Edition. En: Blackwell Publishing Ltd. The diversity of fungi and fungus-like organisms (pp. 16-47).

**Desai, J.V., A.P. Mitchell and D.R. Andes.** 2014. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Oct 1;4 a019729

**Deveau, A. and D.A. Hogan.** 2011. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Methods. Mol. Biol.* 692: 219-233.

**Deveau, A., A.E. Piispanen, A.A. Jackson and D.A. Hogan.** 2010. Farnesol Induces Hydrogen Peroxide Resistance in *Candida albicans* Yeast by Inhibiting the Ras-Cyclic AMP Signaling Pathway. *Eukaryot. Cell.* 9: 569-577.

**Dominic, R.M., S. Shenoy and S. Baliga.** 2007. *Candida* biofilms in medical devices: evolving trends. *Kathmandu Univ Med J.* 5: 431–436.

**Domer, J. E.** 1989. *Candida* cell wall mannan: a polysaccharide with diverse immunologic properties. *Crit. Rev. Microbiol.* 17: 33-51.

**Donlan, R. M.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-890.

**Donlan, R.M. and J.W. Costerton.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*;15: 167–193.

**Douglas, L. J.** 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev. Iberoam. Micol.* 19: 139-143.

**Douglas, L.J.** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends. Microbiol.* 11:30–36.

**Ecker, M., R., Deutzmann, L., Lehle, V. Mrsă and W. Tanner,** 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J. Biol. Chem.* 281: 11523-11529.

**Elorza, M. V., H. Rico, and R. Sentandreu.** 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1577-1582.

**Eroles, P., M. Sentandreu, M. V. Elorza, and R. Sentandreu.** 1997. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology.* 143: 313-320.

**Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H.C. Korting, W. Schafer and Hube, B.** 2002. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 and Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun.* 70:3689-3700.

**Finkel, J.S., and A.P. Mitchell.** 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 109-118.

**Flemming, H.C. and J. Wingender.** 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623–633.

**Flemming, H.C., T. R. Neu and D. J. Wozniak** 2007. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Bacteriol.* 189: 7945–7947.

**Fox, E.P. and C.J. Nobile.** 2012. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription.* 3: 315–322.

**Fukazawa, Y., and K. Kagaya.** 1997. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 87-99.

- Gale C.A., C.M. Bendel , M. McClellan, M. Hauser , J.M. Becker , J. Berman and M.K. Hostetter.** 1998. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science*. 279: 1355-1358.
- Ganguly, S. and A.P. Mitchell.** 2011. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:380–385.
- Garcerá, A., A. I. Martínez, L. Castillo, M. V. Elorza, R. Sentandreu, and E. Valentín.** 2003. Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology* 149: 2137-2145.
- García-Sánchez, S., S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J. M. Ghigo, and C. d'Enfert.** 2004. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot. Cell*. 3: 536-545.
- Gelis, S., P.W. de Groot, , L. Castillo, M.D. Moragues, R. Sentandreu, M.M. Gómez, and E. Valentín.** 2012. Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence. *Fungal Genet Biol.* 49: 322-331.
- Ghannoum, M.A.** 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 122-143.
- Gil-Bona, A., C.M. Parra-Giraldo, M.L. Hernández, J.A. Reales-Calderon, N.V. Solis, S.G. Filler, L. Monteoliva and C. Gil.** 2015. *Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction. *J Proteomics*.127: 340-351.
- Gil-Navarro, I., M. L. Gil, M. Casanova, J. E. O'Connor, J. P. Martínez, and D. Gozalbo.** 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* 179:4992-4999.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay, and D. R. Kirsch.** 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol. Gen. Genet.* 198: 179-182
- Gómez-Molero, E., H.L. Dekker, A.D. de Boe and P.W. de Groot.** 2016. Identification of Secreted Candida Proteins Using Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol.* 1356: 79-94.
- Gow, N. A.** 1997. Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr. Top. Med. Mycol.* 8: 43-55.
- Gow, N. A., A. J. Brown, and F. C. Odds.** 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 366-371.

**Gow, N.A. and B. Hube.** 2012. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 15: 406-412.

**Guirao-Abad J.P., R. Sánchez-Fresneda, E. Valentin, M. Martínez-Esparza and J.C. Argüelles.** 2013. Analysis of validamycin as a potential antifungal compound against *Candida albicans*. *Int. Microbiol.* 16: 217-225.

**Granger, B.L.** 2012. Insight into the antiadhesive effect of yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 11: 795–805.

**Granger, B .L., M. I. Flenniken , D.A. Davis , A.P. Mitchell and J.E. Cutler.** 2005. Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Microbiology.* 15: 1631-1644.

**Gregus, P., H. Vlcková, V. Buchta, J. Kestranek, L. Krivčíková and L. Nováková.** 2010. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53: 674-681.

**Griffith, O. H., and M. Ryan.** 1999. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1441: 237-254.

**Hall-Stoodley, L., and P. Stoodley.** 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 13: 7-10.

**Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

**Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: Glover DM (ed.) *DNA cloning: a practical approach*: Oxford: IRL Press, 109-135.

**Harriot, M.M and M.C. Noverr.** 2011. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends. Microbiol.* 19: 557-563.

**Hasim S, Hussin NR, Alomar F, Bidasee KR, Nickerson KW and Wilson MA.** 2014. A glutathione-independent glyoxalase of the DJ-1 superfamily plays an important role in managing metabolically generated methylglyoxal in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 289: 1662-1674

**Hawser, S.P., and L.J. Douglas.** 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun.* 62: 915–921.

**Hazen, K. C., and P. M. Glee.** 1995. Cell surface hydrophobicity and medically important fungi. *Curr. Top. Med. Mycol.* 6: 1-31.

**Hazen, K. C., and B. W. Hazen.** 1987. A polystyrene microsphere assay for detecting cell surface hydrophobicity within *Candida albicans* populations. *J. Microbiol. Methods.* 6: 289-299.

- Hazen, K.C., J.G. Wu and J. Masuoka.** 2001. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect. Immun.* 69: 779-786.
- Henriques, M., J. Azeredo and R. Oliveira.** 2006. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Crit. Rev. Microbiol.* 32: 217–226.
- Hernday A.D., M.B. Lohse, P.M. Fordyce, C.J. Nobile, J.L. Derisi and A.D. Johnson.** 2013. Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 90: 22–35.
- Hnisz, D., A.F. Bardet, C.J. Nobile, A. Petryshyn, W. Glaser, U. Schöck, A. Stark and K. Kuchler.** 2012. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLOS Genet.* 8:e1003118.
- Hostetter, M. K.** 1994. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 29-42.
- Hoyer, L. L.** 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9: 176-180.
- Hoyer, L. L., T. L. Payne, and J. E. Hecht.** 1998b. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J. Bacteriol.* 180: 5334-5343.
- Huang, G.** 2012. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence.* 3): 251-261.
- Hube, B.** 2000. Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contrib. Microbiol.* 5: 126-137.
- Hube, B.** 2004. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 336-341.
- Hube, B.** 2006. Infection-associated genes of *Candida albicans*. *Future Microbiol.* 1: 209-218.
- Hube, B., and J. Naglik.** 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147: 1997-2005.
- Hube, B., D. Sanglard, F.C. Odds, D. Hess, M. Monod, W. Schäfer, A.J. Brown and N.A. Gow.** 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* 65: 3529-3538.
- Ibrahim, A.S., F. Mirbod, S.G. Filler, Y. Banno, G.T. Cole, Y. Kitajima, J.E. Edwards Jr, Y. Nozawa, and M.A. Ghannoum.,** 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63:1993-1998.

**Jayatilake, J. A., Y. H. Samaranayake, and L. P. Samaranayake.** 2005. An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J. Oral Pathol. Med.* 34: 240-246.

**Jacobsen, I.D., D. Wilson, B. Wächtler, S. Brunke, J.R. Naglik and B. Hube.** 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert .Rev. Anti .Infect .Ther.* 10: 85-93.

**Jefferson, K.K.** 2009. In *Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends*, Ullrich, M., ed., pp. 175-186, Caister Academic, Norfolk, U.K.

**Jentoft N.** 1990. Why are proteins O-glycosylated? *Trends. Biochem. Sci.* 15: 291-294.

**Jin, Y., Y.H. Samaranayake, H.K. Yip, and L.P. Samaranayake.** 2005. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 160: 191-200.

**Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Muller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol. Microbiol.* 35: 601-611.

**Kapteyn, J. C., R. C. Montijn, G. J. Dijkgraaf, H. Van den Ende, and F. M. Klis.** 1995. Covalent association of  $\beta$ -1,3-glucan with  $\beta$ -1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 177: 3788-3792.

**Kapteyn, J. C., R. C. Montijn, E. Vink, J. de la Cruz, A. Llobell, J. E. Douwes, H. Shimoï, P. N. Lipke, and F. M. Klis.** 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked  $\beta$ -1,3-/ $\beta$ -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* 6: 337-345.

**Kapteyn, J. C., H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 1999a. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426: 373-383.

**Kapteyn, J. C., P. Van Egmond, E. Sievi, H. Van Den Ende, M. Makarow, and F. M. Klis.** 1999b. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and  $\beta$ -1,6-glucan-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* 31: 1835-1844.

**Keller, L. and M.G. Surette.** 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:249-258.

**Kennedy, M.J. and P. A. Volz.** 1985. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect. Immun.* 49: 654-663.

**Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 39: 1-8.

- Klotz, S. A., N. K. Gaur, R. De Armond, D. Sheppard, N. Khardori, J. E. Edwards Jr, P. N. Lipke, and M. El-Azizi.** 2007. *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med. Mycol.* 45: 363-370.
- Kniemeyer, O., A.D. Schmidt, M. Vödich, D. Wartenberg and A.A. Brakhage.** 2011. Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* by proteomics. *Int J Med Microbiol.* 301: 368-377.
- Kojic, E.M. and R.O. Darouiche.** 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 255-267.
- Kollar, R., E. Petrakova, G. Ashwell, P. W. Robbins, and E. Cabib.** 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan. *J. Biol. Chem.* 270: 1170-1178.
- Kollar, R., B. B. Reinhold, E. Petrakova, H. J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonova, J. C. Kapteyn, F. M. Klis, and E. Cabib.** 1997. Architecture of the yeast cell wall.  $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan interconnects mannoprotein,  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272: 17762-17775.
- Kolter, R.** 2005. Surfacing views of biofilm biology. *Trends. Microbiol.* 13: 1-2.
- Kolter, R.** 2010. Biofilms in lab and nature: a molecular geneticist's voyage to microbial ecology. *Int. Microbiol.* 13: 1-7.
- Kolter, R and E.P. Greenberg.** 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature.*441: 300-302.
- Kopecka, M., and M. Gabriel.** 1992. The influence of congo red on the cell wall and  $(1\rightarrow3)$ - $\beta$ -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 158: 115-126.
- Korting, H.C., B. Hube, S. Oberhauer, E. Januschke, G. Hamm, A. Albrecht and C. Borelli.** 2003. Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J. Med. Microbiol.* 52: 623-632.
- Kullberg, B.J. and A.M. Oude Lashof.** 2002. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur. J. Med. Res.* 7: 183-191.
- Kumamoto, C.A.** 2002. *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 5 :608-611.
- Kumamoto, C.A.** 2011. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 386-391.

**Kumamoto, C. A., and M. D. Vines.** 2005. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 113-133.

**Kuppra, M.** 2009. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses.* 52: 1-10.

**Kurtz, M. B., D. R. Kirsch, and R. Kelly.** 1988. The molecular genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Sci.* 5: 58-63.

**Kuster B, M. Schirle, P. Mallick and R. Aebersold.** 2005 Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol Cell. Biol.* 6: 577-583.

**Kyte, J. and R.F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

**La Fleur, M.D., C.A. Kumamoto and K. Lewis.** 2006. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3839-3846.

**Laforet, L., I. Moreno, R. Sánchez-Fresneda, M. Martínez-Esparza, J.P. Martínez, J.C. Argüelles, P.W.J. de Groot and E. Valentin-Gomez.** 2011. Pga26 mediates filamentation and biofilm formation and is required for virulence 456 in *Candida albicans*. *FEMS. Yeas. Res.* 11: 389-397.

**Lamagni, T.L., B.G. Evans, M. Shigematsu and E.M. Johnson.** 2001. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). *Epidemiol. Infect.* 126: 397-414.

**Lamarre, C., N. Deslauriers, and Y. Bourbonnais.** 2000. Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol. Microbiol.* 35: 444-453.

**Lan, C.Y., G. Newport , L.A. Murillo , T. Jones , S. Scherer , R.W. Davis and N. Agabian.** 2002. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 14907-14912.

**Lawrence, J.R., G.D.W. Swerhone, U. Kuhlicke, and T.R. Neu.** 2007. *In situ* evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can. J. Microbiol.* 53:450-458.

**Lepak A and D. Andes.** 2011. Fungal sepsis: optimizing antifungal therapy in the critical care setting. *Crit. Care. Clin.*; 27: 123–147.

**Li, F., and S. P. Palecek.** 2003. EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot. Cell* 2:1266-1273.

**Li, F., and S. P. Palecek.** 2008. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions. *Microbiology* 154: 1193-1203.

- Li, F., M. J. Svarovsky, A. J. Karlsson, J. P. Wagner, K. Marchillo, P. Oshel, D. Andes, and S. P. Palecek.** 2007. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot. Cell.* 6: 931-939.
- Lim, C.S, R. Rosli, H.F. Seow and P.P. Chong.** 2012. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eu.r J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 21–31.
- Lipke, P. N., and R. Ovalle.** 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180: 3735-3740.
- Lopez, D., H. Vlamakis and R. Kolter.** 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Jul;2(7): a000398.
- López-Villar, E., L. Monteoliva, M. R. Larsen, E. Sachon, M. Shabaz, M. Pardo, J. Pla, C. Gil, P. Roepstorff, and C. Nombela.** 2006. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics.* 6: 107-118.
- Luo, G. and L.P. Samaranayake.** 2002. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS.* 110: 601-610.
- Ma, L., M. Conover, H. Lu, M.R. Parsek, K. Bayles, and D.J. Wozniak.** 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 5:e1000354.
- Magee, B.B., and P.T. Magee.** 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLa* strains. *Science.* 289: 310–313.
- Mah, T.F., and G.A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9:34-39.
- Manners, D.J., A.J. Masson and J.C. Patterson.** 1973. The structure of a beta-1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* 135: 19-30.
- Martínez, A. I., L. Castillo, A. Garcerá, M. V. Elorza, E. Valentín, and R. Sentandreu.** 2004. Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology* 150: 3151-3161.
- Martínez, J.P. and D. Gozalbo.** 1994. Chitin synthetases in *Candida albicans*: a review on their subcellular distribution and biological function. *Microbiologia.* 10: 2392-2348.
- Martínez J.P., R. Blanes, M. Casanova, E. Valentín, A. Murgui and A. Domínguez.** 2016. Null mutants of *Candida albicans* for cell-wall-related genes form fragile biofilms that display an almost identical extracellular matrix proteome. *FEMS. Yeast. Res.* 16: 1-12.

**Martínez, J. P., M. L. Gil, J. L. López-Ribot, and W. L. Chaffin.** 1998. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 121-141.

**Martínez-Gomariz, M., P. Perumal, S. Mekala, C. Nombela, W.L. Chaffin and C. Gil.** 2009. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics.* 9: 2230-2252.

**Martins, M., M. Henriques, J. Azeredo, S.M. Rocha, M.A, Coimbra and R. Oliveira.** 2007. Morphogenesis Control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through Signaling Molecules Produced by Planktonic and Biofilm Cells. *Eukaryot Cell.* 6: 2429-2436.

**Martins, M., M. Henriques, J.L. Lopez-Ribot and R. Oliveira.** 2012. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses.* 55: 80-85.

**Martins, M., P. Uppuluri, D.P. Thomas, I.A. Cleary, M. Henriques, J. L. Lopez-Ribot JL and R. Oliveira .** 2010. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 169:323–331.

**Massey, S.E., G. Moura, P. Beltrão, R. Almeida, J.R. Garey, M.F. Tuite and M.A. Santos.** 2003. Comparative Evolutionary Genomics Unveils the Molecular Mechanism of Reassignment of the CTG Codon in *Candida* spp. *Genome Res.* 13: 544-557.

**Masuoka, J.** 2004. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 281-310.

**Masuoka, J., and K. C. Hazen.** 1997. Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Microbiology.* 143: 3015 -3021.

**Mateus, C., S.A. Crow Jr and D.G. Ahearn.** 2004. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 3358–3366.

**Mathé, L. and P. Van Dijck.** 2013. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr. Genet.* 59: 251-264.

**Mayer, F.L, D. Wilson and B. Hube.** 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 4: 119–128.

**Merson-Davies, L. A. and F. C. Odds.** 1989. A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 3143-3152.

- Mitchell, K.F., H.T. Taff, M.A. Cuevas, E.L. Reinicke, H. Sanchez and D.R. Andes.** 2013. Role of matrix  $\beta$ -1,3 glucan in antifungal resistance of *non-albicans Candida* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 57: 1918–1920.
- Mitchell, K.F., R. Zarnowski, and D.R. Andes.** 2016 a. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathog.* 12: e1005828.
- Mitchell, K.F., R. Zarnowski, and D.R. Andes.** 2016 b. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. In: Imbert C. (eds) Fungal Biofilms and related infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* 931: 21-35.
- Modrzewska, B and P. Kurnatowski.** 2015. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann. Parasitol.* 61: 3-9.
- Monod, M., S. Capoccia, B. Lechenne, C. Zaugg, M. Holdom and O. Jousson.** 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med Microbiol.* 292:405-419.
- Monteoliva, L., M.L. Matas, C. Gil, C. Nombela and J. Pla.** 2002. Large-scale identification of putative exported proteins in *Candida albicans* by genetic selection. *Eukaryot. Cell.* 1: 514-525.
- Moscardo, T.** 2013. Función del gen *PIR32* en la construcción y biogénesis de la pared celular de *Candida albicans*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. UVEG.
- Moukadiri, I., L. Jaafar and J. Zueco.** 1999. Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* *mnn1 mnn9* double mutant by reducing agents. *J. Bacteriol.* 181: 4741-4745.
- Moukadiri, I. and J. Zueco,** 2001. Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Res.* 1: 241-245.
- Moyes, D L., J.P. Richardson, and J. R Naglik.** 2015. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 6: 338–346.
- Mrsá. V., T. Seidl. M. Gentsch and W. Tanner.** 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13: 1145- 1154.
- Muadcheingka, T. and P. Tantivitayakul.** 2015. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch. Oral. Biol.* 60: 894-901.
- Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod and S. Lewenza.** 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 4:e1000213.

**Mukherjee, P.K., and M. A. Ghannoum.** 2002. Secretory proteins in fungal virulence, pp. 51-79. *In: Calderone, R.A., and Cihlar, R.L., eds. Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications.* New York:Marcel Dekker

**Mukherjee, P.K., K.R. Seshan, S.D. Leidich, J. Chandra, G.T. Cole and M.A. Ghannoum.** 2001. Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. *Microbiology.* 147: 2585-2597.

**Munro C.A, and N.A. Gow.** 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 1: 41-53.

**Murgui, A., M,V, Elorza and R. Sentandreu.** 1985 Effect of papulacandin B and calcofluor white on the incorporation of mannoproteins in the wall of *Candida albicans* blastospores. *Biochim. Biophys. Acta.* 841: 215-222.

**Murillo, L. A., G. Newport, C. Y. Lan, S. Habelitz, J. Dungan, and N. M. Agabian.** 2005. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 4: 1562-1573.

**Natl. Nosocom. Infect. Surveill. Sys. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report,** data summary from January 1992-June 2001, issued August 2001. *Am. J. Infect. Control.* 29: 404-421.

**Naglik, J. R., S. J. Challacombe, and B. Hube.** 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 400-428.

**Naglik, J., A. Albrecht, O. Bader, and B. Hube.** 2004. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6: 915-926.

**Negi, M., R. Tsuboi, T. Matsui, and H. Ogawa.** 1984. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. *J. Invest. Dermatol.* 8: 32-36.

**Nelson, R. D., N. Shibata, R. P. Podzorski, and M. J. Herron.** 1991. *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 1-19.

**Nett, J.E., K. Crawford, K. Marchillo and D.R. Andes.** 2010 a. Role of fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54: 3505-3508.

**Nett J.E., A.J. Lepak, K. Marchillo and D.R. Andes.** 2009. Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *J. Infect. Dis.* 200: 307-313.

**Nett, J., L. Lincoln, K. Marchillo, R. Massey, K.Holoyda, B. Hoff, M. VanHandel and D. Andes.** 2007. Putative role of  $\beta$ -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 510-520.

- Nett, J.E., H. Sanchez, M.T. Cain and D.R. Andes** 2010 b. Genetic basis of *Candida biofilm* resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J. Infect. Dis.* 202: 171–175.
- Nett J.E., H. Sanchez, M.T. Cain, K.M. Ross and D.R. Andes.** 2011. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot Cell.* 10: 1660–1669.
- Ni, L., C. Bruce, C. Hart, J. Leigh-Bell, D. Gelperin., L. Umansky, M.B. Gerstein and M. Snyder.** 2009. Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes. Dev.* 23: 1351–1363.
- Nickerson, K.W., A.L. Atkin, and J.M. Hornby.** 2006. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3805–3813.
- Nimrichter, L., M.M. de Souza, M. Del Poeta, J.D. Nosanchuk, L. Joffe, M. Tavares Pde and M.L. Rodrigues.** 2016 Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells. *Front. Microbiol.* 7: 1034.
- Nobile C.J., D.R. Andes, J.E. Nett, F.J. Smith, F. Yue, Q.T. Phan, J.E. Edwards, S.G. Filler and A.P. Mitchell.** 2006. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLOS Pathog.*; 2: e63.
- Nobile C.J., E.P. Fox, N. Hartooni, K.F. Mitchell, D. Hnisz, D.R Andes, K. Kuchler and A.D. Johnson.** 2014. A histone deacetylase complex mediates biofilm dispersal and drug resistance in *Candida albicans*. *mBio.* 5: e01201–14.
- Nobile C.J., E. P Fox, J.E. Nett, T.R. Sorrells, Q.M. Mitrovich, A.D. Hernday, B.B. Tuch, D.R. Andes and A.D. Johnson.** 2012. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 148: 126–138.
- Nobile C.J. and J A.D. ohnson.** 2015. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease *Annu. Re.v Microbiol.* 69: 71-92.
- Nobile CJ and A.P. Mitchell.** 2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr. Biol.*15: 1150–1155.
- Nobile, C.J. and A.P. Mitchell.** 2006. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell. Microbiol.* 8: 1382–1391.
- Nobile C.J. and A.P. Mitchell A.P.** 2007. Microbial biofilms: e pluribus unum. *Curr .Biol.* 17: 349-453.
- Nobile, C J. and A.P. Mitchell.** 2009. Large-scale gene disruption using the UAU1 cassette. *Methods Molm Biol.* 499: 175-194.

**Nobile, C. J., D. R. Andes, J. E. Nett, F. J. Smith, F. Yue, Q. T. Phan, J. E. Edwards, S. G. Filler, and A. P. Mitchell.** 2006 a. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog.* 2:e63.

**Nobile C.J., J.E. Nett, D.R. Andes and A.P. Mitchell.** 2006 b. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot. Cell.* 5: 1604–1610.

**Nobile C.J., J.E. Nett, A.D. Hernday, O.R. Homann, J.S. Deneault, A. Nantel, D.R. Andes, A.D. Johnso and A. Mitchell.** 2009. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLOS Biol.* 7:e1000133.

**Nobile C.J., H.A. Schneider, J.E. Nett, D. Sheppard, S.G. Filler, D.R. Andes and A.P. Mitchell.** 2008. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.* 18:1017–1024.

**Nombela C., C. Gil and W.L. Chaffin.** 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* 14: 15-21.

**Nuoffer, C., A. Horvath, and H. Riezman.** 1993. Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J. Biol. Chem.* 268: 10558-10563.

**Odds, F. C.** 1985. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol.* 12: 45-93.

**Pande, K., C. Chen and S.M. Noble.** 2013. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat. Genet.* 45: 1088–1089.

**Pappas, P.G., J.H. Rex, J.D. Sobel, S.G. Filler, W.E. Dismukes, T.J. Walsh, J.E. Edwards and Infectious Diseases Society of America.** 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 38: 161-189.

**Peleg A.Y., D.A. Hogan and E. Mylonakis** 2010. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat. Rev- Microbiol.* 8: 340-349.

**Pérez, A., B. Pedrós, A. Murgui, M. Casanova, J.L. López-Ribot and J.P. Martínez.** 2006. Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. *FEMS. Yeast. Res.* 6: 1074-1084.

**Pérez, V.** 2017. Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en especies del género *Candida*. Tesis doctoral. Universitat de València/Estudi general. Valencia España.

**Perlroth, J., B. Choi and B. Spellberg.** 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med. Mycol.* 45: 321-346.

**Perumal, P., S. Mekala and W.L.Chaffin.** 2007. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 2454-2463.

**Pfaller, M.A. and D. J. Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 20: 133–163.

**Pierce C.G., T. Vila, J.A. Romo, D. Montelongo-Jauregui, G. Wall, A. Ramasubramanian, and Lopez-Ribot J.L.** 2017. The *Candida albicans* Biofilm matrix: Composition, structure and function. *J. Fungi.* 3:14

**Pitarch, A., J. Abian, M. Carrascal, M. Sánchez, C. Nombela, and C. Gil.** 2004. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics* 4: 3084-3106.

**Pitarch, A., M. Sánchez, C. Nombela, and C. Gil.** 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell. Proteomics.* 1: 967-982.

**Poulain, D., G. Tronchin, J. F. Dubremetz, and J. Biguet.** 1978. Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. *Ann. Microbiol.* **129**:141-153.

**Pugh, D., and R. A. Cawson.** 1977. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* 15: 29-35.

**Raina, S., D. De Vizio and T. Keshavarz.** 2010. Quorum sensing in filamentous fungi. *J. Biotechnol.*150 :76.

**Rajendran R., L. Sherry. C.J. Nile, A. Sherriff, E.M. Johnson, M.F. Hanson, C. Williams, C.A. Munro, B. Jones and G. Ramage.** 2016. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* blood stream infection-scotland, 2012–2013. *Clin. Microbiol. Infect.* 22: 87–93.

**Ram, A. F., A. Wolters, R. Ten Hoopen, and F. M. Klis.** 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast.* 10: 1019-1030.

**Ramage, G., S. Bachmann, T.F. Patterson, B.L. Wickes and J.L. Lopez-Ribot.** 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 973–980.

**Ramage, G., J.P. Martínez and J.L. López-Ribot.** 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 6: 979-986.

**Ramage, G., E. Mowat, B. Jones, C. Williams and J. Lopez-Ribot.** 2009. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 35: 340–355.

**Ramage, G., R. Rajendran, L. Sherry and C. Williams.** 2012. Fungal biofilm resistance. *Int. J. Microbiol.* ID. 528521. 1-14.

**Ramage G, VandeWalle K, Bachmann SP, Wickes BL and J.L. López-Ribot.** 2002. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 3634-3636.

**Ramage, G., K. Vandewalle, B. L. Wickes, and J. L. López-Ribot.** 2001. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:163-170.

**Reiss, E., V. M. Hearn, D. Poulain, and M. G. Shepherd.** 1992. Structure and function of the fungal cell wall. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 143-156.

**Reuss, O., A. Vik, R. Kolter and J. Morschhäuser.** 2004. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene.* 341: 119-127.

**Rickard, A.H., S.R. Campagna and P.E. Kolenbrander.** 2008. Autoinducer-2 is produced in saliva-fed flow conditions relevant to natural oral biofilms. *J Appl. Microbiol.* 105.: 2096–2103.

**Robbins, N., P. Uppuluri, J. Nett, R. Rajendran, G. Ramage, J. L. Lopez-Ribot, D. Andes and L.E. Cowen.** 2011. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLOS. Pathog.* 7: e1002257.

**Rosenberg, M., H. Judes and E. Weiss.** 1983. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. *Infect. Immun.* 42:831-834.

**Rotrosen, D., J..E Edwards Jr, T.R. Gibson , J.C. Moore , A.H. Cohen and I. Green.** 1985. Adherence of *Candida* to cultured vascular endothelial cells: mechanisms of attachment and endothelial cell penetration. *J Infect. Dis.* 152: 1264-1274.

**Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, E. Valentín, and R. Sentandreu.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6: 14-29.

**Ruiz-Herrera J, Martínez AI, Sentandreu R.** 2002. Determination of the stability of protein pools from the cell wall of fungi. *Res. Microbiol.* 153: 373-378.

**Ruhnke, M. and G. Maschmeyer.** 2002. Management of mycoses in patients with Hematologic disease and cancer. Review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 7:227-235.

**Ryder, C., M. Byrd, D. J. Wozniak.** 2007. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 644-648.

**Sánchez-Fresneda, R., M, Martínez-Esparza, S. Maicas, J.C. Argüelles, and E. Valentín.** 2014. In *Candida parapsilosis* the *ATC1* gene encodes for an acid trehalase involved in trehalose hydrolysis, stress resistance and virulence. *PLoS One.* Jun 12;9(6):e99113.

- Sandini, S, R. La Valle, F. De Bernardis, C. Macrì and A. Cassone.** 2007. The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative beta-glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. *Cell. Microbiol.*9: 1223-1238.
- Saville, S. P., D. P. Thomas, and J. L. López Ribot.** 2006. A role for Efg1p in *Candida albicans* interactions with extracellular matrices. *FEMS Microbiol. Lett.* 256: 151-158.
- Savolainen, J., K. Lammintausta, K. Kalimo and M. Viander.** 1993. *Candida albicans* and atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy.* 23: 332-339.
- Schofield, D. A., C. Westwater, T. Warner, and E. Balish.** 2005. Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 244: 359-365.
- Schoofs, A.G., F.C. Odds, R. Colebunders, M. Ieven, and H. Goossens.** 1998. Cross-sectional study of oral *Candida* carriage in a human immunodeficiency virus (HIV) seropositive population: predisposing factors, epidemiology and antifungal susceptibility. *Mycoses.* 41: 203-211.
- Schweizer, A., S. Rupp, B.N. Taylor, M. Rollinghoff and K. Schroppel.** 2000. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 38: 435-445.
- Seddiki, S.M., Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, S. Badsì-Amir, M. Taleb and D. Kunkel.** 2013. Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation: first study in an intensive care unit in Algeria. *Int. J. Gen. Med.* 6: 1-7.
- Selmecki, A., A. Forche and J. Berman.** 2010. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 9: 991-1008.
- Sentandreu, M., M. V. Elorza, R. Sentandreu, and W. A. Fonzi.** 1998. Cloning and characterization of *PRA1*, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 180: 282-289.
- Sentandreu, R., E. Herrero, J. P. Martínez, and M. V. Elorza.** 1991. Yeast cell wall glycoproteins. In: NATO Workshop. *Fungal cell wall and immune response* (J.P. Latgé and D. Boucias, eds.), pp. 229-239. Springer-Verlag, Berlin, New York, London.
- Serra, D.O., A.M. Richter and R. Hengge .** 2013. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J. Bacteriol.* 195: 5540-5554.
- Serrano-Fujarte, I., E. López-Romero and M. Cuéllar-Cruz.** 2016. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb. Pathog.* 2016. 90: 22-33.

**Shapiro R.S., P. Uppuluri, A.K. Zaas, C. Collins, H. Senn, J.R. Perfect, J. Heitman and L.E. Cowen.** 2009. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr. Biol.* 19: 621–629.

**Shepherd, M. G.** 1987. Cell envelope of *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol.* 15: 7-25.

**Shepherd, M. G., R. T. Poulter, and P. A. Sullivan.** 1985. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu. Rev. Microbiol.* 39: 579-614.

**Shevchenko, A., O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchenko, H. Boucherie and M. Mann.** 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 14440-14445.

**Shibata, N., M. Arai, E. Haga, T. Kikuchi, M. Najima, T. Satoh, H. Kobayashi and S Suzuki.** 1992. Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues. *Infect. Immun.* 60: 4100–4110.

**Shilov, IV., S.L. Seymour, A.A. Patel, A. Loboda, W.H. Tang, S.P. Keating, C.L. Hunter, L.M. Nuwaysir and D.A. Schaeffer.** 2007. The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol. Cell Proteomics.* 6: 1638-6155.

**Siehnell R., B. Traxler, D.D. An, M.R. Parsek, A.L. Schaefer and P.-K Singh.** 2010. A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107: 7916-7921.

**Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller and D.R. Soll.** 1987. “White-opaque transition”: A second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 169: 189–197.

**Smits, G. J., J. C. Kapteyn, H. van den Ende, and F. M. Klis.** 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 348-352.

**Soll, D.R.** 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol.Rev.* 5: 183–203.

**Soll, D.R.** 1997. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology.* 143: 279-288.

**Soll, D.R.** 2009. Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Res.* 9: 973–989.

**Soll, D.R.** 2011. Evolution of a new signal transduction pathway in *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 19 :8-13.

- Sorgo, A.G., C.J. Heilmann, H.L. Dekker, S. Brul, de C.G. Koster, F.M. Klis.** 2010, Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast*. 27: 661-672.
- Sorgo, A.G., S. Brul, C.G. de Koster, L.J. de Koning and F.M. Klis.** 2013. Iron restriction-induced adaptations in the wall proteome of *Candida albicans*. *Microbiology*. 159: 1673-1682.
- Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283: 1535-1538.
- Staab J. F. and Sundstrom, P.** 1998. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWP1* of *Candida albicans*. *Yeast*. 14: 681-686.
- Stehr, F., A. Felk, A. Gacser, M. Kretschmar, B. Mahnss, K. Neuber, B. Hube, and W. Schafer.** 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS .Yeast. Res.* 4: 401-408.
- Stewart, P.S., and J.W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358: 135–138.
- Sundstrom, P.** 2002. Adhesion in *Candida* spp. *Cell. Microbiol.* 4: 461-469.
- Taff, H.T., J.E. Nett, R. Zarnowski, K.M. Ross, H. Sanchez, M.T. Cain, J. Hamaker, A.P. Mitchell and D.R. Andes.** 2012. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: Implications for drug resistance. *PLoS. Pathog.* 8:e1002848.
- Tanner, W., and L. Lehle.** 1987. Protein glycosylation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 906 :81-99.
- Tao, L., H. Du, G. Guan, Y. Dai, C.J. Nobile, W. Liang, C. Cao, Q. Zhang , J. Zhong and G. Huang .** 2014. Discovery of a “white-gray-opaque” tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: Roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PloS. Biol.* Apr 1. 12:e1001830.
- Thomas, J. R., R. A. Dwek, and T. W. Rademacher.** 1990. Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. *Biochemistry.* 29: 5413-5422.
- Thomas, D.P., A. Pitarch, L. Monteoliva, C. Gil, and J.L. López-Ribot.** 2006. Proteomics to study *Candida albicans* biology and pathogenicity. *Infect. Disord. Drug Targets* 6:335-341.
- Toh-e, A., S. Yasunaga, H. Nisogi, K. Tanaka, T. Oguchi and Y. Matsui,** 1993. Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast*. 9: 481-494.

**Tournu, H and P. Van Dijck.** 2012. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *Int. J. Microbiol.* 16 pages. 2012:845352.

**Tronchin, G., M. Pihet, L.M. Lopes-Bezerra and J.P. Bouchara.** 2008. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 46: 749–772.

**Uppuluri, P, A.K. Chaturvedi, A. Srinivasan, M. Banerjee, A.K. Ramasubramaniam, J.R. Köhler, D. Kadosh and J.L. Lopez-Ribot.** 2010. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLOS Pathog.* 6:e1000828

**Uppuluri, P., C.G. Pierce and J.L. López-Ribot.** 2009. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future. Microbiol.* 4: 1235-1237.

**Uppuluri, P., C.G. Pierce, D.P. Thomas, S.S. Bubeck, S.P Saville and J.L. Lopez-Ribot.** 2010b. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot. Cell.* 9:1531–1537.

**Uppuluri, P., B. Sarmah, and W.L. Chaffin.** 2006. *Candida albicans* SNO1 and SNZ1 expressed in stationary-phase planktonic yeast cells and base of biofilm. *Microbiology*,.152: 2031-2038.

**Valentín, E., E. Herrero, F.I.J. Pastor and R. Sentandreu.** 1984. Solubilization and analysis of mannoproteins molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen. Microb.* 130:1419-1428.

**Valentín, E., E. Herrero, H. Rico, F. Miragall, and R. Sentandreu,** 1987. Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 148: 88-94.

**Valentín, E., S. Mormeneo and Sentandreu, R.** 2000. The cell surface of *Candida albicans* during morphogenesis. *Contrib Microbiol.* 5: 138-150.

**Van Acker, H., P. Van Dijck, and T. Coenye.** 2014. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends. Microbiol.* 22: 326-333.

**Van der Vaart J.M., L.H. Caro, J.W. Chapman, F.M. Klis and C..T Verrips.** 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 3104-3110.

**Vargas, G., J.D. Rocha, D.L. Oliveira, P.C. Albuquerque, S. Frases, S.S. Santos, J.D. Nosanchuk, A.M. Gomes, L.C. Medeiros, K. Miranda, T.J. Sobreira, E.S. Nakayasu, E.A. Arigi, A. Casadevall, A.J. Guimaraes, M.L. Rodrigues, C.G. Freire-de-Lima, I.C. Almeida and L. Nimrichter.**2015. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* 17: 389-407.

- Verstrepen, K. J., and F. M. Klis.** 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* 60: 5-15.
- Vilain, S., J.M. Pretorius, J. Theron, and V.S. Broezel.** 2009. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2861-2868.
- Wang, A., S. Lane, Z. Tian, A. Sharon, I. Hazan, and H. Liu.** 2007. Temporal and spatial control of *HGC1* expression results in Hgc1 localization to the apical cells of hyphae in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 6:253-261.
- Wenzel, R.P.** 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1531–1534.
- Whiteway, M. and C. Bachewich.** 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 529–553.
- Wingender, J., and K.E. Jaeger.** 2002. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Bitton, G., ed., pp. 1207-1223, Wiley, New York.
- Winner, H.I. and R. Hurley.** 1964. *Candida albicans*. London: Churchill.
- Winter M.B., E.C. Salcedo, M.B. Lohse, N. Hartooni, M. Gulati, H. Sanchez, J. Takagi, B. Hube, D.R. Andes, A.D. Johnson, C.S. Craik and C.J. Nobile.** 2016. Global Identification of Biofilm-Specific Proteolysis in *Candida albicans*. *MBio.* Sep 13;7(5). pii: e01514-16.
- Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S.M. Tallent, H. Seifert, R.P. Wenzel and M.B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39: 309–317.
- Wolf, J.M. and A. Casadevall.** 2014. Challenges posed by extracellular vesicles from eukaryotic microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 22:73-78.
- Yang, L., K.B. Barken, M.E. Skindersoe, A.B. Christensen, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 153: 1318-1328.
- Yeater K.M., J. Chandra , G. Cheng, P.K. Mukherjee, X. Zhao, S.L, Rodriguez-Zas , K.E, Kwast, M.A, Ghannoum and L.L. Hoyer .** 2007. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology.* 153: 2373-2385.
- Zajic, J.E., and W. Seffens.** 1998. Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 1: 87-107.
- Zanetta J.P., R. Bonaly, S. Maschke, G. Strecker and J.C. Michalski.** 1998. Differential binding of lectins IL-2 and CSL to candida albicans and cancer cells. *Glycobiology.* 8: 221-225.

**Zarnowski, R., W.M. Westler, G.A. Lacmbouh, J.M. Marita, J.R. Bothe, J. Bernhardt, A. Lounes-Hadj Sahraoui, J. Fontaine, H. Sanchez, R.D. Hatfield, J.M. Ntambi, J.E. Nett, A.P. Mitchell and D.R. Andes.** 2014. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio*. Aug 5;5(4): e01333-14.

**Zhang, L.H., and Y.H. Dong.** 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53: 1563-1571.

**Zhao, X., K.J. Daniels, S.H. Oh, C.B. Green, K.M. Yeater, D.R. Soll and L.L. Hoyer.** 2006. *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology.* 152: 2287–2299.

**Zhao, X., S. H. Oh, K. M. Yeater, and L. L. Hoyer.** 2005. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology.* 151: 1619-1630.

**Zheng, X., Y. Wang, and Y. Wang.** 2004. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J.* 23: 1845-1856.

**Zobell CE.** 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J. Bacteriol.* 46:39-56.

**Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz y U. Römling.** 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39: 1452–1463.

**Zhu, W. and S.G. Filler.** 2010. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 2: 273–282.

## **VII. ANEXOS**



## **ANEXO I**



Nº de aislado	media de absorbancia	R= Abs muestra/ Abs control	Adherencia	Abs T <sub>0</sub>	Abs T <sub>20</sub>	Hidrofilidad	Hidrofo-bicidad
SC 5314	0,648	1,000	SA	1,000	0,800	80,00	20,00
2	0,486	0,75	SA	0,968	0,770	79,55	20,45
3	0,596	0,92	SA	0,920	0,676	73,48	26,52
4	0,460	0,71	SA	0,876	0,746	85,16	14,84
5	0,479	0,74	SA	0,800	0,550	68,75	31,25
6	0,152	0,23	WA	0,812	0,788	97,04	2,96
7	0,145	0,22	WA	0,926	0,952	100,00	0,00
8	0,643	0,99	SA	0,970	0,710	73,20	26,80
9	0,541	0,83	SA	0,964	0,964	100,00	0,00
10	0,257	0,40	WA	1,006	1,004	99,80	0,20
11	0,182	0,28	WA	0,902	0,920	100,00	0,00
12	0,296	0,46	WA	0,954	0,900	94,34	5,66
13	0,308	0,47	WA	0,884	0,852	96,38	3,62
14	0,234	0,36	WA	1,012	0,966	95,45	4,55
15	0,436	0,67	MA	0,828	0,716	86,47	13,53
16	0,000	0,00	NA	0,912	0,860	94,30	5,70
17	0,200	0,31	WA	1,018	0,914	89,78	10,22
18	0,000	0,00	NA	0,940	0,922	98,09	1,91
19	0,382	0,59	MA	0,846	0,738	87,23	12,77
20	0,045	0,07	NA	0,904	0,856	94,69	5,31
21	0,012	0,02	NA	0,920	0,894	97,17	2,83
22	0,354	0,55	MA	1,114	1,066	95,69	4,31
23	0,378	0,58	MA	1,134	1,050	92,59	7,41
24	0,501	0,77	SA	0,898	0,852	94,88	5,12
25	0,561	0,87	SA	1,006	0,812	80,72	19,28
26	0,553	0,85	SA	0,920	0,812	88,26	11,74
28	0,222	0,34	WA	1,046	1,014	96,94	3,06
29	0,260	0,40	WA	0,832	0,772	92,79	7,21
30	0,695	1,07	SA	1,066	0,884	82,93	17,07
32	0,129	0,20	WA	0,906	0,836	92,27	7,73
33	0,315	0,49	WA	0,850	0,780	91,76	8,24
34	0,282	0,43	WA	1,026	0,858	83,63	16,37
35	0,383	0,59	MA	1,010	1,000	99,01	0,99
36	0,115	0,18	NA	0,916	0,866	94,54	5,46
37	0,335	0,52	MA	0,972	0,864	88,89	11,11

38	0,468	0,72	SA	1,052	0,776	73,76	26,24
39	0,420	0,65	MA	1,118	1,054	94,28	5,72
40	0,342	0,53	MA	0,934	0,880	94,22	5,78
41	0,417	0,64	MA	1,092	1,036	94,87	5,13
43	0,326	0,50	MA	0,964	0,556	57,68	42,32
44	0,462	0,71	SA	1,112	0,950	85,43	14,57
45	0,159	0,25	WA	0,982	0,920	93,69	6,31
46	0,605	0,93	SA	0,976	0,852	87,30	12,70
47	0,137	0,21	WA	0,964	0,932	96,68	3,32
48	0,338	0,52	MA	0,912	0,846	92,76	7,24
49	0,533	0,82	SA	0,908	0,688	75,77	24,23
50	0,000	0,00	NA	0,944	0,952	100,00	0,00
51	0,000	0,00	NA	1,088	1,010	92,83	7,17
52	0,024	0,04	NA	0,970	0,942	97,11	2,89
53	0,037	0,06	NA	0,972	0,916	94,24	5,76
54	0,268	0,41	WA	0,982	0,856	87,17	12,83
55	0,338	0,52	MA	0,932	0,926	99,36	0,64
56	0,562	0,87	SA	0,968	0,910	94,01	5,99
57	0,492	0,76	SA	0,940	0,860	91,49	8,51
58	0,408	0,63	MA	1,060	0,704	66,42	33,58
59	0,104	0,16	NA	1,012	0,900	88,93	11,07
60	0,406	0,63	MA	1,006	0,938	93,24	6,76
61	0,188	0,29	WA	0,952	0,868	91,18	8,82
62	0,073	0,11	NA	0,860	0,856	99,53	0,47
63	0,000	0,00	NA	0,984	0,852	86,59	13,41
64	0,000	0,00	NA	0,948	0,912	96,20	3,80
65	0,042	0,06	NA	1,066	1,066	100,00	0,00
66	0,029	0,04	NA	1,132	1,140	100,00	0,00
67	0,299	0,46	WA	0,918	0,960	100,00	0,00
68	0,000	0,00	NA	0,894	0,948	100,00	0,00
69	0,027	0,04	NA	0,940	0,926	98,51	1,49
70	0,121	0,19	NA	0,888	0,818	92,12	7,88
71	0,147	0,23	WA	0,952	0,890	93,49	6,51
72	0,392	0,60	MA	0,964	0,916	95,02	4,98
73	0,112	0,17	NA	0,860	0,800	93,02	6,98
74	0,102	0,16	NA	1,028	0,956	93,00	7,00
75	0,000	0,00	NA	0,804	0,840	100,00	0,00
76	0,129	0,20	WA	0,878	0,840	95,67	4,33

77	0,001	0,00	NA	0,882	0,850	96,37	3,63
78	0,000	0,00	NA	0,896	0,872	97,32	2,68
79	0,127	0,20	WA	0,956	0,666	69,67	30,33
80	0,049	0,08	NA	0,900	0,770	85,56	14,44
81	0,029	0,05	NA	1,074	1,074	100,00	0,00
82	0,000	0,00	NA	1,018	1,010	99,21	0,79
83	0,466	0,72	SA	1,060	1,012	95,47	4,53
84	0,000	0,00	NA	1,038	0,990	95,38	4,62
85	0,384	0,59	MA	0,876	0,744	84,93	15,07
86	0,433	0,67	MA	1,334	1,298	97,30	2,70
88	0,409	0,63	MA	1,168	0,766	65,58	34,42
89	0,107	0,17	NA	1,048	1,040	99,24	0,76
90	0,394	0,61	MA	0,840	0,526	62,62	37,38
91	0,144	0,22	WA	1,150	1,054	91,65	8,35
92	0,448	0,69	MA	1,034	0,866	83,75	16,25
93	0,537	0,83	SA	1,000	0,612	61,20	38,80
94	0,375	0,58	MA	1,034	0,724	70,02	29,98
95	0,097	0,15	NA	0,986	0,998	100,00	0,00
96	0,494	0,76	SA	0,866	0,768	88,68	11,32
97	0,064	0,10	NA	1,036	0,908	87,64	12,36
98	0,249	0,38	WA	0,960	0,838	87,29	12,71
99	0,252	0,39	WA	1,068	0,992	92,88	7,12
100	0,298	0,46	WA	0,978	0,724	74,03	25,97
101	0,361	0,56	MA	0,932	0,838	89,91	10,09
102	0,127	0,20	WA	0,942	0,862	91,51	8,49
103	0,063	0,10	NA	1,020	1,016	99,61	0,39
104	0,509	0,79	SA	0,984	0,728	73,98	26,02
105	0,028	0,04	NA	1,028	0,946	92,02	7,98
106	0,240	0,37	WA	0,956	0,940	98,33	1,67
107	0,000	0,00	NA	0,956	0,912	95,40	4,60
108	0,051	0,08	NA	0,964	0,918	95,23	4,77
109	0,192	0,30	WA	0,942	0,822	87,26	12,74
110	0,002	0,00	NA	0,864	0,844	97,69	2,31
111	0,203	0,31	WA	1,056	1,010	95,64	4,36
112	0,413	0,64	MA	0,914	0,880	96,28	3,72
113	0,252	0,39	WA	0,910	0,958	100,00	0,00
114	0,135	0,21	WA	0,974	0,972	99,79	0,21
115	0,277	0,43	WA	1,078	0,982	91,09	8,91

116	0,027	0,04	NA	0,984	0,984	100,00	0,00
117	0,370	0,57	MA	0,894	0,924	100,00	0,00
119	0,000	0,00	NA	0,950	0,908	95,58	4,42
120	0,000	0,00	NA	0,932	0,920	98,71	1,29
121	0,152	0,23	WA	1,000	0,950	95,00	5,00
122	0,052	0,08	NA	0,968	0,874	90,29	9,71
124	0,403	0,62	MA	0,876	0,876	100,00	0,00
125	0,273	0,42	WA	0,918	0,846	92,16	7,84
126	0,241	0,37	WA	0,870	0,600	68,97	31,03
127	0,636	0,98	SA	0,978	0,890	91,00	9,00
128	0,296	0,46	WA	0,948	0,890	93,88	6,12
129	0,000	0,00	NA	0,938	0,938	100,00	0,00
130	0,301	0,46	WA	0,964	0,914	94,81	5,19
131	0,576	0,89	SA	0,888	0,728	81,98	18,02
132	0,000	0,00	NA	1,080	1,026	95,00	5,00
133	0,000	0,00	NA	0,948	1,000	100,00	0,00
134	0,000	0,00	NA	0,884	0,920	100,00	0,00
135	0,058	0,09	NA	1,052	1,048	99,62	0,38
136	0,000	0,00	NA	1,008	0,970	96,23	3,77
137	0,034	0,05	NA	1,078	0,956	88,68	11,32
138	0,067	0,10	NA	0,824	0,782	94,90	5,10
139	0,004	0,01	NA	0,952	0,958	100,00	0,00
140	0,000	0,00	NA	0,914	0,910	99,56	0,44
141	0,000	0,00	NA	1,030	0,978	94,95	5,05
142	0,420	0,65	MA	0,978	0,980	100,00	0,00
143	0,000	0,00	NA	1,000	0,888	88,80	11,20
144	0,240	0,37	WA	0,978	0,926	94,68	5,32
145	0,074	0,11	NA	0,956	0,920	96,23	3,77
146	0,607	0,94	SA	0,960	0,840	87,50	12,50
147	0,609	0,94	SA	1,094	1,116	100,00	0,00
148	0,021	0,03	NA	0,992	0,866	87,30	12,70
149	0,317	0,49	WA	0,966	0,988	100,00	0,00
150	0,353	0,54	MA	1,012	0,932	92,09	7,91
151	0,302	0,47	WA	1,042	1,006	96,55	3,45
152	0,000	0,00	NA	1,056	1,024	96,97	3,03
154	0,082	0,13	NA	1,008	0,876	86,90	13,10
155	0,000	0,00	NA	1,024	0,846	82,62	17,38
156	0,131	0,20	WA	0,970	0,920	94,85	5,15

157	0,026	0,04	NA	1,048	0,890	84,92	15,08
158	0,036	0,06	NA	1,000	0,906	90,60	9,40
158B	0,091	0,14	NA	0,996	0,912	91,57	8,43
159	0,011	0,02	NA	0,970	0,864	89,07	10,93
160	0,002	0,00	NA	0,960	0,858	89,38	10,63
162	0,000	0,00	NA	1,060	0,920	86,79	13,21
163	0,000	0,00	NA	1,040	0,914	87,88	12,12
164	0,000	0,00	NA	1,040	0,864	83,08	16,92
165	0,000	0,00	NA	1,060	0,982	92,64	7,36
166	0,000	0,00	NA	1,000	0,890	89,00	11,00
167	0,483	0,74	SA	0,912	0,812	89,04	10,96
168	0,000	0,00	NA	1,048	0,860	82,06	17,94
169	0,000	0,00	NA	1,200	1,072	89,33	10,67
170	0,339	0,52	MA	1,024	0,868	84,77	15,23
171	0,000	0,00	NA	1,158	1,106	95,51	4,49
172	0,000	0,00	NA	1,030	0,940	91,26	8,74
173	0,015	0,02	NA	1,036	0,894	86,29	13,71
174	0,000	0,00	NA	1,032	0,968	93,80	6,20
175	0,487	0,75	SA	1,040	0,880	84,62	15,38
176	0,105	0,16	NA	1,040	0,874	84,04	15,96
177	0,013	0,02	NA	1,024	1,024	100,00	0,00
178	0,000	0,00	NA	1,046	0,956	91,40	8,60
179	0,033	0,05	NA	1,044	0,990	94,83	5,17
180	0,599	0,92	SA	1,000	0,886	88,60	11,40
181	0,008	0,01	NA	1,006	0,934	92,84	7,16
182	0,000	0,00	NA	0,994	0,884	88,93	11,07
183	0,062	0,10	NA	0,976	0,896	91,80	8,20
184	0,133	0,21	WA	0,980	0,824	84,08	15,92
185	0,000	0,00	NA	1,038	0,988	95,18	4,82
186	0,002	0,00	NA	1,080	0,900	83,33	16,67
187	0,271	0,42	WA	0,940	0,836	88,94	11,06
188	0,309	0,48	WA	0,958	0,956	99,79	0,21
189	0,000	0,00	NA	0,922	0,900	97,61	2,39
190	0,046	0,07	NA	0,990	0,912	92,12	7,88
191	0,000	0,00	NA	1,056	1,042	98,67	1,33
192	0,086	0,13	NA	1,140	1,048	91,93	8,07
193	0,004	0,01	NA	1,022	0,968	94,72	5,28
194	0,504	0,78	SA	1,034	1,054	100,00	0,00

195	0,314	0,49	WA	0,900	0,892	99,11	0,89
196	0,210	0,32	WA	0,946	0,852	90,06	9,94
197	0,261	0,40	WA	1,004	0,900	89,64	10,36
198	0,295	0,46	WA	0,902	0,394	43,68	56,32
199	0,181	0,28	WA	0,896	0,408	45,54	54,46
200	0,028	0,04	NA	0,938	0,858	91,47	8,53
201	0,341	0,53	MA	0,930	0,878	94,41	5,59
202	0,207	0,32	WA	0,896	0,866	96,65	3,35
203	0,305	0,47	WA	0,920	0,780	84,78	15,22
204	0,315	0,49	WA	0,908	0,898	98,90	1,10
205	0,693	1,07	SA	0,872	0,534	61,24	38,76
206	0,174	0,27	WA	0,960	0,856	89,17	10,83
207	0,465	0,72	SA	0,956	0,712	74,48	25,52
208	0,286	0,44	WA	1,032	0,866	83,91	16,09
209	0,453	0,70	SA	0,872	0,652	74,77	25,23
210	0,000	0,00	NA	0,960	0,854	88,96	11,04
211	0,000	0,00	NA	0,936	0,830	88,68	11,32
212	0,185	0,29	WA	0,910	0,778	85,49	14,51
213	0,561	0,87	SA	0,960	0,826	86,04	13,96
214	0,181	0,28	WA	1,000	0,932	93,20	6,80
215	0,174	0,27	WA	0,978	0,914	93,46	6,54
216	0,538	0,83	SA	0,956	0,946	98,95	1,05
217	0,144	0,22	WA	0,996	0,928	93,17	6,83
218	0,306	0,47	WA	1,088	0,980	90,07	9,93
219	0,221	0,34	WA	1,096	1,020	93,07	6,93
220	0,484	0,75	SA	1,042	0,978	93,86	6,14
221	0,278	0,43	WA	0,946	0,810	85,62	14,38
222	0,287	0,44	WA	1,006	0,894	88,87	11,13
223	0,674	1,04	SA	1,012	0,740	73,12	26,88
224	0,394	0,61	MA	0,936	0,800	85,47	14,53
225	0,354	0,55	MA	1,010	0,956	94,65	5,35
226	0,144	0,22	WA	0,926	0,660	71,27	28,73
227	0,637	0,98	SA	0,864	0,612	70,83	29,17
228	0,587	0,91	SA	0,984	0,934	94,92	5,08
229	0,147	0,23	WA	0,784	0,784	100,00	0,00
230	0,239	0,37	WA	0,960	0,872	90,83	9,17
231	0,046	0,07	NA	0,962	0,858	89,19	10,81
232	0,520	0,80	SA	0,870	0,620	71,26	28,74

233	0,133	0,20	WA	0,950	0,896	94,32	5,68
234	0,301	0,46	WA	0,850	0,768	90,35	9,65
235	0,154	0,24	WA	0,972	0,864	88,89	11,11
236	0,164	0,25	WA	0,916	0,746	81,44	18,56
237	0,060	0,09	NA	0,992	0,890	89,72	10,28
238	0,284	0,44	WA	0,908	0,910	100,00	0,00
239	0,000	0,00	NA	0,990	0,822	83,03	16,97
240	0,313	0,48	WA	0,920	0,878	95,43	4,57
241	0,592	0,91	SA	0,884	0,750	84,84	15,16
242	0,000	0,00	NA	0,920	0,532	57,83	42,17
243	0,091	0,14	NA	1,016	0,966	95,08	4,92
244	0,187	0,29	WA	0,890	0,804	90,34	9,66
245	0,431	0,67	MA	0,918	0,916	99,78	0,22
246	0,409	0,63	MA	0,834	0,704	84,41	15,59
247	0,173	0,27	WA	0,888	0,734	82,66	17,34
248	0,537	0,83	SA	0,874	0,880	100,00	0,00
249	0,304	0,47	WA	1,000	0,900	90,00	10,00
249B	0,000	0,00	NA	0,970	0,780	80,41	19,59
250	0,435	0,67	MA	1,022	0,870	85,13	14,87
251	0,011	0,02	NA	0,894	0,810	90,60	9,40
254	0,140	0,22	WA	0,966	0,906	93,79	6,21
255	0,170	0,26	WA	0,946	0,870	91,97	8,03
256	0,257	0,40	WA	0,910	0,920	100,00	0,00
257	0,000	0,00	NA	0,920	0,812	88,26	11,74
258	0,373	0,58	MA	0,928	0,800	86,21	13,79
259	0,000	0,00	NA	0,960	0,934	97,29	2,71
260	0,323	0,50	MA	0,463	0,446	96,33	3,67
261	0,495	0,76	SA	0,426	0,388	91,08	8,92
262	0,284	0,44	WA	0,550	0,513	93,27	6,73
263	0,441	0,68	MA	0,438	0,400	91,32	8,68
264	0,596	0,92	SA	0,403	0,386	95,78	4,22
265	0,167	0,26	WA	0,462	0,426	92,21	7,79
266	0,588	0,91	SA	0,491	0,468	95,32	4,68
267	0,505	0,78	SA	0,428	0,453	100,00	0,00
268	0,055	0,08	NA	0,493	0,490	99,39	0,61
269	0,209	0,32	WA	0,443	0,448	100,00	0,00
270	0,650	1,00	SA	0,481	0,418	86,90	13,10
271	0,293	0,45	WA	0,449	0,168	37,42	62,58

272	0,000	0,00	NA	0,469	0,469	100,00	0,00
273	0,000	0,00	NA	0,465	0,455	97,85	2,15
274	0,031	0,05	NA	0,425	0,466	100,00	0,00
275	0,644	0,99	SA	0,494	0,459	92,91	7,09
276	0,040	0,06	NA	0,465	0,473	100,00	0,00
277	0,210	0,32	WA	0,450	0,458	100,00	0,00
278	0,125	0,19	NA	0,439	0,450	100,00	0,00
279	0,632	0,98	SA	0,448	0,456	100,00	0,00
280	0,000	0,00	NA	0,490	0,464	94,69	5,31
281	0,046	0,07	NA	0,454	0,438	96,48	3,52
282	0,197	0,30	WA	0,473	0,484	100,00	0,00
283	0,176	0,27	WA	0,482	0,482	100,00	0,00
284	0,042	0,07	NA	0,441	0,433	98,19	1,81
285	0,000	0,00	NA	0,500	0,495	99,00	1,00
286	0,413	0,64	MA	0,400	0,400	100,00	0,00
287	0,529	0,82	SA	0,538	0,543	100,00	0,00
288	0,075	0,12	NA	0,475	0,420	88,42	11,58
289	0,144	0,22	WA	0,515	0,446	86,60	13,40
290	0,295	0,45	WA	0,483	0,417	86,34	13,66
291	0,214	0,33	WA	0,477	0,403	84,49	15,51
292	0,121	0,19	NA	0,499	0,472	94,59	5,41
293	0,269	0,41	WA	0,513	0,447	87,13	12,87
294	0,000	0,00	NA	0,505	0,447	88,51	11,49
295	0,297	0,46	WA	0,413	0,312	75,54	24,46
296	0,020	0,03	NA	0,468	0,414	88,46	11,54
297	0,226	0,35	WA	0,510	0,448	87,84	12,16
298	0,180	0,28	WA	0,483	0,489	100,00	0,00
299	0,176	0,27	WA	0,484	0,433	89,46	10,54
300	0,279	0,43	WA	0,946	0,808	85,41	14,59
301	0,040	0,06	NA	0,950	0,788	82,95	17,05
302	0,452	0,70	SA	1,022	0,932	91,19	8,81
303	0,232	0,36	WA	1,040	0,918	88,27	11,73
304	0,369	0,41	WA	1,018	0,976	95,87	4,13
305	0,520	0,80	SA	0,948	0,878	92,62	7,38
306	0,294	0,45	WA	0,906	0,838	92,49	7,51
307	0,006	0,00	NA	0,938	0,806	85,93	14,07
308	0,194	0,30	WA	0,964	0,868	90,04	9,96
309	0,049	0,02	NA	1,020	0,796	78,04	21,96

310	0,324	0,50	MA	1,020	0,972	95,29	4,71
311	0,008	0,01	NA	0,936	0,980	100,00	0,00
312	0,040	0,06	NA	1,048	0,910	86,83	13,17
313	0,386	0,60	MA	0,932	0,878	94,21	5,79
314	0,026	0,04	NA	0,906	0,852	94,04	5,96
315	0,003	0,00	NA	0,968	0,926	95,66	4,34
316	0,475	0,73	SA	0,860	0,834	96,98	3,02
317	0,315	0,49	WA	0,936	0,786	83,97	16,03
318	0,426	0,65	MA	0,842	0,686	81,47	18,53
319	0,000	0,00	NA	0,924	0,810	87,66	12,34
320	0,418	0,65	MA	0,914	0,906	99,12	0,88
321	0,252	0,39	WA	0,946	0,896	94,71	5,29
322	0,351	0,54	MA	0,860	0,680	79,07	20,93
323	0,206	0,32	WA	0,890	0,704	79,10	20,90
324	0,164	0,25	WA	0,898	0,770	85,75	14,25
325	0,291	0,45	WA	0,800	0,836	100,00	0,00
326	0,282	0,44	WA	0,858	0,730	85,08	14,92
327	0,017	0,03	NA	0,924	0,800	86,58	13,42
328	0,384	0,59	MA	0,800	0,678	84,75	15,25
329	0,300	0,46	WA	0,906	0,750	82,78	17,22
330	0,133	0,21	WA	0,996	1,010	100,00	0,00
331	0,000	0,00	NA	0,978	0,880	89,98	10,02
332	0,079	0,12	NA	1,090	0,868	79,63	20,37
333	0,000	0,00	NA	1,050	0,922	87,81	12,19
334	0,435	0,67	MA	0,878	0,848	96,58	3,42
335	0,026	0,04	NA	0,934	0,856	91,65	8,35
336	0,000	0,00	NA	0,962	0,898	93,35	6,65
337	0,271	0,42	WA	0,948	0,952	100,00	0,00
338	0,251	0,39	WA	0,894	0,850	95,08	4,92
339	0,000	0,00	NA	0,886	0,856	96,61	3,39
340	0,221	0,34	WA	0,916	0,820	89,52	10,48
341	0,395	0,61	MA	0,892	0,796	89,24	10,76
342	0,038	0,06	NA	0,848	0,806	95,05	4,95
343	0,082	0,31	WA	0,972	0,564	58,02	41,98
344	0,303	0,47	WA	0,878	0,838	95,44	4,56
345	0,328	0,51	MA	0,960	0,800	83,33	16,67
346	0,352	0,54	MA	0,816	0,630	77,21	22,79
347	0,000	0,00	NA	0,908	0,760	83,70	16,30

348	0,000	0,00	NA	0,832	0,720	86,54	13,46
349	0,539	0,83	SA	0,900	0,688	76,44	23,56
350	0,102	0,16	NA	0,938	0,840	89,55	10,45
351	0,053	0,08	NA	0,888	0,864	97,30	2,70
352	0,387	0,60	MA	0,936	0,768	82,05	17,95
353	0,508	0,78	SA	0,850	0,960	100,00	0,00
354	0,206	0,32	WA	0,820	0,720	87,80	12,20
355	0,033	0,05	NA	0,800	0,734	91,75	8,25
356	0,086	0,13	NA	0,918	0,692	75,38	24,62
357	0,092	0,14	NA	0,816	0,674	82,60	17,40
358	0,328	0,51	MA	0,900	0,776	86,22	13,78
359	0,810	1,25	SA	0,760	0,594	78,16	21,84
360	0,286	0,44	WA	0,932	0,758	81,33	18,67
361	0,794	1,22	SA	0,944	0,782	82,84	17,16
362	0,148	0,23	WA	1,002	0,870	86,83	13,17
363	0,064	0,10	NA	0,956	0,912	95,40	4,60
364	0,554	0,85	SA	1,600	0,564	35,25	64,75
365	0,342	0,53	MA	0,920	0,748	81,30	18,70
366	0,346	0,53	MA	0,874	0,800	91,53	8,47
367	0,666	1,03	SA	0,960	0,864	90,00	10,00
368	0,000	0,00	NA	0,944	0,796	84,32	15,68
369	0,080	0,12	NA	0,912	0,892	97,81	2,19
370	0,126	0,19	NA	1,012	0,932	92,09	7,91
371	0,050	0,08	NA	0,904	0,886	98,01	1,99
372	0,275	0,42	WA	0,930	0,878	94,41	5,59
373	0,199	0,31	WA	0,910	0,844	92,75	7,25
374	0,068	0,10	NA	1,012	0,868	85,77	14,23
375	0,131	0,20	WA	0,900	0,792	88,00	12,00
376	0,486	0,75	SA	0,840	0,784	93,33	6,67
377	0,607	0,94	SA	0,816	0,714	87,50	12,50
378	0,688	1,06	SA	0,794	0,724	91,18	8,82
379	0,000	0,00	NA	0,848	0,792	93,40	6,60
380	0,422	0,65	MA	0,824	0,640	77,67	22,33
381	0,283	0,43	WA	0,858	0,830	96,74	3,26
382	0,232	0,36	WA	0,888	0,944	100,00	0,00
383	0,530	0,85	SA	0,900	0,860	95,56	4,44
384	0,127	0,20	WA	0,778	0,710	91,26	8,74
385	0,483	0,75	SA	0,940	0,854	90,85	9,15

386	0,032	0,05	NA	0,870	0,798	91,72	8,28
387	0,122	0,19	NA	0,874	0,818	93,59	6,41
388	0,701	1,08	SA	0,872	0,824	94,50	5,50
389	0,111	0,17	NA	0,840	0,504	60,00	40,00
390	0,127	0,20	WA	0,870	0,774	88,97	11,03
391	0,423	0,65	MA	0,892	0,854	95,74	4,26
392	0,000	0,00	NA	0,836	0,788	94,26	5,74
393	0,406	0,63	MA	0,888	0,830	93,47	6,53
394	0,340	0,52	MA	0,992	0,792	79,84	20,16
395	0,000	0,00	NA	0,864	0,772	89,35	10,65
396	0,082	0,13	NA	0,856	0,790	92,29	7,71
397	0,411	0,63	MA	0,884	0,800	90,50	9,50
398	0,376	0,58	MA	0,876	0,792	90,41	9,59
399	0,127	0,20	WA	0,752	0,780	100,00	0,00
400	0,023	0,04	NA	0,978	1,028	100,00	0,00
401	0,000	0,00	NA	0,942	0,948	100,00	0,00
402	0,416	0,64	MA	0,914	0,470	51,42	48,58
403	0,161	0,25	WA	0,914	0,902	98,69	1,31
404	0,007	0,01	NA	0,848	0,860	100,00	0,00
405	0,000	0,00	NA	0,904	0,890	98,45	1,55
406	0,000	0,00	NA	0,948	0,912	96,20	3,80
407	0,098	0,15	NA	0,788	0,804	100,00	0,00
408	0,000	0,00	NA	0,872	0,858	98,39	1,61
409	0,439	0,68	MA	1,018	1,008	99,02	0,98
410	0,000	0,00	NA	0,900	0,844	93,78	6,22
411	0,000	0,00	NA	0,922	0,872	94,58	5,42
412	0,191	0,30	WA	1,030	0,966	93,79	6,21
413	0,400	0,62	MA	1,024	0,972	94,92	5,08
414	0,204	0,32	WA	0,936	0,894	95,51	4,49
415	0,593	0,91	SA	0,968	0,968	100,00	0,00
416	0,700	1,08	SA	0,956	0,938	98,12	1,88
417	0,094	0,14	NA	0,894	0,888	99,33	0,67
418	0,008	0,01	NA	0,920	0,884	96,09	3,91
419	0,216	0,33	WA	0,958	0,874	91,23	8,77
420	0,009	0,01	NA	0,948	0,948	100,00	0,00
421	0,088	0,14	NA	0,916	0,852	93,01	6,99
422	0,285	0,44	WA	0,880	0,880	100,00	0,00
423	0,034	0,05	NA	1,012	1,012	100,00	0,00

424	0,668	1,03	SA	0,972	0,940	96,71	3,29
425	0,013	0,02	NA	0,996	0,980	98,39	1,61
426	0,581	0,90	SA	0,944	0,920	97,46	2,54
427	0,059	0,09	NA	0,988	0,960	97,17	2,83
429	0,075	0,12	NA	1,184	1,022	86,32	13,68
430	0,127	0,20	NA	1,148	0,904	78,75	21,25
432	0,406	0,63	MA	1,114	1,052	94,43	5,57
433	0,065	0,10	NA	1,064	1,064	100,00	0,00
434	0,101	0,16	NA	1,140	1,070	93,86	6,14
435	0,159	0,25	WA	1,132	1,080	95,41	4,59
436	0,376	0,58	MA	1,142	1,090	95,45	4,55
437	0,081	0,13	NA	1,010	0,068	6,73	93,27
438	0,272	0,42	WA	1,018	0,800	78,59	21,41
439	0,206	0,32	WA	1,110	1,008	90,81	9,19
440	0,408	0,63	WA	1,056	1,026	97,16	2,84
441	0,199	0,31	WA	1,092	1,016	93,04	6,96
442	0,218	0,34	WA	1,036	0,968	93,44	6,56
443	0,131	0,20	NA	1,084	1,034	95,39	4,61
444	0,360	0,56	MA	0,974	0,346	35,52	64,48
445	0,037	0,06	NA	1,094	1,024	93,60	6,40
446	0,265	0,41	WA	1,056	1,096	100,00	0,00
447	0,140	0,22	WA	1,094	1,052	96,16	3,84
448	0,000	0,00	NA	0,932	0,932	100,00	0,00
449	0,024	0,04	NA	1,018	0,968	95,09	4,91
450	0,419	0,65	MA	1,018	1,012	99,41	0,59
451	0,164	0,25	WA	0,960	0,948	98,75	1,25
452	0,618	0,95	SA	1,014	0,968	95,46	4,54
453	0,627	0,97	SA	1,044	1,042	99,81	0,19
454	0,319	0,49	WA	1,000	0,992	99,20	0,80
455	0,082	0,13	NA	0,994	0,962	96,78	3,22
456	0,705	1,09	SA	0,964	0,880	91,29	8,71
457	0,093	0,14	NA	0,998	0,988	99,00	1,00
458	0,078	0,12	NA	0,996	0,996	100,00	0,00
459	0,216	0,33	WA	1,024	0,892	87,11	12,89

Los datos representan la media de tres experimentos distintos.

## **ANEXO II**



	GEN	SC5314	270 MUY	359 MUY	456 MUY	208 POCO	317 POCO	329 POCO	286 MEDIO	318 MEDIO	394 MEDIO
1	<b>AAT1</b>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
2	<b>AAT21</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
3	<b>ABP1</b>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
4	<b>ACB1</b>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
5	<b>ACH1</b>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
6	<b>ACO1</b>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
7	<b>ACO2</b>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
8	<b>ACP1</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
9	<b>ACP12</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
10	<b>ACS1</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
11	<b>ACS2</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
12	<b>ACT1</b>	•	•	•	•	•	—	•	—	•	•
13	<b>ADE1</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
14	<b>ADE12</b>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
15	<b>ADE13</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
16	<b>ADE17</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
17	<b>ADE5,7</b>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
18	<b>ADE6</b>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
19	<b>ADH1</b>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
20	<b>ADH2</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	•	—
21	<b>ADH5</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
22	<b>ADK1</b>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
23	<b>ADO1</b>	•	•	•	•	—	•	—	—	—	—
24	<b>AGE3</b>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
25	<b>AHP1</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
26	<b>AHP2</b>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
27	<b>ALA1</b>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
28	<b>ALD5</b>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
29	<b>ALI1</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
30	<b>ALS3</b>	—	•	•	—	•	—	—	—	•	•
31	<b>AMS1</b>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
32	<b>ANB1</b>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
33	<b>APR1</b>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

34	<i>APT1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
35	<i>ARA1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
36	<i>ARC1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
37	<i>ARC15</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
38	<i>ARD</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	—
39	<i>ARF1</i>	•	•	•	•	•	—	•	—	•	•
40	<i>ARF2</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
41	<i>ARG1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
42	<i>ARG5,6</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
43	<i>ARO10</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
44	<i>ARO2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	•	—
45	<i>ARO3</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
46	<i>ARO4</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
47	<i>ARO8</i>	—	—	•	—	—	—	—	—	—	—
48	<i>ARP2</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
49	<i>ASC1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
50	<i>ASR1</i>	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•
51	<i>ASR2</i>	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•
52	<i>ASR3</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
53	<i>ATO1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
54	<i>ATP1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
55	<i>ATP14</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
56	<i>ATP16</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	—
57	<i>ATP17</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
58	<i>ATP18</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
59	<i>ATP19</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
60	<i>ATP2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
61	<i>ATP20</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
62	<i>ATP3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
63	<i>ATP4</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
64	<i>ATP5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
65	<i>ATP7</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
66	<i>ATX1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
67	<i>BAT22</i>	—	•	•	—	—	—	—	•	—	—
68	<i>BCY1</i>	•	•	•	4	—	—	—	—	—	—
69	<i>BEM2</i>	—	—	—	—	—	—	—	•	—	—
70	<i>BFR1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
71	<i>BGL2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
72	<i>BLP1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
73	<i>BMH1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
74	<i>BNR1</i>	—	—	—	—	—	•	•	—	•	•
75	<i>BUB3</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
76	<i>C1_00270W_A</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•

77	C1_00420W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
78	C1_00450C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
79	C1_00700W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
80	C1_00790W_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
81	C1_00920W_A	—	—	—	—	—	—	—	—	•	—
82	C1_01300W_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
83	C1_01490W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
84	C1_01580W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
85	C1_01930W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
86	C1_02270C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
87	C1_02310C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
88	C1_02330C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
89	C1_02650W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
90	C1_02780W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
91	C1_03100W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
92	C1_03170C_A	—	—	—	—	•	•	•	•	•	•
93	C1_03240W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	•	—
94	C1_03370W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
95	C1_03510C_A	•	•	•	•	•	•	—	•	•	—
96	C1_03620C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
97	C1_03660W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
98	C1_04010C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
99	C1_04360C_A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
100	C1_04370C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
101	C1_04430C_A	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
102	C1_04970W_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
103	C1_05160C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
104	C1_05180C_A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
105	C1_05190C_A	•	•	•	•	•	•	•	—	•	•
106	C1_05490C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
107	C1_05670W_A	—	—	—	—	•	—	—	—	•	—
108	C1_05720W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
109	C1_06470W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
110	C1_06600W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
111	C1_06640C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
112	C1_06650W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
113	C1_06670W_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
114	C1_06890C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
115	C1_07360W_A	—	—	—	—	•	•	•	—	•	•
116	C1_07510W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
117	C1_08050W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
118	C1_08350C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
119	C1_08520C_A	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—

120	C1_08680C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
121	C1_09350W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
122	C1_10240C_A	•	•	•	•	•	—	—	•	•	•
123	C1_10280C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
124	C1_10680C_A	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
125	C1_11120C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
126	C1_11200W_A	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
127	C1_11320C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	•	—
128	C1_11860W_A	—	•	—	—	—	—	•	—	—	—
129	C1_13190W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
130	C1_13260W_A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
131	C1_13270W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
132	C1_13320C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
133	C1_13690C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
134	C1_14060W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
135	C1_14090W_A	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
136	C1_14450C_A	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
137	C1_14500C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
138	C1_14630C_A	—	—	—	—	—	•	—	•	•	•
139	C2_00880W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
140	C2_00940W_A	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
141	C2_01440C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
142	C2_01450C_A	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
143	C2_01720C_A	—	—	—	—	•	—	—	—	•	—
144	C2_02050C_A	—	—	—	—	—	—	—	•	—	—
145	C2_02150C_A	—	—	—	—	—	—	—	•	—	—
146	C2_02310W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
147	C2_02410W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
148	C2_02620W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
149	C2_03210W_A	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
150	C2_03260W_A	—	•	•	—	•	—	—	•	•	•
151	C2_04170C_A	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
152	C2_04490W_A	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
153	C2_04850C_A	—	—	—	—	—	—	•	—	—	—
154	C2_05410W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
155	C2_05480C_A	—	—	—	—	•	—	—	•	—	•
156	C2_05550W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
157	C2_05710C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
158	C2_05760C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
159	C2_06630C_A	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
160	C2_07000W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
161	C2_07140W_A	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
162	C2_07190C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—

163	C2_07200W_A	●	●	●	●	●	—	—	—	●	—
164	C2_07420W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
165	C2_07540W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
166	C2_07550W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
167	C2_07630C_A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
168	C2_07680W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
169	C2_08160C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
170	C2_08260W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
171	C2_08650W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
172	C2_08930W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
173	C2_09040W_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
174	C2_09690C_A	—	—	—	—	—	—	●	—	—	—
175	C2_09980W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
176	C2_10070W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
177	C2_10650W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
178	C2_10670W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
179	C3_00380C_A	—	—	—	—	—	●	—	—	—	●
180	C3_00850C_A	●	●	●	●	●	—	●	—	—	—
181	C3_00910W_A	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
182	C3_01420C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
183	C3_01610W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
184	C3_01780C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
185	C3_01890C_A	●	—	●	●	—	—	—	—	—	—
186	C3_02180C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
187	C3_02620C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
188	C3_02920W_A	●	●	●	●	●	—	—	—	●	—
189	C3_03300C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
190	C3_03340C_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
191	C3_03410C_A	—	●	—	—	—	—	—	—	—	—
192	C3_03590W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
193	C3_03740W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
194	C3_03920W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
195	C3_04080W_A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
196	C3_04380C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
197	C3_04590W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
198	C3_04810C_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
199	C3_04920C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
200	C3_06490W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
201	C3_06750W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
202	C3_06860C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
203	C3_06920W_A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
204	C3_07390C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
205	C3_07580W_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—

206	C4_00170W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
207	C4_00330C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
208	C4_00420C_A	—	—	●	—	—	—	—	—	—	—
209	C4_01140C_A	—	—	—	—	●	—	●	—	—	●
210	C4_01460C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
211	C4_01510W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
212	C4_01560C_A	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
213	C4_01720C_A	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
214	C4_01800W_A	—	—	—	—	—	—	—	—	●	—
215	C4_01840C_A	●	●	●	●	—	—	—	●	—	—
216	C4_02340W_A	●	●	●	●	●	—	●	●	●	●
217	C4_02470C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
218	C4_02520C_A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	●
219	C4_02620C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
220	C4_02860W_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
221	C4_03090W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
222	C4_03400W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
223	C4_03770W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
224	C4_04330C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
225	C4_04350W_A	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
226	C4_04390W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
227	C4_04800W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
228	C4_04970C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
229	C4_05580C_A	—	●	●	—	●	●	●	—	—	●
230	C4_05610C_A	—	●	—	—	—	—	—	—	—	—
231	C4_06130W_A	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
232	C4_06470W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
233	C4_06800W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
234	C4_06880C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
235	C5_00100C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
236	C5_00150C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
237	C5_00310C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
238	C5_00330C_A	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
239	C5_00560W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
240	C5_00850C_A	—	—	—	—	●	—	●	—	●	—
241	C5_01000C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
242	C5_01230C_A	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
243	C5_01420W_A	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
244	C5_01540W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
245	C5_01890W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
246	C5_02110W_A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
247	C5_02140C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
248	C5_02190C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—

249	C5_02380W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
250	C5_02400W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
251	C5_02660C_A	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
252	C5_03140C_A	—	●	—	—	—	—	—	—	—	—
253	C5_03400C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
254	C5_03550W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
255	C5_03870C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
256	C5_03960W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
257	C5_04300C_A	●	—	●	●	—	—	—	—	—	—
258	C5_04470C_A	●	●	●	●	●	●	●	—	●	●
259	C5_04720C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
260	C5_04950C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
261	C5_05230C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
262	C5_05250C_A	—	—	●	—	—	—	—	—	—	—
263	C6_00090W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
264	C6_00360C_A	●	●	●	●	●	—	—	—	●	●
265	C6_00760W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
266	C6_00850W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
267	C6_00910C_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
268	C6_00930C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
269	C6_01210W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
270	C6_01560W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
271	C6_02030C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
272	C6_02100W_A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
273	C6_02330W_A	●	●	●	●	●	—	●	●	●	—
274	C6_02480W_A	—	—	—	—	●	—	—	—	●	●
275	C6_02740W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
276	C6_03130W_A	●	●	●	●	●	●	—	●	●	●
277	C6_03240W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
278	C6_03380W_A	●	—	●	—	—	—	—	—	—	—
279	C6_04100W_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
280	C6_04420W_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
281	C6_04560W_A	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
282	C7_00150W_A	—	●	●	—	—	—	●	—	—	●
283	C7_00250C_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
284	C7_00350C_A	●	●	●	●	●	●	—	—	●	●
285	C7_01160C_A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
286	C7_01360C_A	—	●	●	—	●	—	—	—	—	—
287	C7_02600C_A	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—
288	C7_03270W_A	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
289	C7_03650W_A	—	—	—	—	●	—	●	—	●	—
290	C7_03660C_A	—	●	—	—	—	—	—	—	—	—
291	C7_03860W_A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	●

292	<i>C7_03890C_A</i>	●	—	●	—	—	—	—	—	—	—
293	<i>C7_04210C_A</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
294	<i>CAB3</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
295	<i>CAM1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
296	<i>CAP1</i>	●	—	●	●	—	—	—	—	—	—
297	<i>CAR1</i>	●	●	●	●	●	●	—	●	●	●
298	<i>CAR2</i>	●	●	●	●	●	—	—	●	●	●
299	<i>CAT1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
300	<i>CAT2</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
301	<i>CBP1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
302	<i>CBR1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
303	<i>CCP1</i>	●	●	●	●	—	—	●	—	●	●
304	<i>CCS1</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
305	<i>CCT2</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
306	<i>CCT6</i>	—	—	—	—	●	●	—	—	—	●
307	<i>CDC10</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
308	<i>CDC12</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
309	<i>CDC19</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
310	<i>CDC3</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
311	<i>CDC48</i>	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
312	<i>CDC54</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	●
313	<i>CDC6</i>	—	—	—	—	—	—	●	—	—	—
314	<i>CDG1</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
315	<i>CEF3</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
316	<i>CHT2</i>	●	●	●	●	●	—	●	—	●	●
317	<i>CHT3</i>	—	—	—	—	●	●	●	●	●	●
318	<i>CHT4</i>	—	—	—	—	●	—	●	●	●	—
319	<i>CIP1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
320	<i>CIT1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
321	<i>CLC1</i>	●	●	●	●	●	—	●	●	●	●
322	<i>CMD1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
323	<i>CMP1</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	●	—
324	<i>CNB1</i>	●	●	●	●	●	—	●	●	●	●
325	<i>COF1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
326	<i>COI1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
327	<i>COX12</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
328	<i>COX13</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
329	<i>COX17</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
330	<i>COX2</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
331	<i>COX4</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	●	—
332	<i>COX5</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
333	<i>COX6</i>	●	●	●	●	●	—	●	●	●	●
334	<i>COX8</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—

335	COX9	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
336	CPR3	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
337	CPR6	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
338	CPY1	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
339	CR_00090C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
340	CR_00340C_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
341	CR_00430C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
342	CR_01280C_A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
343	CR_01300W_A	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
344	CR_01350C_A	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
345	CR_01490C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
346	CR_01790C_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
347	CR_02620C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
348	CR_03020C_A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
349	CR_04490C_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
350	CR_04650W_A	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
351	CR_04820W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
352	CR_04870C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
353	CR_05440W_A	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•
354	CR_05480W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
355	CR_05800C_A	—	—	—	—	•	•	•	•	•	•
356	CR_06500C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
357	CR_06510W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
358	CR_06530W_A	•	•	•	•	•	—	—	•	•	•
359	CR_06560C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
360	CR_06930W_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
361	CR_07020W_A	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
362	CR_07230W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
363	CR_08050C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
364	CR_08330W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
365	CR_08400C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
366	CR_08880C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
367	CR_08920W_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
368	CR_09010C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
369	CR_09240C_A	•	•	•	•	—	•	•	•	•	•
370	CR_09440C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
371	CR_09510C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
372	CR_09640C_A	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
373	CR_09670C_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
374	CR_10140W_A	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
375	CR_10230W_A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
376	CR_10280W_A	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•
377	CR_10290C_A	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—

378	<i>CRC1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
379	<i>CRD2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
380	<i>CRG1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
381	<i>CRH11</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
382	<i>CSA2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
383	<i>CSH1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
384	<i>CSP37</i>	•	•	•	•	•	•	—	—	—	—
385	<i>CTA3</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
386	<i>CTR1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
387	<i>CUE5</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
388	<i>CYB5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	•
389	<i>CYC1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
390	<i>CYP1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
391	<i>CYP5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
392	<i>CYS4</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
393	<i>CYT1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
394	<i>DAD1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
395	<i>DAK2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
396	<i>DBP5</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
397	<i>DCK2</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
398	<i>DDR48</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
399	<i>DED81</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
400	<i>DFI1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
401	<i>DNA2</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	•	—
402	<i>DOT5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
403	<i>DPM1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
404	<i>DPS1-1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
405	<i>DQD1</i>	—	—	—	—	•	—	—	•	•	•
406	<i>DUT1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
407	<i>ECE1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
408	<i>ECM14</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	•	—
409	<i>ECM15</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	•	•
410	<i>ECM33</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
411	<i>ECM4</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
412	<i>EFB1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
413	<i>EFG1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
414	<i>EFT2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
415	<i>EGD1</i>	•	•	•	•	•	—	—	•	•	—
416	<i>EGD2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
417	<i>EIF4E</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
418	<i>EMP24</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
419	<i>END3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
420	<i>ENG1</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•

421	<i>ENO1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
422	<i>ENT3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
423	<i>ERG10</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
424	<i>ERG11</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
425	<i>ERG13</i>	•	—	•	—	•	—	—	—	—	—
426	<i>ERG20</i>	•	—	•	•	—	—	—	—	—	—
427	<i>ERG6</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
428	<i>ERP5</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
429	<i>ETR1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
430	<i>FAA4</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
431	<i>FAB1</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
432	<i>FAS1</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
433	<i>FBA1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
434	<i>FBP1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
435	<i>FDH1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
436	<i>FDH3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
437	<i>FET34</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
438	<i>FHL1</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
439	<i>FMP27</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
440	<i>FOX2</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
441	<i>FOX3</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	•
442	<i>FRP3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
443	<i>FTR1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
444	<i>FUM11</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
445	<i>FUM12</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
446	<i>FUR1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
447	<i>FZO1</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
448	<i>GAD1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
449	<i>GAR1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
450	<i>GCA1</i>	—	—	—	—	•	—	—	•	•	—
451	<i>GCA2</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	•	•
452	<i>GCF1</i>	—	—	•	—	—	—	—	—	—	—
453	<i>GCV1</i>	—	—	•	—	—	—	—	—	—	—
454	<i>GCV2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
455	<i>GCV3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
456	<i>GCY1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
457	<i>GDH2</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
458	<i>GDH3</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
459	<i>GDI1</i>	•	—	•	—	—	—	—	—	—	—
460	<i>GFA1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
461	<i>GIN4</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
462	<i>GIS2</i>	•	•	•	—	•	—	—	—	•	—
463	<i>GLC7</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—

464	<i>GLE2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
465	<i>GLK1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
466	<i>GLK4</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
467	<i>GLO1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
468	<i>GLO2</i>	•	•	•	•	•	—	•	—	—	—
469	<i>GLR1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
470	<i>GLX3</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
471	<i>GND1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
472	<i>GPD1</i>	•	—	•	—	—	—	—	—	—	—
473	<i>GPH1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
474	<i>GPM1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
475	<i>GRE2</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
476	<i>GRE3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
477	<i>GRP2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
478	<i>GRS1</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
479	<i>GSP1</i>	•	•	•	•	•	•	—	•	•	•
480	<i>GTT11</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
481	<i>GTT12</i>	—	—	•	—	—	—	—	—	—	—
482	<i>GVP36</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
483	<i>HBR2</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
484	<i>HCR1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
485	<i>HEM13</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
486	<i>HET1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
487	<i>HGT1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
488	<i>HGT6</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
489	<i>HHF1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
490	<i>HHF22</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
491	<i>HHO1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
492	<i>HHT1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
493	<i>HIS1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
494	<i>HIS3</i>	—	—	—	•	—	—	—	•	—	—
495	<i>HMO1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
496	<i>HNT1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
497	<i>HOM2</i>	•	—	•	•	•	—	—	—	—	—
498	<i>HOM6</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
499	<i>HPT1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
500	<i>HSP104</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
501	<i>HSP12</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
501	<i>HSP21</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
503	<i>HSP30</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
504	<i>HSP60</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
505	<i>HSP70</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
506	<i>HSP78</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—

507	<i>HSP90</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
508	<i>HTA1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
509	<i>HTA2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
510	<i>HTA3</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
511	<i>HTB1</i>	•	•	•	•	—	•	—	—	•	—
512	<i>HTB2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	•
513	<i>HTS1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
514	<i>HXK2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
515	<i>HYR1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
516	<i>ICL1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
517	<i>IDH1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
518	<i>IDH2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
519	<i>IDI1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
520	<i>IDP1</i>	•	•	•	•	—	—	—	•	—	—
521	<i>IDP2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
522	<i>IFD6</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
523	<i>IFE2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
524	<i>IFR2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
525	<i>IHD1</i>	—	—	•	—	•	—	•	—	—	—
526	<i>ILV3</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	•	—
527	<i>ILV5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
528	<i>ILV6</i>	•	—	•	—	—	—	—	—	—	—
529	<i>IMH3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
530	<i>INO4</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
531	<i>IPP1 d</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
532	<i>IST2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
533	<i>KAR2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
534	<i>KEM1</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
535	<i>KGD1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
536	<i>KGD2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
537	<i>KRE9</i>	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•
538	<i>KRS1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	•
539	<i>KTI11</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
540	<i>LAP3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
541	<i>LAP41</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
542	<i>LAT1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
543	<i>LEU2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
544	<i>LHP1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
545	<i>LPD1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
546	<i>LPG20</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
547	<i>LSC1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
548	<i>LSC2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
549	<i>LSP1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—

550	<i>LTE1</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	●
551	<i>LYS1</i>	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
552	<i>LYS12</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
553	<i>LYS9</i>	—	—	●	—	—	—	—	—	—	—
554	<i>MBF1</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
555	<i>MCA1</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
556	<i>MCR1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
557	<i>MDG1</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	●	—
558	<i>MDH1</i>	●	●	●	●	●	●	—	●	—	—
559	<i>MDH1-1</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
560	<i>MDH1-3</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
561	<i>MEC1</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	●
562	<i>MET15</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
563	<i>MET6</i>	●	●	●	●	●	—	—	●	—	●
564	<i>MEU1</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	●	●
565	<i>MGE1</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
566	<i>MIA40</i>	—	●	●	—	●	—	●	—	—	—
567	<i>MIR1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
568	<i>MIS11</i>	—	●	—	—	—	—	—	—	—	—
569	<i>MLC1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
570	<i>MLP1</i>	—	●	—	—	●	—	—	—	—	—
571	<i>MLS1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
572	<i>MMD1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
573	<i>MP65</i>	—	●	●	—	●	●	—	●	●	—
574	<i>MPRL36</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
575	<i>MRF1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
576	<i>MRP8</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
577	<i>MRPL10</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
578	<i>MRPL19</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
579	<i>MRPL37</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
580	<i>MRS7</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
581	<i>MSB2</i>	—	—	—	—	●	●	●	●	●	●
582	<i>MSI3</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
583	<i>MVD</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
584	<i>MYO1</i>	—	—	—	—	●	—	—	●	—	●
585	<i>NAB3</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
586	<i>NAP1</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
587	<i>NCB2</i>	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
588	<i>NCE102</i>	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
589	<i>NCP1</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
590	<i>NCR1</i>	—	—	—	—	●	●	●	●	—	●
591	<i>NHP6A</i>	●	●	●	●	●	●	●	—	—	—
592	<i>NIF3</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—

593	<i>NOP10</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	—
594	<i>NOP14</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
595	<i>NOP4</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	•
596	<i>NOP5</i>	—	—	•	—	—	—	—	—	—	—
597	<i>NSP1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
598	<i>NTF2</i>	•	•	•	•	—	•	•	—	•	•
599	<i>NUC2</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
600	<i>NUO</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
601	<i>NUO2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
602	<i>OFR1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
603	<i>OP4</i>	—	•	•	—	•	•	•	—	—	•
604	<i>ORM1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
605	<i>OSM1</i>	•	•	•	•	—	—	—	•	—	—
606	<i>PAN1</i>	—	•	•	—	•	—	—	—	—	—
607	<i>PCK1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
608	<i>PDA1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
609	<i>PDB1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
610	<i>PDC11</i>	•	•	•	•	•	•	—	—	—	—
611	<i>PDI1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
612	<i>PDX1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
613	<i>PDX3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
614	<i>PET9</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
615	<i>PEX11</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
616	<i>PEX14</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
617	<i>PEX19</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
618	<i>PFY1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
619	<i>PGA10</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
620	<i>PGA4</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
621	<i>PGA45</i>	—	•	•	—	•	•	—	—	•	—
622	<i>PGA63</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
623	<i>PGI1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
624	<i>PGK1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
625	<i>PGM2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
626	<i>PHB1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
627	<i>PHB2</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
628	<i>PHHB</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
629	<i>PHM7</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
630	<i>PHO88</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
631	<i>PHR1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
632	<i>PHR2</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
633	<i>PIL1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
634	<i>PIN3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
635	<i>PMA1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—

636	<i>PMC1</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
637	<i>PMI1</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
638	<i>PMM1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
639	<i>PNC1</i>	—	—	—	—	●	●	—	—	—	—
640	<i>PNP1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
641	<i>POL30</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
642	<i>POR1</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
643	<i>POT1</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	—	●
644	<i>POX1-3</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
645	<i>PPH21</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
646	<i>PR26</i>	●	—	●	—	—	—	—	—	—	—
647	<i>PRA1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	—	●
648	<i>PRC2</i>	—	—	—	—	—	●	●	—	—	—
649	<i>PRE10</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
650	<i>PRE8</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
651	<i>PRO3</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
652	<i>PRP31</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
653	<i>PRX1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
654	<i>PST1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
655	<i>PST2</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
656	<i>PST3</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
657	<i>PTC7</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
658	<i>PTP3</i>	—	●	—	—	—	—	—	—	—	—
659	<i>PUP2</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
660	<i>PUP3</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
661	<i>PUT2</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
662	<i>PYC2</i>	—	●	—	—	—	—	—	—	—	—
663	<i>QCR2</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
664	<i>QCR7</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
665	<i>QCR8</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
666	<i>RAC1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
667	<i>RAD23</i>	●	●	●	●	●	●	—	●	—	●
668	<i>RAD32</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
669	<i>RAD50</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	●	●
670	<i>RAS1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
671	<i>RBE1</i>	—	—	—	—	●	●	●	●	●	●
672	<i>RBP1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
673	<i>RBT4</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	●	—
674	<i>RBT5</i>	●	●	●	●	●	●	—	●	●	●
675	<i>RCT1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
676	<i>RDI1</i>	●	●	●	●	●	●	—	●	●	●
677	<i>RHD3</i>	●	●	●	●	●	—	—	—	●	—
678	<i>RHO1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—

679	<i>RIB3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
680	<i>RIB4</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
681	<i>RIM1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
682	<i>RIP1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
683	<i>RIX7</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
684	<i>RKI1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
685	<i>RNA1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
686	<i>RPA12</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
687	<i>RPL10</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
688	<i>RPL10A</i>	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•
689	<i>RPL11</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
690	<i>RPL12</i>	•	•	•	•	•	—	—	•	•	•
691	<i>RPL13</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
692	<i>RPL14</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
693	<i>RPL15A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
694	<i>RPL16A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
695	<i>RPL17B</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
696	<i>RPL18</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
697	<i>RPL19A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
698	<i>RPL2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
699	<i>RPL20B</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
700	<i>RPL21A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
701	<i>RPL23A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
702	<i>RPL24A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
703	<i>RPL25</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
704	<i>RPL27A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
705	<i>RPL28</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
706	<i>RPL3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
707	<i>RPL30</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
708	<i>RPL32</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
709	<i>RPL35</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
710	<i>RPL37B</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
711	<i>RPL38</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
712	<i>RPL39</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
713	<i>RPL42</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
714	<i>RPL43A</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
715	<i>RPL4B</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
716	<i>RPL5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
717	<i>RPL6</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
718	<i>RPL82</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
719	<i>RPL8B</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
720	<i>RPL9B</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
721	<i>RPN8</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—

722	RPO26	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
723	RPP0	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
724	RPP1A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
725	RPP1B	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
726	RPP2A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
727	RPP2B	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
728	RPS1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
729	RPS10	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
730	RPS12	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
731	RPS13	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
732	RPS14B	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
733	RPS15	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
734	RPS16A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
735	RPS17B	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
736	RPS18	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
737	RPS19A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
738	RPS20	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
739	RPS21	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
740	RPS21B	●	●	●	●	●	—	—	●	●	●
741	RPS22A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
742	RPS23A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
743	RPS24	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
744	RPS25B	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
745	RPS26A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
746	RPS27	—	—	—	—	●	—	—	—	—	●
747	RPS27A	●	●	●	●	●	—	—	●	●	●
748	RPS28B	●	●	●	●	●	—	—	—	—	●
749	RPS3	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
750	RPS30	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
751	RPS42	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
752	RPS4A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
753	RPS5	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
754	RPS6A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
755	RPS7A	●	●	●	●	●	—	—	—	—	●
756	RPS8A	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
757	RPS9B	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
758	RSR1	●	●	●	●	—	—	—	●	●	—
759	RUB1	●	●	●	—	●	—	●	●	●	●
760	SAC3	—	—	—	—	●	●	—	—	—	—
761	SAC6	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
762	SAH1	●	●	●	●	●	●	—	●	●	●
763	SAM2	●	●	●	●	●	—	—	●	●	●
764	SAP5	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—

765	SAR1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
766	SBA1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
767	SBP1	●	—	●	●	—	—	—	—	—	—
768	SCL1	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
769	SCS7	—	●	●	—	—	—	—	—	—	●
770	SDC1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
771	SDH12	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
772	SDH2	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
773	SEC14	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
774	SEC4	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
775	SEC65	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
776	SEN1	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
777	SER1	●	●	●	—	—	—	—	—	—	—
778	SER33	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
779	SES1	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
780	SFC1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
781	SFH5	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
782	SGT2	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
783	SHE3	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
784	SHM1	●	●	●	●	●	—	—	—	●	—
785	SHM2	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
786	SHP1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
787	SIM1	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
788	SIS1	●	●	●	●	●	—	—	—	—	●
789	SIT4	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
790	SKP1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
791	SLK19	●	●	●	●	●	—	—	●	—	●
792	SLP3	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
793	SMT3	●	●	●	●	●	—	—	●	—	—
794	SNF7	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
795	SNL1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
796	SNZ1	●	●	●	●	●	—	—	—	●	●
797	SOD1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
798	SOD2	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
799	SOD3	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
800	SOD5	●	●	●	●	●	—	—	—	—	—
801	SOL2	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
802	SOL3	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
803	SOU1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
804	SPE3	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
805	SRB1	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
806	SRV2	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
807	SSA2	●	●	●	●	●	—	—	—	●	—

808	<i>SSB1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
809	<i>SSC1</i>	•	•	•	•	•	•	—	—	•	•
810	<i>SSD1</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
811	<i>SSN6</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
812	<i>SSO2</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
813	<i>SSR1</i>	—	—	—	—	•	—	—	•	•	•
814	<i>STF2</i>	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•
815	<i>STI1</i>	•	•	•	•	•	—	—	•	—	•
816	<i>SUB2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
817	<i>SUI2</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
818	<i>SUN41</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
819	<i>SUR7</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
820	<i>TAF14</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
821	<i>TAL1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
822	<i>TDH3</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
823	<i>TEF1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
824	<i>TEF2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
825	<i>TFP1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
826	<i>TFS1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
827	<i>THR4</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
828	<i>THS1</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
829	<i>TIF</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
830	<i>TIF11</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
831	<i>TIF3</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
832	<i>TIF4631</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
833	<i>TIF5</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
834	<i>TIM10</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
835	<i>TIM13</i>	—	•	•	—	•	—	—	—	—	—
836	<i>TIM23 8</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
837	<i>TIM44</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•
838	<i>TIM8</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
839	<i>TIM9</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
840	<i>TKL1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
841	<i>TMA19</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
842	<i>TOM20</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
843	<i>TOM22</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
844	<i>TOM40</i>	•	—	•	—	—	—	—	—	—	—
845	<i>TOM70</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
846	<i>TPI1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
847	<i>TPM2</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
848	<i>TPS1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
849	<i>TRP99</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
850	<i>TRR1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—

851	<i>TRX1</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
852	<i>TSA1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
853	<i>TSA1B</i>	•	•	•	•	•	—	•	—	—	•
854	<i>TTR1</i>	•	•	•	•	•	—	•	•	—	•
855	<i>TUB1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
856	<i>TUB2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
857	<i>TUF1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
858	<i>TUP1</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
859	<i>TYS1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
860	<i>UBA1</i>	—	•	—	—	—	—	—	—	—	—
861	<i>UBC1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
862	<i>UBI3</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
863	<i>UBI4</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
864	<i>UCF1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
865	<i>UGP1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
866	<i>URA3</i>	•	•	•	•	•	—	•	•	•	•
867	<i>URA4</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	•	—
868	<i>URA5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
869	<i>URA6</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
870	<i>UTR2</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
871	<i>VMA10</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—
872	<i>VMA2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
873	<i>VMA4</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
874	<i>VMA7</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
875	<i>VPH1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
876	<i>VPS1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
877	<i>VPS13</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
878	<i>VPS21</i>	•	•	•	•	•	—	—	—	•	•
879	<i>VPS8</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—
880	<i>VRP1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
881	<i>VTI1</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
882	<i>WH11</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
883	<i>XOG1</i>	—	—	—	—	•	•	•	•	•	•
884	<i>XYL2</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
885	<i>YBN5</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
886	<i>YCK2</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
887	<i>YCP4</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
888	<i>YDJ1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
889	<i>YHM1</i>	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—
890	<i>YIM1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
891	<i>YKT6</i>	—	•	•	—	—	—	—	—	—	—
892	<i>YNK1</i>	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—
893	<i>YPS7</i>	—	—	—	—	•	—	—	—	—	—

894	<i>YPT1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
895	<i>YPT31</i>	—	●	●	—	●	—	●	—	●	—
896	<i>YPT52</i>	—	●	●	—	—	—	—	—	—	—
897	<i>YRB1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
898	<i>YSA1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
899	<i>YST1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
900	<i>YWP1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
901	<i>ZCF15</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
902	<i>ZRT1</i>	—	—	—	—	●	—	—	—	—	—
903	<i>ZRT2</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—
904	<i>ZUO1</i>	—	—	●	—	—	—	—	—	—	—
905	<i>ZWF1</i>	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—

El total de los 905 genes identificados en análisis proteómico están ordenados en la presente tabla por orden alfabético. Los símbolos utilizados corresponden a (●) cuando se encuentra presente y (—) cuando no se encuentra en el estudio.