



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA (ò*) Facultat de Farmacia

Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**“Aislamiento y caracterización de
vesículas extracelulares en especies del
género *Candida*”**

Tesis Doctoral

Virginia Pérez Doñate

Valencia, 2017



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA [ò*] Facultat de Farmacia

Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

“Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en especies del género *Candida*”

Memoria para optar al grado de
Doctor, presentada por:
D^a. Virginia Pérez Doñate

Dirigida por:
Dr. D. Eulogio Valentín Gómez
Dr. D. Lucas del Castillo Agudo
Dra. D^a. Matilde Merino Sanjuán

Valencia, 2017



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA () Facultat de Farmacia

Los abajo firmantes, Dr. Eulogio Valentín Gómez, Catedrático de Microbiología, Dr. Lucas del Castillo Agudo, Catedrático de Microbiología y Dra. Matilde Merino Sanjuán, Catedrática de Farmacia y Tecnología Farmacéutica,

CERTIFICAN: que la Memoria de Tesis Doctoral, titulada “**Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en especies del género *Candida***”, realizada por la Licenciada, **D^a. Virginia Pérez Doñate**, para aspirar al Grado de Doctor, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo nuestra dirección y reúne las condiciones de originalidad y rigor científico necesarios para su presentación, juicio y calificación, ante el Tribunal correspondiente.

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

Valencia, 25 de abril de 2017.

Dr. Eulogio Valentín Gómez Dr. Lucas del Castillo Agudo Dra. Matilde Merino Sanjuán

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que, con su apoyo incondicional, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral,

A mis directores, Dr. Eulogio Valentín y Dr. Lucas del Castillo, Catedráticos de Microbiología, por transmitirme, ya desde la licenciatura, el interés por la Microbiología, por la confianza depositada en mí, acogiéndome en vuestro laboratorio y enseñándome una metodología de trabajo y un espíritu crítico e inconformista, imprescindibles en investigación; a la Dra. Matilde Merino, Catedrático de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por tus consejos y permanente disposición e interés, que han facilitado la compatibilidad entre el trabajo del Hospital y el de investigación. A los tres, gracias por dirigir este proyecto que ha culminado en mi tesis doctoral.

A mis padres, por estar a mi lado todos los días durante estos años, por ser mi guía y orientación, mis compañeros inseparables, por darme serenidad en los momentos duros. Nada habría sido posible sin vuestra ayuda y vuestro cariño.

A mi hermano, mi “tete”, gracias por tu interés en todo lo referente a mi doctorado, por preocuparte por mí, por estar a mi lado, por alegrarte conmigo, por animarme en las horas difíciles.

A Rai, gracias por darme tu apoyo, por respetar mis tiempos, por intentar aprender y disfrutar con todo lo relacionado con mi trabajo, eso me ha hecho enormemente feliz.

A mi jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Ribera, Dr. Javier Colomina. Gracias por tus consejos, a nivel profesional y personal, gracias por creer y confiar en mí, por haberme enseñado a querer y disfrutar día a día de esta maravillosa especialidad que es la Microbiología Clínica.

Gracias también a dos grandes personas y amigas, las Dras. María Borrás y Olalla Martínez, del Servicio de Microbiología del Hospital de la Ribera, ambas me habéis dado excelentes consejos, apoyo y energía, gracias por estar siempre conmigo y sobre todo, gracias por ser así.

A todos, gracias de corazón.

A mis padres y a mi hermano

“Felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace”

ABREVIATURAS

- ATCC:** American Type Culture Collection.
- CI:** candidiasis invasivas.
- CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CMI:** concentración mínima inhibitoria.
- CMOS:** complementary metal-oxide-semiconductor.
- D.O.:** densidad óptica, absorbancia.
- EM:** endosomas multivesiculares.
- EUCAST:** European Committe of Antimicrobial Susceptibility Testing.
- g:** gravedades.
- IFI:** infecciones fúngicas invasivas.
- ILV:** vesícula intraluminal.
- ITS:** Espaciador transcrito interno.
- kDa:** kilodalton.
- kV:** kilovoltio.
- LC:** cromatografía líquida.
- LR:** London Resin.
- mA:** miliamperio.
- MALDI-TOF MS:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry.
- ME:** mercaptoetanol.
- MET:** microscopía electrónica de transmisión.
- min:** minuto.
- mL:** mililitro.
- mM:** milimolar.
- Mpx:** megapíxel.
- MS:** espectrometría de masas.
- Mv:** microvesícula.
- MVE:** microvesícula extracelular.
- nm:** nanómetro.
- NTA:** Nanoparticle Tracking Analysis.
- pb:** pares de bases.

PBS: Phosphate Buffer Saline.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PVDF: difluoruro de polivinilideno microporoso.

rpm: revoluciones por minuto.

s: segundo.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SN: sobrenadante.

UCI: Unidad de cuidados intensivos.

UFC: unidades formadoras de colonias.

VE: vesícula extracelular.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

WB: Western Blot.

YPD: Yeast extract Peptone Dextrose.

μg: microgramo.

μL: microlitro.

μm: micrómetro.

ÍNDICE

ÍNDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES	3
1.1.1. Infecciones fúngicas e importancia en salud pública	3
1.2. <i>CANDIDA ALBICANS</i> HONGO PATÓGENO MÁS FRECUENTEMENTE AISLADO	9
1.2.1. Genoma de <i>Candida albicans</i>	11
1.2.2. Morfologías de <i>Candida albicans</i>	11
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	12
1.3.1. Candidiasis y candidemias: enfermedades y manifestaciones clínicas	18
1.4. PARED CELULAR DE <i>CANDIDA SPP.</i>	19
1.4.1. Composición química de la pared celular	20
1.4.1.1. Quitina	21
1.4.1.2. β -glucanos	22
1.4.1.2.1. β -1,3-glucano	22
1.4.1.2.2. β -1,6-glucano	23
1.4.1.3. Manoproteínas	24
1.4.1.3.1. Clasificación de las manoproteínas	24
1.4.1.3.1.1. Proteínas unidas no covalentemente a la pared celular	25
1.4.1.3.1.2. Proteínas extraíbles por agentes reductores	25
1.4.1.3.1.3. Proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles	26
1.4.1.3.1.4. Proteínas unidas por enlaces glicosil fosfatidil inositol (proteínas GPI)	27
1.4.1.3.1.5. Proteínas atípicas de pared celular	28
1.5. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>CANDIDA SPP.</i>	30
1.5.1. Morfogénesis	30
1.5.2. Enzimas	32
1.5.3. Capacidad de adherencia	33
1.5.4. Formación de biopelículas	34
1.5.5. Otros factores de virulencia	36
1.6. VESÍCULAS EXTRACELULARES Y FUNCIONES QUE DESEMPEÑAN	37
1.6.1. Formación y liberación de los exosomas	38

1.6.2. Composición de los exosomas	39
1.7. EXOSOMAS EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS	42
1.8. INTERACCIÓN DE LAS MICROVESÍCULAS CON LAS CÉLULAS DIANA	44
1.9. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	46
2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1. LEVADURAS EMPLEADAS	49
2.2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS	49
2.3. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE EXOSOMAS	50
2.3.1. Obtención de pre-cultivos	50
2.3.2. Obtención de los cultivos	50
2.3.3. Obtención de sobrenadantes puros, exentos de levaduras	50
2.3.4. Concentración de los filtrados	51
2.3.5. Ultracentrifugación	51
2.4. DETERMINACIONES REALIZADAS EN EXOSOMAS	52
2.4.1. Determinación de proteína total	52
2.4.2. Transferencia y detección de proteínas en soporte de PVDF (Western blot)	53
2.4.2.1. Separación electroforética de proteínas en geles de SDS- Poliacrilamida (SDS-PAGE)	54
2.4.2.2. Transferencia a membranas PVDF	55
2.4.2.3. Inmunodetección de proteínas en soporte de PVDF	55
2.4.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET)	57
2.4.3.1. Preparación de muestras incluidas en resinas LR-White	57
2.4.3.2. Preparación de muestras tratadas con Concanavalina A-ferritina	57
2.4.4. Análisis de las muestras mediante técnicas NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)	58
2.4.5. Análisis Proteómico y molecular de exosomas de <i>Candida albicans</i>	59
2.4.6. Análisis de miRNA en exosomas de <i>Candida albicans</i>	61
2.5. OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	62
3. RESULTADOS	

3.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	65
3.2. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	65
3.3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	67
3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS TRATADAS CON CONCANAVALINA A-FERRITINA	70
3.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE TÉCNICAS NTA (NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS)	71
3.6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MOLECULAR DE EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	72
3.7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE miRNAs DE EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	110
3.8. POSIBLE MECANISMO DE SECRECIÓN DE LOS EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	116
4. DISCUSIÓN	
4.1. IDENTIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y TÉCNICAS NTA	125
4.2. RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS EN LOS EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	125
4.3. RECONOCIMIENTO DE MANOPROTEÍNAS EN LOS EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> , MEDIANTE CONCANAVALINA A-FERRITINA	127
4.4. INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MOLECULAR DE LOS EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	128
4.5. INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS DE LOS miRNAs OBTENIDOS EN LOS EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	129
4.6. HIPÓTESIS SOBRE EL MECANISMO DE SECRECIÓN DE LOS EXOSOMAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	129
5. CONCLUSIONES	133
6. BIBLIOGRAFÍA	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Influencia del uso de antibióticos de amplio espectro en la infección endógena por levaduras.	6
Figura 1.2. Etapas de la infección por <i>C. albicans</i> y mecanismos de virulencia que intervienen en cada una de ellas.	10
Figura 1.3. Distintas morfologías de <i>C. albicans</i> : a) Levaduras; b) Hifas; c) Pseudohifas; d) Clamidosporas (Modificado de Sudbery, et al. 2004).	11
Figura 1.4. Porcentaje de candidemias producidas por algunas especies de <i>Candida</i> por grupo de edades. Datos tomados de The Emerginig Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms Survey, 1998 a 2001. (Datos tomados de Pfaller, et al. 2007).	14
Figura 1.5. Perspectiva general de la candidemia nosocomial. AD, aparato digestivo; UCI, unidad de cuidados intensivos. (Adaptado de Pfaller, et al. 2009).	16
Figura 1.6. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de <i>C. albicans</i> (Adoptado de Molina, et al. 2000).	20
Figura 1.7. Estructura química de quitina (Ruiz-Herrera, et al. 2006).	21
Figura 1.8. Estructura química de β -1,3/ β -1,6-glucano (Ruiz-Herrera, et al. 2006).	22
Figura 1.9. Clasificación de las proteínas de pared celular.	25
Figura 1.10. Esquema general de una proteína Pir 1. Pir1 presenta cuatro cisteínas en el C-terminal de la proteína (-C-66aa-C-16aa-C-12aa-C-COOH) y tiene nueve (IPF15363) o siete (IPF19968) repeticiones internas con la estructura [-(A/K/Q)-Q-I-(S/T/G/N)-D-G-Q-I-Q-H-Q-T-]. Además, un sitio potencial de N-glicosilación tanto en la IPF 19968 como en la IPF15363 y aproximadamente el 20% de los aminoácidos son Ser o Thr, indicando que la proteína podría estar muy glicosilada (Adaptado de Ruiz-Herrera, et al. 2006).	26
Figura 1.11. Esquema general de una GPI-CWP de levaduras. Son proteínas ricas en Ser/Thr, indicando que la proteína podría estar muy glicosilada, con uno o más sitios potenciales de N-glicosilación. (Adaptado de Ruiz-Herrera, et al. 2006).	27
Figura 1.12. Esquema propuesto por el consorcio europeo Galar Fungail I para la pared celular de <i>C. albicans</i> . Está constituida por una red de β -1,6- y β -1,3-glucano y quitina. NCL-CWP (<i>non covalently linked protein</i>), extraíble con SDS. RAE-CWP (<i>reducing agent extractable</i>), extraíbles con un tratamiento con β -mercaptoetanol. ASL-CWP (<i>alkali sensitive linkage cell wall proteins</i>), extraíbles con un tratamiento	29

suave con álcali. GPI-CWP (*glycosylphosphatidylinositol cell wall proteins*), extraíbles con un tratamiento con HF-piridina o por digestión con laminarina o zimoliasa.

- Figura 1.13.** Morfogénesis de *Candida* spp. durante la infección. 31
- Figura 1.14.** Diferentes procesos y fases en el desarrollo de un biopelícula. 35
(Adaptado de Blankenship, et al. 2006).
- Figura 1.15.** Vesículas extracelulares. Se muestran de forma esquemática los distintos tipos de vesículas extracelulares producidas por una célula eucariota, representada en verde (modificado de Cocucci, et al. 2009). 37
- Figura 1.16.** Ilustración esquemática de la pared celular de los hongos e hipótesis de secreción de MVEs (Nimrichter, et al. 2016). 41
- Figura 1.17.** Representación de una MV. Esquema de una MV (en este caso un exosoma), donde se muestra la composición lipídica de la membrana y el contenido proteico y de ARN, manteniendo las relaciones de tamaño. (Adaptado de Vlassov, et al. 2012). 42
- Figura 1.18.** Esquema de los posibles efectos y funciones de la liberación de MVs por microorganismos. A: En bacterias, las MVs pueden participar en la secreción de polisacáridos capsulares. B: las MVs también pueden ser utilizadas como medio de comunicación en Bacteria y Archea, a través del transporte de antimicrobianos, material genético y moléculas involucradas en procesos de quorum sensing. C: en microorganismos patógenos, las MVs pueden ser el vehículo de factores de virulencia. D: asimismo, pueden transportar moléculas tales como lipopolisacárido (LPS), lipoproteína o peptidoglicános (PG) que permitan la activación de la respuesta inmune innata. E: las MVs pueden dar lugar entonces a la activación de la respuesta inmune adaptativa, a través de la activación de la respuesta innata o gracias al transporte de moléculas antigénicas que serán recibidas por células presentadoras de antígenos (F) (Modificado de Deatherage, et al. 2012). 43
- Figura 1.19.** Esquema de la transferencia de RNA y Proteínas mediante Vesículas Extracelulares: las MVE se fusionan con la membrana plasmática para liberar los exosomas en el medio extracelular. MVs y exosomas pueden contactar con la membrana plasmática de una célula diana (1); pueden fundirse directamente con la membrana plasmática (2); ser endocitados (3); las vesículas endocitadas pueden 45

fusionarse con otros orgánulos membranosos en el citoplasma (4). Todas vías conducen a la liberación de proteínas y RNAs en la membrana o citosol de la célula diana (modificado de Raposo, et al. 2013).

Figura 2.1. Esquema general de la producción de exosomas.	52
Figura 2.2. Recta patrón obtenida para la valoración de proteína, ecuación y coeficiente de regresión.	53
Figura 2.3. Esquema instrumental de la tecnología NTA (Nano Sight®. Minton Park. London. United Kingdom).	58
Figura 2.4. Etapas del análisis proteómico realizado en las muestras de exosomas. (Modificado de Kuster et al. 2005).	60
Figura 3.1. Resultados correspondientes al Western blot realizado empleando anticuerpos anti-Calnexina, anti-CD63, anti-CD9 y anti-CD81, en muestras de exosomas (VE) de <i>C. albicans</i> y sus correspondientes lisados celulares (L).	66
Figura 3.2. Resultados correspondientes al Western blot realizado empleando anticuerpos anti-enolasa y anti-Hsp70, en muestras de exosomas (VE) de <i>C. albicans</i> y sus correspondientes sobrenadantes (SN) de ultracentrifugación.	66
Figura 3.3. Western blot mostrando el resultado positivo y con elevada polidispersión, de la fracción de Vesículas extracelulares (VE), frente a los anticuerpos anti-pared de <i>C. albicans</i> .	67
Figura 3.4. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión en las muestras de exosomas purificados de <i>C. albicans</i> SC5314 a 37°C.	68
Figura 3.5. Imagen de microscopía electrónica de una muestra de microvesículas (Mv) purificadas de <i>C. krusei</i> .	69
Figura 3.6. Imagen de microscopía electrónica de una muestra de microvesículas (Mv) purificadas de <i>C. parapsilosis</i> .	69
Figura 3.7. Imágenes de microscopía electrónica de una muestra de exosomas purificados de <i>C. albicans</i> SC5314 a 37°C: (A) sin tratamiento previo y (B) con tratamiento previo con Concanavalina A-ferritina.	70

Figura 3.8. Espectro de distribución del tamaño de las nanopartículas y su concentración, en una muestra de exosomas de <i>C. albicans</i> SC5314 (37°C). El gráfico incrustado muestra la intensidad de luz dispersada en función del número de partículas y tamaño de las mismas.	71
Figura 3.9. Resultados del análisis proteómico realizado en los exosomas obtenidos para las cepas de <i>C. albicans</i> SC5314 (28 °C), y los mutantes <i>Δglx3</i> y <i>Δpir1</i> . El número de proteínas indicadas, corresponde al valor obtenido aplicando como límite de corte 5 péptidos.	74
Figura 3.10. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de <i>C. albicans</i> SC5314 a 37 °C y 28 °C (ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.	101
Figura 3.11. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de <i>C. albicans</i> SC5314 a 28°C y del mutante <i>Δglx3</i> (ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.	102
Figura 3.12. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de <i>C. albicans</i> SC5314 a 28°C y del mutante <i>Δpir1</i> (ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.	103
Figura 3.13. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de los mutantes <i>Δglx3</i> y <i>Δpir1</i> (ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.	104
Figura 3.14. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de <i>C. albicans</i> SC5314 a 28°C y en los mutantes <i>Δglx3</i> y <i>Δpir1</i> (ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.	108
Figura 3.15. Fracciones de miRNA detectadas en la muestra de exosomas de <i>C. albicans</i> .	110

Figura 3.16. Número de bases y frecuencias con que aparecen para los 32 miRNAs encontrados en los exosomas de <i>C. albicans</i> SC5314 a 37°C.	112
Figura 3.17. Cromosomas en los que se localizan los miRNAs encontrados en los exosomas de <i>C. albicans</i> SC5314 a 37°C y sus valores de frecuencia.	112
Figura 3.18. Funciones descritas para los genes flanqueantes a los miRNAs y sus respectivas frecuencias de aparición.	115
Figura 3.19. Esquema general de la composición de proteínas comunes, identificadas en los exosomas purificados de <i>C. albicans</i> SC5314 (28°C), <i>Δglx3</i> y <i>Δpir1</i> , que presentan las funciones más relevantes y sus correspondientes ubicaciones.	116
Figura 3.20. La imagen superior muestra una levadura de <i>C. albicans</i> (10000x), donde se aprecian estructuras tales como mitocondrias (Mtc), una gran vacuola central (Vc), la membrana plasmática (M) y la pared celular (P), así como una estructura compatible con una microvesícula (MV) de 131 nm de diámetro, que se aprecia en detalle, ampliada en la imagen izquierda.	117
Figura 3.21. Microvesícula (Mv) ocupando una invaginación creada entre la membrana plasmática y la pared celular de una levadura de <i>C. albicans</i> .	118
Figura 3.22. La imagen superior muestra una levadura de <i>C. albicans</i> , donde se aprecian microvesículas (Mv) contiguas a la pared celular, de tamaños 114, 115 y 124 nm (Aumentada en la imagen izquierda).	118
Figura 3.23. Levadura de <i>C. albicans</i> , donde se aprecian microvesículas (Mv) junto a la pared celular de tamaños 105 y 113 nm (Aumentada en la imagen izquierda).	119
Figura 3.24. Imágenes de microvesículas (Mv) de <i>C. albicans</i> , donde se aprecia su estructura de doble membrana, junto a la pared celular, con glucano y manoproteínas.	120
Figura 3.25. Secuencia de imágenes de microscopía electrónica que muestran: (A) cuerpo vesicular citoplasmático; (B) microvesícula ocupando el espacio periplásmico contiguo a la pared celular; (C) cuerpos vesiculares semiesféricos a punto de atravesar la pared celular; (D) microvesícula en el exterior de la levadura.	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Exceso de mortalidad atribuible a infecciones nosocomiales por <i>Candida</i> y <i>Aspergillus</i> .	15
Tabla 1.2. Infecciones nosocomiales septicémicas patógenos asociados con una mayor frecuencia: programa de vigilancia SCOPE. Infecciones nosocomiales septicémicas y patógenos asociados con mayor frecuencia: programa de vigilancia SCOPE.	17
Tabla 2.1. Cepas de <i>C. albicans</i> utilizadas.	49
Tabla 2.2. Valores de Absorbancia obtenidos a 595 nm, para las diluciones de proteína de la recta patrón.	53
Tabla 2.3. Composición de los geles de poliacrilamida empleados en electroforesis.	54
Tabla 2.4. Ac-primario y Ac-secundarios empleados en Western blot.	56
Tabla 3.1. Valores de proteína total obtenidos para las muestras de exosomas obtenidas en las diferentes cepas de <i>C. albicans</i> utilizadas.	65
Tabla 3.2. Resultados del análisis proteómico realizado en exosomas obtenidos de <i>C. albicans</i> , SC5314 a 37 °C y 28 °C, y de los mutantes $\Delta pir1$ y $\Delta glx3$, ambas a 28°C. Las proteínas indicadas, corresponden al valor obtenido aplicando como límite de corte 5 péptidos.	73
Tabla 3.3. Resultados del análisis proteómico realizado en exosomas obtenidos de <i>C. albicans</i> SC5314 a 37 °C y 28 °C, y de los mutantes $\Delta pir1$ y $\Delta glx3$, incluyendo la denominación del gen y la función descrita en el ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genome Database (www.candidagenome.org). En todos los casos se ha aplicado como límite de corte el valor de 5 péptidos.	74
Tabla 3.4. Proteínas comunes identificadas en los exosomas obtenidos de <i>C. albicans</i> SC5314 a 28 °C, y de los mutantes $\Delta pir1$ y $\Delta glx3$, incluyendo la denominación del gen y la función descrita en el ensamblaje 22 de <i>Candida</i> Genome Database (www.candidagenome.org).	105

Tabla 3.5. Proteínas comunes más representativas, de entre las identificadas en los exosomas obtenidos de <i>C. albicans</i> SC5314 a 28 °C, y de los mutantes $\Delta pir1$ y $\Delta glx3$.	109
Tabla 3.6. Secuencias de bases obtenidas en el análisis de los miRNAs específicos de <i>C. albicans</i> , encontrados en los exosomas producidos por la cepa SC5314 cuando se crece a 37°C y cromosomas en que se encuentran.	110
Tabla 3.7. miRNAs y genes flanqueantes, con sus funciones principales y distancias respectivas 5' y 3'.	113
Tabla 3.8. Secuencias de bases obtenidas en el análisis de los miRNAs de <i>C. albicans</i> , que presentan homología completa con humanos, encontrados en los exosomas producidos por la cepa SC5314 cuando se crece a 37°C y cromosomas en que se encuentran.	115

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

1.1.1. Infecciones fúngicas e importancia en salud pública

Los hongos son capaces de causar infecciones muy diversas, que van desde afecciones superficiales leves, como candidiasis cutáneas, hasta infecciones fúngicas invasivas (IFI) que pueden afectar a órganos vitales, comprometiendo la vida de los pacientes. Actualmente las IFI son un importante problema en los hospitales y en la sanidad en general, ya que suponen un aumento del riesgo de muerte, prolongan la estancia hospitalaria de los pacientes y elevan los costes socio-sanitarios (Salavert, et al. 2006; Cervera. 2012).

La infección fúngica nosocomial ha incrementado notablemente su incidencia en la última década, debido al aumento del espectro de enfermos susceptibles de sufrir estas infecciones. Las IFI se caracterizan en general por ser infecciones de difícil diagnóstico que pueden presentar una alta mortalidad, hecho que no ha decrecido a pesar de los nuevos fármacos antifúngicos introducidos en el mercado (triazoles y equinocandinas) (Osawa, et al. 2013; Han, et al. 2016; Jin, et al. 2016; Leroy, et al. 2016; Pappas, et al. 2016).

Frecuentemente se detectan IFI en pacientes inmunodeprimidos, estas IFI son ocasionadas, sobre todo, por hongos como *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Pneumocystis jiroveci*, hongos filamentosos no coenocíticos (con hifas no septadas) como por ejemplo los hongos pertenecientes al orden Mucoral y *Cryptococcus spp.* La epidemiología de las IFIs está en continua evolución, éstas se ven influenciadas por los cambios climáticos, por las modificaciones medio ambientales, y sobre todo por la aparición de nuevos pacientes en riesgo. Los factores que predisponen a estos pacientes están bien definidos y contribuyen al riesgo de padecer dichas infecciones como ocurre en pacientes neutropénicos, una hospitalización prolongada, cirugía abdominal, tratamientos invasivos y el uso de antibióticos de amplio espectro (Cornistein, et al. 2013), también son factores de riesgo la nutrición parenteral, sepsis, pancreatitis, poseer un catéter central/catéter intravascular o enfermos que reciben corticoides (Cheng, et al. 2005; Pfaller, et al. 2010; Gaspar, et al. 2015).

Es de vital importancia conocer la epidemiología del lugar de estudio, para, un mejor reconocimiento de los microorganismos causantes de infección, que se detectan con mayor frecuencia y así seleccionar un tratamiento empírico adecuado. Algunos hongos son endémicos de algunas áreas geográficas, como América del Sur y Norteamérica. Se trata de las micosis regionales o endémicas producidas por *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Blastomyces dermatitidis*. Estos hongos son capaces de infectar

a pacientes con el sistema inmune intacto, son patógenos primarios pudiendo afectar a personas inmunocompetentes, aunque los cuadros graves se dan en pacientes inmunodeprimidos. En cambio, otros tienen una distribución mundial como *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* estos dos grandes géneros además son los causantes de la mayoría de las IFI. Pero cada vez son más frecuentes este tipo de infecciones causadas por otros hongos como *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.*, Mucorales, *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus neoformans* (Pemán, et al. 2016).

Actualmente la distribución epidemiológica de la IFI es la siguiente, 80-90% de las mismas son desarrolladas por hongos levaduriformes y un 10-20%, ocasionadas por hongos filamentosos, siendo *Candida spp.* el hongo levaduriforme más común causante de infecciones fúngicas invasivas (más del 50% de todas las micosis invasivas). Dentro de este género la especie *C. albicans* es la más prevalente seguida de *C. parapsilosis* (Rodríguez-Tudela, et al. 2015). Entre los hongos filamentosos causantes de IFIs el más prevalente es *Aspergillus spp.* produciendo el 86.3% de las mismas y la especie más prevalente de este género es *A. fumigatus* 48,5% (Alastruey-Izquierdo, et al. 2013). Los factores predisponentes para sufrir una aspergilosis invasiva son, por ejemplo, la neutropenia, la alteración de la capacidad fagocítica, la disminución de la inmunidad celular (pacientes VIH), el uso de corticoides y otros inmunosupresores (en el trasplante de órgano sólido), el fallo hepático y/o cirrosis, los pacientes sometidos a cirugía mayor compleja, ruptura de las barreras mucocutáneas y por último la exposición ambiental (influenciada por el número de conidias en el lugar de la infección) (Pemán, et al. 2014).

Las IFIs por levaduras no pertenecientes al género *Candida spp.* son cada vez más frecuentes y de mayor gravedad, produciendo una mortalidad comprendida entre 40-80%, son producidas por levaduras comensales en piel y mucosas (como por ejemplo *Malassezia spp.*, *Trichosporon spp.*, *Rhodotorula spp.*) y además, éstos últimos microorganismos son más resistentes que *Candida spp.* frente a los antifúngicos (Pemán, et al. 2013).

Las candidiasis invasivas (CI) representan el 80-90% de las micosis invasivas nosocomiales. La incidencia de CI se incrementó a partir del año 1980, debido a los importantes avances médicos y quirúrgicos, tratamientos oncológicos y trasplantes de órganos sólidos. Desde hace una década la incidencia se mantiene estable o ha disminuido, gracias a las mejoras diagnósticas y terapéuticas, no habiendo disminución en su mortalidad (Pemán, et al. 2013).

La mayoría de las especies de *Candida* habitan en el ser humano y otros animales homeotermos, colonizando la boca y aparato digestivo del 30-50% de los individuos. Dicha colonización se produce desde los primeros días de vida y es más relevante en lactantes, niños y ancianos, receptores de antibióticos y quimioterápicos, pacientes con VIH, diabéticos, y mujeres embarazadas (10-40%) (Pemán, et al. 2013).

Aunque se han descrito más de 150 especies diferentes de *Candida* el 95-97% de todas las IFIs están producidas fundamentalmente por cinco especies de levaduras de este género: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Pemán, et al. 2013). Actualmente existe una alerta por la emergencia global de infecciones invasivas causadas por una levadura multirresistente, concretamente *Candida auris*. A nivel mundial se ha descrito que *C. auris*, está relacionada con infecciones invasivas y una elevada mortalidad. Algunas cepas de *C. auris* presentan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) elevadas con las tres principales clases de antifúngicos, limitando así las opciones terapéuticas. La identificación de *C. auris* requiere métodos con los que los laboratorios de mediana complejidad no cuentan, por lo cual puede identificársela erróneamente como otra especie. El primer reporte de *C. auris* se hizo en el Japón en 2009 a partir de la secreción del oído de un paciente (Satoh, et al. 2009). A partir de ese momento, las infecciones por esta levadura, especialmente fungemias, se han descrito en Corea del Sur (Lee, et al. 2011), India (Chowdhary, et al. 2013), Sur África (Magobo, et al. 2014) y Kuwait (Emara, et al. 2015). En Colombia ha habido casos de infección asociada a *C. auris* en Santa Marta, Barranquilla y Cartagena y recientemente se ha notificado un brote por dicha levadura en España, concretamente en Valencia. Las infecciones por *C. auris* se presentan principalmente en el ambiente hospitalario en forma de infecciones del torrente sanguíneo, en heridas y en otitis (Lee, et al. 2011). También se ha cultivado muestras de orina y de vías respiratorias. Sin embargo, aún se desconoce si el aislamiento a partir de estas fuentes corresponde a una infección o a la colonización del microorganismo. Se ha documentado que *C. auris* causa infección en pacientes de cualquier grupo etario y que los factores de riesgo asociados son similares a aquellos descritos en condiciones causadas por otras especies de *Candida spp.* Igualmente, se han descrito infecciones concomitantes con otras especies de *Candida*, incluso cuando el paciente está siendo tratado con antifúngicos (Lee, et al. 2011). Las tres características más importantes de esta levadura son en primer lugar su multirresistencia, en segundo lugar la dificultad de identificación, que requiere metodologías más específicas (la identificación inapropiada puede llevar a administrar un tratamiento inadecuado) y en último lugar, que causa brotes en unidades hospitalarias, por lo que, la identificación rápida de *C. auris*

en un paciente hospitalizado es de gran importancia para tomar las precauciones adecuadas con el caso y prevenir/evitar su diseminación.

La principal fuente de transmisión de las IFI producidas por *Candida spp.* es la vía endógena, previa colonización de piel y mucosas, otros mecanismos de transmisión secundarios son por ejemplo el contacto con pacientes/personal sanitario infectado-colonizado o mediante material infectado. Por ejemplo, el uso de antimicrobianos de amplio espectro, elimina la microbiota intestinal, lo que permite el incremento del crecimiento de las levaduras comensales, y estas pueden alcanzar la circulación sanguínea diseminándose (Figura 1.1) (Pemán, et al. 2013).

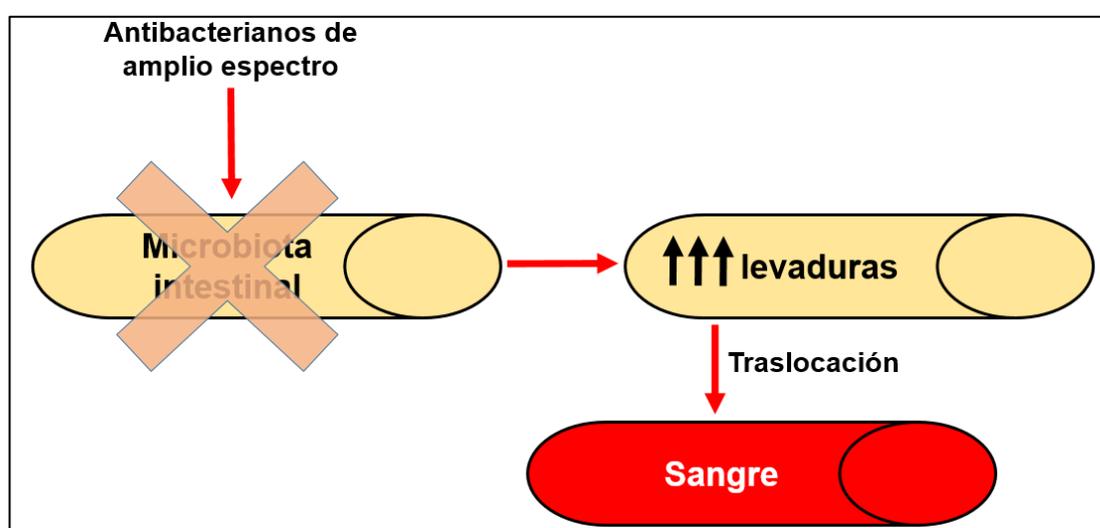


Figura 1.1. Influencia del uso de antibióticos de amplio espectro en la infección endógena por levaduras.

Entre los factores de riesgo que predisponen a sufrir CI se encuentran el padecer una enfermedad aguda, llevar incorporados dispositivos invasivos, edades extremas, tener comorbilidades como: diabetes *mellitus*, cirrosis, malnutrición, cirugía gastrointestinal previa, estancia prolongada en UCI, nutrición parenteral, catéter vesical, transfusiones múltiples, antibióticos de amplio espectro, colonización previa por *Candida spp.* insuficiencia renal y/o hemodiálisis, grandes quemados y politraumatismo (Weinberger, et al. 2005; Pasqualotto, et al. 2006; Pemán, et al. 2013). Dentro de la CI existe una gran variabilidad geográfica de las especies causantes, además de presentar una sensibilidad variable a los antifúngicos, por ello es importante conocer la epidemiología local o del entorno, antes de instaurar un tratamiento antifúngico empírico y realizar un buen diagnóstico (Pfaller, et al. 2002; Lortholary, et al. 2011; Pemán, et al. 2013; Miranda, et al. 2015).

El diagnóstico de las IFI es multidisciplinar, puede realizarse de forma clínica, radiológica, histológica y microbiológica, siendo esta última el método de referencia. En el

diagnóstico de las candidiasis invasivas, dentro de las técnicas microbiológicas convencionales, se encuentra la extracción de sangre del paciente y cultivo de la misma mediante el uso de hemocultivos, este último es el criterio de referencia, presentando una sensibilidad del 50-75%. El cultivo microbiológico como método diagnóstico tiene limitaciones importantes, una de ellas es el tiempo necesario para obtener los resultados, ya que es un proceso lento que necesita el aislamiento del patógeno para proceder a su identificación. Además, tiene una sensibilidad y especificidad moderada y en ocasiones para obtener un resultado óptimo, se precisan muestras cuya obtención es invasiva, con el consiguiente riesgo para el paciente.

En condiciones normales, el diagnóstico microbiológico de las IFI producidas por *Candida spp.* se basa fundamentalmente en la obtención de muestras clínicas, procesamiento y aislamiento del agente patógeno. La detección de *Candida spp.* en un aislado, cuando no es una muestra cuya obtención ha sido invasiva, no siempre es indicativo de infección ya que en ocasiones forma parte de la microbiota normal, por lo que esto depende del lugar anatómico donde se halle. Por ello es importante diferenciar entre infección y colonización; esta segunda constituye un factor de riesgo para la infección fúngica invasiva que todavía no ha acontecido. Estos métodos convencionales permiten realizar una identificación fehaciente de la especie, además de un estudio de sensibilidad a los diferentes antifúngicos. La identificación puede realizarse mediante pruebas de asimilación de azúcares, sistemas semiautomáticos (Vitek®, BioMerieux®), amplificación y secuenciación de ITS e intrón del gen RPS0 y espectrometría de masas (Ayats, et al. 2011).

En la actualidad existen métodos diagnósticos no convencionales que están cobrando mayor interés, estos se clasifican en dos grupos, métodos directos serológicos como la detección de antígenos y de componentes estructurales de pared y métodos indirectos serológicos que detectan la presencia de anticuerpos generados por el hospedador al entrar en contacto con la levadura. Se detectan componentes de pared como manano, β -1,3-D-glucano (polisacárido presente en la pared celular de la mayoría de las especies, a excepción de mucorales y *Cryptococcus spp.*) el inconveniente de esta técnica es la obtención de un gran número de resultados falsos positivos en pacientes con bacteriemias, tras emplear derivados sanguíneos, usos de β -lactámicos, o pacientes dializados, entre otras causas. (Obayashi, et al. 1992; Albert, et al. 2011; Lamoth, et al. 2012; Goudjil, et al. 2013). También pueden detectarse anticuerpos antimanano y frente a moléculas específicas de micelio. El manano es un componente de la pared celular de las levaduras que circula por sangre en las CI, es más abundante en *C. albicans* que en *C. parapsilosis* o *C. krusei*. En el método de detección de anticuerpos anti-micelio, se

detectan anticuerpos frente al tubo germinal de *C. albicans* y sirve para diferenciar colonización de infección por lo que podrían ser de gran utilidad en CI en localizaciones profundas (Cuenca-Estrella, et al. 2012). La detección del DNA está pendiente de estandarización, no obstante, actualmente se dispone de técnicas (Light Cycler Septifast®, Roche), que mejoran la sensibilidad con respecto al hemocultivo (Avni, et al. 2011; Nguyen, et al. 2012; Fortún, et al. 2014).

La introducción de la Biología Molecular en la micología ha permitido realizar identificaciones de especie, estudios genotípicos y conocer de un modo más amplio los mecanismos de resistencia a los antifúngicos. Desde otro punto de vista el empleo reciente del sistema de Espectrometría de Masas MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) en Microbiología, permite conocer la composición de una muestra, bien en estado sólido, es decir, como unidades formadoras de colonias (UFC) o en medio líquido, directamente de un hemocultivo. Esta tecnología consiste en la ionización química de los compuestos, obteniéndose moléculas cargadas que se estudian en función de su relación masa/carga y dan lugar a un patrón de proteínas o péptidos. Este patrón de proteínas, se asemejan a la huella dactilar de un ser humano, ya que únicamente se repite en microorganismos de una misma especie y permite la rápida identificación del mismo. Sin embargo, esta metodología no está adaptada para la determinación de pruebas de sensibilidad antifúngica.

Existen dos comités ampliamente distribuidos que determinan la sensibilidad a los antifúngicos en aislados productores de infección fúngica invasora, EUCAST (*European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*) y el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Ambos aportan puntos de corte principalmente para *Candida spp.* y clasifican a los aislados como sensibles o resistentes. Los puntos de corte actuales de estas dos organizaciones son muy similares (Pfaller, et al. 2010; Ghannoum. 2012; EUCAST. 2013, Leroy, et al. 2016).

Los antifúngicos son fármacos cuyo uso está muy distribuido, probablemente su versatilidad en la vía de administración favorece a este hecho. Pero sus características farmacocinéticas hacen muy difícil predecir los niveles plasmáticos del paciente. Este hecho tiene un gran interés, porque dosis infraterapéuticas conducirán al fracaso del tratamiento, mientras que dosis supraterapéuticas pueden presentar toxicidad.

1.2. *CANDIDA ALBICANS* HONGO PATÓGENO MÁS FRECUENTEMENTE AISLADO

C. albicans es un hongo patógeno oportunista del ser humano, que en condiciones normales forma parte de la microbiota habitual del organismo, principalmente la de las membranas mucosas de los tractos gastrointestinal, genitourinario y piel. Sin embargo, en condiciones en las que la respuesta inmune se encuentra disminuida, este hongo es capaz de invadir otros tejidos y órganos de su hospedador llegando a producir infecciones sistémicas que pueden ser graves, causando incluso la muerte del paciente (Winner, et al. 1964; Geraldine, et al. 2009; Pfaller, et al. 2010).

Los factores de virulencia de este patógeno oportunista incluyen su habilidad para sobrevivir como comensal, la adherencia a células del hospedador, la secreción de enzimas hidrolíticas y el cambio de morfología (Selmecki, et al. 2010; Lim, et al. 2012), entre otros. Estos factores de virulencia juegan un papel en cada etapa de la infección por *C. albicans*. La infección puede dividirse en cuatro etapas. En primer lugar, la colonización, en la que participan la adhesión epitelial y adquisición de nutrientes por medio de la acción de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas y cambio fenotípico.

En el caso de infección superficial es importante la penetración epitelial por medio de la degradación de proteínas del hospedador por parte de enzimas hidrolíticas y formación de hifas. En la infección profunda influyen factores como la penetración tisular, invasión vascular y evasión de las defensas inmunitarias por medio de enzimas hidrolíticas y la formación de hifas. Y en último lugar la infección diseminada, que *C. albicans* realiza a través de la adherencia al endotelio, la infección de tejidos del hospedador, la activación del sistema de coagulación mediada por adhesinas y enzimas hidrolíticas. Estudios *in vitro*, en animales y humanos, han implicado a las proteasas como factor de virulencia en *C. albicans* (Naglik, et al. 2003, De La Calle-Rodríguez, et al. 2012) (figura 1.2).

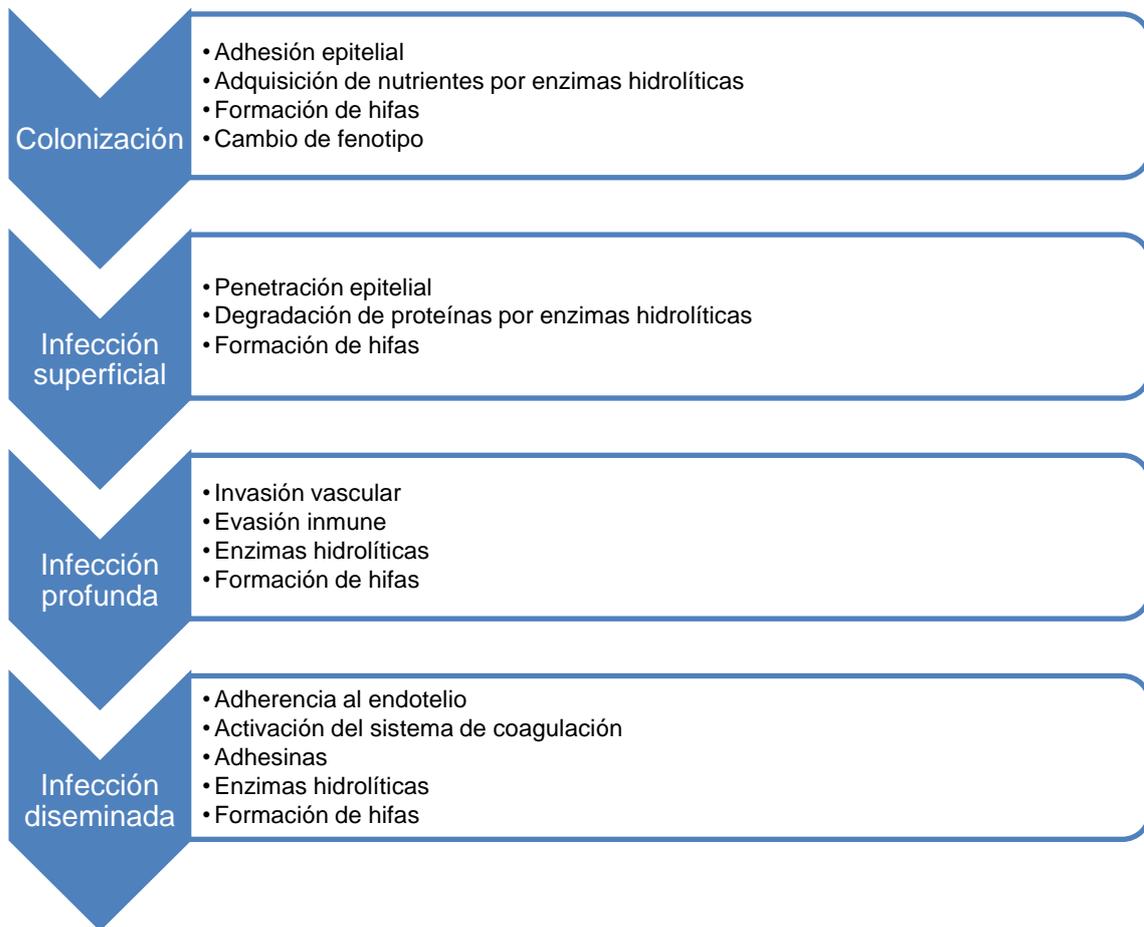


Figura 1.2. Etapas de la infección por *C. albicans* y mecanismos de virulencia que intervienen en cada una de ellas.

Fundamentalmente la infección tiene un origen endógeno, produciéndose en situaciones en las que hay un desequilibrio entre la comensalidad de *C. albicans* y el sistema inmunitario del paciente, por ejemplo, alteraciones de las barreras físicas mucocutáneas, implantación de prótesis o trasplantes de órganos, enfermedades subyacentes, como la diabetes, neoplasias o el VIH, y tratamientos médicos como quimioterapia o el uso de antibióticos de amplio espectro, los cuales reducen la microbiota habitual, eliminando así los competidores.

1.2.1. Genoma de *Candida albicans*

C. albicans es un organismo diploide para el que no se ha descrito claramente un ciclo sexual completo. Su genoma es de aproximadamente 14,5 Mb distribuido en 8 cromosomas que albergan alrededor de 6100 genes de un tamaño medio de 1.450 pb (Butler, et al. 2009). Uno de los hechos más importantes del genoma de *C. albicans*, es la relevancia de los reordenamientos cromosómicos que dan lugar a un incremento de la diversidad genética. Estas alteraciones generan cambios en el fenotipo, permitiendo una mayor adaptación al entorno (Butler, et al. 2009; Selmecki, et al. 2010).

Otra característica importante del genoma del género *Candida*, es que en muchas de sus especies (como *C. albicans* o *C. glabrata*) el codón CUG, que en otras especies codifica para leucina, aquí lo hace para serina. Esta ambigüedad en el uso del codón CUG puede permitirle a *C. albicans*, bajo condiciones de estrés disminuir la tasa de síntesis de proteínas e inducir la expresión constitutiva de la maquinaria de respuesta a estrés. Así, una respuesta permanente al estrés celular se traduce en una mejor adaptación del hongo a cambios ambientales (Santos, et al. 1999). La principal herramienta de adaptación de *C. albicans* es la versatilidad y diversidad que presenta su genoma.

1.2.2. Morfologías de *Candida albicans*

C. albicans es un hongo polimórfico que puede desarrollar varias formas como respuesta a estímulos ambientales, levaduras, hifas, pseudohifas y clamidosporas (figura 1.3).

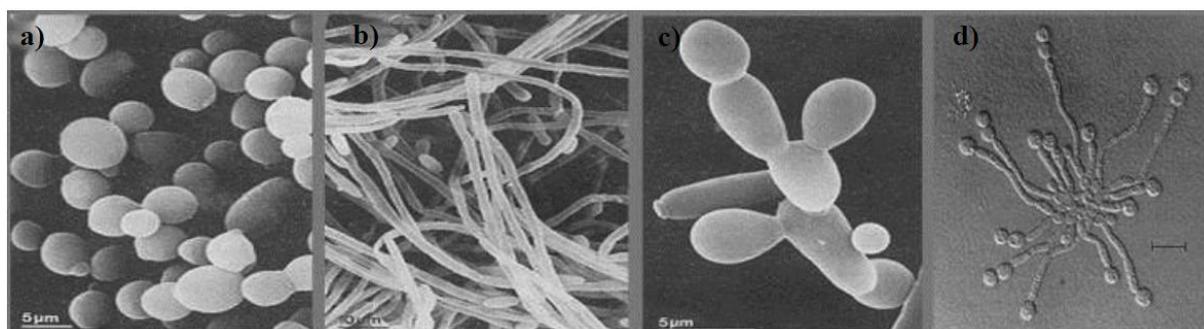


Figura 1.3. Distintas morfologías de *C. albicans*: a) Levaduras; b) Hifas; c) Pseudohifas; d) Clamidosporas (Modificado de Sudbery, et al. 2004).

Las levaduras son formas redondeadas unicelulares que se dividen por gemación y se separan al finalizar la citoquinesis. Las hifas son estructuras multicelulares que presentan un crecimiento hiperpolarizado dando lugar a filamentos en los que las paredes laterales del

filamento se mantienen paralelas a nivel del septo. Las pseudohifas se presentan como una forma intermedia entre levaduras e hifas y se caracterizan por presentar constricciones en los planos de división de los diferentes compartimentos celulares y por crecer de forma ramificada (Burnett, 1979; Orlean, et al. 1986; Sudbery, et al. 2001; Sudbery, et al. 2004; Sudbery, et al. 2011).

Todas las especies del género *Candida* se desarrollan como formas levaduriformes ovoides (3 a 5 μm) que forman yemas o blastoconidias. Las especies de *Candida* producen pseudohifas o hifas verdaderas, siendo *C. glabrata* la única excepción. Desde otro punto de vista, *C. albicans* genera tubos germinales y clamidosporas terminales de pared gruesa. La segunda especie más frecuente desde un punto de vista clínico del género es *C. glabrata*. Esta levadura no genera pseudohifas, ni hifas, y tampoco tubos germinales y clamidosporas.

En condiciones *in vitro*, casi todas las especies de este género dan lugar a colonias lisas de color blanco a crema. *C. albicans* tiene la capacidad de realizar cambios fenotípicos y sufrir un cambio en su morfología colonial, siendo las colonias más rugosas, incluso llegando a ser “vellosas” (Ausina Ruiz, et al. 2006). Es posible que este cambio en su aspecto, pueda deberse a una mayor facilidad de esta especie a sufrir cambios en respuesta a una señal ambiental o alteraciones de su micro-ecosistema.

Realiza numerosas transiciones morfológicas en las que cambia de forma reversible su morfología y fisiología. Estos cambios morfogenéticos son importantes para la virulencia de *C. albicans* y se considera que dichos cambios fenotípicos le confieren la capacidad de supervivencia en nichos ambientales muy diversos, en el interior del ser humano y de animales de sangre caliente (Castrillón Rivera, et al. 2005).

C. albicans ha desarrollado una serie de características que le permiten adaptarse rápidamente a los estímulos ambientales (pH, presión de oxígeno, CO₂, temperatura y suero sanguíneo) (Biswas, et al. 2007).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Las especies del género *Candida* colonizan el ser humano y animales de sangre caliente, por lo que se encuentran tanto en personas como en los ambientes naturales. El lugar primario de colonización es el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto. También se desarrollan como comensales en la vagina y la uretra, la piel y bajo las uñas del pie y la mano.

C. albicans se ha detectado también en el agua, aire y suelo. *C. albicans* es el principal agente etiológico de enfermedad en el ser humano dentro del género *Candida*.

Se estima que entre un 25 y un 50% de las personas sanas porta microorganismos del género *Candida* en la microbiota normal de la cavidad bucal y de ellas, *C. albicans* representa entre un 70 y un 80% de las cepas. La tasa de portadores orales es significativamente mayor en poblaciones pediátricas, pacientes ingresados, sujetos infectados por el VIH, personas con dentadura postiza, diabéticos, pacientes sometidos a quimioterapia antineoplásica y antibioterapia. Prácticamente todos los seres humanos pueden albergar una o más especies de *Candida* en su tubo digestivo, y los niveles del estado de portador sano, pueden aumentar hasta los niveles de enfermedad detectable u otra situación de alteración de los mecanismos de defensa del organismo hospedador.

La principal fuente de infección causada por las especies de *Candida* (desde la enfermedad mucosa y cutánea, superficial hasta la diseminación hematógona) es el propio paciente. (Pemán, et al. 2013)

La mayoría de los tipos de candidiasis son por infección endógena, en los que la microbiota comensal aprovecha la oportunidad para producir una infección. Para ello, debe existir en el hospedador algún desequilibrio en las barreras frente a *Candida*. Por ejemplo, en el caso de la infección septicémica por *Candida*, la transferencia del microorganismo desde la mucosa digestiva hasta el torrente circulatorio, exige la proliferación excesiva de las levaduras en su nicho comensal, junto a un fallo de la integridad de la mucosa digestiva.

La transmisión exógena de *Candida*, también ocasiona ciertos tipos de candidiasis. Como ejemplos de tal transmisión, se encuentra el uso de soluciones de irrigación, líquidos de nutrición parenteral, transductores de presión vascular, válvulas cardíacas y córneas contaminadas. Se ha comprobado la transmisión de estas levaduras desde profesionales sanitarios a los pacientes, y entre éstos, especialmente en cuidados intensivos. Las manos de los profesionales sanitarios, actúan como posible reservorio en la transmisión nosocomial de este género (Pemán, et al. 2013).

Entre las distintas especies de *Candida* con capacidad de infectar al ser humano (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* o *I. orientalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. auris*), *C. albicans* predomina en casi todos los tipos de infección (figura 1.4). Esta especie suele estar implicada en casi todas las infecciones de localizaciones genitales, cutáneas y bucales. El abanico de especies capaces de producir

infecciones sistémicas es más amplio y aunque *C. albicans* suele ser la especie predominante, la frecuencia de aislamientos de cada especie se ve influenciada por la edad del paciente, la situación local y regional o global.

Mientras que *C. albicans* y *C. parapsilosis* son especies importantes en la etiología de infección sistémica en lactantes y niños, en las personas de mayor edad, se observa una disminución de las infecciones por ambas especies, en paralelo a un notable incremento de las debidas a *C. glabrata*. De igual modo, aunque *C. albicans* es la especie dominante de infección septicémica en Norteamérica, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* tienen una mayor frecuencia en Latinoamérica.

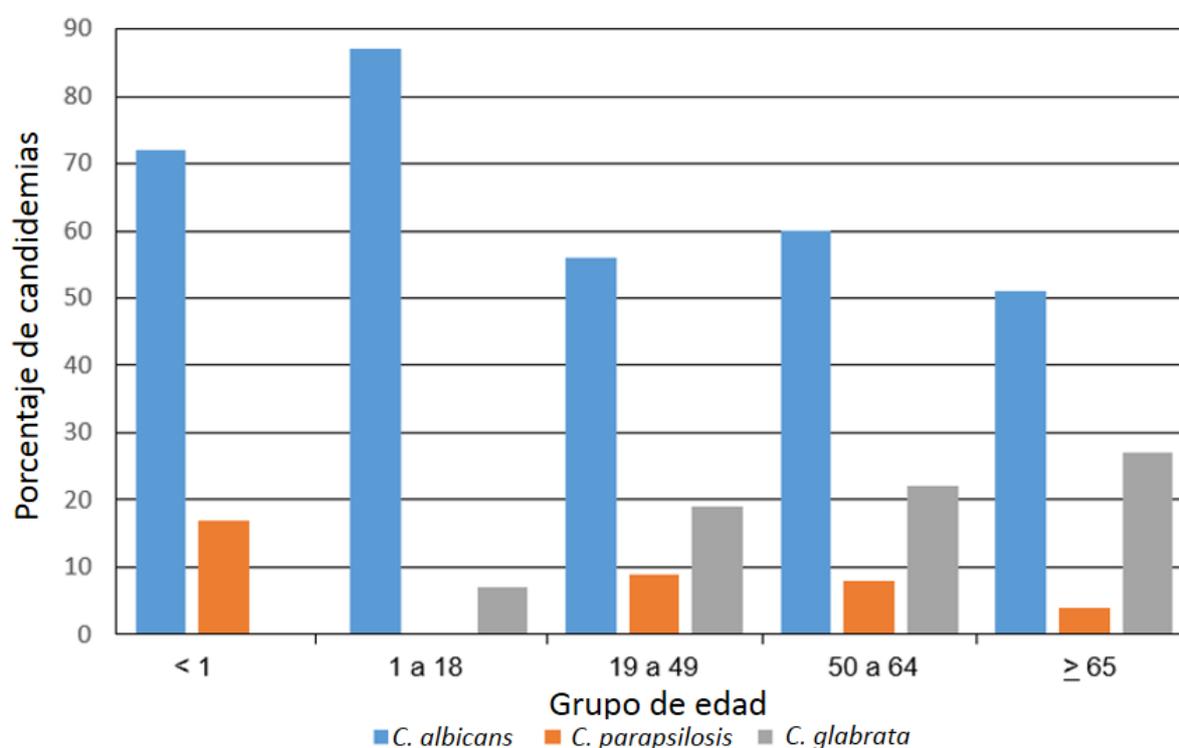


Figura 1.4. Porcentaje de candidemias producidas por algunas especies de *Candida* por grupo de edades. Datos tomados de The Emerginig Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms Survey, 1998 a 2001. (Datos tomados de Pfaller, et al. 2007).

La presencia de determinados factores como la edad de los pacientes, la inmunosupresión, el uso de determinados antifúngicos, pueden influenciar la presencia de determinadas especies del género *Candida*. Por ejemplo, el uso de azoles (p.ej. fluconazol) para profilaxis antimicótica, puede incrementar la presencia de *C. glabrata* y *C. krusei*, por presentar una menor sensibilidad a estos antifúngicos. En cambio, una mala praxis en el control de las infecciones y la manipulación de catéteres vasculares puede originar infecciones por *C.*

parapsilosis, que es más prevalente en las manos de los profesionales sanitarios (Aguado, et al. 2011).

Las consecuencias de las infecciones sistémicas por *Candida* en el paciente hospitalizado son graves. Se ha demostrado, que los pacientes con infecciones sistémicas por levaduras, presentan un riesgo dos veces mayor de morir en el hospital, que aquellos con infección septicémica no candidiásica. Se ha comprobado que la candidemia constituye un factor pronóstico independiente de muerte hospitalaria en los pacientes con infección septicémica nosocomial. A pesar de que la grave naturaleza de las enfermedades subyacentes, en muchos de estos pacientes, puede generar confusión en las estimaciones de mortalidad, los estudios de cohortes emparejadas han confirmado, que la mortalidad atribuible de forma directa a la infección por hongos es relativamente elevada (tabla 1.1).

Tabla 1.1. Exceso de mortalidad atribuible a infecciones nosocomiales por *Candida* y *Aspergillus*.

Tipo de tasa de mortalidad	Porcentaje de mortalidad		
	<i>Candida</i> *		<i>Aspergillus</i> **
	1988	2001	1991
Tasa bruta de mortalidad			
Casos	57	61	95
Sujetos del grupo control	19	12	10
Mortalidad atribuible	38	49	85

* *Pacientes con candidemia. Datos tomados de Wey, et al. 1988; Gudlaugsson, et al. 2003.*

***Receptores de trasplante de médula ósea con aspergilosis pulmonar invasiva. Datos tomados de Pannuti, et al. 1991.*

En particular, el exceso de mortalidad atribuible a la candidemia, no ha disminuido con relación a las cifras observadas a mediados de la década de los ochenta, aún a pesar de la introducción de nuevos fármacos antifúngicos con buena actividad frente a la mayoría de las especies de este género.

La epidemiología de la candidemia nosocomial se conoce con mayor detalle que la de ninguna otra micosis. Los indicios acumulados permiten esbozar una perspectiva general de la candidemia nosocomial (figura 1.5).

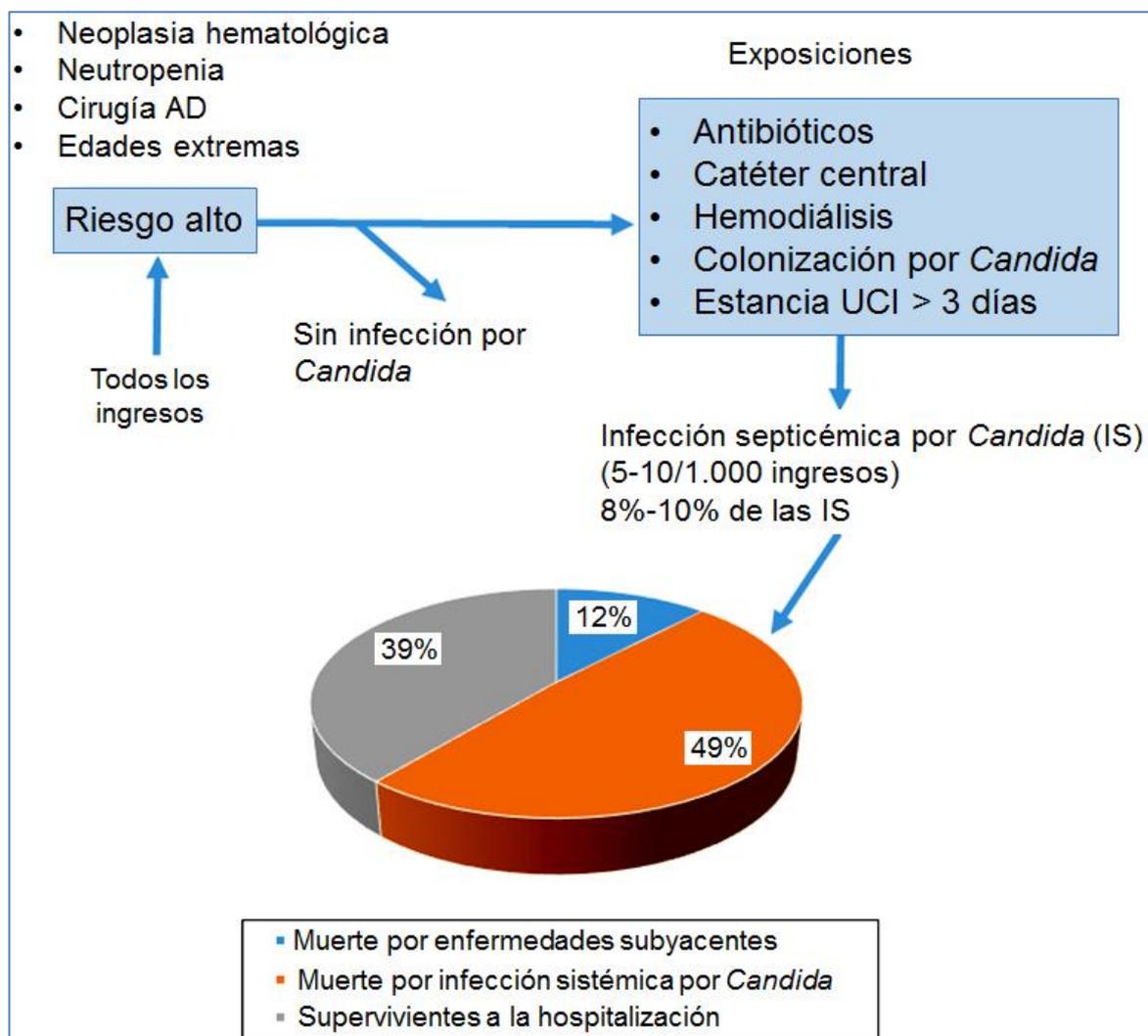


Figura 1.5. Perspectiva general de la candidemia nosocomial. AD, aparato digestivo; UCI, unidad de cuidados intensivos. (Adaptado de Pfaller, et al. 2009).

Claramente, ciertos sujetos ingresados presentan un riesgo mayor de candidemia durante el periodo de hospitalización como consecuencia de su afección de base: pacientes con neoplasias hematológicas o neutropenia, sometidos a cirugía digestiva, niños prematuros y personas mayores de 70 años de edad. En comparación con los sujetos del grupo control carentes de estos factores o exposiciones específicas de riesgo, la probabilidad de adquirir una candidemia durante el periodo de hospitalización por los citados pacientes, es aproximadamente

2 veces mayor en pacientes tratados con antibacterianos de amplio espectro, 7 veces mayor en los portadores de una catéter venoso central, 10 veces mayor cuando existe colonización de otras localizaciones anatómicas por *Candida* y 18 veces mayor cuando el paciente se ha sometido a hemodiálisis aguda. El ingreso en la unidad de cuidados intensivos hace posible la transmisión de *Candida* entre pacientes y constituye otro factor independiente de riesgo.

Los datos epidemiológicos publicados, indican que entre un 5% y un 10% de cada 1.000 pacientes de alto riesgo, expuestos a los factores enumerados anteriormente, contrae infección septicémica causada por una especie de *Candida* (8% a 10% de infección septicémica nosocomial. Tabla 1.2). Las especies de *Candida* reconocidas como los principales agentes de infecciones adquiridas en el hospital, ocupan el cuarto lugar entre los patógenos aislados en sangre, sobrepasando la frecuencia de aislamiento de los bacilos gramnegativos (Martone, et al. 1995; Gaynes, et al. 1990; Emori, et al. 1991).

Tabla 1.2. Infecciones nosocomiales septicémicas patógenos asociados con una mayor frecuencia: programa de vigilancia SCOPE. Infecciones nosocomiales septicémicas y patógenos asociados con mayor frecuencia: programa de vigilancia SCOPE.

Puesto	Patógeno	% de cepas*
1	Estafilococos coagulasa-negativos	31.3
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	20.2
3	Género <i>Enterococcus</i>	9.4
4	Género <i>Candida</i>	9
5	<i>Escherichia coli</i>	5.6
6	Género <i>Klebsiella</i>	4.8
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.3
8	Género <i>Enterobacter</i>	3.9
9	Género <i>Serratia</i>	1.7
10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.3

*Porcentaje de un total de 20.978 infecciones. Datos tomados de Wisplinghoff, et al. 2004.

Aproximadamente un 49% de estos pacientes morirá como consecuencia de la infección, el 12% lo hará debido a la enfermedad subyacente y el 39% superará la hospitalización (figura 1.5). Esta situación no se ha modificado y podría ser incluso peor que la

descrita en la década de los ochenta. El desenlace de casi la mitad de los pacientes con candidemia podría mejorar, mediante la utilización de abordajes más eficaces de prevención, diagnóstico y tratamiento. Evidentemente, el elemento más deseable de los tres anteriores es la prevención, la cual se lleva a cabo por medio de un control riguroso de las exposiciones, con limitación de la administración de antibióticos de amplio espectro, manejo adecuando de catéteres y cumplimiento de las directrices de control de infecciones.

1.3.1. Candidiasis y candidemias: enfermedades y manifestaciones clínicas

Las especies del género *Candida* pueden producir una infección clínica, en prácticamente cualquier órgano o tejido. Desde hace más de una década, se ha observado un aumento de la incidencia de estas infecciones a nivel global en todos los hospitales y en todos los grupos etarios.

El espectro de infección, abarca desde las enfermedades de las mucosas y cutáneas superficiales, hasta la diseminación hematógena extensa, con afección de órganos vitales como el hígado, el corazón, el bazo, el riñón y el cerebro. La candidiasis invasora o candidemia es una de las manifestaciones más graves de la infección por *Candida spp.*, y su diagnóstico se realiza mediante el aislamiento de dicho microorganismo en hemocultivos.

La incidencia de candidemia en España se estima que es de 4,3 episodios/10⁵ habitantes, de ellos el 33-55% ocurren en las UCIs, proporción que podría haber disminuido en los últimos años (Aguado, et al. 2011).

Durante el proceso de diseminación hematógena pueden aparecer también lesiones cutáneas, las cuales tienen una gran importancia diagnóstica debido a la posibilidad de hacer una biopsia directa y por tanto obtener un diagnóstico etiológico de un proceso sistémico. En la inmensa mayoría de los casos de candidiasis hematógena, el origen de la misma es endógeno, pero también puede ocurrir por la contaminación de un catéter. Los microorganismos transferidos a este dispositivo pueden formar una biopelícula en su interior con la consiguiente diseminación hacia el torrente circulatorio. Su tratamiento es en cierto modo más sencillo, consisten en la retirada del catéter, eliminando así el foco de infección. Evidentemente si la contaminación de dicho catéter conlleva a la diseminación del microorganismo a otros órganos distantes, las consecuencias y los tratamientos serán los mismos que los asociados a un foco endógeno.

1.4. PARED CELULAR DE *CANDIDA SPP.*

La pared celular de los hongos es la estructura más externa de los mismos y esta multiestratificada. Aunque en un principio dicha estructura se consideraba inerte y se creía que solo proporcionaba rigidez y protección a las células, hoy se sabe que es una estructura compleja y dinámica. La pared celular de los hongos cambia según las necesidades de la célula tanto a nivel biológico como a nivel patogénico, esto se observa en *Candida spp.* (Gow, et al. 2012; Briard, et al. 2017).

Dicha rigidez protege a la célula de la presión de turgencia del protoplasto, de las agresiones físicas externas y evita la lisis celular en medios hipotónicos, le aporta protección frente a sustancias potencialmente dañinas y evita la excreción de proteínas periplásmicas.

También facilita la exposición de proteínas involucradas en las interacciones celulares de carácter sexual, inmunomodulador o inmunógeno.

La pared celular es una excelente diana en el estudio y desarrollo de nuevos antifúngicos ya que solo está presente en hongos, plantas, algas y bacterias y está ausente en células de mamífero. Su composición principalmente es de carácter polisacárido (90%) y proteico (10%), dicha estructura supone el 15-30% del peso seco de la célula (Valentín, et al. 1987)

Esta estructura está constituida por diferentes capas, en la que los carbohidratos mayoritarios son tres: β -glucano (polímeros de D-glucosa con enlaces tanto β -1,3 como β -1,6); manano, en su forma mayoritaria como fosfopeptidomanano (PPM, proteínas O-y/o N-glicosiladas) como en su forma minoritaria fosfolipomanano (PLM); y quitina (polímero de N-acetilglucosamina con uniones β -1,4) (Arana, et al. 2009; Merzendorfer. 2011). Los constituyentes de la pared se sintetizan tanto en la membrana plasmática (quitina y β -1,3-glucano), como a través la ruta de secreción (proteínas de la pared y posiblemente β -1,6-glucano) y se disponen formando una red tridimensional como se observa en la figura 1.6.

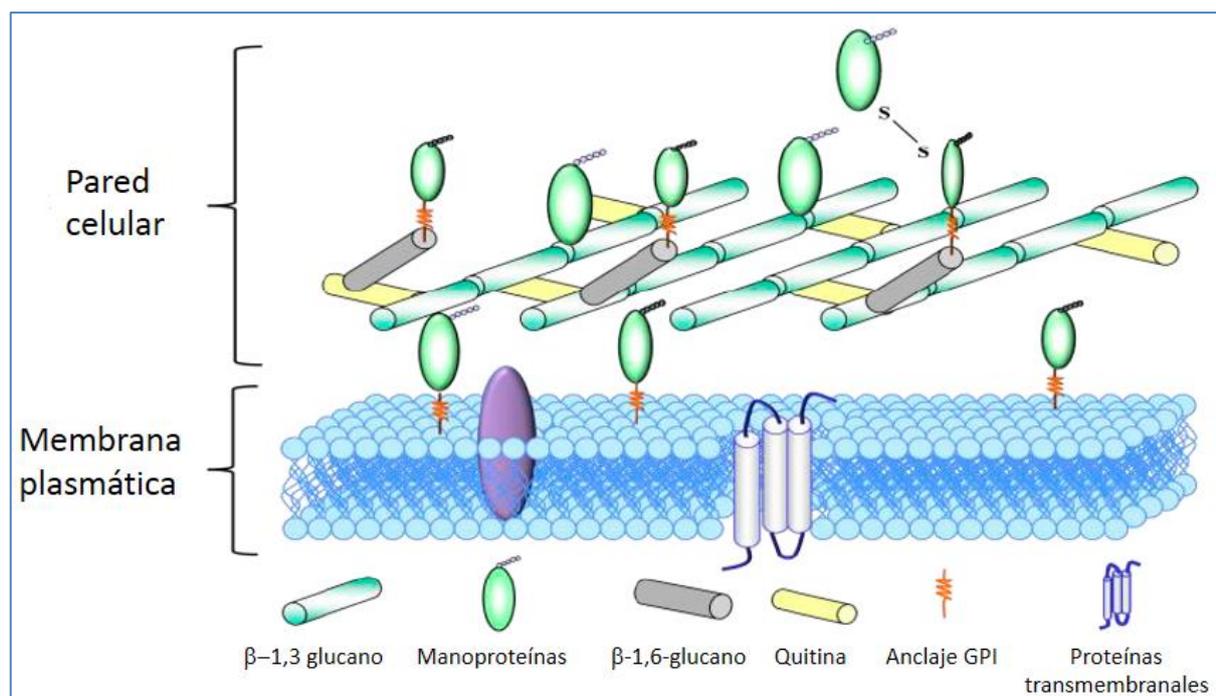


Figura 1.6. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de *C. albicans* (Adaptado de Molina, et al. 2000).

1.4.1. Composición química de la pared celular

Los polisacáridos estructurales localizados en capas internas de la pared que confieren rigidez y forma en *Candida spp.* son quitina (1-2% del peso seco de la pared) y β -1,3-glucano (50-60%), que conforman el esqueleto microfibrilar de la pared. Su pared celular es una estructura compleja.

Aunque las manoproteínas (35-40%) (componente amorfo) están en toda la extensión de la pared celular, se encuentran principalmente en el exterior, concretamente ancladas al esqueleto microfibrilar, formando una capa menos estructurada determinando en buena medida la porosidad de la pared celular. Generalmente los polímeros de manosa están unidos a las proteínas mediante enlaces N-glicosídico (N-manano) y/u O-glicosídicos (O-manano). El enlace N-glicosídico consiste en la unión a aspargina de una cadena lineal de manosa por enlaces α -1,6 a su vez con ramificaciones mediante enlaces α -1,2 y α -1,3. El enlace O-glicosídico se forma por unión de pequeñas cadenas de α -1,2 o α -1,3-manosa a residuos de serina y/o treonina (Ruiz-Herrera. 1967; Poulain, et al. 2004).

1.4.1.1. Quitina

La quitina es un homopolímero lineal de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina. En los hongos las cadenas de azúcares adoptan una posición antiparalela y su estructura es de α -quitina (figura 1.7). La quitina es insoluble, probablemente debido a la presencia de numerosos puentes de hidrogeno a lo largo de toda su estructura. (Ruiz-Herrera, et al. 1992; Shaw, et al. 1991).

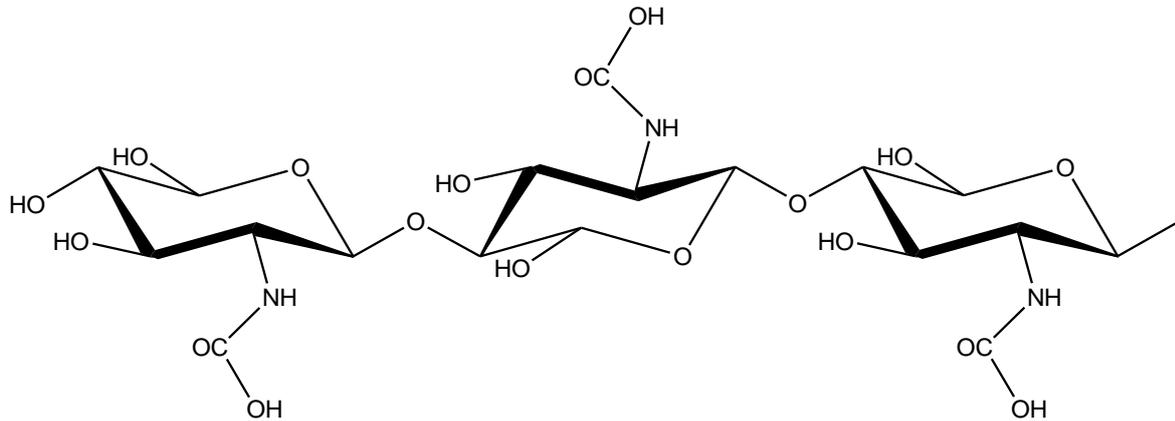


Figura 1.7. Estructura química de quitina (Ruiz-Herrera, et al. 2006).

El papel de la quitina es de gran importancia en *Candida spp.* Para el mantenimiento de su estructura externa y en la transición morfogénica del hongo, siendo tres veces mayor en la pared micelial que en la levaduriforme (Chattaway, et. al. 1968).

En el citosol del hongo, en microvesículas denominadas quitosomas, se encuentran enzimas como las quitina sintetasas (Ruiz-Herrera, et al. 2006).

C. albicans posee cuatro quitina sintetasas codificadas por cuatro genes (*CHS1*, *CHS2*, *CHS3*, *CHS8*) (Munro, et al. 2007):

- ✓ *CHS1*, la proteína que codifica este gen es una enzima esencial tanto en la síntesis como en la integridad de la pared celular. Su pérdida es letal (Munro, et al. 2001)
- ✓ *CHS2*, se expresa fundamentalmente durante la formación de micelio. Este gen no es necesario para el crecimiento normal, la virulencia y la morfogénesis de las células (Gow, et al. 2002).
- ✓ *CHS3*, alcanza su máximo nivel de expresión durante la inducción de micelio.
- ✓ *CHS8*, codifica una proteína quitina sintetasa con similitud a Chs2.

1.4.1.2. β -glucanos

La pared celular de *Candida spp.* está constituida por la unión de moléculas de D-glucano en configuración β , no presenta en su estructura α -glucano. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces β -1,6 (en *Candida*, pero no en *Aspergillus*) (Figura 1.8). El glucano presenta diferente peso molecular según se encuentre en células levaduriformes o en micelios, cuando forma parte de las levaduras su peso molecular es aproximadamente 10^6 Da, mientras que en micelios es ligeramente más alto. Surarit, et al. (1988) mostraron la existencia de uniones covalentes entre el β -1,6- glucano y la quitina en posición 1 de glucosa y 6 de N-acetilglucosamina.

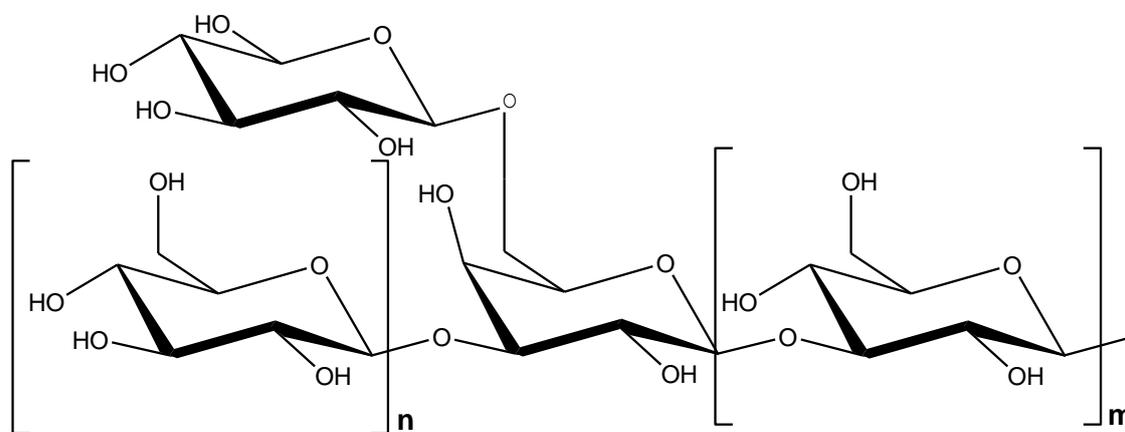


Figura 1.8. Estructura química de β -1,3/ β -1,6-glucano (Ruiz-Herrera, et al. 2006).

1.4.1.2.1. β -1,3-glucano

Constituye habitualmente un 80% del total del β -glucano, es el componente más abundante. Está formado aproximadamente por 1500 residuos de glucosa por molécula, forma una cadena lineal con uniones β -1,3 y presenta aproximadamente un 3% de ramificaciones unidas mediante enlace β -1,6 (Manners, et al. 1973).

En un primer momento se clasificó el β -1,3-glucano como álcali soluble o insoluble característica dependiente de la unión del mismo a la quitina, de modo que aquel β -1,3-glucano que estuviese unido a quitina sería insoluble en álcali, (Kollár, et al. 1995). Estas características estudiadas que hacen referencia a la solubilidad o insolubilidad del β -1,3-glucano en *Candida spp.* no son exclusivas de las mismas, tampoco pertenecen solo al *phylum* en el cual se clasifican, es decir, *Ascomycota*, sino que también se comparten con otro *phylum* como por

ejemplo *Basidiomycota*. Como por ejemplo el hongo *Ustilago maydis*, hongo patógeno del maíz. (Fonseca-García, et al. 2010).

En cuanto a sus funciones celulares, la fracción insoluble, es decir la unida a quitina tiene un papel directo en el mantenimiento de la rigidez y morfología de la pared celular, ya que la forma de la célula permanece inalterada después de haber realizado una extracción del manano y del glucano álcali soluble (Fleet, et al. 1977; Kopecká, et al. 1974).

El glucano también presenta un papel importante en la virulencia. Es habitual encontrar en pacientes infectados por *Candida spp.* fragmentos de glucano o complejos con manano. Estos compuestos han provocado shock anafiláctico y arteritis coronaria en el modelo murino. Además, el glucano reduce indirectamente la actividad de monocitos y linfocitos T de modo que juega un papel importante en el desarrollo de candidiasis, hipótesis basada en la acción de los anticuerpos anti- β -glucano en la respuesta inmune, ya que reconocen *Candida spp.* y otros patógenos fúngicos. (Ishibashi, et al. 2005; Ballou, et al. 2016).

La síntesis del β -1,3-glucano es producida mediante una transglicosilación a nivel de membrana plasmática y es catalizada por un complejo enzimático que requiere UDP-glucosa como sustrato. El complejo enzimático está formado, al menos, por dos subunidades, una con acción catalítica unida a membrana (Fks1 y Fks2) y otra soluble con acción reguladora (Rho1) (GTP dependiente) (Shematek, et al. 1980).

1.4.1.2.2. β -1,6-glucano

El β -1,6-glucano juega un papel esencial en la interconexión del resto de componentes de la pared celular y constituye aproximadamente el 5% del peso seco tal de la misma (Klis, et al. 2001).

Al igual que ocurre con el β -1,3-glucano, éste también se clasifica en álcali soluble y álcali insoluble. Puede ser parcialmente purificada en la fracción álcali insoluble de la pared celular como una molécula muy ramificada que consiste principalmente en residuos de glucosa unidos mediante enlaces β -1,6 con una pequeña porción de residuos unidos mediante enlaces β -1,3. También ha sido detectado en la fracción álcali soluble como un heteropolímero β -1,3/ β -1,6-glucano (Fleet, et al. 1977).

1.4.1.3. Manoproteínas

Las manoproteínas son glicoproteínas muy importantes en las células eucariotas, poseen una estructura común, que consiste en una matriz proteica a la cual se le unen de forma covalente cadenas de carbohidratos. Esta estructura recibe el nombre de manoproteínas en algunos hongos microscópicos como *Candida spp.* y *Saccharomyces cerevisiae*, porque las cadenas de carbohidratos contienen de forma mayoritaria unidades de manosa, aunque otros hongos frecuentemente presentan otros azúcares y grupos fosfatos (Ruiz-Herrera, et al. 1992).

Las manoproteínas se clasifican según su actividad biológica en:

- ✓ **Manoproteínas con actividad enzimática**, proteasas como las proteínas Sap (Naglik, et al. 2003), fosfolipasas (Ibrahim, et al. 1995; Ghannoum, et al. 2000), transglicosidasas como Crh (Pardini, et al. 2006) e hidrolasas como, Atc1 que es una trehalasa ácida de pared celular (Pedreño, et al. 2004).
- ✓ **Manoproteínas estructurales**, estas proteínas son componentes intrínsecos de la estructura de la pared: Ssr1 (Garcerá, et al. 2003), Hwp1 (Sharkey, et al. 1999), Pga13 (Gelis, et al. 2012) o Pga26 (Laforet, et al. 2011), entre otras.
- ✓ **Manoproteínas de adhesión**, como las proteínas de la familia Als (Hoyer, et al. 2008).

Las manoproteínas están distribuidas ampliamente se pueden localizar en diversos puntos, a nivel del espacio periplásmico, formar parte estructural de la pared celular o ser secretadas al medio (Valentín, et al. 1987).

1.4.1.3.1. Clasificación de las manoproteínas

Tras la anotación del genoma de *C. albicans*, se han identificado más de un centenar de proteínas putativas de pared celular (Garcerá, et al. 2003; De Groot, et al. 2003; Eisenhaber, et al. 2004; Richard, et al. 2007; De Groot, et al. 2013). Estas proteínas se han clasificado en distintos grupos en función del tipo de enlace en la pared celular (Figura 1.9).

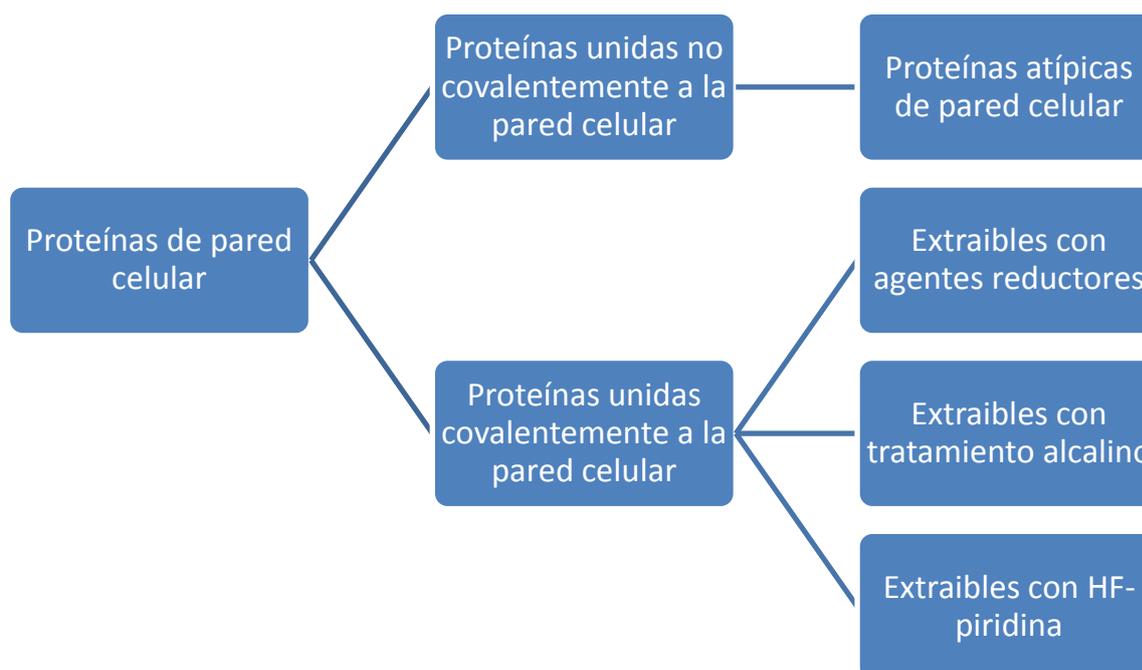


Figura 1.9. Clasificación de las proteínas de pared celular.

1.4.1.3.1.1. Proteínas unidas no covalentemente a la pared celular

Las proteínas que forman parte de este grupo son aquellas que están unidas mediante enlace débiles, tipo puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, es decir de modo no covalentemente a la pared (Non-Covalently Linked Cell Wall Proteins, NCL-CWP), de manera que pueden ser extraídas utilizando detergentes iónicos como SDS (Valentín, et al. 1984) o agentes caotrópicos como la urea.

Las proteínas que se extraen de la pared tras tratamiento con un detergente no suelen ser componentes reales de las mismas se tratan de contaminantes con fragmentos de membrana (Klis, et al. 2001), pero existen excepciones como es el caso de la transglucosidasa Bg12 (Sarthy, et al. 1997), o la trehalasa ácida Atc1 (Pedreño, et al. 2004).

Aunque no es del todo bien conocido el mecanismo, hay hipótesis que defienden la existencia de una ruta de secreción no convencional para excretar dichas proteínas al exterior (Delgado, et al. 2001).

1.4.1.3.1.2. Proteínas extraíbles por agentes reductores

Estas proteínas establecen puentes disulfuro con otras proteínas y consecuentemente pueden extraerse por agentes reductores como el ditioneitol (DTT) o β -mercaptoetanol (β -ME)

(Moukadiri, et al. 2001). Este grupo corresponde a las proteínas llamadas en inglés Reducing Agent Extractable-Cell Wall Proteins, (RAE-CWP). De forma aparente estas proteínas no tienen una estructura o función claramente definida y además la naturaleza de las proteínas con las que se asocia es desconocida, pero se piensa que pueden unirse a la pared mediante otros tipos de uniones covalentes (Ramón, et al. 1997).

1.4.1.3.1.3. Proteínas unidas por enlaces álcali-sensibles

Las proteínas de este grupo se encuentran unidas directamente al β -1,3-glucano mediante enlaces covalentes sensibles al tratamiento alcalino, las proteínas de este grupo se denominan en inglés Alkali-Sensitive Linkage Cell Wall Proteins (ASL-CWP). En este grupo están las proteínas Pir, caracterizadas por presentar un elevado porcentaje de O-glicosilación y repeticiones internas con el patrón Q[IV]XDGQ[IVP]Q en proporciones variables y 4 Cys conservadas (figura 1.10).

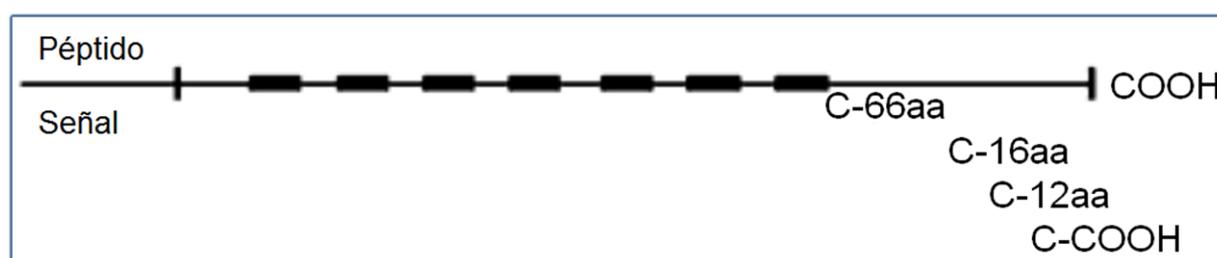


Figura 1.10. Esquema general de la proteína Pir 1. Pir1 presenta cuatro cisteínas en el C-terminal de la proteína (-C-66aa-C-16aa-C-12aa-C-COOH) y tiene nueve (C2_08870C_A) o siete (C2_08870C_B) repeticiones internas con la estructura [-(A/K/Q)-Q-I-(S/T/G/N)-D-G-Q-I-Q-H-Q-T-]. Además, un sitio potencial de N-glicosilación tanto en la IPF 19968 como en la IPF15363 y aproximadamente el 20% de los aminoácidos son Ser o Thr, indicando que la proteína podría estar muy glicosilada (Adaptado de Ruiz-Herrera, et al. 2006).

El tipo de enlace que une las proteínas Pir con la pared celular es un puente glicosídico que une al β -1,3-glucano y al residuo de manosa de las cadenas O-glicosídicas de las proteínas Pir. Se ha demostrado también que se requieren las secuencias repetidas para la unión al β -1,3-glucano (Castillo, et al. 2003; Klis, et al. 2002). Si contienen la secuencia “de unión” estas repeticiones, están directamente implicadas en la unión al β -1,3-glucano y por tanto las proteínas Pir pueden interconectar dos o más moléculas de β -1,3-glucano.

Algunas proteínas Pir se ha demostrado que se encuentran retenidas en la pared exclusivamente por puentes disulfuro, esto se ha elucidado al estudiar el resultado obtenido tras la solubilización de las mismas con agentes reductores tales como β -ME o DTT (Castillo, et al. 2003; Orlean, et al. 1986; Moukadiri, et al. 2001).

1.4.1.3.1.4. Proteínas unidas por enlaces glicosil fosfatidil inositol (proteínas GPI)

Estas proteínas se unen vía β -1,6-glucano al β -1,3-glucano, en un 90% de los casos o a quitina en el 10% restante (Marcilla, et al. 1991). A estas proteínas unidas a través de un enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI).

La mayoría de las proteínas GPI de pared descritas en *Candida spp.* presentan las siguientes características (Richard, et al. 2007) (Figura 1.11): (i) poseen en el extremo N-terminal un péptido señal procesable, (ii) una secuencia que podría proporcionar sitios para O-glicosilación que es rica en serinas y/o treoninas, (iii) tienen en el extremo C-terminal un sitio de anclaje de GPI y (iv) un sitio ω donde se une el enlace GPI al β -1,6-glucano localizado en la cola hidrofóbica (Caro, et al. 1997).

El sitio ω es una región hidrofoba de aminoácidos formada por un grupo de unión constituido por tres aminoácidos denominados ω , $\omega+1$ y $\omega+2$. Entre el sitio ω y $\omega+1$ tiene lugar la rotura de la proteína permitiendo el anclaje mediante enlaces GPI al aminoácido ω (Nuoffer, et al. 1993).

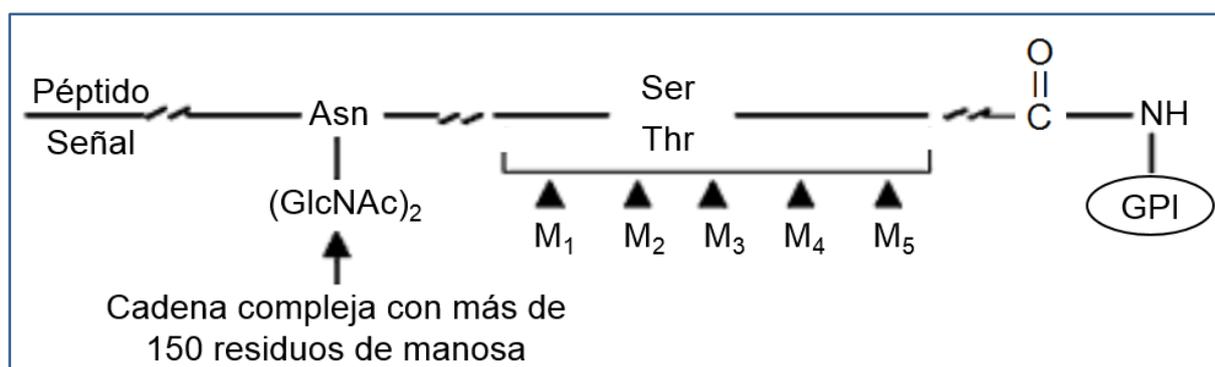


Figura 1.11. Esquema general de una GPI-CWP de levaduras. Son proteínas ricas en Ser/Thr, indicando que la proteína podría estar muy glicosilada, con uno o más sitios potenciales de N-glicosilación. (Adaptado de Ruiz-Herrera, et al. 2006).

Las proteínas GPI son las proteínas intrínsecas de pared celular más abundantes en *Candida spp.* representando aproximadamente el 88% de las proteínas de pared celular unidas covalentemente.

Richard y Plaine en el año 2007, publicaron un listado de 115 proteínas de *C. albicans*, que han sido clasificadas en cuatro grupos: (i) 76 proteínas putativas con funciones desconocidas, (ii) 15 proteínas tienen funciones relacionadas con la remodelación o con la biogénesis de la pared celular, (iii) 13 proteínas relacionadas con la adhesión entre células y

otras interacciones varias entre las mismas y por último (iv) 11 proteínas que presentan diferentes actividades enzimáticas (Garcerá, et al. 2003).

1.4.1.3.1.5. Proteínas atípicas de pared celular

Este grupo está constituido por proteínas que, aunque se encuentran en la pared, se incluyen como proteínas citoplasmáticas y no poseen las características propias de proteínas de pared celular (péptido señal y sitios potenciales de glicosilación). Algunas de estas proteínas atípicas son enzimas glicolíticas y factores de traducción encontradas en extractos de pared celular (Nombela, et al. 2006).

En *C. albicans* han sido encontradas por primera vez proteínas relacionadas con el estrés como Hsp70 (López-Ribot, et al. 1996), proteínas como la enolasa (Edwards, et al. 1999), relacionadas con la síntesis de proteínas Tef1, Tef2 y Tef3, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Delgado, et al. 2001).

En la figura 1.12 podemos observar un modelo de organización y ensamblaje de la pared celular de *C. albicans* desarrollado por el consorcio europeo Galar Fungail, reuniendo todos los datos correspondientes a los componentes de misma.

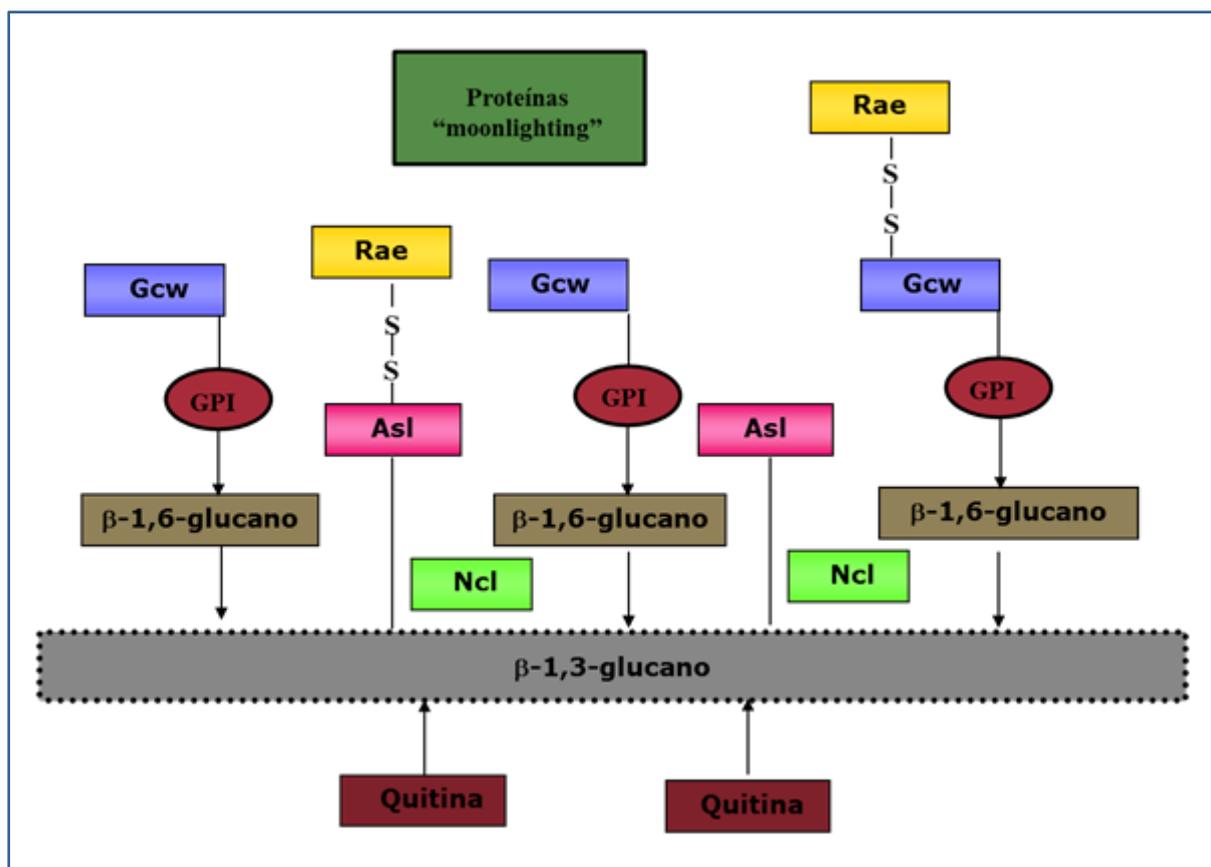


Figura 1.12. Esquema propuesto por el consorcio europeo Galar Fungail I para la pared celular de *C. albicans*. Está constituida por una red de β -1,6- y β -1,3-glucano y quitina. NCL-CWP (*non covalently linked protein*), extraíble con SDS. RAE-CWP (*reducing agent extractable*), extraíbles con un tratamiento con β -mercaptoetanol. ASL-CWP (*alkali sensitive linkage cell wall proteins*), extraíbles con un tratamiento suave con álcali. GPI-CWP (*glycosylphosphatidylinostol cell wall proteins*), extraíbles con un tratamiento con HF-piridina o por digestión con laminarinasa o zimoliasa.

Las proteínas se pueden extraer de la pared mediante diferentes tratamientos tanto químicos como enzimáticos:

- ✓ Tratamiento con β -ME para extraer las proteínas unidas por puentes disulfuro a otras proteínas (Popolo, et al. 2008).
- ✓ Tratamiento con SDS para extraer las proteínas no retenidas covalentemente a la pared celular (Valentín, et al. 1984).
- ✓ Tratamiento con NaOH para extraer las proteínas retenidas covalentemente a la pared por enlaces sensibles al álcali (Ruiz-Herrera, et al. 2002; Garcerá, et al. 2003).
- ✓ Tratamiento con quitinasa que rompe la unión de la quitina con el β -1,6-glucano (Marcilla, et al. 1991).

- ✓ Tratamiento con ácido fluorhídrico-piridina (HF-piridina) acuoso o con fosfodiesterasas para extraer las proteínas unidas mediante un anclaje GPI (Kapteyn, et al. 1994; Klis, et al. 2001).
- ✓ Tratamiento con zimoliasa que desestabiliza toda la pared celular (Chaffin, et al. 2008).
- ✓ Tratamiento con endo β -1,3-glucanasa o con endo β -1,6-glucanasa que rompen el β -1,3-glucano y el β -1,6-glucano respectivamente (Kapteyn, et al. 2000).

1.5. FACTORES DE VIRULENCIA DE *CANDIDA SPP.*

Los factores que contribuyen a la patogénesis de *C. albicans*, incluyen la morfogénesis (transición entre las células de levadura unicelulares y las formas de crecimiento filamentosas), las enzimas secretadas, como aspartil proteasas (SAP) y fosfolipasas, la hidrofobicidad de la pared celular de las levaduras y las biomoléculas de reconocimiento del huésped (adhesinas), que le permiten iniciar el proceso de formación de biopelículas.

1.5.1. Morfogénesis

Uno de los principales factores de virulencias de *Candida spp.* es la conversión de la forma unicelular de levadura al crecimiento filamentosos. La morfogénesis está sujeta a múltiples controles, rutas de transducción y señalización. La transición de levaduras a hifas es uno de los principales factores de virulencia de *C. albicans* para invadir tejidos. La forma filamentosos le permite invadir tejidos y células más fácilmente. Las levaduras predominan generalmente durante la colonización de la mucosa del hospedador sano y las hifas emergen cuando el sistema inmune del mismo, se debilita. Por ello ambas formas de crecimiento tienen su relevancia en la patogénesis del hospedador. La transición de levadura a hifa se revierte durante el avance de la infección y la razón de estos cambios puede ser alguna señal del medio ambiente, que el hongo recibe (figura 1.13) (García de Acevedo Chávez, et al. 2005). Por ejemplo, las levaduras se transforman en hifas en el estado temprano de la colonización y durante el avance de la enfermedad o en el tejido ya necrótico, se observan levaduras.

Se ha propuesto que este dimorfismo este asociado a la virulencia en los hongos, ya que un morfotipo existe en el medio ambiente o durante la colonización y el otro en el hospedador en el proceso de infección. Se ha sugerido que el cambio de forma de levadura a hifa es realmente importante para la virulencia.

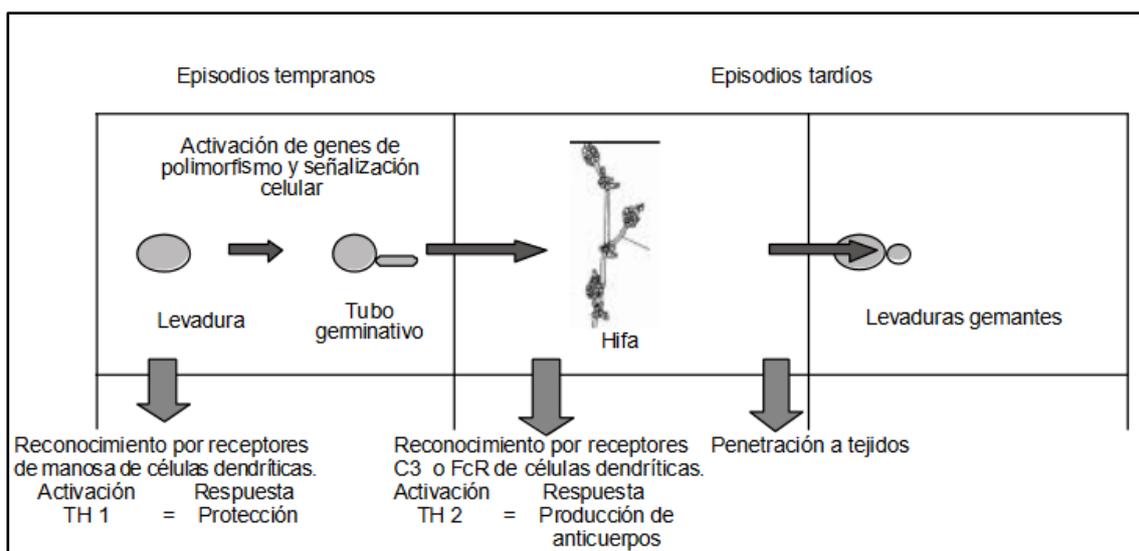


Figura 1.13. Morfogénesis de *Candida* spp. durante la infección.

Existen tres factores que sustentan la hipótesis de que la morfogénesis de levadura a hifa se requiere para la virulencia de *Candida*, el primero de ellos, es que la formación de filamentos acontece o se estimula a 37°C en presencia de suero, con pH neutro. En segundo lugar, los filamentos recién formados llamados tubos germinativos, son más adherentes a las células de mamíferos que las levaduras y el requisito para la penetración tisular es la adherencia a la superficie celular. Por último, la formación de filamento es una forma de evadir al sistema inmune del hospedador, ya que las levaduras si son fagocitadas por macrófagos, producen filamentos y éstos lisan a los fagocitos. No existe una demostración inequívoca de esta asociación entre morfogénesis y virulencia, pero lo cierto es que mutantes de *C. albicans* incapaces de formas hifas, son avirulentos en los modelos de candidiasis diseminada en ratón. (Mitchell. 1998; Cutler. 1991; Gow, et al. 2002; Haynes. 2001).

1.5.2. Enzimas

Pueden considerarse como factores de virulencia, ya que permiten la ruptura de polímeros que producen nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como la inactivación de moléculas útiles en la defensa del hospedador. Proteasas, fosfolipasas y lipasas son las principales enzimas extracelulares relacionadas con su patogénesis.

Se han descrito un gran número de proteasas en *C. albicans*, como por ejemplo las aspartil proteasas secretadas (Saps) que constituyen una familia de hasta 11 enzimas. Actúan como factores de virulencia facilitando la colonización e invasión debido fundamentalmente a su capacidad de dañar los tejidos y degradar material del hospedador, principalmente defensas inmunológicas y estructurales (Silva, et al. 2011). *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son menos productoras de Saps, comparadas con *C. albicans*. Estas enzimas se agrupan en familias de genes/proteínas, y la expresión de las isoenzimas dependerá de la especie y de las condiciones ambientales. Su número es mayor en los genomas de los patógenos, principalmente en las especies más patógenas como *C. albicans* así como en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Silva, et al. 2011).

Las proteínas Sap tienen funciones especializadas durante el proceso infeccioso e incluyen la digestión de proteínas para adquirir nutrientes, como por ejemplo nitrógeno para las células, digerir o distorsionar las estructuras en la superficie de las células del hospedador y facilitar la adhesión en los tejidos del mismo, la invasión por degradación o distorsión de las estructuras y la destrucción de moléculas del sistema inmunitario del hospedador para evitar o resistir el ataque de éste.

Las fosfolipasas son otras enzimas hidrolíticas secretadas por *C. albicans* (Ghannoum, 2000). Se han identificado cuatro fosfolipasas (Pla, Plb, nPlc y Pld), de las cuales sólo la Plb1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia de *Candida* en modelo animal (Leidich, et al. 1998). Una cepa con la delección de este gen y su consiguiente menor expresión de la enzima, reduce su virulencia hasta en un 60%, comparada con la cepa salvaje. Se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos (Calderone, et al. 2001).

Las lipasas secretadas por *C. albicans* se codifican por una familia de genes con, al menos, 10 miembros (*LIP1-LIP10*). El patrón de expresión se ha investigado *in vitro* y se ha demostrado que la expresión de esos genes depende del estado de infección. (Hube, et al. 2000; Stehr, et al. 2004).

1.5.3. Capacidad de adherencia

La capacidad de adherencia favorece en primera instancia la colonización y posteriormente la infección (Noumi, et al. 2010). La adherencia está influenciada tanto por la pared celular de las levaduras como por la superficie de adhesión (Imbert, et al. 2003). La adhesión ocurre en varias etapas; la primera, inespecífica, basada en fuerzas de atracción repulsión en la que destaca la hidrofobicidad de la superficie (Jabra-Rizk, et al. 2001) y posteriormente se establecen interacciones específicas entre la levadura y receptores celulares. Esto constituye el primer paso en la adhesión, siendo crucial la hidrofobicidad de la superficie celular de las levaduras.

Las moléculas hidrofóbicas poseen una mayor capacidad de adhesión (Blanco, et al. 2010), esto es debido a un incremento de la energía libre de la superficie, si el cambio de energía es negativo la reacción transcurre espontáneamente y no requiere receptores específicos.

La patogenicidad de *C. albicans* está relacionada de forma positiva con su adherencia a la superficie de las células del hospedador, las cepas más adherentes son más patógenas que el fenotipo menos adherente. Las adhesinas son biomoléculas que promueven dicha adherencia (Vidotto, et al. 2003). Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a la matriz extracelular de las células del mamífero, concretamente a proteínas como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV (Chaffin, et al. 1998; Sturtevant, et al. 1997; Hostetter, 1994).

Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida* como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p. La adhesina Als se requiere para el reconocimiento célula-célula. El gen Hwp1 codifica una manoproteína que permite una unión de las hifas de *C. albicans* a las células epiteliales estable y covalente. El gen *INT1* juega un papel importante en la adherencia a las líneas epiteliales y filamentación de *C. albicans* (Gale, et al. 1998).

Las cepas de *C. albicans* que tienen delección en el gen α -1,2 manosil transferasa (*MNT1*) son menos capaces de adherirse *in vitro* y son avirulentas (Buurman, et al. 1998). La proteína que codifica este gen es una proteína de membrana tipo II que se requiere para la manosilación en el hongo tanto en O- como en N-.

1.5.4. Formación de biopelículas

Casi siempre, los dispositivos como catéteres urinarios y tubos endotraqueales se asocian con infecciones y se detecta la formación de biopelículas en su superficie. (Crump, et al. 2000; Ramage, et al. 2001; Douglas, 2002). Otros dispositivos, como válvulas cardíacas, marcapasos y prótesis de articulaciones como por ejemplo de cadera o de rodilla, son susceptibles de infección por *Candida*, generalmente durante el tiempo de su colocación. La mayor capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas en estas superficies es la razón por la que esta especie es más patógena que las que son menos capaces de formar estas estructuras, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*. (Nikawa, et al. 1998) La percepción de los microorganismos como formas unicelulares de vida se basa en el modo de crecimiento como cultivo puro, axénico; sin embargo, la mayor parte de los microorganismos persisten unidos a las superficies dentro de un ecosistema estructurado, como biopelículas y no como organismos libres en flotación (planctónico).

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos, unidos a una superficie que contiene matriz exopolimérica y que muestra propiedades fenotípicas distintivas (Donlan, 2002).

En las biopelículas, las células desarrollan características fenotípicas que son diferentes de las propiedades que poseen en la forma de vida libre, como por ejemplo, el incremento en la resistencia a los agentes antimicrobianos, adhesión a dispositivos médicos, la protección frente al sistema inmune del hospedador; además, estas biopelículas permiten la persistencia de células viables dentro de las mismas después del tratamiento. (Chandra, et al. 2001; Kumamoto, 2002)

Las biopelículas formadas por *C. albicans* están compuestas por un consorcio de células en forma de hifa y en forma de levadura, embebidas en una matriz extracelular. (Baillie, et al. 2001.). Dicha matriz está formada por hidratos de carbono, hexosamina, fósforo, proteínas y ácidos nucleicos, está altamente hidratada y confiere un aspecto gelatinoso (Baillie, et al. 1999).

La matriz es el soporte principal de la biopelícula y su espesor aumenta con el tiempo de maduración. Su composición varía según la especie, por ejemplo en *C. albicans* está presente de forma mayoritaria la glucosa (32%) en cambio en *C. tropicalis* es mayoritaria la hexosamina (27%). (Al-Fattani, et al. 2006)

La capacidad de los microorganismos para formación de biopelícula es considerada un importante factor de virulencia (Perumal, et al. 2007). Es un mecanismo de patogenicidad complejo en el que participan diferentes aspectos como adhesión, crecimiento, germinación, formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración.

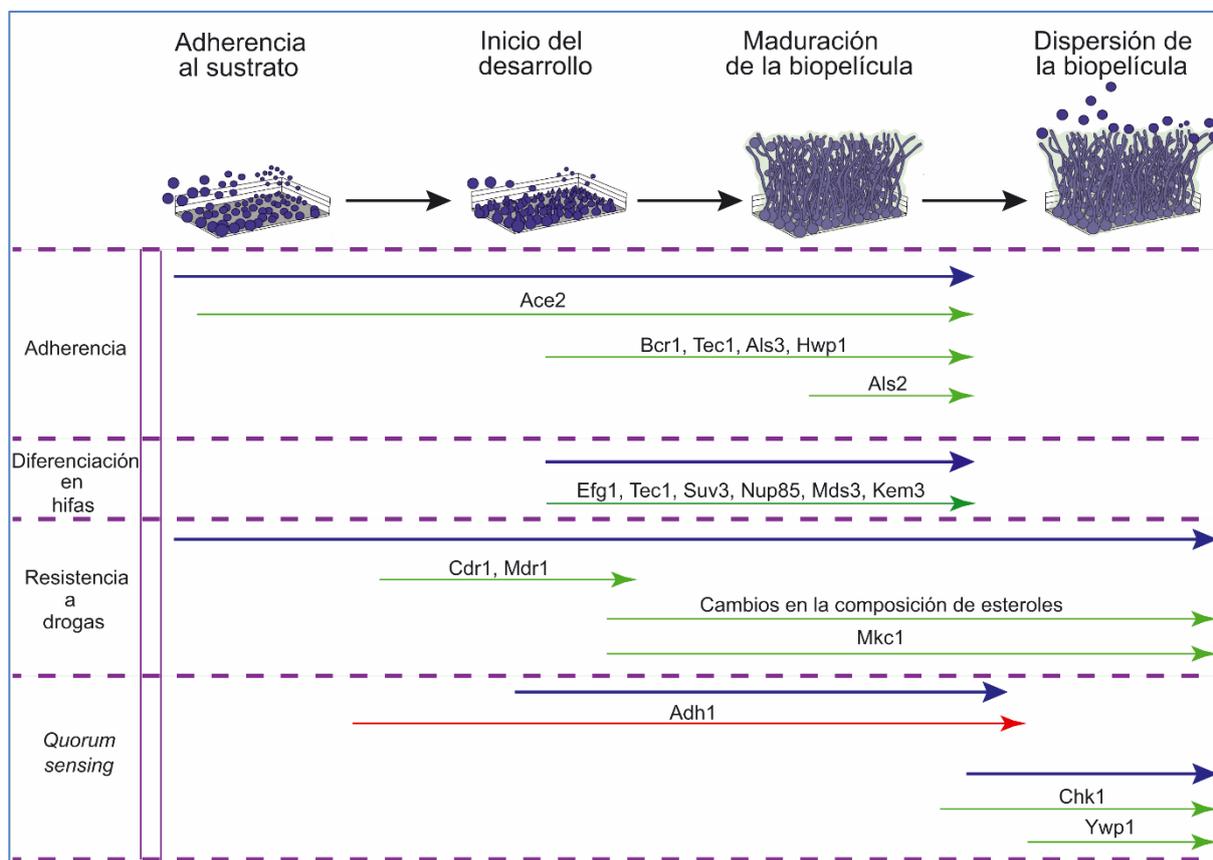


Figura 1.14. Diferentes procesos y fases en el desarrollo de un biopelícula. (Adaptado de Blankenship, et al. 2006).

La formación de biopelículas sobre superficies mucosas, así como sobre la superficie de implantes, prótesis y catéteres es un proceso que facilita las infecciones sistémicas, ya que los depósitos en la superficie de catéteres venosos centrales, favorecen la rápida diseminación de la infección (Douglas, 2003).

Las biopelículas están formadas por microorganismos adheridos a una superficie y embebidos en una matriz (figura 1.14).

Se han propuesto tres posibles mecanismos de resistencia de las biopelículas a los fármacos, en primer lugar, la penetración restringida a través de la matriz de la biopelícula, en segundo lugar, cambios de fenotipo que ocasionan disminución del crecimiento o limitación de los nutrientes y por último la expresión de genes de resistencia inducidos por el contacto con la superficie. En referencia a la penetración restringida, se ha sugerido que la matriz extracelular excluye o limita el acceso de los antimicrobianos a los organismos profundos de la biopelícula (Mah, et al. 2001).

Se ha propuesto que la matriz extracelular de las biopelículas, causa la disminución de la difusión o secuestro de los antimicrobianos y posiblemente también existan mecanismos adicionales que facilitan este proceso, como la expresión de genes inducidos por contacto, para adquirir otras propiedades y mediante el cual se adquiriera la resistencia a los antibióticos (Donlan, 2002).

1.5.5. Otros factores de virulencia

La propia evolución de los microorganismos ha generado la necesidad de que éstos busquen diferentes vías de comunicación entre sí.

Existen tres modalidades de comunicación intercelular, en primer lugar, la producción y liberación de mediadores tales como hormonas, citoquinas u óxido nítrico, que actúan entre células a determinada distancia. En segundo lugar, moléculas de superficie que se agrupan y conectan directamente con otras células o la matriz extracelular, como las integrinas y por último uniones entre células, del tipo de las uniones gap, pequeños canales proteicos que permiten comunicaciones intercelulares.

Recientemente se ha descubierto otro mecanismo de comunicación, como es la liberación y producción de vesículas extracelulares, que transmiten material proteico y genético pudiendo enviar mensajes entre células de la misma entidad y de entidades diferentes (György, et al. 2011).

Las células tanto procariotas como eucariotas liberan al exterior unas vesículas membranosas de tamaño variable entre 30 y 100 nm, denominadas habitualmente exosomas (Harding, et al. 2013).

1.6. VESÍCULAS EXTRACELULARES Y FUNCIONES QUE DESEMPEÑAN

Las células eucariotas como lo son las levaduras, además de los conocidos cuerpos apoptóticos, producen exosomas y ectosomas, orgánulos que han sido estudiados en profundidad en los últimos años (Harding, et al. 2013). Los primeros tienen un diámetro de entre 30-100 nm y son de origen endosomal, siendo liberados por exocitosis a partir de cuerpos multivesiculares. Los ectosomas son de un tamaño mayor (100-1000 nm) y son generados a nivel de la membrana plasmática. Ambos tipos de vesículas son liberadas tanto de forma constitutiva como en respuesta a estímulos (György, et al. 2011). Antiguamente se consideraba que los exosomas eran vesículas extracelulares producidas por el daño o lisis celular que contenían material de desecho, en la actualidad se sabe que permiten establecer comunicaciones entre células y participan en diferentes procesos biológicos. (Cocucci, et al. 2009; Vlassov, et al. 2012). En la actualidad se puede afirmar que las microvesículas participan en importantes procesos biológicos y de comunicación intercelular.

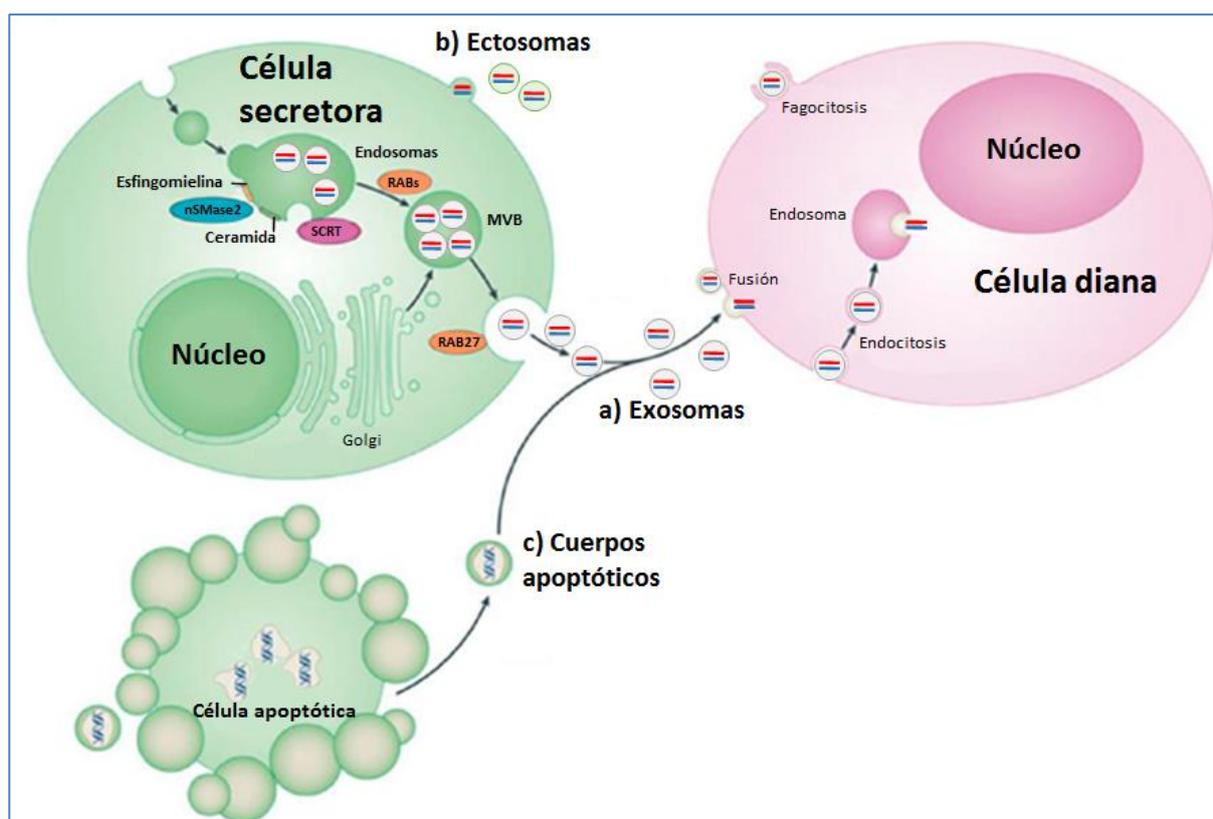


Figura 1.15. Vesículas extracelulares. Se muestran de forma esquemática los distintos tipos de vesículas extracelulares producidas por una célula eucariota, representada en verde (modificado de Cocucci, et al. 2009).

La Figura 1.15 muestra los diferentes tipos de microvesículas que podemos encontrar en una célula eucariota, desde la liberación de exosomas a partir de cuerpos multivesiculares a la formación de ectosomas a nivel de la membrana plasmática, así como la formación de cuerpos apoptóticos en una célula vieja y la interacción con una célula diana, internalizando vesículas y su contenido, por diferentes mecanismos (Mittelbrun, et al. 2012).

1.6.1. Formación y liberación de los exosomas

Los exosomas son generados en los cuerpos o endosomas multivesiculares (EM) como vesículas intraluminales (ILVs), y liberados por la fusión de los primeros con la membrana plasmática. La formación de los MVEs implica la segregación del contenido de los futuros exosomas sobre una región de la membrana endosomal y la posterior invaginación de vesículas de tamaño variable hacia el lumen de un endosoma temprano. Estos mecanismos sugieren una gran complejidad en la composición de los MVEs, incluyendo las membranas y las moléculas citoplasmáticas. (Albuquerque, et al. 2008; Rodrigues, et al. 2008; Vallejo, et al. 2011; Wolf, et al. 2014; Gil-Bona, et al. 2015; Vargas, et al. 2015; Ferguson, et al. 2016; Nguyen, et al. 2016; Ratajczak, et al. 2016; Van Dongen, et al. 2016; Yuan, et al. 2016). A diferencia de los MVEs destinados a la degradación en el lisosoma, aquellos que se fusionarán con la membrana plasmática presentan una composición lipídica diferente, enriquecida en ergosterol. Sin embargo, existen evidencias de que la misma maquinaria involucrada en la formación de EM que irán hacia el lisosoma, también participa en la formación de los EM destinados a exocitosis. Esta maquinaria se encuentra muy conservada, y se organiza en cuatro complejos multiproteicos denominados complejos clasificadores endosomales responsables del transporte. Se ha visto que la depleción de ciertos miembros de estos complejos lleva a una disminución de la formación de exosomas en distintos tipos celulares, con lo que se los ha asociado a la formación de los MVEs. Mecanismos independientes a estos procesos de regulación también han sido propuestos para la formación de EM en ciertos tipos celulares. Uno de estos mecanismos involucra la enzima esfingomielinasa, encargada de la producción de ceramida, encontrándose esta en grandes cantidades en los exosomas. Asimismo, las tetraspaninas, han sido asociadas con la formación de EM en células de mamíferos, encontrándose también elevadas cantidades en los mismos (Raposo, et al. 2013; Shifrin, et al. 2013). Todavía no se cuenta con una descripción de los mecanismos completos de generación de las EM.

1.6.2. Composición de los exosomas

La composición de las MVs es indicativa tanto de su origen (endosomal o a partir de la membrana plasmática) como del tipo celular del que fueron secretadas, así como también puede dar información de su posible papel fisiológico o sus células diana (Van Doormaal, et al. 2009). Los exosomas típicamente presentan proteínas asociadas a endosomas, proteínas que se concentran tanto en endosomas como en la membrana plasmática. El mecanismo por el cual proteínas citosólicas son específicamente incluidas en los exosomas aún no se ha dilucidado, pero se cree que podría involucrar la interacción de proteínas de la membrana exosomal con chaperonas celulares, encargadas de la selección de las mismas.

Estudios proteómicos de microvesículas extracelulares (MVE) de diferentes hongos muestran la presencia de un considerable número de enzimas asociadas a rutas metabólicas, algunas de estas enzimas son características de especies determinadas. Mientras tanto otras proteínas realizan infinidad de funciones biológicas primarias y secundarias (Jeffery, 2014). Las más relevantes detectadas son enzimas necesarias para la glicolisis, fermentación, gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato (Nimrichter, et al. 2016). En este grupo de moléculas se sitúan gliceraldehido-3-fosfato (GAPDH), enolasa y transaldolasa que han sido detectadas mediante estudios de proteómica en *C. neoformans*, *C. albicans*, *P. brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. De acuerdo con Gozalbo, D. (1998) Gapdh, es una proteína citoplasmática, detectada también en la capa más externa de *C. albicans*, que favorece la adhesión a laminina y fibronectina. Aparentemente esta proteína tiene un bajo carácter inmunógeno, ya que inmunizar a ratones con Gapdh o exponer a los mismos frente a anticuerpos contra Gapdh no impiden las candidiasis diseminadas (Gil, et al. 2006; Saputo. 2012). La enolasa es otro ejemplo de proteína inmunógena, citoplasmática que participa en la interacción hongo-hospedador. Este antígeno es detectado en grandes cantidades en el sobrenadante de *C. albicans* (Sundstrom, et al. 1994). Además, la enolasa es una de las moléculas más abundantes en la pared celular de dicha levadura (Angiolella, et al. 1996). De hecho, se considera el principal antígeno que activa el sistema inmune humoral, tanto en ratones como en humanos en candidiasis diseminadas (Sundstrom, et al. 1994; Pitarch, et al. 2008; Pontón. 2009). Autores como Li y colaboradores (2013), sugieren que presentar anticuerpos de *C. albicans* tipo IgG frente a enolasa y aldolasa en combinación podría servir para diagnosticar candidiasis invasiva, es decir podrían servir como marcadores. En comparación con Gapdh, los anticuerpos antienolasa son, al menos, parcialmente protectores en candidiasis en ratones (van Deventer, et al. 1996; Cantona, et al. 2014; Montagnoli, et al. 2004; Li, et al. 2011). Además de su papel en

la ruta glicolítica y sus propiedades inmunógenas, la enolasa participa en la adhesión a la célula hospedadora. Por ejemplo, dichas enzimas en *C. albicans* reconocen plasmina y plasminógeno (Jong, et al. 2003). Las células ligadas a plasmina inician de un modo más eficaz la fibrinólisis y pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Igualmente, la enolasa puede actuar en la colonización intestinal, de este modo la adhesión de las levaduras al epitelio intestinal puede ser inhibida mediante un pretratamiento con anticuerpos anti-enolasa (Silva, et al. 2011).

La relevancia de la enolasa durante la infección ha sido confirmada ya que dicha enzima ha sido recuperada de cultivos de *P. brasiliensis* en tejidos de ratones (Nogueira, et al. 2010). Adicionalmente la enolasa ha sido detectada en otras especies de forma reciente en su superficie celular, tales como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, y *C. glabrata*. La enolasa de *A. fumigatus* se une al plasminógeno libre y así activan el receptor de plasminogeno, concretamente la uroquinasa (uPA), facilitando la fibrinólisis y permitiendo la infección fúngica diseminada (Funk, et al. 2016).

Además, en las MVEs de *C. albicans* se han detectado 6 enzimas, Pgmt1, alcohol deshidrogenasa, Gapdh, fosfoglicerato quinasa y aldolasa entre otras. (Gil-Bona, et al. 2015; Vargas, et al. 2015).

De modo similar a lo que ocurre con las enzimas glicolíticas, Hsp70 es transportado por las MVEs de los hongos a través de la pared celular (Albuquerque, et al. 2008; Rodrigues, et al. 2008; Vallejo, et al. 2011; Wolf, et al. 2014; Gil-Bona, et al. 2015; Vargas, et al. 2015). Su participación durante la interacción con la célula huésped ha sido investigada en *C. neoformans* y *C. albicans* (Silveira, et al. 2013). La Hsp70 se localizaba en la superficie fúngica, concretamente en la pared o cápsula.

La Hsp70 recombinante de *C. neoformans* es eficazmente internalizado por macrófagos, este hecho produce una disminución en la producción de óxido nítrico por los mismos y una disminución de la polarización de ambos hechos facilitan la integridad de las MVEs de *C. neoformans* en la célula hospedadora (Silveira, et al. 2013).

C. albicans expresa dos proteínas del grupo de las Hsp70, como son la Ssa1 y Ssa2. Ssa2 ha sido localizada en la membrana plasmática y pared celular tanto de las levaduras como de las hifas (López-Ribot, et al. 1996). Por otra parte, Ssa1 es necesario *in vitro* para la endocitosis de las células endoteliales y epiteliales. La presencia de Ssa1 en *C. albicans* incrementa su virulencia ya que facilita la candidiasis orofaríngea y la invasión hematológica (Sun, et al. 2010).

En las MVEs se han detectado también hidrolasas tales como; glicosilasas, lipasas y proteasas estas enzimas podrían permitir la liberación de las MVEs durante situaciones de estrés celular (Nimrichter, et al. 2016, Sugiyama, et al. 2016).

En cuanto a su composición lipídica, los exosomas se ven enriquecidos (en relación a la membrana plasmática) en esteroides, esfingomielina y derivados de la ceramida. Finalmente, se ha visto que los exosomas presentan una composición glucídica diferencial con respecto a las células de las que se originaron. Los ácidos grasos en los exosomas son en su mayoría saturados o monoinsaturados (Batista, et al. 2011).

En la figura 1.16 observamos los diferentes componentes de la pared celular de los hongos y sus principales polisacáridos y proteínas. En dicha imagen podemos observar MVEs como estructuras de doble membrana. Dentro de los polisacáridos estructurales tenemos la quitina (color verde), próxima a la membrana plasmática, β -1,3 (azul) y glucanos β -1,6 (amarillo). También se ilustran los oligómeros de quitina (estructuras verdes distribuidas a lo largo de la pared celular), mananos y manoproteínas (rojo oscuro y difuso). Las MVEs, al atravesar la pared celular del hongo remodelan su estructura mediante la hidrólisis de polisacáridos y manoproteínas y al mismo tiempo, esta lisis sirve para exponer componentes internos al exterior.

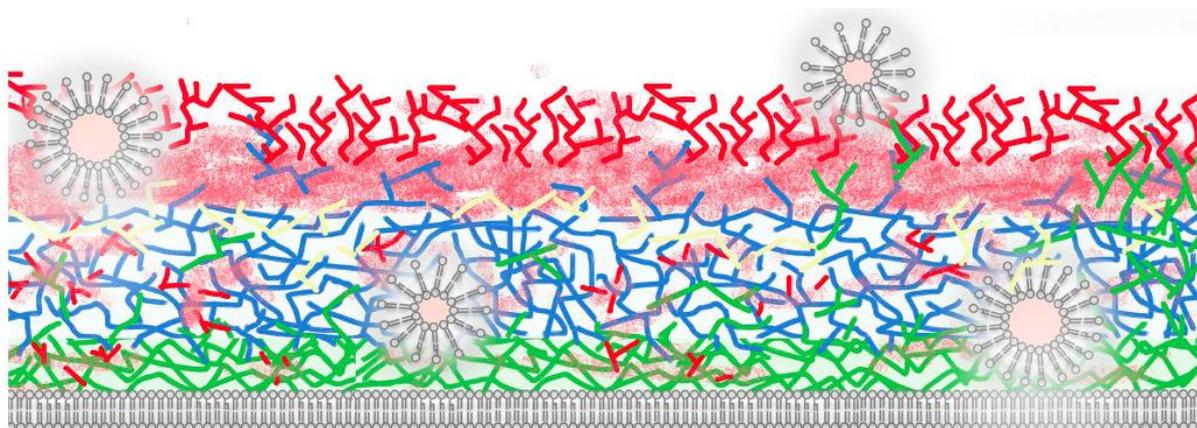


Figura 1.16. Ilustración esquemática de la pared celular de los hongos e hipótesis de secreción de MVEs (Nimrichter, et al. 2016).

Un aspecto de los exosomas que resulta de vital interés es que estos contienen RNA mensajero y pequeños RNAs que son funcionales en la célula diana (Valadi, et al. 2007, Bellingham, et al. 2012). Adicionalmente, otros pequeños RNAs no codificantes, entre los que

se encuentran aquellos derivados de RNA de transferencia (descritos en detalle en secciones posteriores) también se han detectado dentro de MVs.

El mecanismo por el cual tiene lugar la incorporación selectiva de moléculas de RNA a las MVs aún no se conoce completamente.

Los diferentes componentes de un exosoma se muestran en la figura 1.17.

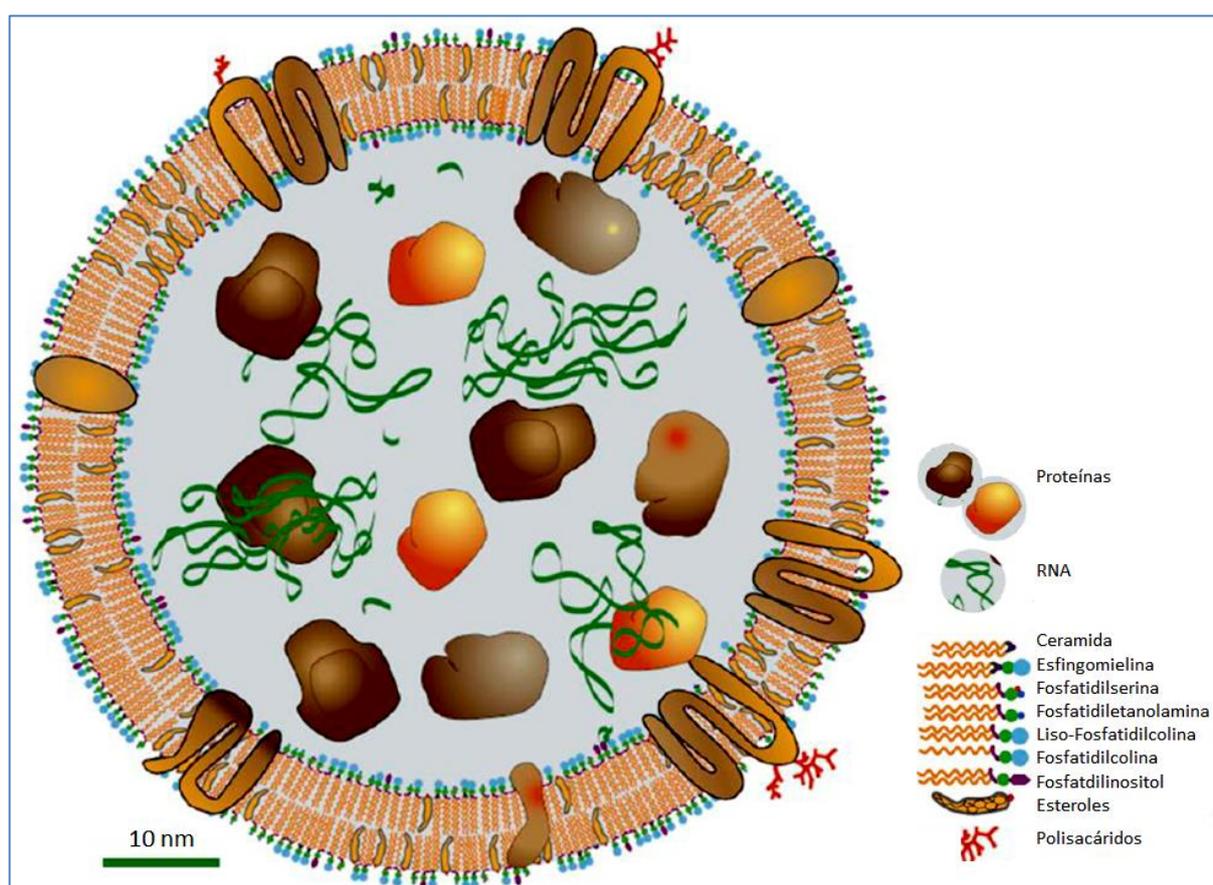


Figura 1.17. Representación de una MV. Esquema de una MV (en este caso un exosoma), donde se muestra la composición lipídica de la membrana y el contenido proteico y de RNA, manteniendo las relaciones de tamaño. (Adaptado de Vlassov, et al. 2012).

1.7. EXOSOMAS EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Los exosomas o microvesículas pueden entenderse como transportadores multifunción, es decir, son capaces de establecer comunicaciones entre células y a la vez permiten el intercambio de material genético, procurando de este modo una protección frente a factores tanto externos como internos. (Nieuwland, et al. 2010)

La producción de MVS se ha observado en organismos procariotas como bacterias y arqueobacterias y en eucariotas como hongos y protozoos. La liberación de las mismas les permite en primer lugar responder a señales ambientales, en segundo lugar, secretar al exterior componentes propios entre ellos factores de virulencia y en el caso de los microorganismos patógenos les permite interactuar con la célula hospedadora como se muestra en la figura 1.18. Estas funciones se consideran cruciales para la vida microbiana. (Deatherage, et al. 2012).

Dentro de los organismos eucariotas como por ejemplo los parásitos, la liberación de exosomas es un proceso ampliamente conocido, ya que tiene lugar a lo largo de su ciclo vital y puede ser percibido por la célula hospedadora teniendo efectos sobre esta. (Deolindo, et al. 2013; Inal, et al. 2013; Silverman, et al. 2011).

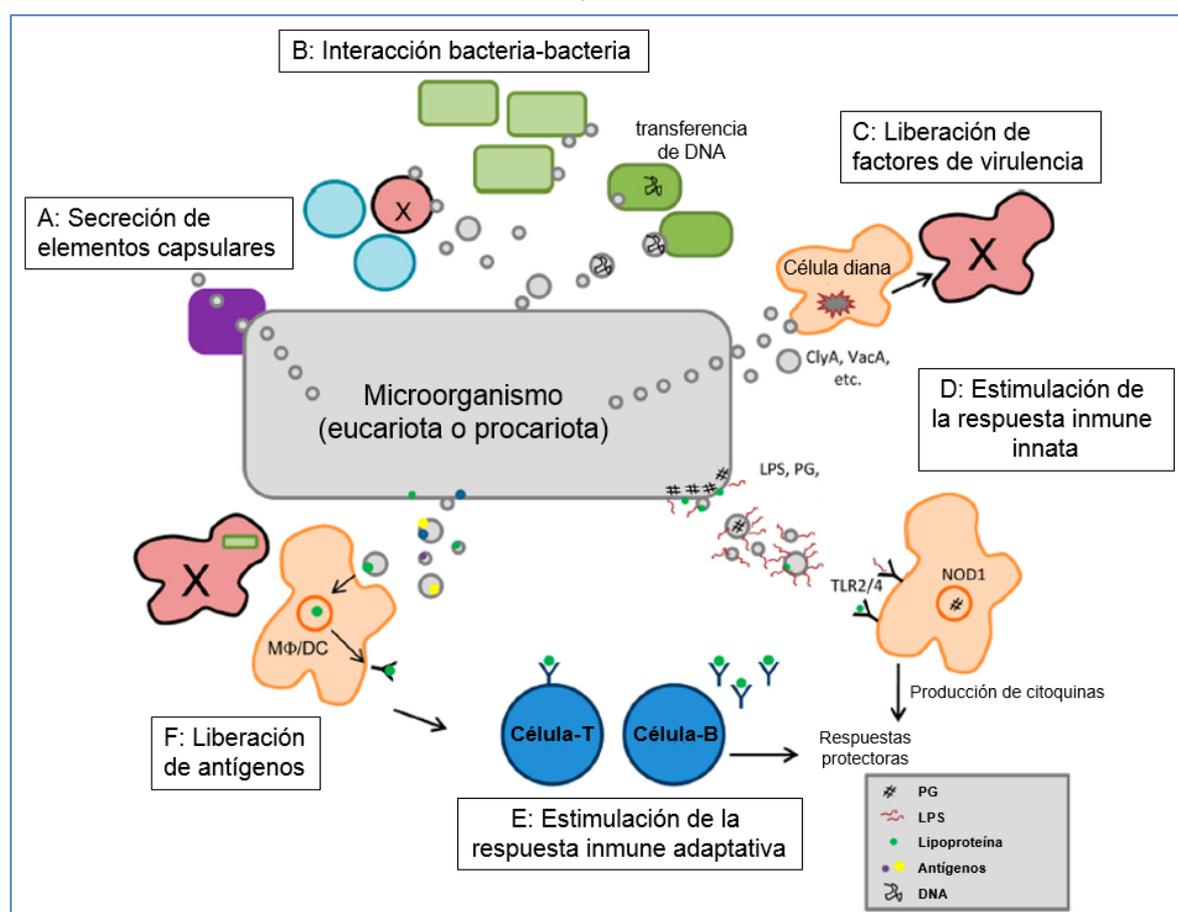


Figura 1.18. Esquema de los posibles efectos y funciones de la liberación de MVs por microorganismos. A: En bacterias, las MVs pueden participar en la secreción de polisacáridos capsulares. B: las MVs también pueden ser utilizadas como medio de comunicación en Bacteria y Archea, a través del transporte de antimicrobianos, material genético y moléculas involucradas en procesos de “*quorum sensing*”. C: en microorganismos patógenos, las MVs pueden ser el vehículo de factores de virulencia. D: asimismo, pueden transportar moléculas tales como lipopolisacárido (LPS), lipoproteína o peptidoglicanos (PG) que permitan la activación de la respuesta inmune innata. E: las MVs pueden dar lugar a la activación de la respuesta inmune adaptativa, a través de la activación de la respuesta innata o gracias al transporte de moléculas antigénicas que serán recibidas por células presentadoras de antígenos (F) (Modificado de Deatherage, et al. 2012).

Existen múltiples ejemplos de microorganismos liberadores de MVS que interaccionan con el hospedador. Trematodos, como *Echinostoma caproni* y *Fasciola hepatica* y protozoos hemotisulares como *Trypanosoma Cruzi*, liberan MVs que son internalizadas por células del epitelio intestinal (Marcilla, et al. 2012). El agente causante de la meningitis criptocócica, *C. neoformans*, produce y libera MVs que contienen su principal factor de virulencia (Rodrigues, et al. 2008), permitiendo su acumulación en el lugar de infección y facilitándoles el paso a través de la barrera hematoencefálica (Huang, et al. 2012).

En cambio, los exosomas producidos por *Leishmania donovani*, contienen reconocidos factores de virulencia capaces de afectar vías reguladoras y de señalización en la célula hospedadora. Además, son internalizados por macrófagos (Silverman, et al. 2010; Silverman, et al. 2011; Marcilla, et al. 2012; Rodrigues, et al. 2008; Huang, 2012).

También se ha demostrado que los exosomas tienen, además, capacidad inmunomoduladora (Silverman, et al. 2010).

1.8. INTERACCIÓN DE LAS MICROVESÍCULAS CON LAS CÉLULAS DIANA

Las funciones de los MVs son múltiples, realizando tanto procesos fisiológicos como patológicos. Una de las funciones inicialmente descritas de las MVs fue la de presentación de antígenos, para la estimulación de la respuesta inmune. Las células del sistema inmunitario liberan MVs en respuesta a señales pro-inflamatorias, y células infectadas también producen MVs con el fin de provocar una respuesta protectora (Raposo, et al. 2013; Shifrin, et al. 2013).

Las células del sistema nervioso producen MVs, que pueden ser importantes para el crecimiento, la angiogénesis y la formación de mielina. Asimismo, están asociadas con enfermedades del sistema nervioso central, dado que se ha reportado que transportan proteínas priónicas y péptidos-amiloides (Raposo, et al. 2013; Shifrin, et al. 2013).

A la vez también participan en procesos patológicos, particularmente neoplásicos, donde se estima que tienen un papel fundamental en la transformación maligna, la progresión tumoral y metástasis, dado su función en la regulación de apoptosis, la respuesta inmune, la inflamación, la angiogénesis y la coagulación (Van Doormaal, et al. 2009; Batista, et al. 2011; Valadi, et al. 2007; Bellingham, et al. 2012; Nolte-'t Hoen, et al. 2012; Gibbings, et al. 2009; Wysoczynski, et al. 2009).

Las funciones descritas para las MVs se basan en la interacción que estas tienen con las células receptoras y de los efectos que ejercen sobre ellas. Tras la interacción inicial, las MVs pueden mantenerse asociadas de forma estable en la superficie celular, fusionarse con la célula o ingresar mediante algún tipo de endocitosis, permitiendo así la liberación de su contenido al interior celular.

La información disponible para procariotas y eucariotas inferiores es, en comparación, mucho más limitada, pero aun así es suficiente para sustentar su relevancia, especialmente en el caso de microorganismos patógenos y su interacción con el hospedador.

En primer lugar, se cree que los exosomas son un medio de comunicación intercelular y de transmisión de macromoléculas entre las células. En segundo lugar, se les han atribuido funciones de propagación de proteínas, lípidos, RNAm, miRNA, DNA (Villarroya-Beltri, 2013; Fabian, et al. 2012). Y, en tercer lugar, se les ha propuesto como vectores útiles para las drogas, porque están compuestos de membranas celulares, en lugar de polímeros sintéticos, y como tal son mejor tolerados por el hospedador (figura 1.19).

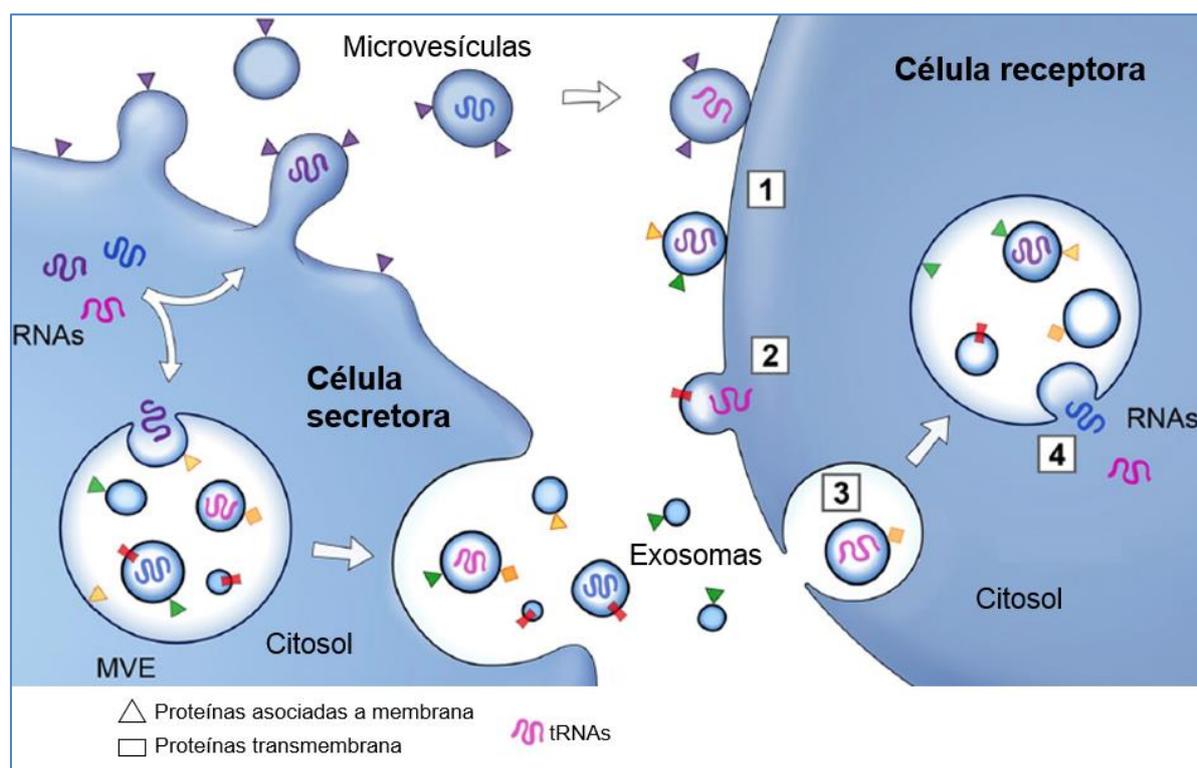


Figura 1.19. Esquema de la transferencia de RNA y Proteínas mediante Vesículas Extracelulares: las MVE se fusionan con la membrana plasmática para liberar los exosomas en el medio extracelular. MVs y exosomas pueden contactar con la membrana plasmática de una célula diana (1); pueden fundirse directamente con la membrana plasmática (2); ser endocitados (3); las vesículas endocitadas pueden fusionarse con otros orgánulos membranosos en el citoplasma (4). Todas vías conducen a la liberación de proteínas y RNAs en la membrana o citosol de la célula diana (modificado de Raposo, et al. 2013).

1.9. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La población en riesgo de IFI en pacientes hospitalizados es cada vez mayor debido a todos los factores de riesgo que predisponen a su causa. Aunque *Candida spp.* continúa siendo la causa mayoritaria de las IFI en nuestro medio, se aíslan con más frecuencia otros agentes causales, éstos con mayores tasas de resistencia a los antifúngicos habituales y elevada mortalidad. Ante el diagnóstico y tratamiento de las CI se debe tener en cuenta la distribución de las especies causales ya que, es propia de cada país, hospital y unidad. Pero a pesar del uso de nuevos antifúngicos en los últimos años la etiología de las candidemias no ha variado, la tasa de resistencias a azoles y candinas sigue siendo baja y la mortalidad no ha descendido. Todos estos motivos muestran la relevancia actual de dicha especie en el entorno socio-sanitario, mostrando a *Candida spp.* como la causa más común de infecciones fúngicas invasivas a nivel mundial (70-90% de todas las micosis invasivas). Por todo ello es de vital importancia prevenir la aparición de las mismas en pacientes susceptibles, además de realizar un diagnóstico rápido, bien de forma directa (detectando la presencia de las mismas, mostrando la presencia de componentes de pared o de sustancias que puedan eliminar al medio externo) o indirecta mediante serología.

El objetivo de esta Tesis es demostrar la existencia de vesículas extracelulares en *Candida albicans*, que podrían servir como medios de diagnóstico de CI o bien como herramientas terapéuticas. Además de estudiar la capacidad de respuesta del hospedador frente a ellas, sintetizando anticuerpos frente a dichas vesículas extracelulares (método diagnóstico serológico directo). Para ello debemos:

- Demostrar la existencia de vesículas extracelulares en el microorganismo objeto de estudio.
- Obtener vesículas extracelulares puras.
- Estudiar su composición mediante el empleo de anticuerpos y técnicas proteómicas.
- Demostrar la presencia o no, de miRNAs.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. LEVADURAS EMPLEADAS

Las levaduras empleadas en el presente trabajo han sido en todos los casos del género *Candida*. Las cepas de *C. albicans* utilizadas, se detallan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Cepas de *C. albicans* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Parental	Referencia
SC5314	Silvestre	---	Gillum <i>et al.</i> , 1984
$\Delta pir1$	$pir1\Delta::FRT/pir1\Delta::FRT$	SC5314	Valentín E., resultados no publicados
$\Delta glx3$	$glx3\Delta::FRT/glx3\Delta::FRT$	SC5314	Blanes Feijoo, M.R. (2012)

Se han utilizado, además, levaduras de *C. parapsilosis* (ATCC 22019), y *C. krusei* (ATCC 6258).

2.2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo, se prepararon en agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 min. A los medios sólidos se les agregó un 2% de agar.

Los cultivos en medio líquido, se realizaron en matraces de tipo Erlenmeyer, con un volumen de medio no superior a un cuarto del volumen total del matraz. La incubación se realizó en un agitador orbital (Orbi-Safe, SANYO), a 150 rpm, siendo la temperatura de 37°C o 28°C para *C. albicans* (SC5314), *C. parapsilosis*, y *C. krusei* y exclusivamente de 28°C para las cepas de los mutantes $\Delta pir1$ y $\Delta glx3$, que son termosensibles.

La composición de los medios de cultivo se detalla a continuación:

MEDIO YPD (Yeast extract Peptone Dextrose):

Es un medio rico que contiene todas las sales minerales y vitaminas necesarias para el crecimiento de levaduras, siendo su composición porcentual:

- Peptona 2%
- Extracto de levadura 1%
- Dextrosa 2%

Las cepas se mantuvieron mediante resiembras periódicas en agar YPD, usado de manera rutinaria en el laboratorio microbiológico, tanto en forma sólida, en placa, como líquida, en tubo. Para la conservación en largos periodos de tiempo, se procedió al glicerinado de las mismas (15% de glicerol y 85% de cultivo), almacenando a -80°C.

2.3. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE EXOSOMAS

Para el aislamiento de exosomas de células planctónicas de diferentes especies del género *Candida*, se ha modificado el protocolo descrito por Rodrigues, et al. (2007).

2.3.1. Obtención de pre-cultivos

Las colonias de las diferentes especies y/o mutantes de *Candida* anteriormente citados, se crecieron en agar YPD+Cloranfenicol (35 µg/mL), se resuspendieron en 5 mL de medio YPD líquido y se incubaron en agitación a 150 rpm a 37°C (o 28°C, según sus necesidades de crecimiento), durante 24 h, para obtener un pre-cultivo con el que realizar la dilución y posterior inoculación en medio YPD líquido de mayor volumen. A una D.O._{600nm} entre 0,1 y 0,3 unidades D.O._{600nm}.

2.3.2. Obtención de los cultivos

Para cada una de las especies y/o mutantes de *Candida*, se prepararon tres matraces Erlenmeyer conteniendo cada uno de ellos 1 L de medio YPD líquido en los que se inocularon 1 mL de pre-cultivo, incubándose en agitación orbital (150 rpm.) a 37°C ó 28°C, según sus requerimientos, durante 48 h.

2.3.3. Obtención de sobrenadantes puros, exentos de levaduras

Para eliminar todos los componentes celulares se procedió en primer lugar a centrifugar los cultivos obtenidos a 4.000xg durante 15 min. El sobrenadante así obtenido fue sometido posteriormente a una filtración forzada mediante vacío (Millipore®), empleando filtros de membrana estériles, de nitrato de celulosa, de tamaño de poro de 0.45 µm (Sartorius®). El sedimento obtenido se conservó para su posible utilización posterior en otros estudios.

2.3.4. Concentración de los filtrados

La concentración de los filtrados se realizó mediante un sistema de diafiltración Vivaflow® 50R de Sartorius, formado por diferentes membranas de celulosa (Hydrosart®) que permite la filtración y recirculación de muestras con volúmenes de hasta 5 L y que está especialmente diseñado para la concentración de nanopartículas, que resultó adecuado para la concentración de vesículas extracelulares. Se utilizó una bomba peristáltica auxiliar (MasterFlex® L/S™ ColePalmer®), que proporcionaba un flujo de entrada en el casete Vivaflow de 200 a 400 mL/min y una presión de salida, de 2.5 bar, lo que permitió la recirculación de un volumen aproximado de cultivo filtrado de 3 L en un tiempo total de unas 2 h, hasta obtener un volumen final 50 mL (60 veces inferior al inicial), en que se habrán concentrado los exosomas.

Los 50 mL de volumen final obtenidos, se sometieron a una posterior filtración a través de filtros de membrana estériles, de nitrato de celulosa, de tamaño de poro de 0.20 µm (Sartorius®), para asegurar la esterilidad y ausencia de elementos celulares en la muestra.

Para la limpieza del sistema, tanto el casete, como las válvulas y conexiones, se pasan 250 mL de agua desionizada, recirculando posteriormente 250 mL de una solución 0.5 M de NaOH y lavando nuevamente con agua desionizada; finalmente se lava con una solución de etanol 10% en agua desionizada, lo que permite mantener la membrana Vivaflow a 4°C.

2.3.5. Ultracentrifugación

Las muestras concentradas y sometidas a filtración, fueron ultracentrifugadas a 200.000xg durante 70 min a 4°C, utilizando una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima®MAX. Decantando el sobrenadante, el sedimento obtenido, se resuspendió en tampón PBS (Phosphate Buffer Saline: Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ 0.01 M; NaCl 0.138 M; KCl 0.0027 M) pH 7.4, hasta un volumen final de 1 mL. Las suspensiones obtenidas, conteniendo los exosomas, se repartieron en tubos eppendorf en alícuotas de 100 µL y se conservaron congeladas a -30°C. Una de las alícuotas se procesó inmediatamente y sin congelación, adicionándole 400 µL de fijador Karnovsky (Paraformaldehído 2.5% y Glutaraldehído 0.5%, en tampón PBS), para su procesamiento por microscopía electrónica de transmisión (Figura 2.1).

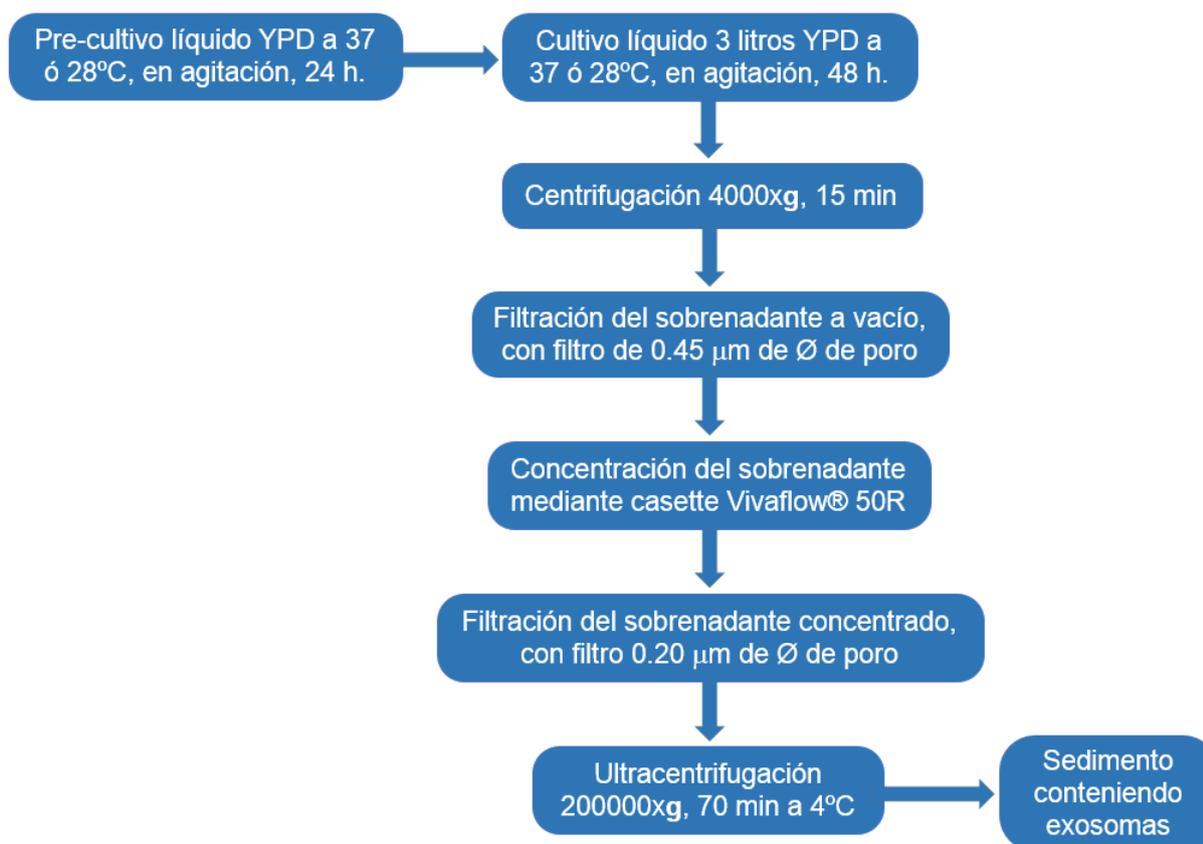


Figura 2.1. Esquema general de la producción de exosomas.

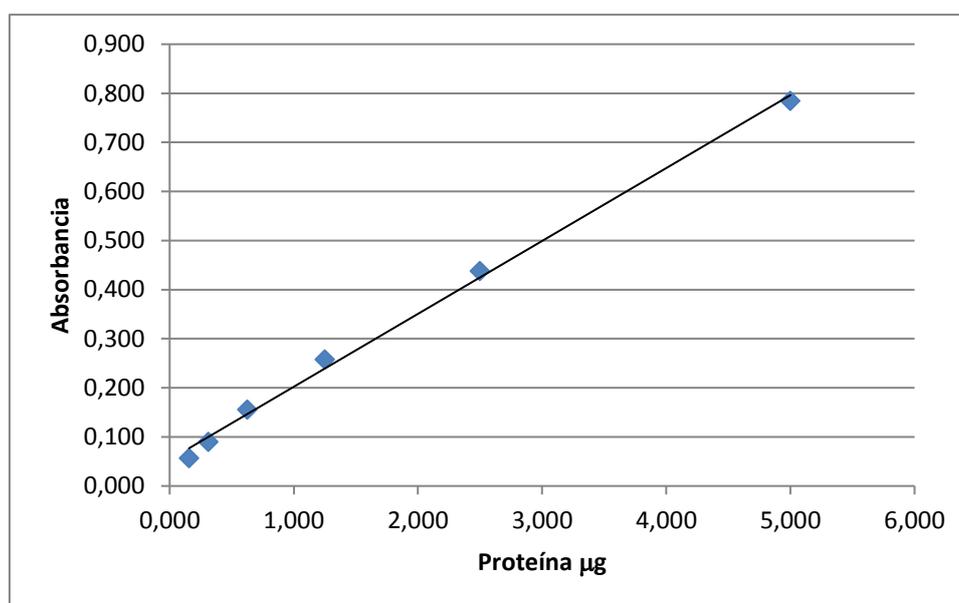
2.4. DETERMINACIONES REALIZADAS EN EXOSOMAS

2.4.1. Determinación de proteína total

La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo suministrado por Bio-Rad®. Se dispensaron 5 µL de cada una de las muestras y/o disoluciones patrón, en pocillos de placas de microtitulación, a los que se añadieron 250 µL del reactivo Bradford listo para su uso. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, se leyeron las D.O._{595nm}. La concentración de proteína total de las muestras se calculó, interpolando sus valores de absorbancia, en la recta patrón construida a partir de diluciones de cantidades conocidas de BSA, comprendidas entre 0 y 5.0 µg de proteína. Todas las medidas se realizaron por duplicado (Tabla 2.2 y Figura 2.2).

Tabla 2.2. Valores de Absorbancia obtenidos a 595 nm, para las diluciones de proteína de la recta patrón.

	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Proteína (µg)	0.000	0.156	0.313	0.625	1.250	2.500	5.000
Absorbancia (595 nm)	0.000	0.057	0.090	0.156	0.258	0.438	0.785



$$y = 0.1485x + 0.0537 \quad R^2 = 0.9968$$

Figura 2.2. Recta patrón obtenida para la valoración de proteína, ecuación y coeficiente de regresión.

2.4.2. Transferencia y detección de proteínas en soporte de PVDF (Western blot)

Para comprobar la pureza de las preparaciones obtenidas, se procedió a realizar la separación electroforética de proteínas y posterior Western blot, empleando anticuerpos marcadores de vesículas extracelulares y marcadores de fracción citosólica que reconocen componentes fibrilares de citoesqueleto, ausentes en los exosomas, para descartar contaminación celular.

2.4.2.1. Separación electroforética de proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida, según la técnica descrita por Laemmli (1970), de electroforesis vertical entre placas de vidrio.

Para ello se emplearon geles de poliácridamida separadores y de empaquetamiento con la composición que aparece en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Composición de los geles de poliácridamida empleados en electroforesis.

	Gel de separación (10% Acrilamida)	Gel de empaquetamiento (3% Acrilamida)
H ₂ O destilada	3.99 mL	3.05 mL
Acrilamida/Bis Acrilamida (30%)	3.30 mL	0.65 mL
Tampón de separación ⁽¹⁾	2.60 mL	--
Tampón de empaquetamiento ⁽²⁾	--	1.25 mL
Amonio Persulfato (APS) 10%	100 µL	30 µL
TEMED (<i>N,N,N,N'</i> -tetrametiletano-1,2-diamina)	10 µL	5 µL

(1) Tris-HCl 1.5 M, SDS 2 g. (pH=8.8)

(2) Tris-HCl 0.5 M, SDS 2 g. (pH=6.8)

A las muestras a analizar, con valores de proteína total comprendidos entre 0.166 y 0.250 µg/µL se les adicionaron volúmenes de una solución solubilizadora de Laemmli que contenía glicerol al 40 %, SDS al 8 %, β-mercaptoetanol al 20 % y azul de bromofenol al 0.001 %, en tampón Tris HCl 0.25 mM, de pH 6.8, actuando como tampón de carga, siendo la relación entre ambas 6:1, en volumen. Antes de ser cargadas en el gel se desnaturalizaron por calentamiento a 90°C durante 10 min.

Las muestras se empaquetaron a un voltaje constante de 120 V, realizándose el resto de la separación electroforética a 180 V. Se utilizó PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas®) (una mezcla de 9 proteínas de pesos moleculares aparentes entre 10 y 250 KDa), como patrón de peso molecular.

2.4.2.2. Transferencia a membranas PVDF

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas y retenidas en membranas PVDF (difluoruro de polivinilideno microporoso) de 0.2 μm de tamaño de poro. Para equilibrar dicha membrana se sumergió sucesivamente en metanol, durante 2 seg, H₂O destilada durante 2 min y tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 y metanol al 20%) durante 2 min. Se empleó el sistema de transferencia de proteínas en semiseco de Cleaver Scientific, se dispusieron 6 papeles de filtro, previamente sumergidos en el mismo tampón de transferencia, sobre los que se depositó la membrana PVDF, el gel y otros 6 papeles de filtro. La cubeta se conectó a un alimentador, suministrando una corriente continua con un voltaje que proporcionase una intensidad de corriente comprendida entre 250 y 500 mA, durante 1 h. 30 min.

2.4.2.3. Inmunodetección de proteínas en soporte de PVDF

Las proteínas transferidas a la membrana PVDF se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios específicos para realizar su identificación, con arreglo al siguiente procedimiento:

- **Bloqueo de la membrana:** el bloqueo de las membranas, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo, se realizó con leche desnatada en polvo al 5 % en tampón PBS, adicionado de un 0.1 % de Tween 20, a temperatura ambiente, durante 1 h, en agitación suave. Finalizada esta etapa se realizaron tres lavados de 5 min. cada uno, con tampón PBS-Tween.
- **Incubación con el anticuerpo primario:** las membranas con las proteínas fijadas, fueron incubadas con el anticuerpo adecuado. La dilución del anticuerpo se realizó en tampón PBS-Tween, conteniendo además leche en polvo desnatada al 3 %. Los órdenes de dilución fueron variables entre 1:1000 y 1:5000 dependiendo del tipo de anticuerpo, siendo la incubación, en todos los casos, durante toda la noche, en agitación suave, a 4°C (Tabla 2.4)

Tabla 2.4. Ac-primario y Ac-secundarios empleados en Western blot.

Antígeno	Ac-PRIMARIO ^a	Ac-SECUNDARIO
Calnexina	Ac anti-Calnexina (System Biosciences)	Ac de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich)
CD9	Ac anti-CD9 (System Biosciences)	Ac de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich)
CD63	Ac anti-CD63 (System Biosciences)	Ac de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich)
CD81	Ac anti-CD81 (System Biosciences)	Ac de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich)
Enolasa	Ac anti-Enolasa (System Biosciences)	Ac de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich)
Hsp70	Ac anti-Hsp70 (System Biosciences)	Ac de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich)
Pared Celular	Ac anti-Pared Celular (Nuestro grupo)	Ac de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich)

a) Anticuerpos obtenidos por inoculación a conejo.

- **Incubación con el anticuerpo secundario:** transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de 5 min. cada uno, con tampón PBS-Tween a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la incubación con un segundo anticuerpo, acoplado a peroxidasa, cuyo tipo y especie vienen condicionados por el anticuerpo primario seleccionado. La dilución fue en todos los casos, 1:20000 en tampón PBS-Tween, conteniendo además leche en polvo desnatada al 3 %, realizándose la incubación a temperatura ambiente, durante 1 h en agitación suave.
- **Detección por quimioluminiscencia:** finalizada la incubación con el segundo anticuerpo, se realizaron tres lavados de 5 min. cada uno, con tampón PBS-Tween a temperatura ambiente y un lavado adicional con tampón PBS antes de proceder al revelado o detección. El revelado se realizó por quimioluminiscencia, empleando el kit AmershamTM ECLTM Select Western Blotting Detection Reagent de GE Healthcare®, basada en la oxidación del luminol por acción de la peroxidasa, en presencia de un potenciador (fenol), capaz de aumentar hasta en 1000 veces la luz emitida

por el luminol oxidado. La emisión de luz a 425 nm puede ser captada por un sensor digital utilizando una cámara CCD y detectar las proteínas a las que se han unido los anticuerpos conjugados con peroxidasa. Eliminando el exceso de tampón PBS, se colocó la membrana entre dos hojas transparentes de acetato de celulosa, depositando sobre ella un volumen de solución reveladora suficiente para cubrir completamente toda su superficie e incubando durante 2 min al abrigo de la luz, antes de proceder a su lectura, eliminando, si fuese necesario, el exceso de reactivo revelador. La solución reveladora se preparó extemporáneamente al mezclar en proporción 1:1 los dos reactivos suministrados en el kit comercial antes citado.

2.4.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET)

2.4.3.1. Preparación de muestras incluidas en resinas LR-White

Las muestras con el sedimento resuspendido en PBS, conteniendo la fracción de exosomas y fijada con formaldehído/glutaraldehído, fueron incubadas a continuación con un 2% de tetróxido de osmio y posteriormente deshidratadas mediante sucesivos pases por concentraciones crecientes de etanol, para realizar la inclusión en resinas LR-White a 60°C durante 24-48 h. Los cortes de 50 a 100 nm, obtenidos con ultramicrotomo, se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y se observaron en un microscopio electrónico JEM 1010 TEM (JEOL) con 100 kV y cámara digital AMT RX80 (8 Mpx). La preparación de las muestras se realizó en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universitat de Valencia.

2.4.3.2. Preparación de muestras tratadas con Concanavalina A-ferritina

La Concanavalina A es una lectina que se utiliza para la detección de manoproteínas. La muestra con el sedimento conteniendo la fracción de exosomas se resuspendió en una solución compuesta por, 0.6 M KCl, 0.5 M NaCl y 2 mM en MnCl₂, MgCl₂ y CaCl₂ (solución A), añadiendo posteriormente Concanavalina A-ferritina, hasta una concentración final de 0.5 mg/mL e incubando durante 30 min a temperatura ambiente. La muestra se lavó dos veces con la solución A, mediante ultracentrifugación a 200.000xg durante 70 min a 4°C, en ambas ocasiones. El sedimento obtenido se resuspendió con tampón PBS pH 7.4 y se fijó con formaldehído/glutaraldehído para su

inclusión en resinas y posterior procesamiento para observación por microscopía electrónica de transmisión.

2.4.4. Análisis de las muestras mediante técnicas NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)

La técnica NTA es un método de visualización directa y análisis en tiempo real

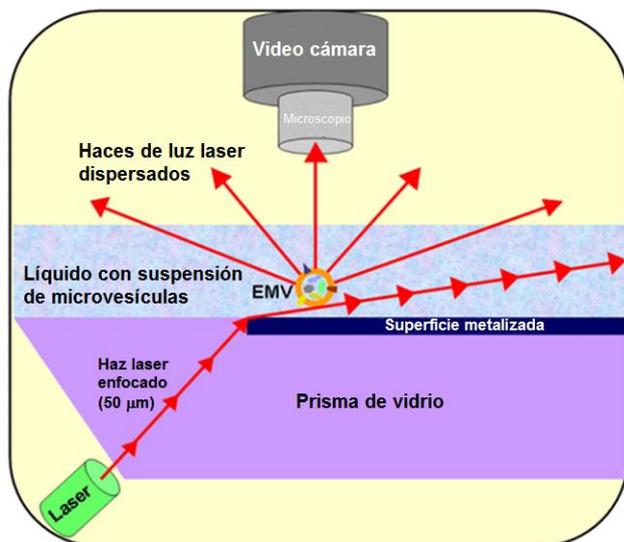


Figura 2.3. Esquema instrumental de la tecnología NTA (Nano Sight®. Minton Park. London. United Kingdom).

de nanopartículas en líquidos. Está basada en una técnica de microscopía con una fuente laser, que permite analizar el movimiento Browniano de las nanopartículas, de modo que cada partícula, puede ser visualizada y su trayectoria analizada, por separado, pudiendo medir el tamaño de cada una de ellas y obtener una distribución del tamaño de las mismas, mediante las imágenes

captadas por un sensor CMOS (*complementary metal-oxide-*

semiconductor) de alta sensibilidad y posteriormente procesadas por un programa que identifica el centro y trayectoria de cada partícula en cada fotograma, a partir de la dispersión de luz que producen (Fig. 2.3). Los resultados son similares a los obtenidos por métodos de Dynamic Light Scattering (DLS) o de Photon Correlation Spectroscopy (PCS), con la ventaja de poder obtener un mapa de distribución de frecuencias, tamaños y número total de partículas en un determinado volumen de medida, con lo que permite, además, calcular su concentración (figura 2.3).

Mediante esta técnica se pueden analizar partículas de origen biológico, que presentan bajo índice de refracción, con tamaños comprendidos entre 30 y 300 nm, que son difícilmente detectables por la mayor parte de citómetros y que corresponden a los tamaños habituales de la mayoría de exosomas.

Mediante la técnica NTA se procesó una de las alícuotas que contenía el sedimento resuspendido en tampón PBS, cargando el volumen necesario para llenar la

cámara de lectura del instrumento de medida. Un aspecto importante del análisis realizado, es que el espectro de distribución de tamaños de las nanopartículas proporciona información relevante sobre la pureza y homogeneidad de la composición de la muestra analizada, así como de su concentración.

2.4.5. Análisis Proteómico y molecular de exosomas de *Candida albicans*

Las fracciones de exosomas obtenidas, una vez comprobada su pureza, se repartieron en dos alícuotas, una de ellas se desecó en un evaporador rotatorio para análisis por electroforesis SDS-PAGE y realizar el análisis del proteoma total de los exosomas, mientras que la otra, fue sometida 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), dejándolo toda la noche a 5°C. La muestra se centrifugó durante 1 h a 16500xg a 5°C, retirándose el sobrenadante que contiene los péptidos tripticos y desecándola en un “speed-vac”.

Ambas muestras desecadas, conteniendo las proteínas se lavaron con 200 µL de acetona a -20°C y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones, dejando secar el sedimento, que se resuspendió con tampón Laemmli, ajustando el pH a 8.0 con NaOH 0.1 M y ajustando el volumen final a 50 µL. Las muestras se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE.

Las mezclas peptídicas obtenidas se procesaron mediante LC, MS/MS (cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en modo tándem) que permite el análisis e identificación de muestras complejas de proteínas (Figura 2.4).

Un volumen de 5 μL de muestra se cargó en una columna trampa (NanoLC, 3 μm C18-CL, 350 μm x 0.5 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.

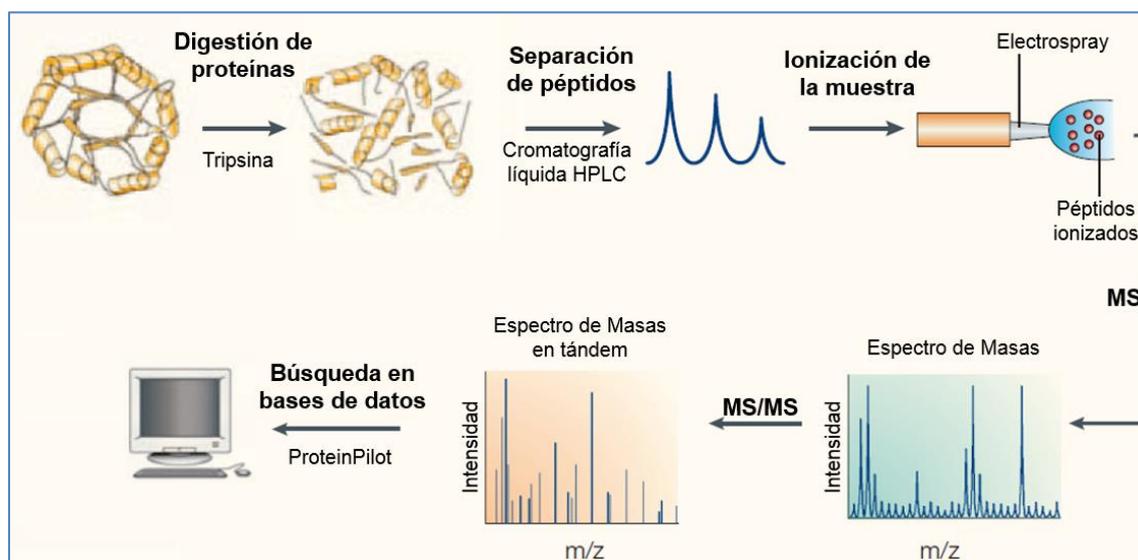


Figura 2.4. Etapas del análisis proteómico realizado en las muestras de exosomas. (Modificado de Kuster et al. 2005).

Los péptidos se cargaron en una columna analítica (LC, 3 μm C18-CL, 75 μm x 12 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 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 adquisición de datos del primer espectrómetro de masas (MS1), fue de 350-1250 m/z durante 250 ms. La resolución del cuadrupolo se ajustó para el segundo espectro de masas (MS2), de modo que la adquisición de datos fue de 100-1500 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 adquiridos.

El análisis proteómico se realizó en el Servicio de Proteómica de la Universitat de Valencia SCSIE, que forma parte de ProteoRed, PRB2-ISCI, con apoyo del programa PT13/0001.

2.4.6. Análisis de miRNA en exosomas de *Candida albicans*

La detección de miRNA en exosomas de *C. albicans* se ha realizado mediante el empleo de un bioanalizador Agilent 2100, en colaboración con el Dr. Felip Vilella y la Dra. Inmaculada Moreno de la Fundación IVI (Instituto Valenciano de Infertilidad) y posteriormente se realizó la secuenciación, en el Servicio de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de Valencia.

La preparación de las muestras se realizó mediante un kit de purificación de RNA de “Qiagen®” (miRNeasy Mini Kit). A 35 μ L de muestra, colocados en un tubo con tapa segura, se le añadieron 700 μ L del reactivo QIAzol Lysis homogeneizando con vortex durante 5 min y posteriormente se adicionaron 140 μ L de cloroformo, agitando vigorosamente durante 15 seg. e incubando a temperatura ambiente durante 3 min. Posteriormente se centrifugó a 12000xg a 4°C durante 15 min.

La fase acuosa superior se transfirió a un tubo de recogida, procurando no arrastrar el contenido de la interfase y se añadieron 525 μ L de etanol 100 %, mezclando bien con la pipeta. De la muestra anterior se transfirió un volumen de 700 μ L, incluyendo cualquier posible precipitado, a una columna RNeasy®Mini (suministrada en el kit), a la que se acopló un tubo de recogida de 2 mL. El conjunto columna-tubo de recogida, se centrifugó a 8000xg durante 15 s. a temperatura ambiente, descartando el líquido que hubiese pasado al fondo del tubo y repitiendo el proceso nuevamente con el resto de muestra. Este paso se repitió utilizando 700 μ L de tampón RWT (proporcionado en el kit) y descartando nuevamente el filtrado que pudiese fluir al fondo del tubo de recogida.

Posteriormente se añadieron 500 μ L de tampón RPE (suministrado en el kit) y se centrifugó a 8000xg durante 15 s. a temperatura ambiente, descartando igualmente el filtrado. El proceso se repitió nuevamente, centrifugando durante 2 min y descartando finalmente el tubo de recogida, con todo el filtrado que pudiese contener.

La columna se transfirió a un nuevo tubo de recogida de 1.5 mL y se añadieron 30 μ L de H₂O libre de RNasa, directamente sobre la membrana de la columna, centrifugando a 8000xg durante 1 min, a temperatura ambiente, para eluir completamente la membrana. Las muestras así obtenidas se conservaron a -80°C.

2.5. OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES DE *CANDIDA ALBICANS*

Las células procedentes de 100 mL de cultivo líquido en medio YPD de *C. albicans* (cepa SC5314), se recogieron por centrifugación (8000xg, 10 min), se lavaron con tampón PBS estéril conteniendo 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), como inhibidor de actividades proteolíticas.

Para proceder a la rotura se dispensaron 0.5 mL del precipitado resuspendido en PBS-PMSF, en tubos de 2 mL con tapón hermético, a los que se adicionó igual volumen de perlas de vidrio de diámetro de 425-600 μ m (Sigma®) y se sometieron a cuatro ciclos de agitación de 20 s. (intensidad 4) en un disruptor de células FastPrep FP120, a 4°C, con intervalos iguales de reposo en hielo. El rendimiento de rotura alcanzado en estas condiciones, fue prácticamente del 100 %, analizándose el proceso mediante observación al microscopio de contraste de fases Olympus BX41. Una vez analizada la rotura, se recuperó el extracto celular, centrifugando a 8000xg durante 10 min, lavando posteriormente con PBS-PMSF 1 mM y repartiéndolo en alícuotas para su conservación congelado.

Al extracto citoplásmico de *Candida* así obtenido, se le realizaron las correspondientes valoraciones de proteína total, por el método Bradford antes expuesto y las separaciones electroforéticas y métodos de inmunodetección, ante los mismos anticuerpos que a las preparaciones de exosomas antes citadas, sirviendo así de comparación con las mismas.

3. RESULTADOS

3.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Las muestras de exosomas obtenidas, siguiendo el protocolo anteriormente descrito, para las cepas de levaduras de *C. albicans*, SC5314 (crecidas a 37°C y 28°C) y de los mutantes *Δpir1* y *Δglx3*, se sometieron a un análisis de determinación de proteína total, mediante el método Bradford, utilizando el reactivo suministrado por Bio-Rad® y el procedimiento antes expuesto. Las absorbancias medidas a 595 nm, para las diferentes muestras, procesadas por duplicado, se interpolaron en la recta patrón preparada, al representar los valores de absorbancia de los estándares, obteniéndose los valores de proteína total que aparecen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores de proteína total obtenidos para las muestras de exosomas obtenidas en las diferentes cepas de *C. albicans* utilizadas.

Cepa	Proteína total (μg/μL)
SC5314 a 37°C	0,166
SC5314 a 28°C	0,140
<i>Δpir1</i>	0,250
<i>Δglx3</i>	0,190

3.2 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Se procedió a la separación electroforética de proteínas y posterior Western blot, para comprobar la pureza de las preparaciones obtenidas, empleando anticuerpos marcadores de vesículas extracelulares y marcadores de fracción citosólica que reconocen componentes fibrilares de citoesqueleto, ausentes en los exosomas, para descartar contaminación celular. Se analizaron tres tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), calnexina (proteína del retículo endoplasmático), enolasa (enzima glicolítica), Hsp70 (proteína chaperona) y manoproteínas de pared celular.

Las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, se consideran biomarcadores de vesículas extracelulares en células eucariotas superiores, aunque no se han descrito homólogos en *C. albicans*, mientras que la calnexina determina la ausencia de contaminación por fragmentos celulares, por lo que la utilización de anticuerpos frente a dichas proteínas permite detectar la presencia de microvesículas extracelulares y la pureza de las mismas. En efecto, los resultados obtenidos, que aparecen en la figura 3.1, muestran resultado

positivo frente a CD63, CD9 y CD81, en las fracciones de exosomas y negativo en sus respectivos lisados celulares, mientras que, frente a la Calnexina, se detecta únicamente en la fracción de lisado celular y se obtiene resultado negativo en la correspondiente a la de microvesículas.

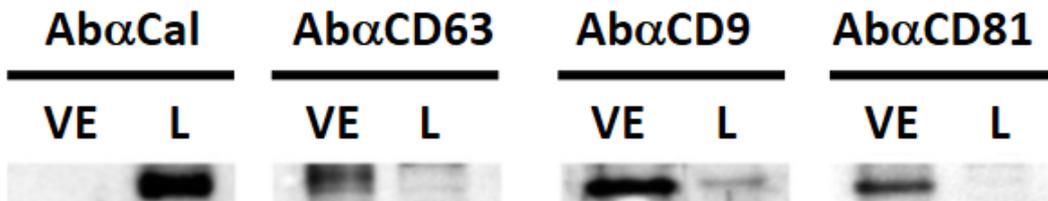


Figura 3.1. Resultados correspondientes al Western blot realizado empleando anticuerpos anti-Calnexina, anti-CD63, anti-CD9 y anti-CD81, en muestras de exosomas (VE) de *C. albicans* y sus correspondientes lisados celulares (L).

Además, se utilizaron otros biomarcadores tales como la Enolasa, una proteína localizada tanto en pared como en citoplasma celular y Hsp70, cuya localización es ubicua en todos los organismos vivos, ya que suelen localizarse en citoplasma y núcleo, pero también pueden secretarse al medio exterior. La figura 3.2 muestra el resultado obtenido con los anticuerpos indicados, siendo positivo únicamente en la fracción de exosomas (VE) y no en el sobrenadante (SN) de la ultracentrifugación, en el caso de los anticuerpos anti-enolasa y positivo en ambas fracciones en el de los anticuerpos anti-Hsp70.

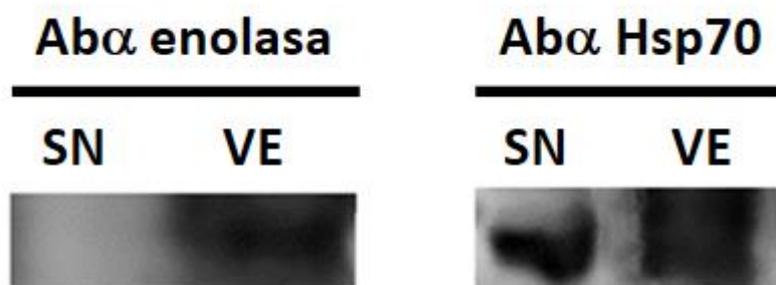
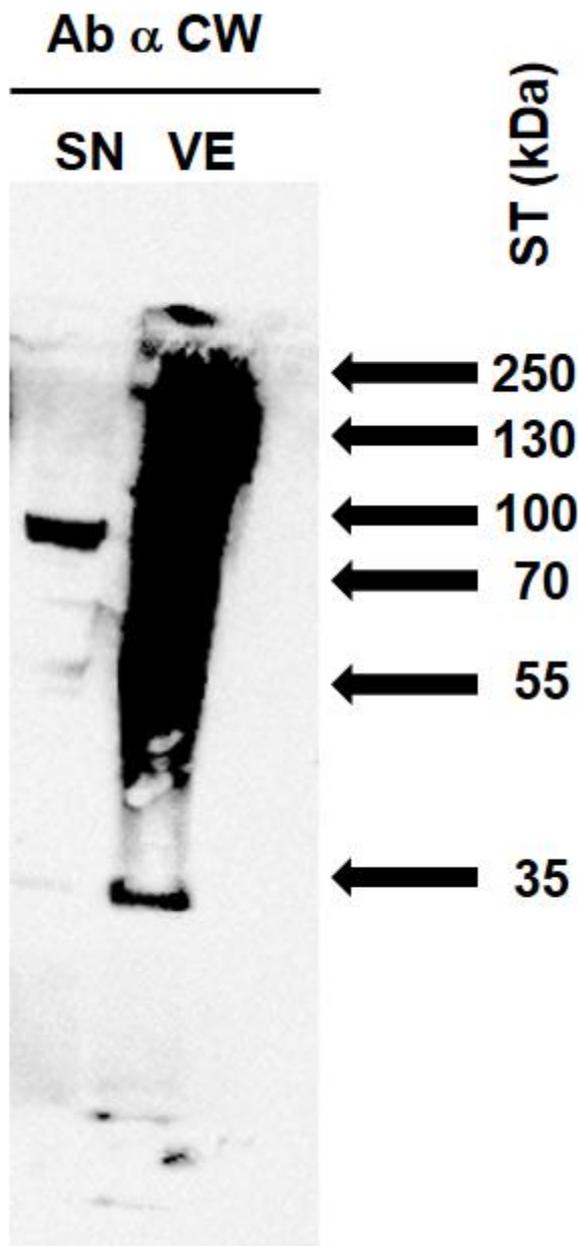


Figura 3.2. Resultados correspondientes al Western blot realizado empleando anticuerpos anti-enolasa y anti-Hsp70, en muestras de exosomas (VE) de *C. albicans* y sus correspondientes sobrenadantes (SN) de ultracentrifugación.

Por último, se realizó un análisis WB a muestras de exosomas y sobrenadante de ultracentrifugación frente a anticuerpos anti-pared celular de *C. albicans*, con el propósito



de detectar la presencia de manoproteínas. Dichos anticuerpos fueron obtenidos en nuestra unidad de investigación al inocular a conejos un lisado purificado de paredes. Como se puede apreciar en la figura 3.3, se observa resultado positivo en la muestra de vesículas extracelulares, dando un marcado polidisperso, como consecuencia del diferente grado de glicosilación de las manoproteínas detectadas.

Figura 3.3. Western blot mostrando el resultado positivo y con elevada polidispersión, de la fracción de Vesículas extracelulares (VE), frente a los anticuerpos anti-pared de *C. albicans*.

3.3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Las muestras con el sedimento resuspendido en PBS, conteniendo la fracción de exosomas, fueron incluidas en resinas LR-White, realizando cortes de 50 a 100 nm, para realizar la observación por microscopía electrónica de transmisión y comprobar la pureza de las mismas.

La figura 3.4 muestra las imágenes obtenidas a 40000 aumentos, en la preparación correspondiente a la muestra de exosomas de *C. albicans* SC5314 a 37°C, en la que aparecen estructuras vesiculares con doble membrana, de tamaños comprendidos entre 100 y 200 nm, coincidentes con las encontradas en el análisis mediante la técnica Nanoside.

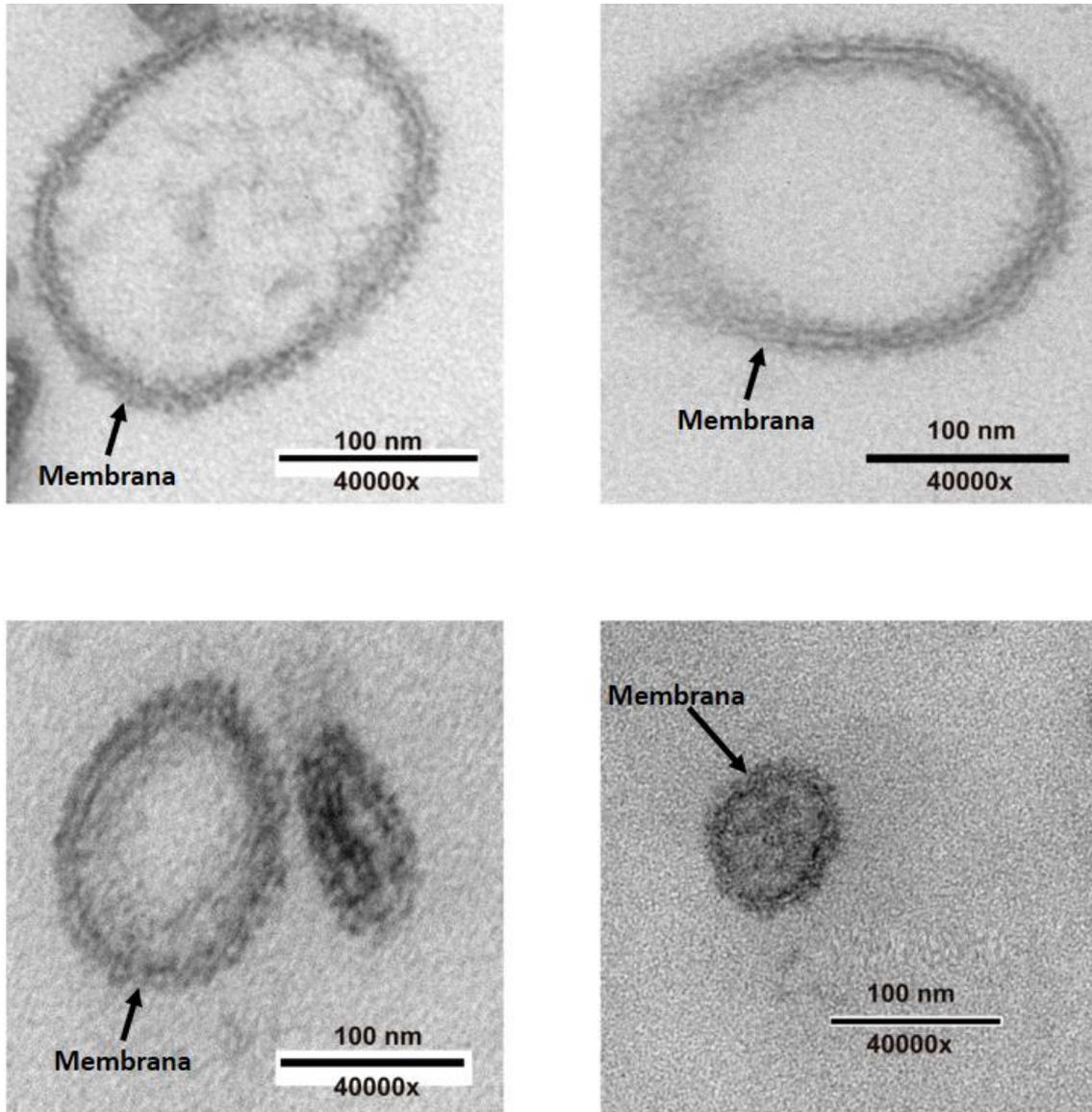


Figura 3.4. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión en las muestras de exosomas purificados de *C. albicans* SC5314 a 37°C.

Idéntico procedimiento de purificación se realizó para un cultivo de levaduras de *C. krusei*, obteniéndose una muestra de microvesículas purificadas, similares a las

obtenidas para *C. albicans*, como se puede apreciar en la imagen de microscopía electrónica que aparece en la figura 3.5.

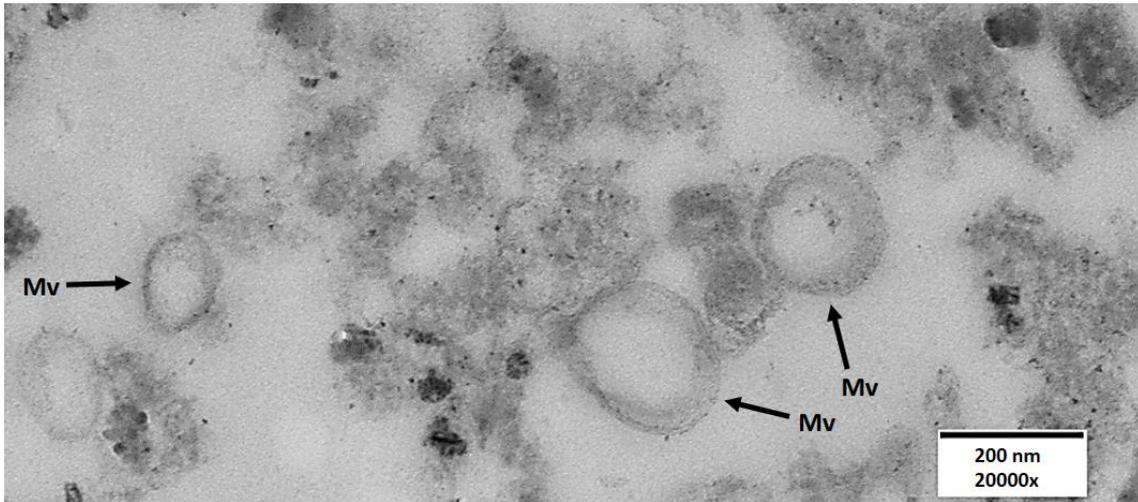


Figura 3.5. Imagen de microscopía electrónica de una muestra de microvesículas (Mv) purificadas de *C. krusei*.

Similares resultados se obtuvieron también para cultivos de levaduras de *C. parapsilosis*, como puede apreciarse en la imagen de microscopía electrónica que aparece en la figura 3.6.

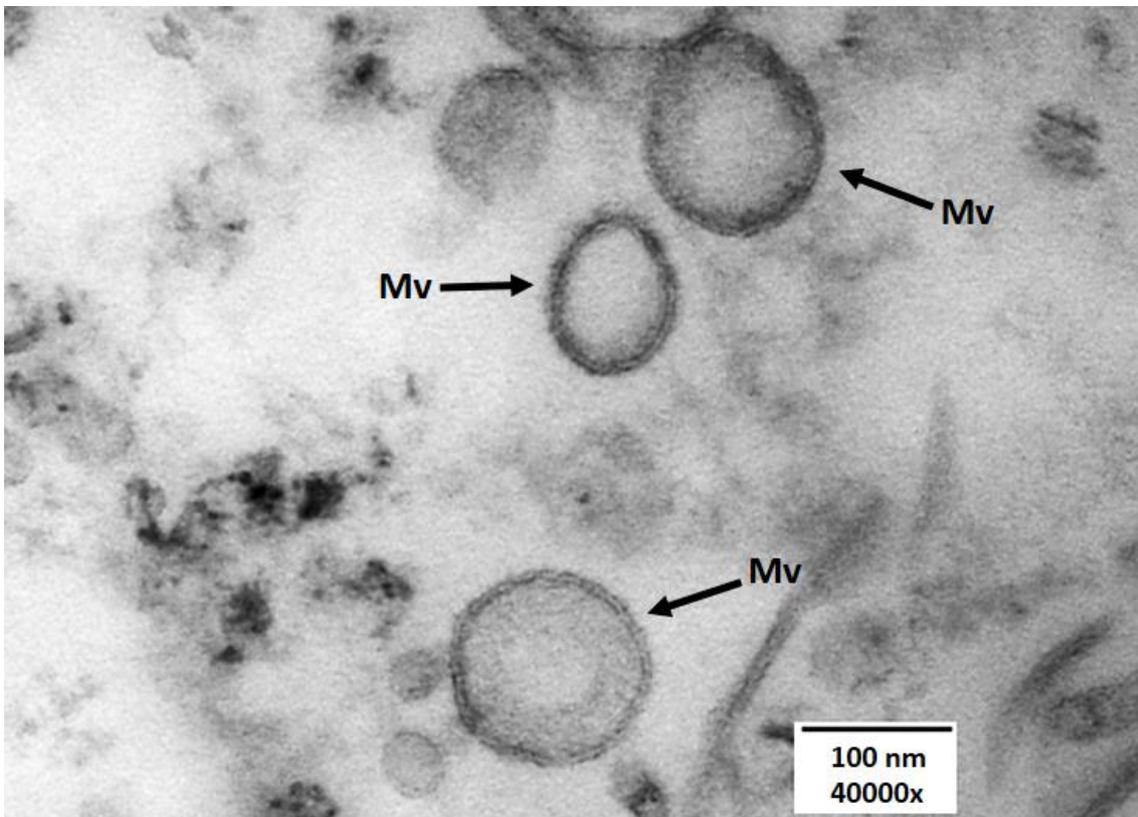


Figura 3.6. Imagen de microscopía electrónica de una muestra de microvesículas (Mv) purificadas de *C. parapsilosis*.

3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS TRATADAS CON CONCANAVALINA A-FERRITINA

Tras comprobar la presencia de exosomas por medio de las preparaciones de microscopía electrónica y la pureza de los mismos, mediante la detección de anticuerpos realizada con la técnica WB, llevamos a cabo una determinación más específica, incubando las muestras de exosomas de *C. albicans* SC5314 a 37°C, con Concanavalina A-ferritina, una lectina que se utiliza para la detección de los restos de manosa de las glicoproteínas. La muestra así procesada, se fijó con formaldehído/glutaraldehído, para su inclusión en resinas y posterior observación por microscopía electrónica de transmisión. Se analizaron de forma paralela, muestras con exosomas purificados, sin ningún tratamiento previo y otras con tratamiento con Concanavalina A-ferritina, observándose en estas últimas un marcaje en forma de punteado negro, que indica la presencia de manoproteínas en las microvesículas, lo que confirma el resultado obtenido mediante Western blot, al detectar anticuerpos anti-manano, que reconocen de forma selectiva las microvesículas. En la figura 3.7, se observan sendas imágenes de microscopía electrónica, en las que se pueden apreciar exosomas tratados (B) y no tratados (A) con Concanavalina A-ferritina.

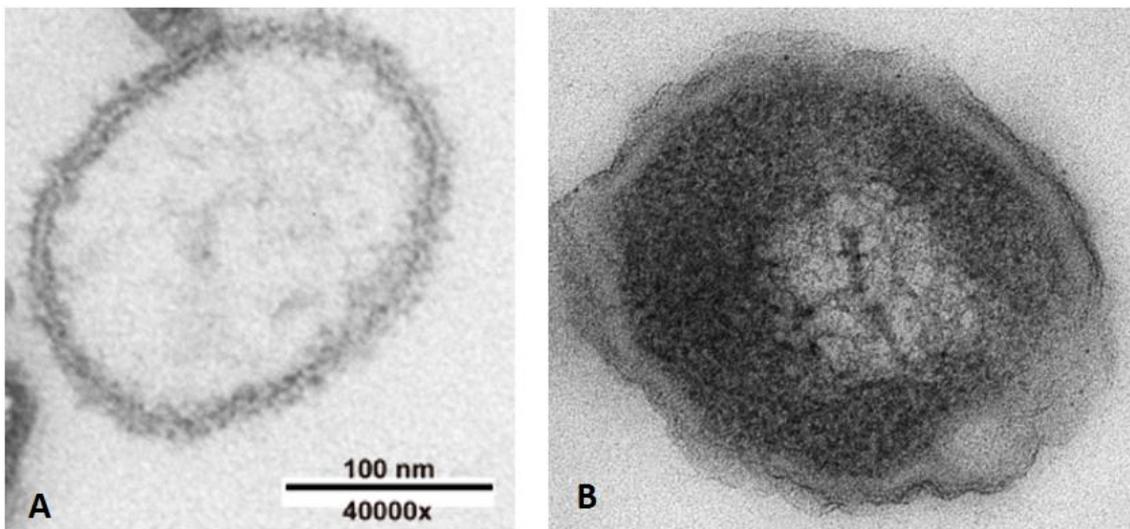


Figura 3.7. Imágenes de microscopía electrónica de una muestra de exosomas purificados de *C. albicans* SC5314 a 37°C: (A) sin tratamiento previo y (B) con tratamiento previo con Concanavalina A-ferritina.

3.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE TÉCNICAS NTA (NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS)

Una de las alícuotas que contenía el sedimento con los exosomas de la cepa SC5314 de *C. albicans*, se resuspendió en tampón PBS, siendo analizada en un equipo Nano Sight®, mediante la técnica NTA, cargando el volumen necesario para llenar la cámara de lectura del instrumento de medida. El estudio del movimiento y trayectoria de las partículas mediante las imágenes captadas por un sensor CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*) de alta sensibilidad, permitió determinar el tamaño y distribución de las mismas a partir de la información obtenida tras analizar 1500 fotogramas captados, a razón de 25 fotogramas por segundo. El análisis realizado pone en evidencia la elevada homogeneidad de tamaños de las nanopartículas, según se aprecia en el espectro de distribución de las mismas que aparece en la figura 3.8, lo que permite ratificar la pureza de la muestra. Las concentraciones de partículas más elevadas, fueron las correspondientes a los tamaños de 125 nm y 165 nm, observándose escasa presencia de partículas de 245 y 385 nm, siendo el tamaño medio de las mismas de 146,1 nm.

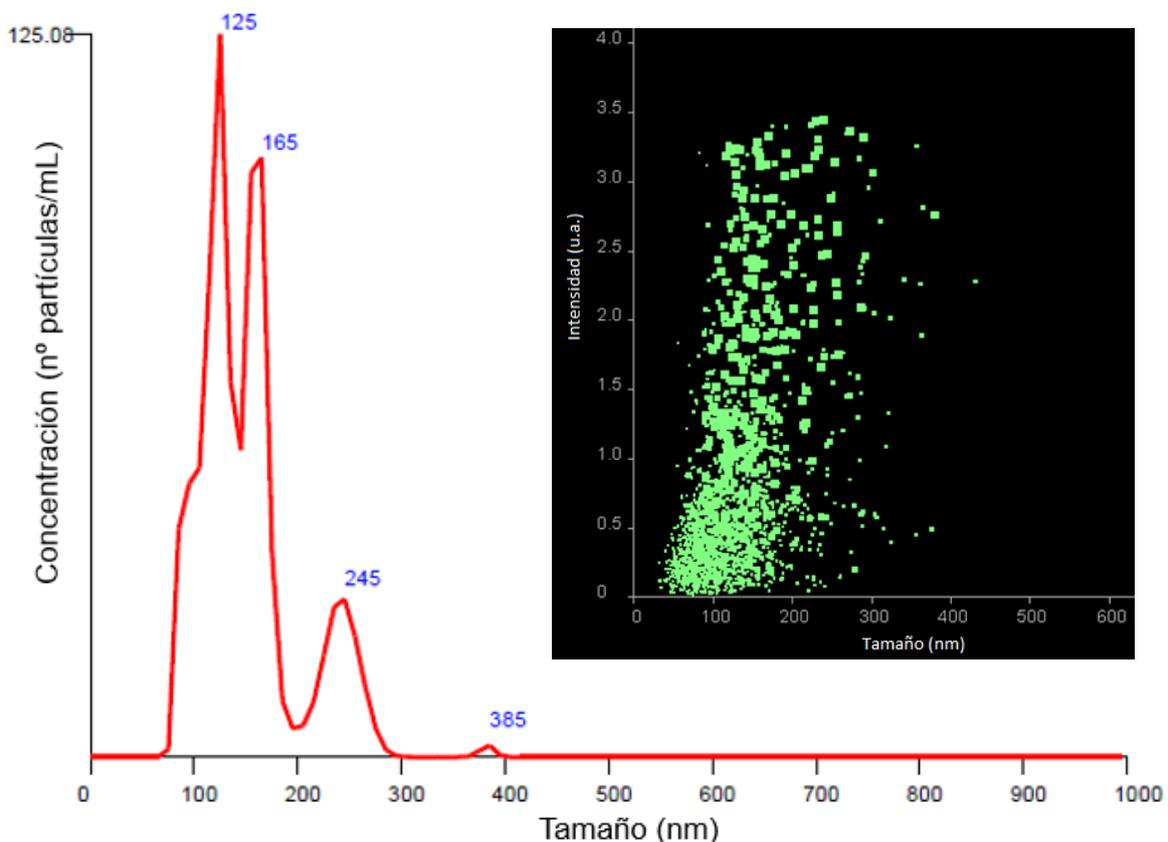


Figura 3.8. Espectro de distribución del tamaño de las nanopartículas y su concentración, en una muestra de exosomas de *C. albicans* SC5314 (37°C). El gráfico incrustado muestra la intensidad de luz dispersada en función del número de partículas y tamaño de las mismas.

El gráfico incrustado en la figura 3.8, muestra la intensidad de la luz láser dispersada, en función del número y tamaño de las nanopartículas presentes en la muestra, observándose, así mismo, un notable agrupamiento en torno a los 100 y 200 nm, no existiendo valores apreciables en torno a otros valores, ratificando la elevada pureza y homogeneidad de la muestra.

3.6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MOLECULAR DE EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*

Las fracciones de exosomas obtenidas, una vez comprobada su pureza, se sometieron a un análisis proteómico, realizado en el Servicio de Proteómica de la Universitat de Valencia SCSIE, que forma parte de ProteoRed, PRB2-ISCIH, con apoyo del programa PT13/0001.

Todas las muestras se procesaron por duplicado, obteniéndose el número de proteínas que aparecen en la tabla 3.2, para cada una de las cepas analizadas, tomando como límite de corte 5 péptidos, lo que proporciona una confianza en la identificación de las mismas, superior al 99%. Del número total de obtenidas en los exosomas de las cuatro cepas, tan solo 181 están presentes en la cepa SC5314, cuando se crece a 37°C, encontrándose un valor similar para los de la cepa mutante $\Delta glx3$ a 28°C (173), mientras que la cepa SC5314, cuando se crece a 28°C, el número de proteínas que aparecen en los exosomas, aumenta hasta 350. Mención aparte merece el hecho de que el número de proteínas que aparecen en los obtenidos en el caso del mutante $\Delta pir1$, a 28°C aumenta considerablemente, hasta las 932.

Tabla 3.2. Resultados del análisis proteómico realizado en exosomas obtenidos de *C. albicans*, SC5314 a 37 °C y 28 °C, y de los mutantes *Δpir1* y *Δglx3*, ambas a 28°C. Las proteínas indicadas, corresponden al valor obtenido aplicando como límite de corte 5 péptidos.

Cepa	Proteínas	%
Número total de proteínas identificadas	985	
SC5314 a 37°C	181	18,4
SC5314 a 28°C	350	35,5
<i>Δpir1</i> a 28°C	932	94,6
<i>Δglx3</i> a 28°C	173	17,6
Comunes SC5314 a 37°C y 28°C	158 de 181	87,3
Comunes SC5314 a 28°C y <i>Δglx3</i>	167 de 350	47,7
Comunes SC5314 a 28°C y <i>Δpir1</i>	307 de 350	87,7
Comunes <i>Δglx3</i> y <i>Δpir1</i>	161 de 173	96,5
Comunes a SC5314 a 28°C, <i>Δglx3</i> y <i>Δpir1</i>	158 de 985	16,0
Comunes a todas las cepas	107 de 985	10,9

Del conjunto de las 985 proteínas identificadas, tan solo el 10,9% (107 proteínas) son comunes a los exosomas de las cuatro cepas, mientras que cuando comparamos las correspondientes a las tres cepas crecidas a 28°C, la coincidencia aumenta hasta el 19,6% (158 proteínas). La comparación entre las cepas SC5314 crecidas a 37 y 28°C muestra una coincidencia del 87,29% (158 de 181 proteínas). Las comparaciones con la cepa mutante *Δpir1* muestran elevada coincidencia tanto con SC5314 a 28°C (87,71 %, 307 de 350 proteínas), como con *Δglx3* (96,53%, 161 de 173 proteínas), mientras que la coincidencia entre la cepa SC5314 a 28°C y la mutante *Δglx3* desciende hasta el 47,71% (167 de 350 proteínas), como se puede apreciar en el diagrama de Venn que se muestra en la Figura 3.9.

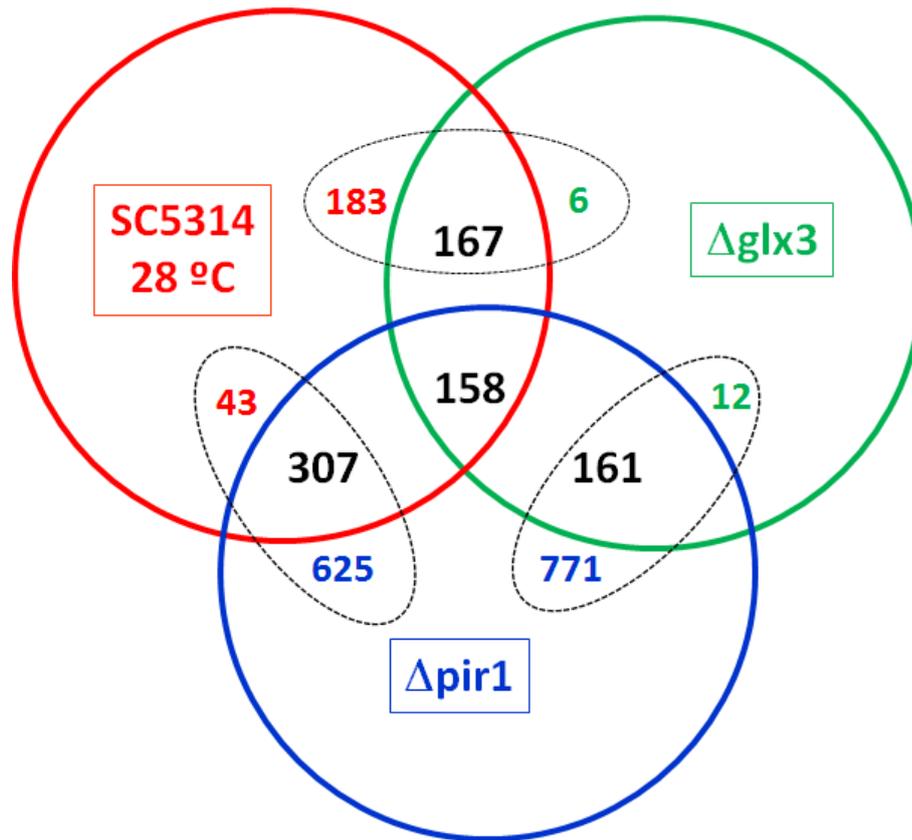


Figura 3.9. Resultados del análisis proteómico realizado en los exosomas obtenidos para las cepas de *C. albicans* SC5314 (28 °C), y los mutantes $\Delta glx3$ y $\Delta pir1$. El número de proteínas indicadas, corresponde al valor obtenido aplicando como límite de corte 5 péptidos.

En la Tabla 3.3 se disponen las denominaciones de los genes codificantes de las proteínas identificadas en el análisis proteómico de los exosomas de las cuatro cepas estudiadas, según la descripción del ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database (www.candidagenome.org), así como la función descrita para cada uno de ellos en la citada base de datos.

Tabla 3.3. Resultados del análisis proteómico realizado en exosomas obtenidos de *C. albicans* SC5314 a 37 °C y 28 °C, y de los mutantes $\Delta pir1$ y $\Delta glx3$, incluyendo la denominación del gen y la función descrita en el ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database (www.candidagenome.org). En todos los casos se ha aplicado como límite de corte el valor de 5 péptidos.

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
1	<i>C1_03790C_A</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (putativa)	-	-	+	-
2	<i>STR2</i>	Cistationina gamma-sintetasa	-	-	+	-
3	<i>MNS1</i>	2-manosidasa	-	-	+	-
4	<i>C1_03720C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
5	<i>POR1</i>	Poro de la membrana externa mitocondrial	+	+	+	+
6	<i>ERB1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
7	<i>IFD6</i>	Aldo-ceto reductasa	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
8	<i>HTA2</i>	Histona H2A (putativa)	-	-	+	-
9	<i>C1_04180W_A</i>	Histona H2B	-	-	+	-
10	<i>C1_04200C_A</i>	Constituyentes estructurales de los poros nucleares	+	+	-	+
11	<i>CDC3</i>	Septina	-	+	+	-
12	<i>ACS2</i>	Acetil-CoA sintetasa	-	+	+	-
13	<i>SSA2</i>	Hsp70 chaperona de la pared celular	+	+	+	+
14	<i>CDC39</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Cdc39p	-	-	+	-
15	<i>C6_04280W_A</i>	Ortólogos con actividad ubiquitina-proteína ligasa	-	-	+	-
16	<i>C6_04290W_A</i>	Ortólogos con actividad en la desubiquitinación de proteínas	-	-	+	-
17	<i>ALS2</i>	Proteína de la familia ALS que interviene en la adhesión	-	+	+	-
18	<i>MRF1</i>	Proteína respiratoria mitocondrial (putativa)	+	+	+	-
19	<i>GAD1</i>	Glutamato descarboxilasa (putativa)	-	+	+	+
20	<i>CTA3</i>	Función desconocida	-	-	+	-
21	<i>ARO7</i>	Corismato mutasa (putativa)	-	-	+	-
22	<i>NOP5</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Nop58	-	+	+	-
23	<i>C6_04080W_A</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> MAP2	-	-	+	-
24	<i>RVS167</i>	Endocitosis	-	-	+	-
25	<i>C1_07690C_A</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> CSEI, proteína nuclear	-	-	+	-
26	<i>ADE4</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
27	<i>GVP36</i>	Proteína con dominio BAR	-	-	+	-
28	<i>C4_05580C_A</i>	Proteína externa	+	-	-	-
29	<i>CIC1</i>	Proteína que interactúa con el proteasoma (putativa)	-	-	+	-
30	<i>SEC23</i>	Proteína activadora de la GTPasa (putativa)	-	-	+	-
31	<i>SUI1</i>	Factor de iniciación de la traducción (putativa)	-	-	+	-
32	<i>VAS1</i>	RNAt-Val sintetasa (putativa)	+	+	+	-
33	<i>RPN6</i>	Subunidad 26S de proteasoma (putativa)	-	+	+	-
34	<i>HSM3</i>	Unidad reguladora 19S de proteasoma	-	-	+	-
35	<i>PUP3</i>	Subunidad beta 3 de proteasoma 20S (putativa)	-	+	+	-
36	<i>C7_03370C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
37	<i>SHM1</i>	Serina hidroximetiltransferasa mitocondrial	-	-	+	-
38	<i>LIP8</i>	Lipasa secretada	-	+	-	-
39	<i>UCF1</i>	Función desconocida	-	-	+	-
40	<i>C2_09970C_A</i>	Función desconocida (putativa)	-	-	+	-
41	<i>C2_09930W_A</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> VBX4, degradación de proteínas poliubiquitinadas	-	-	+	-
42	<i>SSO2</i>	Ortólogos con actividad de receptor SNAP	+	-	+	-
43	<i>PMI1</i>	Fosfomanosa isomerasa	-	-	+	-
44	<i>CCT2</i>	Chaperonina del complejo de anillo TCP1 citosólico	-	+	+	-
45	<i>TEF1</i>	Factor 1-alfa de elongación traducción	-	-	-	+
46	<i>PLB4.5</i>	Fosfolipasa B	+	+	+	+
47	<i>APT1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
48	<i>SPT5</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Spt5p factor de elongación de la transcripción	-	-	+	-
49	<i>C2_01530C_A</i>	NAD sintetasa dependiente de glutamina (putativa)	-	-	+	-
50	<i>SMP2</i>	Fosfatidato fosfatasa dependiente de Mg ²⁺ (putativa)	-	-	+	-
51	<i>COX13</i>	Citocromo c oxidasa	-	-	+	-
52	<i>MSB2</i>	Proteína similar a la adhesina de la familia de la mucina	+	+	+	+
53	<i>RAD7</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Rad7p	-	-	+	-
54	<i>C2_02000W_A</i>	Proteína del aparato de Golgi	-	-	+	-
55	<i>C2_02020W_A</i>	Proteasa específica de ubiquitina	-	-	+	-
56	<i>ARO3</i>	3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintetasa	-	-	+	-
57	<i>C2_02310W_A</i>	Proteína asociada a la membrana plasmática	-	-	+	-
58	<i>URE2</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Ure2p	-	-	+	-
59	<i>CPR3</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (putativa)	-	-	+	-
60	<i>HOM2</i>	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	-	-	+	-
61	<i>POB3</i>	Proteína implicada en el montaje y desmontaje de la cromatina	-	-	+	-
62	<i>C2_02410W_A</i>	Función desconocida	+	-	+	-
63	<i>C2_02420C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
64	<i>UTP22</i>	Proteína U3 snoRNP (putativa)	-	-	+	-
65	<i>ERG10</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa	-	+	+	-
66	<i>RPL3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
67	<i>ILV2</i>	Acetolactato sintetasa (putativa)	-	-	+	-
68	<i>GFA1</i>	Glucosamina-6-fosfato sintetasa	-	-	+	-
69	<i>C3_02180C_A</i>	Deoxihipusina sintetasa	-	-	+	-
70	<i>LAP41</i>	Precursor de la aminopeptidasa yscI (putativa)	-	+	+	-
71	<i>ERG6</i>	Delta (24)-esterol C-metiltransferasa	-	+	+	-
72	<i>RPL12</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
73	<i>RNA1</i>	Proteína activadora de la GTPasa (putativa)	-	-	+	-
74	<i>POX1-3</i>	Acil-CoA oxidasa	-	-	+	+
75	<i>DBP5</i>	RNA helicasa	-	-	+	-
76	<i>C3_01850W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
77	<i>MNT2</i>	2-manosil transferasa	+	+	+	-
78	<i>MNT1</i>	2-manosil transferasa	+	+	+	+
79	<i>UTR2</i>	Glucosidasa de pared celular anclada por GPI (putativa)	-	+	-	-
80	<i>C3_01720C_A</i>	Subunidad alfa del complejo de vesículas COPI	-	-	+	-
81	<i>CDC53</i>	Subunidad de los complejos SCU ubiquitina-ligasa	-	-	+	-
82	<i>TFP1</i>	Subunidad de H(+)-ATPasa vacuolar	-	+	+	+
83	<i>C3_01610W_A</i>	Proteína de membrana	-	-	+	-
84	<i>PPH21</i>	Proteína fosfatasa Tipo 2A (serina/treonina específica) (putativa)	-	-	+	-
85	<i>C3_01560W_A</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Prp43	-	-	+	-
86	<i>TOS1</i>	Proteína similar a la subunidad de anclaje de alfa aglutinina	+	+	+	+
87	<i>C3_01520C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
88	<i>RPS7A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
89	<i>FOX3</i>	Peroxisomal 3-oxoacilo CoA tiolasa (putativa)	-	-	+	-
90	<i>DBP2</i>	PIRN helicasa ATP-dependiente de la familia DEAD-box (putativa)	-	-	+	-
91	<i>ALI1</i>	NADH-ubiquinona oxidorreductasa (putativa)	-	-	+	-
92	<i>UGPI</i>	UTP-glucosa-1-fosfaturidil transferasa	+	-	+	-
93	<i>HEM3</i>	Hidroximetilbilano sintetasa	-	-	+	-
94	<i>ACS1</i>	Acetyl-CoA sintetasa	+	+	+	-
95	<i>PUS7</i>	Pseudouridina sintetasa	-	-	+	-
96	<i>CMK2</i>	Quinasa dependiente de calmodulina (putativa)	-	-	+	-
97	<i>GPD1</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	-	-	+	-
98	<i>RAS1</i>	Transducción de señales RAS GTPasa	-	-	+	-
99	<i>C2_10160W_A</i>	Proteína externa	-	+	-	-
100	<i>C2_10150W_A</i>	Proteína externa	-	+	-	-
101	<i>CYC1</i>	Citocromo c	-	+	+	+
102	<i>C2_10050W_A</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> , actividad proteasa específica de ubiquitina	-	-	+	-
103	<i>MP65</i>	Manoproteína de la pared celular, adhesina	+	+	+	+
104	<i>C2_09980W_A</i>	Proteína con un dominio regulador del proteasoma PI31	-	-	+	-
105	<i>LYS1</i>	Sacaropina deshidrogenasa (biosintética)	-	-	+	-
106	<i>IMH3</i>	Inosina monofosfato (IMP) deshidrogenasa	-	+	+	-
107	<i>CBR1</i>	Citocromo B5 reductasa (putativa)	-	-	+	-
108	<i>OFD1</i>	Miembro de la familia de prolyl-hydroxylasa (putativa)	-	-	+	-
109	<i>ALS3</i>	Adhesina de pared celular	+	-	-	-
110	<i>RPA190</i>	Subunidad A190 de RNA polimerasa I (putativa)	-	-	+	-
111	<i>ARO10</i>	Decarboxilasa aromática	-	-	+	-
112	<i>C2_04790C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
113	<i>HHF22</i>	Histona H4 (putativa)	-	+	+	-
114	<i>LSC2</i>	Subunidad beta succinato-CoA ligasa (putativa)	-	+	+	-
115	<i>HEM15</i>	Ferroquelatasa involucrada en la biosíntesis de hemo (putativa)	-	-	+	-
116	<i>RCL1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
117	<i>C2_07410W_A</i>	Ortólogos con actividad en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena media	-	-	+	-
118	<i>APR1</i>	Proteasa aspártica vacuolar	-	-	+	-
119	<i>SSC1</i>	Proteína de choque térmico	+	+	+	+
120	<i>MCM3</i>	Proteína de replicación del DNA (putativa)	-	-	+	-
121	<i>PGA52</i>	Proteína GPI	-	+	+	+
122	<i>SNF1</i>	Proteína esencial	-	-	+	-
123	<i>VPS1</i>	Proteína relacionada con GTPasa de la familia Dynamin	-	+	+	-
124	<i>ASN1</i>	Asparagina sintetasa (putativa)	-	+	+	-
125	<i>ARO2</i>	Corismato sintetasa (putativa)	-	-	+	-
126	<i>SNX4</i>	Posible nexina (putativa)	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
127	<i>C2_01320W_A</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> , RPN9 ensamblaje de proteasoma	-	-	+	-
128	<i>MNN24</i>	2-manosil transferasa	+	+	+	-
129	<i>RTS1</i>	Fosfatasa tipo B subunidad reguladora de serina/treonina (putativa)	-	-	+	-
130	<i>C2_01220W_A</i>	Constituyentes estructurales de los poros nucleares	-	-	+	-
131	<i>C2_01160W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
132	<i>KAR2</i>	Similar a Hsp70 de la familia de las chaperonas	+	+	+	+
133	<i>BCY1</i>	Proteína quinasa A subunidad reguladora	-	-	+	-
134	<i>C2_01070W_A</i>	RNA polimerasa I	-	-	+	-
135	<i>CDC47</i>	Proteína fosforilada que interviene en el control de la división celular	-	-	+	-
136	<i>HGT6</i>	Transportadora de glucosa de alta afinidad MFS (putativa)	+	+	+	+
137	<i>HGT8</i>	Transportadora de glucosa de alta afinidad de la superfamilia del facilitador principal	-	-	+	-
138	<i>HGT7</i>	MFS transportadora de glucosa (putativa)	-	+	+	+
139	<i>RFC5</i>	Subunidad del factor C de la replicación heteropentamérica (putativa)	-	-	+	-
140	<i>DFG5</i>	Mannoproteína ligada a N de la pared celular y la membrana	-	-	+	-
141	<i>PHHB</i>	4a-hidroxitetrahidrobiopterina deshidratasa (putativa)	-	-	+	-
142	<i>RFA1</i>	DNA factor de replicación A (putativa)	-	-	+	-
143	<i>C2_00360C_A</i>	Regulación negativa de la transcripción de RNA polimerasa II promotor en respuesta a hierro y citosol	-	-	+	-
144	<i>ARO8</i>	Transaminasa aromática de la ruta de síntesis de alcoholes aromáticos de fusel	+	+	+	-
145	<i>MUQ1</i>	Colina fosfato citidiltransferasa (putativa)	-	-	+	-
146	<i>RPL38</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
147	<i>C2_08930W_A</i>	Proteína de procesos catabólicos ubiquitin dependientes	-	-	+	-
148	<i>LIP4</i>	Lipasa secretada	-	+	-	-
149	<i>ILS1</i>	Isoleucil-tRNA sintetasa (putativa)	+	+	+	+
150	<i>HAT2</i>	Subunidad del complejo Hat1-Hat2 histona acetiltransferasa (putativa)	-	-	+	-
151	<i>C6_04560W_A</i>	Subunidad del complejo de flavoproteína de transferencia de electrones ETF-alfa (putativa)	-	-	+	-
152	<i>VMA5</i>	ATPasa vacuolar H(+) (putativa)	-	-	+	-
153	<i>C2_08160C_A</i>	Citokinesis	-	+	-	+
154	<i>PHM7</i>	Transportador (putativa)	+	-	+	-
155	<i>ARA1</i>	D-Arabinosa deshidrogenasa	-	-	+	-
156	<i>C2_08100W_A</i>	Factor de inducción de apoptosis (putativa)	-	-	+	-
157	<i>RPS10</i>	Biogénesis de Ribosoma	-	-	+	-
158	<i>KRE30</i>	YEF3-subfamilia de proteínas de la familia ABC	-	+	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
159	<i>GDH2</i>	Glutamato deshidrogenasa NAD-específica (putativa)	-	-	+	-
160	<i>PIR1</i>	Proteína de pared celular unida a 1,3-beta-glucano	-	+	-	-
161	<i>C2_07680W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
162	<i>C2_06770W_A</i>	Despolimerización de filamento de actina	-	-	+	-
163	<i>RPL11</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	-
164	<i>PRE2</i>	Subunidad beta-5 del proteasoma (putativa)	-	-	+	-
165	<i>PST1</i>	1,4-benzoquinone reductasa (putativa)	-	-	+	-
166	<i>YPT72</i>	Rab GTPasa monomérica pequeña involucrada en la biogénesis vacuolar	-	-	+	-
167	<i>C2_07010W_A</i>	Proteína localizada en RE	-	-	+	-
168	<i>C2_07100W_A</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> interviene en la regulación positiva de RNA polimerasa II	-	-	+	-
169	<i>RFA2</i>	Factor A de replicación de DNA (putativa)	-	-	+	-
170	<i>RCK2</i>	Proteína quinasa activada por quinasa MAP	-	-	+	-
171	<i>C2_07190C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
172	<i>C2_07220W_A</i>	Proteína de ensamblaje de proteasoma 20S (putativa)	-	-	+	-
173	<i>C2_07290W_A</i>	Desoxihipusina hidroxilasa (putativa)	-	-	+	-
174	<i>CCT5</i>	Chaperona similar a proteína del complejo T1	-	-	+	-
175	<i>ARP3</i>	Proteína dependiente de Myo5p	-	-	+	-
176	<i>WBPI</i>	Subunidad de oligosacariltransferasa (putativa)	-	-	+	-
177	<i>C1_11120C_A</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Gvp36p	-	+	+	-
178	<i>RPL2</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	+
179	<i>RPL82</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
180	<i>ERP5</i>	Proteína implicada en el transporte de ER a Golgi	-	-	+	-
181	<i>UBA4</i>	Proteína activadora de la ubiquitina (putativa)	-	-	+	-
182	<i>RPS17B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
183	<i>C1_10820C_A</i>	Aspartil aminopeptidasa (putativa)	-	+	+	-
184	<i>CDC48</i>	ATPasa microsomal (putativa)	-	+	+	-
185	<i>C1_10730W_A</i>	Función desconocida (putativa)	-	-	+	-
186	<i>MNN2</i>	Alfa-1,2 Manosiltransferasa	-	+	+	-
187	<i>RPL9B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	-
188	<i>URA2</i>	Carbamoilfosfato sintetasa-aspartato-transcarbamilasa bifuncional (putativa)	+	+	+	+
189	<i>MIS11</i>	Precursor de la C1-tetrahidrofolato sintetasa mitocondrial	-	+	+	-
190	<i>CCPI</i>	Citocromo-c peroxidasa N terminal	-	-	+	-
191	<i>DPSI-1</i>	tRNA-Asp sintetasa (putativa)	+	+	+	+
192	<i>SAP8</i>	Aspartil proteasa secretada	+	+	-	+
193	<i>ARC1</i>	Proteína de unión de ácido nucleico G4 (putativa)	-	-	+	-
194	<i>NPL4</i>	Proteína de unión a la ubiquitina (putativa)	-	-	+	-
195	<i>MSI3</i>	Proteína de la familia Hsp70 esencial	+	+	+	+

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
196	<i>ARC35</i>	Subunidad movilidad actina (putativa)	-	-	+	-
197	<i>RGD1</i>	Proteína del activador de la GTPasa	-	-	+	-
198	<i>PGA45</i>	Proteína de pared celular anclada por GPI (putativa)	-	+	+	-
199	<i>C1_05890W_A</i>	Función desconocida	-	+	+	-
200	<i>C1_05780W_A</i>	Componente complejo de remodelación de la cromatina RSC (putativa)	-	-	+	-
201	<i>C1_05720W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
202	<i>C1_05630C_A</i>	Karioferina beta (putativa)	+	+	+	-
203	<i>ARP9</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Arp3p	-	-	+	-
204	<i>GLX3</i>	Glioxalasa independiente de glutathion	-	-	+	-
205	<i>CR_01350C_A</i>	Activador de actividad ATPasa	-	-	+	-
206	<i>LYS12</i>	Homoisocitrato deshidrogenasa	-	+	+	-
207	<i>CSP37</i>	Proteína de la pared celular de hifas	-	+	+	+
208	<i>TRP2</i>	Antranilato sintetasa de la biosíntesis de triptófano (putativa)	-	-	+	-
209	<i>MET6</i>	Metionina sintetasa independiente de la cobalamina	+	+	+	-
210	<i>URA5</i>	Orotate fosforibosiltransferasa (putativa)	-	-	+	-
211	<i>SEC65</i>	Componente de la proteína de detección Señal de Reconocimiento de Partículas (SRP)	-	-	+	-
212	<i>CDC60</i>	Leucil tirosina citosólica sintetasa	+	+	+	-
213	<i>SEC4</i>	Pequeña GTPasa de la familia Rab	+	-	-	-
214	<i>FRS1</i>	Fenilalanil-tRNA sintetasa	-	+	+	-
215	<i>VMA4</i>	H(+) transportadora de la cadena E de ATPasa	-	+	+	-
216	<i>ADH5</i>	Alcohol deshidrogenasa (putativa)	+	+	+	-
217	<i>ECM4</i>	Glutathion S-transferasa citoplásmica	-	-	+	-
218	<i>PHO113</i>	Proteína constitutiva de fosfatasa ácida (putativa)	-	+	-	+
219	<i>YPT31</i>	Tráfico intervesículas en Golgi	-	+	+	-
220	<i>FUR1</i>	Uracil fosforibosiltransferasa	-	-	+	-
221	<i>QCR2</i>	Ubiquinol-citocromo-c reductasa	+	+	+	+
222	<i>CAM1-1</i>	Factor de elongación traducción (putativa)	+	+	+	-
223	<i>RMS1</i>	Lisina metiltransferasa (putativa)	-	-	+	-
224	<i>NCPI</i>	NADPH - citocromo P450 reductasa	-	-	+	-
225	<i>C4_03130W_A</i>	Proteína de GPI transamidasa (putativa)	-	+	-	-
226	<i>RBT7</i>	Proteína con similitud con las enzimas RNasa T2	-	+	-	-
227	<i>SES1</i>	Seril-tRNA sintetasa	+	+	+	-
228	<i>TYS1</i>	tRNA-Tyr sintetasa (putativa)	-	-	+	-
229	<i>ABP1</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Abp1	-	-	+	-
230	<i>CRH11</i>	Transglicosilasa de pared celular anclada por GPI	-	+	+	+
231	<i>ZUO1</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Zuo1	-	-	+	-
232	<i>FAA21</i>	Acil CoA sintetasa	-	-	+	-
233	<i>C4_02780W_A</i>	Chaperonina citosólica del anillo Cct	-	-	+	-
234	<i>C4_02620C_A</i>	Proteína de dominio de la carbohidrato-quinasa	-	-	+	-
235	<i>C4_02470C_A</i>	Procesos catabólicos del proteasoma ubiquitin-independientes	-	-	+	-
236	<i>AHP1</i>	Alquil-hidroperóxido reductasa	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
237	<i>AMS1</i>	Alfa-manosidasa (putativa)	-	-	+	-
238	<i>ID11</i>	Ortólogo con actividad isopentenil-difosfato delta-isomerasa	-	-	+	-
239	<i>ATP7</i>	Subunidad del complejo F1FO-ATPasa (putativa)	-	-	+	-
240	<i>HEM13</i>	Coproporfirinógeno III oxidasa	-	+	+	-
241	<i>RPD3</i>	Histona desacetilasa	-	-	+	-
242	<i>PGM2</i>	Ortologo de <i>S. cerevisiae</i> Pgm2	+	+	+	-
243	<i>RHO1</i>	Pequeña GTPasa de la familia Rho	+	+	+	+
244	<i>RPL28</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	+
245	<i>C4_06620C_A</i>	Función desconocida	-	+	+	+
246	<i>SDH12</i>	Succinato deshidrogenasa	-	-	+	-
247	<i>PDC11</i>	Descarboxilasa	+	+	+	+
248	<i>MET13</i>	Proteína de biosíntesis de metionina (putativa)	-	-	+	-
249	<i>CDC68</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Cdc68	-	-	+	-
250	<i>VMA8</i>	Subunidad H(+)-ATPasa vacuolar (putativa)	-	-	+	-
251	<i>ERG26</i>	C-3 esteroles deshidrogenasa	-	-	+	-
252	<i>C4_06230C_A</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> con actividad Apirasa, SC YND1	-	+	-	-
253	<i>C4_06210C_A</i>	GTPasa (putativa)	-	-	+	-
254	<i>C4_06170C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
255	<i>GSC1</i>	Subunidad esencial de beta-1,3-glucano sintetasa	+	-	+	-
256	<i>C1_02430C_A</i>	Factor de iniciación de la predicción de la traducción	-	-	+	-
257	<i>RPL10</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
258	<i>PMM1</i>	Fosfomanomutasa	-	+	+	-
259	<i>SNZ1</i>	Proteína de fase estacionaria relacionada con la síntesis de vitamina B	+	+	+	+
260	<i>HOM6</i>	Homoserina deshidrogenasa (putativa)	-	+	+	-
261	<i>FRS2</i>	tRNA-Phe sintetasa (putativa)	-	-	+	-
262	<i>C1_02760W_A</i>	Factor de intercambio guanil-nucleótido (putativa)	-	-	+	-
263	<i>TIF34</i>	Factor de iniciación de traducción eIF3 (putativa)	-	-	+	-
264	<i>YKT6</i>	Proteína del complejo vacuolar SNARE (putativa)	-	+	+	-
265	<i>CDC73</i>	Factor de elongación de la transcripción (putativa)	-	-	+	-
266	<i>C1_02970W_A</i>	Aminotransferasa	-	-	+	-
267	<i>XOG1</i>	Exo-1,3-beta-glucanasa	+	+	+	+
268	<i>RPP1A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
269	<i>RPL13</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	+
270	<i>RPS16A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	+
271	<i>RPS1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	+
272	<i>C1_03100W_A</i>	Proteína de unión a lípidos (putativa)	-	-	+	-
273	<i>RPL6</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
274	<i>GGA2</i>	Proteína involucrada en el tráfico de Golgi	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
275	<i>ECM33</i>	Proteína de pared celular anclada por GPI	+	+	+	+
276	<i>CDC12</i>	Septina	-	-	+	-
277	<i>BMH1</i>	Transducción de señal	+	+	+	-
278	<i>ARX1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
279	<i>C1_03310W_A</i>	DNA translocasa (putativa)	-	-	+	-
280	<i>RLI1</i>	Miembro de RNasa L (RLI)	-	-	+	-
281	<i>C1_03370W_A</i>	Proteína de unión a poli (A) (putativa)	-	+	+	-
282	<i>TPS2</i>	Trehalosa-6-fosfato (Tre6P) fosfatasa	-	-	+	-
283	<i>EHT1</i>	Acil-coenzima A: etanol-O-aciltransferasa	-	-	+	-
284	<i>C1_03440C_A</i>	Dominio de aldehído deshidrogenasa	-	-	+	-
285	<i>YPT1</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Ypt1p	-	-	+	-
286	<i>C1_03510C_A</i>	Función desconocida	+	-	+	-
287	<i>RPN3</i>	Proteína de subunidad reguladora no ATPasa de proteasoma (putativa)	-	-	+	-
288	<i>ENG1</i>	Endo-glucanasa-1,3-beta	+	+	+	+
289	<i>UBI3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
290	<i>PDA1</i>	Piruvato deshidrogenasa cadena alfa (putativa)	-	-	+	-
291	<i>TRP4</i>	Enzima de la biosíntesis de aminoácidos	-	-	+	-
292	<i>C2_06550W_A</i>	Función desconocida	-	+	-	-
293	<i>RPT5</i>	26S subunidad reguladora del proteasoma	-	-	+	-
294	<i>C4_06850C_A</i>	MAP1, Metionina amino peptidasa	-	-	+	-
295	<i>CCT6</i>	Chaperonina citosólica Cct (putativa)	-	-	+	-
296	<i>C4_06810C_A</i>	Sintaxina, tráfico intravesicular RE-Golgi	-	-	+	-
297	<i>C4_06800W_A</i>	Cromatina (putativa)	-	-	+	-
298	<i>NOPI</i>	Proteína nucleolar	-	-	+	-
299	<i>C4_06710W_A</i>	Oxidoreductasa dependiente de NADP (putativa)	-	-	+	-
300	<i>LSP1</i>	Endocitosis	+	+	+	+
301	<i>SEC13</i>	Factor de transporte de proteínas (putativa)	-	-	+	-
302	<i>RPN8</i>	Subunidad reguladora del proteasoma 26S (putativa)	-	-	+	-
303	<i>ACH1</i>	Acetil-coA hidrolasa	-	+	+	-
304	<i>C5_01890W_A</i>	Inserción de proteínas ancladas en la membrana ER	-	-	+	-
305	<i>C5_01870W_A</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> alfa-N-acetiltransferasa	-	-	+	-
306	<i>STI1</i>	Proteína que interactúa con Cdc37 y Crk1	-	-	+	-
307	<i>OBPA</i>	Similar a la proteína de unión al oxisterol	-	+	+	-
308	<i>CCT7</i>	Chaperonina citosólica	-	-	+	-
309	<i>CPA2</i>	Carbamoilfosfato sintetasa específica de arginina (putativa)	-	-	+	-
310	<i>ATP3</i>	Subunidad del complejo F1-ATP sintetasa	-	+	+	-
311	<i>CR_01180W_A</i>	F-actina (putativa)	-	-	+	-
312	<i>GSY1</i>	UDP glucosa/almidón glucosiltransferasa	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
313	<i>HMT1</i>	Arginina metiltransferasa de tipo I (PRMT)	-	-	+	-
314	<i>ZPR1</i>	Proteína reguladora con dedos de zinc (putativa)	-	-	+	-
315	<i>C1_01250W_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
316	<i>C1_01300W_A</i>	Tiorredoxina (putativa)	-	-	+	-
317	<i>TIF1</i>	Factor de iniciación de la traducción	+	+	+	+
318	<i>RPS21B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
319	<i>C1_01470W_A</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> , actividad de unión a RNA	-	-	+	-
320	<i>RPS21</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
321	<i>C1_01530C_A</i>	tRNA-Arg sintetasa (putativa)	+	+	+	-
322	<i>C1_01590C_A</i>	Subunidad de RNA polimerasa II B150 (putativa)	-	-	+	-
323	<i>RPS42</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	-	+
324	<i>ISN1</i>	Inosina 5'-monofosfato 5'-nucleotidasa (putativa)	-	-	+	-
325	<i>LSC1</i>	Subunidad succinato-CoA ligasa (putativa)	-	+	+	-
326	<i>ARP8</i>	Reestructuración de cromatina (putativa)	-	-	+	-
327	<i>C3_03410C_A</i>	Glicósido hidrolasa (putativa)	-	-	+	-
328	<i>ADK1</i>	Adenilato quinasa (putativa)	-	-	+	-
329	<i>C6_01890C_A</i>	DEAD-box helicase (putativa)	-	-	+	-
330	<i>SUR7</i>	Proteína necesaria para la pared celular normal	+	+	+	+
331	<i>RPL32</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
332	<i>MAE1</i>	Malato permeasa	-	-	+	-
333	<i>TIF3</i>	Factor de iniciación de la traducción (putativa)	-	-	+	-
334	<i>ANB1</i>	Factor de iniciación de la traducción eIF-5A	-	-	+	-
335	<i>C6_01420C_A</i>	Oxidoreductasa (putativa)	-	-	+	-
336	<i>HOC1</i>	Proteína con semejanza a manosiltransferasas	-	-	+	-
337	<i>C6_02190C_A</i>	Serina/treonina/tirosina quinasa (putativa)	-	-	+	-
338	<i>SAR1</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Sar1	-	+	+	-
339	<i>C6_02230W_A</i>	GTPasa (putativa)	-	-	+	-
340	<i>RPL10A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	-
341	<i>SEC27</i>	Ortólogo con <i>S. cerevisiae</i> , transporte Golgi-RE	-	-	+	-
342	<i>NIP7</i>	Proteína nucleolar (putativa)	-	-	+	-
343	<i>C6_02370C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
344	<i>CHC1</i>	Clathrina cadena pesada	-	-	+	-
345	<i>PRE9</i>	Subunidad alfa3 (C9) del proteasoma 20S	-	-	+	-
346	<i>RPL23A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	+
347	<i>MCR1</i>	NADH-citocromo-b5 reductasa	+	+	+	-
348	<i>CYT1</i>	Citocromo c1	-	+	+	+
349	<i>CKA2</i>	Subunidad alfa catalítica de la proteína quinasa CK2	-	-	+	-
350	<i>MRPL10</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
351	<i>RHO3</i>	Proteína de la familia Rho GTPasa (putativa)	-	+	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
352	<i>ERF1</i>	Factor de liberación de traducción 1 (putativa)	-	-	+	-
353	<i>C2_05160C_A</i>	Ortólogo PUF6, unión a mRNA 3'-UTR regulación de traducción	-	-	+	-
354	<i>CDC21</i>	Timidilato sintetasa (putativa)	-	-	+	-
355	<i>AAT1</i>	Aspartato aminotransferasa	-	+	+	-
356	<i>C2_05270W_A</i>	Karioferina citosólica beta	-	-	+	-
357	<i>RPC40</i>	RNA polimerasa (putativa)	-	-	+	-
358	<i>C2_05410W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
359	<i>CDC19</i>	Piruvato quinasa	+	+	+	+
360	<i>ATP4</i>	Subunidad F0-ATP sintetasa 4 (putativa)	-	+	+	-
361	<i>C2_05530C_A</i>	Ortólogo YRB2 transporte núcleo-citoplásmico	-	-	+	-
362	<i>IPP1</i>	Pirofosfatasa inorgánica (putativa)	-	+	+	-
363	<i>RPT6</i>	Subunidad ATPasa reguladora 19S de proteasoma 26S (putativa)	-	-	+	-
364	<i>TIF4631</i>	Factor de iniciación de traducción eIF4G (putativa)	-	-	+	-
365	<i>UTP15</i>	Subunidad pequeña (SSU) componente de procesoma	-	-	+	-
366	<i>YWP1</i>	Proteína de pared de levadura, secretada	-	+	+	+
367	<i>RSP5</i>	Ubiquitina ligasa de la familia NEDD4 (putativa)	-	-	+	-
368	<i>C4_00020W_A</i>	Subunidad H(+)-ATPasa vacuolar (putativa)	-	+	+	-
369	<i>SUN41</i>	Glicosidasa de pared celular	+	+	+	+
370	<i>CTR1</i>	Transportador de cobre	+	-	+	-
371	<i>C6_00760W_A</i>	Ortólogo FES1 con actividad como factor de intercambio nucleótido-ubiquitina	-	-	+	-
372	<i>PGK1</i>	Fosfoglicerato quinasa	+	+	+	+
373	<i>GAL10</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	-	-	+	-
374	<i>C1_02220C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
375	<i>C1_02240W_A</i>	Ortólogo KAP95 Beta-Karioferina, transporte nuclear	-	-	+	-
376	<i>AGE3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
377	<i>C1_02330C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
378	<i>TOM70</i>	Importación de proteínas en la membrana interna mitocondrial	-	+	+	-
379	<i>YHB1</i>	Óxido nítrico dioxigenasa	+	+	+	-
380	<i>SAP2</i>	Aspartil proteinasa	-	+	-	-
381	<i>PHO112</i>	Proteína constitutiva de fosfatasa ácida (putativa)	-	+	-	+
382	<i>IDP2</i>	Isocitrato deshidrogenasa	+	+	+	-
383	<i>C4_00070C_A</i>	Proteína de procesos catabólicos ubiquitin-dependientes	+	+	-	-
384	<i>RAX2</i>	Proteína de membrana involucrada en el crecimiento de las hifas	-	+	-	-
385	<i>PEP1</i>	Receptor de clasificación transmembrana tipo I para múltiples hidrolasas vacuolares	-	+	+	-
386	<i>RPL30</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	-
387	<i>RPL24A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
388	<i>C4_04870C_A</i>	Ortólogo PAT, unión a RNAm	-	-	+	-
389	<i>C4_04820C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
390	<i>C4_04800W_A</i>	Ortólogo RTN1 mantenimiento de la red tubular del retículo endoplásmico	+	+	+	-
391	<i>C4_04720W_A</i>	Ortólogo con actividad como metilnetetrahidrofolato deshidrogenasa (NAD ⁺)	-	-	+	-
392	<i>SSZ1</i>	Hsp70 chaperona (putativa)	-	+	+	-
393	<i>TEF2</i>	Factor 1-alfa de traducción elongación	+	+	+	+
394	<i>PHR1</i>	Glicosidasa (actúa sobre β-1,3-glucano antes de la unión β-1,6-glucano)	+	+	+	+
395	<i>EFB1</i>	Traducción elongación factor EF-1 beta	-	-	+	-
396	<i>SAP10</i>	Aspartil proteasa secretada	-	+	-	-
397	<i>GCV2</i>	Subunidad P de la glicina descarboxilasa	-	-	+	-
398	<i>CDC28</i>	Proteína quinasa dependiente de ciclina	-	-	+	-
399	<i>SIS1</i>	Tipo II HSP40 co-chaperona (putativa)	-	-	+	-
400	<i>RPL7</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
401	<i>GCR3</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Gcr3	-	-	+	-
402	<i>ADE13</i>	Adenilosuccinato liasa	-	+	+	-
403	<i>PGII</i>	Glucosa-6-fosfato isomerasa	+	+	+	+
404	<i>SCW11</i>	Proteína de la pared celular	+	+	+	+
405	<i>CHT2</i>	Quitinasa unida a GPI	+	+	+	+
406	<i>CDC42</i>	GTPasa tipo Rho	-	+	-	-
407	<i>SAH1</i>	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa	+	+	+	+
408	<i>C5_04290C_A</i>	Ortólogo CD33 factor de iniciación de traducción	-	-	+	-
409	<i>C5_04300C_A</i>	Metalodipeptidasa (putativa)	-	-	+	-
410	<i>C5_04470C_A</i>	Proteína de unión al RNA	-	-	+	-
411	<i>URA7</i>	CTP sintetasa 1	-	-	+	-
412	<i>RPL43A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
413	<i>C5_04640C_A</i>	Ortólogo YTA7 unión a cromatina	-	-	+	-
414	<i>ENO1</i>	Enolasa	+	+	+	+
415	<i>MES1</i>	Metionil-tRNA sintetasa citoplasmática	-	-	+	-
416	<i>SSD1</i>	Proteína de resistencia a los péptidos antimicrobianos del huésped	-	-	+	-
417	<i>HAS1</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Has1p	-	-	+	-
418	<i>PFK1</i>	Fosfofructokinasa subunidad alfa	+	+	+	-
419	<i>C5_04900C_A</i>	Proteína de traducción	-	-	+	-
420	<i>C5_04950C_A</i>	Factor de inicio de la transcripción BTF3	-	-	+	-
421	<i>C1_08540C_A</i>	Proteína quinasa serina/treonina (putativa)	-	-	+	-
422	<i>C5_05020C_A</i>	Dolichil-difosfoligosacárido-proteína glicosiltransferasa	-	+	-	-
423	<i>ADH1</i>	Alcohol deshidrogenasa	+	+	+	+
424	<i>CCT3</i>	Chaperonina citosólica (putativa)	-	-	+	-
425	<i>TCP1</i>	Subunidad del complejo T que contiene chaperonina	-	-	+	-
426	<i>C5_05230C_A</i>	Ubiquinol-citocromo-c reductasa (putativa)	+	+	+	+
427	<i>C5_05250C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
428	<i>HIS1</i>	ATP fosforribosil transferasa	-	-	+	-
429	<i>C5_05350W_A</i>	Ortólogo PRI1 con actividad DNA primasa	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
430	<i>RPN5</i>	Componente de señalosoma COP9 (putativa)	-	-	+	-
431	<i>PGA4</i>	Proteína beta-1,3 glucosil transferasa de superficie celular anclada por GPI	+	+	+	+
432	<i>HTS1</i>	tRNA-His sintetasa (putativa)	-	+	+	-
433	<i>ARO4</i>	3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintetasa	-	-	+	-
434	<i>GCD6</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Gcd6	-	-	+	-
435	<i>MET10</i>	Sulfito reductasa	-	-	+	-
436	<i>SGT1</i>	Proteína co-chaperona (putativa)	-	-	+	-
437	<i>PES1</i>	Homólogo de la proteína “pescadillo”	-	-	+	-
438	<i>ECM17</i>	Sulfito reductasa subunidad beta (putativa)	-	-	+	-
439	<i>RIB4</i>	Catálisis de la síntesis de riboflavina	-	-	+	-
440	<i>RPN10</i>	Partícula reguladora 19S del proteasoma 26S (putativa)	-	-	+	-
441	<i>C5_01540W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
442	<i>CEF3</i>	Factor 3 de traducción elongación	+	+	+	+
443	<i>C5_01590W_A</i>	Activadora de NEDD8	-	+	-	-
444	<i>HIS5</i>	Histidinol-fosfato aminotransferasa (putativa)	-	-	+	-
445	<i>RPS13</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	+
446	<i>FCA1</i>	Citosine desaminasa	-	-	+	-
447	<i>GCD11</i>	Subunidad gamma del factor de iniciación de la traducción eIF2	-	-	+	-
448	<i>C5_02210W_A</i>	Inserción de proteínas ancladas en la membrana ER	-	-	+	-
449	<i>C5_02230W_A</i>	Subunidad beta7 de proteasoma 20S	-	-	+	-
450	<i>THR4</i>	Treonina sintetasa (putativa)	-	-	+	-
451	<i>RET2</i>	Subunidad Delta del complejo de revestimiento (COPI)	-	-	+	-
452	<i>TRP99</i>	Peroxidasa de tiorredoxina/alquil hidroperóxido reductasa (putativa)	-	-	+	-
453	<i>C5_02380W_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
454	<i>TIF5</i>	Factor de iniciación de la traducción (putativa)	-	-	+	-
455	<i>MNN1</i>	Alfa 1,3-manosiltransferasa (putativa)	-	+	-	+
456	<i>C5_02660C_A</i>	Ortólogo EIF6 iniciación de la traducción	-	-	+	-
457	<i>GRP2</i>	Metilglioxal reductasa	-	-	+	-
458	<i>YNK1</i>	Nucleósido difosfato quinasa (NDP quinasa)	-	-	+	-
459	<i>GRE3</i>	D-xilosa reductasa (putativa)	-	-	+	-
460	<i>RPS5</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
461	<i>VPS4</i>	AAA-ATPasa implicada en el transporte de MVB a la vacuola y desmontaje del complejo ESCRT-III	-	-	+	-
462	<i>PRD1</i>	Proteasa (putativa)	-	-	+	-
463	<i>MCM2</i>	Proteína fosforilada de función desconocida	-	-	+	-
464	<i>GRS1</i>	tRNA-Gly sintetasa (putativa)	+	+	+	+
465	<i>TAL1</i>	Transaldolasa	+	+	+	+
466	<i>CR_03760W_A</i>	Ortólogo de NNT1 actividad metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
467	<i>RPS30</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
468	<i>VTC3</i>	Polifosfato sintetasa (putativa)	-	-	+	-
469	<i>CR_03600C_A</i>	Ortólogo de RNT3, mecanismos de transporte de vesícula de Golgi	-	-	+	-
470	<i>CIT1</i>	Citrato sintetasa	-	+	+	-
471	<i>CR_03530W_A</i>	Proteína de la membrana interna mitocondrial	-	-	+	-
472	<i>RPT1</i>	Subunidad reguladora del proteasoma 26S	-	-	+	-
473	<i>SKP1</i>	Subunidad D del complejo de proteína cinetocora CBF3 (putativa)	-	-	+	-
474	<i>PHO15</i>	4-nitrofenil fosfatasa	-	-	+	-
475	<i>CCS1</i>	Chaperona de cobre involucrado en la activación y protección de superóxido dismutasa Sod1p	-	-	+	-
476	<i>RIA1</i>	Factor de elongación de traducción (putativa)	-	-	+	-
477	<i>KTR4</i>	Manosiltransferasa	-	+	+	-
478	<i>CSH1</i>	Aldo-ceto reductasa	-	+	+	-
479	<i>C1_04040C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
480	<i>C2_04620W_A</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Swi3	-	-	+	-
481	<i>RPL17B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
482	<i>ERG20</i>	Farnesil pirofosfato sintetasa (putativa)	+	-	+	-
483	<i>C2_04570W_A</i>	Ortólogo EBP2, maduración de ribosomas	-	-	+	-
484	<i>NDH51</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa complejo I subunidad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	-	-	+	-
485	<i>LYS22</i>	Homocitrato sintetasa (putativa)	-	+	+	-
486	<i>C2_04370W_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
487	<i>HGT1</i>	Transportador de glucosa MFS de alta afinidad	+	-	-	-
488	<i>C1_01900C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
489	<i>CYS4</i>	Cistationine beta-sintetasa	+	+	+	-
490	<i>BFR1</i>	Proteína implicada en el mantenimiento de la ploidía normal	-	-	+	-
491	<i>C4_02260C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
492	<i>BGL2</i>	1,3-beta-glucosiltransferasa de la pared celular	+	+	+	+
493	<i>HGH1</i>	Proteína relacionada con HMG1 / 2 (putativa)	-	-	+	-
494	<i>CAT2</i>	Carnitina acetil transferasa	-	-	+	-
495	<i>MDH1-1</i>	Precursor de malato deshidrogenasa	+	+	+	+
496	<i>POL30</i>	Similar al antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA)	-	-	+	-
497	<i>FBA1</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa	+	+	+	+
498	<i>C4_01730C_A</i>	Ortólogo relacionado con mRNA citoplasmático	-	-	+	-
499	<i>RPL20B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
500	<i>C4_01510W_A</i>	Ortólogo tiene actividad carbonil reductasa (NADPH)	-	-	+	-
501	<i>NIP1</i>	Factor de iniciación de la traducción (putativa)	-	+	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
502	<i>NMT1</i>	Myristoil - CoA: proteína N - miristoiltransferasa	-	-	+	-
503	<i>ILV6</i>	Subunidad reguladora de acetolacetato sintetasa (4putativa)	-	-	+	-
504	<i>RPS6A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
505	<i>DAG7</i>	Proteína secretora	-	+	+	+
506	<i>ARO1</i>	Biosíntesis de corismato (putativa)	-	-	+	-
507	<i>C4_00860C_A</i>	Función desconocida	-	+	-	+
508	<i>GDH3</i>	NADP-glutamato deshidrogenasa	-	-	+	-
509	<i>TRP5</i>	Triptofano sintetasa	-	+	+	-
510	<i>SEC24</i>	Proteína con un posible papel de transporte en ER a Golgi	-	-	+	-
511	<i>ZWF1</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	-	+	+	-
512	<i>KEX2</i>	Proteasa similar a subtilisina (proprotein convertasa)	-	+	-	-
513	<i>COX5</i>	Subunidad V de citocromo oxidasa	-	+	+	+
514	<i>DAK2</i>	Dihidroxiacetona quinasa (putativa)	-	-	+	-
515	<i>ARG5,6</i>	Enzima de biosíntesis de arginina	-	-	+	-
516	<i>GUA1</i>	GMP sintetasa (putativa)	-	+	+	-
517	<i>YTM1</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Ytm1p	-	-	+	-
518	<i>RPT4</i>	Subunidad reguladora del proteasoma 26S	-	-	+	-
519	<i>LIP6</i>	Lipasa secretada	-	+	-	-
520	<i>IDH1</i>	Subunidad mitocondrial NAD-isocitrato deshidrogenasa subunidad 1 (putativa)	-	+	+	-
521	<i>ADE12</i>	Adenilsuccinato sintetasa	-	+	+	-
522	<i>DOA1</i>	Proteína de repetición de WD	-	-	+	-
523	<i>MTS1</i>	Esfingolípido C9-metiltransferasa	-	-	+	-
524	<i>MLS1</i>	Malato sintetasa	+	+	+	+
525	<i>URA1</i>	Dihidroorotato deshidrogenasa	-	-	+	-
526	<i>C1_09850C_A</i>	Ortólogo de CUB1 citosólica implicada en reparación DNA	-	-	+	-
527	<i>DBP3</i>	DEAD-box RNA helicasa (putativa)	-	-	+	-
528	<i>ERO1</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> , tiol-oxidasa	-	-	+	-
529	<i>MEX67</i>	Proteína de exportación nuclear	-	-	+	-
530	<i>MIR1</i>	Transportador de fosfato mitocondrial (putativa)	+	+	+	+
531	<i>SFH5</i>	Transportador de fosfatidilinositol (putativa)	-	-	+	-
532	<i>C1_10280C_A</i>	Función desconocida (putativa)	-	+	+	-
533	<i>GCA1</i>	Glucoamilasa asociada a la membrana extracelular / plasmática	+	+	-	+
534	<i>CR_04080C_A</i>	SEC63 complejo de translocación de proteínas de Retículo endoplásmico	-	-	+	-
535	<i>ADE17</i>	5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribotide transformilasa	+	+	+	-
536	<i>RPL15A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	+
537	<i>C1_13030C_A</i>	tRNA-Cys sintetasa (putativa)	-	-	+	-
538	<i>RPL14</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	-
539	<i>PSA2</i>	Manosa-1-fosfato guaniltransferasa Hap43	+	-	+	-
540	<i>C1_13270W_A</i>	ATPasa putativa	-	-	+	-
541	<i>RPN1</i>	Subunidad reguladora 19S del proteasoma 26S (putativa)	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
542	<i>KEM1</i>	Exoribonucleasa de gránulos de estrés citoplásmico	-	-	+	-
543	<i>HYR1</i>	Proteína de pared de células hifas fijada a GPI	+	+	-	-
544	<i>HSP70</i>	Hsp70 chaperona (putativa)	+	+	+	+
545	<i>SEC18</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Sec18p	-	-	+	-
546	<i>OSM2</i>	Fumarato reductasa mitocondrial (putativa)	-	-	+	-
547	<i>C1_13690C_A</i>	Ortólogo SNC2 interviene en mecanismo transporte Golgi-membrana plasmática	-	-	+	-
548	<i>ACT1</i>	Actina	+	+	+	+
549	<i>CR_04170W_A</i>	Ortólogo NOP2 con actividad RNA metiltransferasa	-	-	+	-
550	<i>MYO2</i>	Miosina clase V	-	-	+	-
551	<i>PDX1</i>	Proteína del complejo piruvato deshidrogenasa X	-	-	+	-
552	<i>GND1</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa	+	+	+	+
553	<i>MET3</i>	Sulfurosa de ATP	-	-	+	-
554	<i>SIM1</i>	Proteína similar a la adhesina	+	+	+	+
555	<i>CR_04180C_A</i>	Ortólogo ARP5 con actividad 3'-5' DNA helicasa ATP-dependiente	-	-	+	-
556	<i>SRV2</i>	Proteína asociada a la adenilato ciclasa	-	-	+	-
557	<i>SMI1</i>	Proteína implicada en la biosíntesis de la pared celular	-	-	+	-
558	<i>YDJ1</i>	HSP40 co-chaperona Tipo I (putativa)	-	-	+	-
559	<i>ADE5,7</i>	Fosforibosilamina-glicinaligasa	-	+	+	-
560	<i>COI1</i>	Proteína externa	-	+	+	+
561	<i>MRPL3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
562	<i>DPM1</i>	Dolichol fosfato manosa sintetasa (putativa)	-	-	+	-
563	<i>C1_08050W_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
564	<i>CDR4</i>	Transportador de la superfamilia ABC (putativa)	+	-	-	-
565	<i>FUN12</i>	Homólogo funcional del factor de iniciación de la traducción Fun12 de <i>S. cerevisiae</i> eIF5B	-	-	+	-
566	<i>DRG1</i>	Miembro de la familia DRG de proteínas de unión a GTP	-	-	+	-
567	<i>C1_08110W_A</i>	Ortólogo PSE1 (karioferina/importina)	-	-	+	-
568	<i>C1_08180C_A</i>	Proteína de unión a oxisterol (putativa)	-	-	+	-
569	<i>C1_04970W_A</i>	Ortólogo CIU1 inicio de la traducción	-	-	+	-
570	<i>TKL1</i>	Transketolasa (putativa)	+	+	+	+
571	<i>ADH2</i>	Alcohol deshidrogenasa	+	+	+	+
572	<i>SDS24</i>	Proteínas similares a <i>S. cerevisiae</i> Sds24 de la yema	-	-	+	-
573	<i>PDII</i>	Proteína disulfuro-isomerasa (putativa)	-	+	+	+
574	<i>C7_02930C_A</i>	Ortólogo interviene en la maduración de SSU-rRNA	-	-	+	-
575	<i>LIP9</i>	Lipasa secretada	-	+	-	-
576	<i>ERG5</i>	Esterol desaturasa C-22 (putativa)	-	-	+	-
577	<i>CR_04300W_A</i>	Ortólogo NCL1 con actividad de tRNA (citosina-5)-metiltransferasa	-	-	+	-
578	<i>PRX1</i>	Tioredoxin peroxidasa	-	+	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
579	<i>POL3</i>	Subunidad grande de DNA polimerasa III	-	-	+	-
580	<i>C7_02780W_A</i>	Factor de intercambio de guanilo-nucleótido Ran (putativa)	-	-	+	-
581	<i>URA6</i>	Ortólogo <i>S. cerevisiae</i> con actividad adenilato quinasa	-	-	+	-
582	<i>APE2</i>	Arginina neutra	-	+	+	-
583	<i>NOP4</i>	Proteína nucleolar (putativa)	-	-	+	-
584	<i>IDP1</i>	Isocitrato deshidrogenasa (putativa)	-	-	+	-
585	<i>PIM1</i>	Proteasa Lon dependiente de ATP	-	-	+	-
586	<i>RPL27A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
587	<i>WRS1</i>	tRNA-Trp sintetasa (putativa)	-	-	+	-
588	<i>RIB3</i>	3,4-Dihidroxi-2-butanone 4-fosfato sintetasa	-	-	+	-
589	<i>MRPS9</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
590	<i>CSI2</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
591	<i>C1_12280C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
592	<i>C1_12240C_A</i>	Alanina tRNA ligasa	-	-	+	-
593	<i>TRP3</i>	Indol-3-glicerol-fosfato sintetasa y antranilato sintetasa (putativa)	-	-	+	-
594	<i>RPN2</i>	Componente de la subunidad 26S del proteasoma	-	-	+	-
595	<i>SER33</i>	Enzima de la biosíntesis de aminoácidos	+	+	+	-
596	<i>SEC26</i>	Proteína secretora de las vesículas	-	-	+	-
597	<i>C1_11860W_A</i>	Proteína G de unión a RNA	-	+	+	-
598	<i>PST3</i>	Flavodoxina (putativa)	+	+	+	+
599	<i>YCP4</i>	Flavodoxina (putativa)	-	-	+	-
600	<i>IFE2</i>	Alcohol deshidrogenasa (putativa)	-	+	+	-
601	<i>AXL2</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Axl2	-	+	-	-
602	<i>PDB1</i>	Piruvato deshidrogenasa (putativa)	-	+	+	-
603	<i>RHD3</i>	Proteína de pared celular de levaduras (Pga29) anclada por GPI	+	+	+	+
604	<i>C2_10460C_A</i>	Ortólogo MET12 con actividad metilnetetrahidrofolato reductasa	-	-	+	-
605	<i>MDH1-3</i>	Malato deshidrogenasa	-	-	+	-
606	<i>GCN1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
607	<i>RPS4A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
608	<i>TPS3</i>	Subunidad reguladora de trehalosa-fosfato sintetasa pronosticada	-	-	+	-
609	<i>SCL1</i>	Subunidad proteasoma YC7alfa	-	-	+	-
610	<i>PMA1</i>	H(+)-ATPasa de la membrana plasmática	+	+	+	+
611	<i>C3_00640W_A</i>	Cisteína sulfinato descarboxilasa (putativa)	-	-	+	-
612	<i>RHD1</i>	Beta-manosiltransferasa (putativa)	-	+	+	-
613	<i>DOT5</i>	Tiol peroxidasa nuclear (putativa)	-	-	+	-
614	<i>ATP5</i>	F0-ATP sintetasa subunidad FO B (putativa)	-	-	+	-
615	<i>HXK2</i>	Hexokinasa II	+	+	+	-
616	<i>FUM11</i>	Fumarato hidratase	-	-	+	-
617	<i>RHR2</i>	Glicerol 3-fosfatasa	-	-	+	-
618	<i>PRE6</i>	Subunidad alfa-4 del proteasoma (putativa)	-	+	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
619	<i>RPT2</i>	ATPasa de la partícula reguladora 19S del proteasoma 26S (putativa)	-	-	+	-
620	<i>C3_00130C_A</i>	Proteína reguladora de la poliadenilación del RNAm	-	-	+	-
621	<i>RPS24</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
622	<i>CDC10</i>	Septina	-	-	+	-
623	<i>ILV1</i>	Treonina deshidratasa (putativa)	-	-	+	-
624	<i>SER1</i>	3-fosfoserina aminotransferasa (putativa)	-	+	+	-
625	<i>GSP1</i>	Pequeña proteína G de RAN	+	+	+	+
626	<i>PDX3</i>	Piridoxamina-fosfato oxidasa	-	-	+	-
627	<i>HIS7</i>	Imidazol glicerol fosfato sintetasa (putativa)	-	-	+	-
628	<i>ENP1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
629	<i>C6_02470W_A</i>	Ortólogo SRP72 componente del complejo SRP en secreción de proteínas RE	-	-	+	-
630	<i>C6_02480W_A</i>	Alcohol deshidrogenasa	-	-	+	-
631	<i>GCV1</i>	Subunidad T de la glicina descarboxilasa (putativa)	-	-	+	-
632	<i>C6_02560W_A</i>	Oxidoreductasa (putativa)	-	+	+	-
633	<i>CDC37</i>	Chaperona Crk1p	-	-	+	-
634	<i>C6_02690C_A</i>	Proteína con semejanza a Nrd1p de <i>S. pombe</i>	-	-	+	-
635	<i>SAC6</i>	Proteína de unión de filamentos de actina	-	+	+	-
636	<i>MRT4</i>	Implicada en la degradación de RNAm (putativa)	-	-	+	-
637	<i>C6_02940C_A</i>	Función desconocida	-	+	-	-
638	<i>GUT1</i>	Glicerol quinasa (putativa)	-	-	+	-
639	<i>SAP5</i>	Aspartil proteinasa secretada	+	-	-	-
640	<i>ADO1</i>	Adenosina quinasa	-	-	+	-
641	<i>C6_03320W_A</i>	Proteína enriquecida en fase estacionaria	-	-	+	-
642	<i>GLC3</i>	Enzima de ramificación de 1,4-glucano (putativa)	-	-	+	-
643	<i>ARP4</i>	Subunidad del complejo de histona acetiltransferasa NuA4	-	-	+	-
644	<i>C6_03380W_A</i>	Ortólogo Hek2/Khd1 de <i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	-
645	<i>QCR7</i>	Ubiquinol-citocromo-c reductasa (putativa)	-	-	+	-
646	<i>APA2</i>	ATP adenililtransferasa II putativa	-	-	+	-
647	<i>CAR2</i>	Ornitina aminotransferasa	+	+	+	-
648	<i>MET15</i>	O-acetilhomoserina O-acetilserina sulfhidrilasa	+	+	+	-
649	<i>SUB2</i>	TREX interviene en la exportación de mRNA nuclear (putativa)	-	+	+	-
650	<i>PRO3</i>	Delta 1-pirrolina-5-carboxilato reductasa	-	-	+	-
651	<i>ATP2</i>	F1 subunidad beta del complejo F1F0 ATPasa	+	+	+	+
652	<i>C4_00420C_A</i>	Ortólogo <i>S. cerevisiae</i> interviene en polimerización despolimerización	-	-	+	-
653	<i>C5_00150C_A</i>	Ortólogo SRP1 interviene en transporte de proteínas y localización en proteasoma	-	-	+	-
654	<i>THS1</i>	Treonil-tRNA sintetasa (putativa)	-	+	+	+

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
655	<i>C5_00100C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
656	<i>C5_00080C_A</i>	Epsilon-COP subunidad del coatomer	-	-	+	-
657	<i>CDC11</i>	Septina	-	-	+	-
658	<i>C5_00030W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
659	<i>NOG2</i>	GTPasa nucleolar (putativa)	-	-	+	-
660	<i>ALS1</i>	Adhesina	-	+	-	-
661	<i>ALAI</i>	Alanil-tRNA sintetasa	-	+	+	-
662	<i>C6_03730C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
663	<i>SHM2</i>	Serina hidroximetiltransferasa citoplasmática	-	+	+	-
664	<i>C6_03820C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
665	<i>C5_00750C_A</i>	Tirosina fosfatasa	-	-	+	-
666	<i>PBP2</i>	Proteína de unión a RNA (putativa)	-	-	+	-
667	<i>C6_03960W_A</i>	Dipeptidil-peptidasa III (putativa)	-	-	+	-
668	<i>TOM1</i>	E3 ubiquitina ligasa (putativa)	-	-	+	-
669	<i>RNR1</i>	Ribonucleótido reductasa subunidad grande	-	-	+	-
670	<i>C2_03130W_A</i>	Ortólogo SMF1 proteína-arginina omega-N monometiltransferasa	-	-	+	-
671	<i>EFT2</i>	Factor de Elongación 2 (eEF2)	+	+	+	+
672	<i>IDH2</i>	Subunidad mitocondrial de NAD-isocitrate deshidrogenasa (putativa)	-	+	+	-
673	<i>PR26</i>	Proteína de la subunidad reguladora proteasa 26S de <i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	-
674	<i>PLC2</i>	Fosfatidilinositol (PtdIns)-fosfolipasa C específica (PI-PLC)	-	-	+	-
675	<i>RNR21</i>	Ribonucleósido-difosfato reductasa	-	-	+	-
676	<i>HYU1</i>	Hidantoína (putativa)	-	-	+	-
677	<i>ALD5</i>	NAD-aldehído deshidrogenasa	-	+	+	-
678	<i>C5_00790C_A</i>	Proteína de unión a RNA (putativa)	-	-	+	-
679	<i>C2_02930C_A</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Ett1	-	-	+	-
680	<i>SGT2</i>	Función desconocida	-	-	+	-
681	<i>LHS1</i>	Proteína similar a Hsp70p de <i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+
682	<i>HPT1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
683	<i>C2_02730W_A</i>	Ortólogo UFD1 con actividad de unión a la poliubiquitina	-	-	+	-
684	<i>C2_02720W_A</i>	Ortólogo SMX1 con actividad de transportador de proteínas de citoplasma a núcleo	-	-	+	-
685	<i>SER2</i>	Ortólogo SER2 con actividad de fosfatasa fosfatasa	-	-	+	-
686	<i>NOC2</i>	Proteína del complejo nucleolar (putativa)	-	-	+	-
687	<i>SBP1</i>	Similar a las proteínas de unión a RNA	-	-	+	-
688	<i>EGD2</i>	Síntesis de proteína	-	-	+	-
689	<i>C3_04380C_A</i>	Maduración RNAm (putativa)	-	+	-	-
690	<i>VPS21</i>	GTPasa de Rab implicada en transporte de proteínas a vacuola	-	-	+	-
691	<i>RIP1</i>	Ubiquinol citocromo c-reductasa (putativa)	-	-	+	-
692	<i>REI1</i>	Factor citoplásmico pre-60S (putativa)	-	-	+	-
693	<i>RPL19A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
694	<i>ADE2</i>	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
695	<i>MAK21</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
696	<i>C3_04590W_A</i>	Transporte de RNAm al citoplasma	-	-	+	-
697	<i>RPS15</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	+
698	<i>C3_04810C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
699	<i>FAS2</i>	Subunidad alfa de la sintetasa de ácidos grasos	+	+	+	+
700	<i>ARF2</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	-
701	<i>RPL35</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
702	<i>RDH1</i>	Inhibidor de la disociación del PIB rho (putativa)	-	-	+	-
703	<i>RPL18</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
704	<i>C3_05150W_A</i>	Subunidad del factor I (putativa)	-	-	+	-
705	<i>MCA1</i>	Cisteína proteasa con similitud con <i>S. cerevisiae</i> Mca1p (putativa)	-	-	+	-
706	<i>RPS19A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	+
707	<i>CDR1</i>	Transportador de la superfamilia ABC	+	-	-	-
708	<i>SAP3</i>	Aspartil proteinasa secretada	+	+	-	-
709	<i>RPL8B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
710	<i>SIN3</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Sin3p	-	-	+	-
711	<i>IMP4</i>	Maduración de RNAr 18S (putativa)	-	-	+	-
712	<i>CMP1</i>	Subunidad catalítica de la calcineurina	-	-	+	-
713	<i>TUB2</i>	Beta-tubulina	-	+	+	+
714	<i>TUF1</i>	Factor de elongación de la traducción	-	+	+	-
715	<i>GCN20</i>	YEF3-subfamilia de proteínas de la familia ABC	-	-	+	-
716	<i>UBP6</i>	Proteasa específica de ubiquitina putativa del proteasoma 26S	-	-	+	-
717	<i>C1_00420W_A</i>	RNA polimerasa II subunidad holoenzima/mediación	-	-	+	-
718	<i>C1_00410C_A</i>	Hexadecenal deshidrogenasa	-	-	+	-
719	<i>SVF1</i>	Factor de supervivencia (putativa)	-	-	+	-
720	<i>PHR2</i>	Glicosidasa	+	+	+	+
721	<i>RPL16A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	-
722	<i>CCT8</i>	Chaperonina con complejoT (TP1)	-	+	+	-
723	<i>MVD</i>	Mevalonato difosfato descarboxilasa	-	-	+	-
724	<i>CR_07460C_A</i>	Función desconocida	-	+	+	+
725	<i>KGD2</i>	Dihidrolipoamida S-succiniltransferasa (putativa)	-	-	+	-
726	<i>LPD1</i>	Dihidrolipoamida deshidrogenasa (putativa)	-	-	+	-
727	<i>CR_07320C_A</i>	Ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> Mrp14	-	-	+	-
728	<i>ARC15</i>	Subunidad del complejo ARP2/3 (putativa)	-	-	+	-
729	<i>C3_00850C_A</i>	Endocitosis	-	-	+	-
730	<i>KGD1</i>	2-oxoglutarato deshidrogenasa (putativa)	-	-	+	-
731	<i>SRB1</i>	GDP-manosa pirofosforilasa	+	+	+	+
732	<i>DHH1</i>	RNA helicasa (putativa)	-	-	+	-
733	<i>RBT4</i>	Proteína de la familia Pry	-	+	+	+
734	<i>SUI2</i>	Factor de iniciación de traducción eIF2 cadena alfa	-	+	+	-
735	<i>ATC1</i>	Trehalasa ácida de pared celular	-	+	+	+

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
736	<i>PGA63</i>	Transporte de RE a Golgi	-	-	+	-
737	<i>CAT1</i>	Catalasa	-	+	+	-
738	<i>MRPL19</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
739	<i>C1_06660W_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
740	<i>RPS23A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	-
741	<i>GLT1</i>	Glutamato sintetasa (putativa)	-	+	+	-
742	<i>C1_06480C_A</i>	Ortólogo YIP3 transporte RE a Golgi	-	-	+	-
743	<i>RPS22A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	-
744	<i>RPS14B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	+
745	<i>GLC7</i>	Subunidad catalítica de ser-tre fosfatasa tipo I (putativa)	-	+	+	-
746	<i>RPS27</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
747	<i>AAT21</i>	Aspartato aminotransferasa (putativa)	-	+	+	-
748	<i>RPS3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
749	<i>ADE6</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	-
750	<i>VID27</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Vid27p	-	-	+	-
751	<i>HET1</i>	Proteína de transferencia de esfingolípidos (putativa)	+	+	+	+
752	<i>RPG1A</i>	Factor de iniciación de la traducción (putativa)	-	+	+	-
753	<i>SSB1</i>	Proteína de choque térmico de la familia Hsp70	+	+	+	+
754	<i>SDH2</i>	Succinato deshidrogenasa	-	-	+	-
755	<i>RPS20</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	-
756	<i>FDH1</i>	Formato deshidrogenasa	+	+	+	-
757	<i>ACO1</i>	Aconitasa	-	+	+	+
758	<i>HSP104</i>	Proteína de choque térmico	+	+	+	-
759	<i>CYS3</i>	Cistationina gamma-liasa	-	-	+	-
760	<i>CR_08350W_A</i>	Ortólogo SIL1 traslocación proteína a RE	-	-	+	-
761	<i>RPP2A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
762	<i>CR_08550W_A</i>	Ortólogo FBP26 con actividad de fructosa-2,6-bisfosfato 2-fosfatasa	-	-	+	-
763	<i>CR_08560C_A</i>	Ortólogo UBC9 con actividad SUMO transferasa	-	-	+	-
764	<i>VMA13</i>	ATPasa transportadora de protones	-	-	+	-
765	<i>GLN1</i>	Glutamato sintetasa (putativa)	-	-	+	-
766	<i>CYP1</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	-	+	+	-
767	<i>C7_02340C_A</i>	Ortólogo TRM82 con actividad tRNA (guanina-N7)-metiltransferasa	-	-	+	-
768	<i>YPS7</i>	Endopeptidasa de tipo aspártico (putativa)	-	+	-	-
769	<i>FMP45</i>	Proteína de membrana	+	+	-	-
770	<i>C7_02100W_A</i>	Proteína de unión a DNA (putativa)	-	-	+	-
771	<i>HSP90</i>	Chaperona	+	+	+	+
772	<i>TOM40</i>	Proteína implicada en la importación de proteínas mitocondriales	-	-	+	-
773	<i>NUC2</i>	NADH-ubiquinona oxidoreductasa (putativa)	-	-	+	-
774	<i>CRN1</i>	Coronina	-	-	+	-
775	<i>RVB2</i>	Modulador de transcripción (putativa)	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>ΔgIx3</i>
776	<i>PFK2</i>	Subunidad beta de la fosfofructoquinasa	+	+	+	-
777	<i>RPL5</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
778	<i>C7_01700W_A</i>	Regulador de la calcineurina	-	-	+	-
779	<i>C7_01650W_A</i>	Subunidad del factor de iniciación de la transcripción de RNA polimerasa III (TFIIIC)	-	-	+	-
780	<i>LAT1</i>	Componente de la dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2) del complejo piruvato deshidrogenasa (putativa)	-	+	+	-
781	<i>SAM2</i>	S-adenosilmetionina sintetasa	+	+	+	+
782	<i>NUP</i>	Nucleósido permeasa	-	+	-	-
783	<i>PRE10</i>	Subunidad alfa7 (C8) del proteasoma 20S	-	-	+	-
784	<i>PRT1</i>	Factor de iniciación de traducción eIF3 (putativa)	-	-	+	-
785	<i>SSF1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
786	<i>PLB3</i>	Fosfolipasa B de superficie celular anclada por GPI	-	+	+	-
787	<i>CR_09670C_A</i>	Esterasa (putativa)	+	-	+	-
788	<i>VMA2</i>	ATPasa vacuolar H(+)	-	+	+	+
789	<i>TPS1</i>	Trealosa-6-fostato sintetasa	+	+	+	-
790	<i>HMO1</i>	Factor de transcripción HMG-box	-	-	+	-
791	<i>SDA1</i>	Proteína nuclear implicada en la organización del citoesqueleto de actina	-	-	+	-
792	<i>NEP1</i>	Ortólogo EMG1 con actividad rRNA (pseudouridina) metiltransferasa	-	-	+	-
793	<i>RPS25B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
794	<i>HEX1</i>	Beta-N-acetilhexosaminidasa/chitobiasa	-	+	-	+
795	<i>ARG4</i>	Argininosuccinato liasa	-	-	+	-
796	<i>MNN26</i>	2-manosiltransferasa	+	+	+	-
797	<i>C7_03660C_A</i>	Proteína con semejanza al aminoácido-tRNA ligasa	-	+	+	-
798	<i>DED81</i>	tRNA-Asn sintetasa (putativa)	+	+	+	-
799	<i>FUM12</i>	Fumarato hidratasa (putativa)	-	-	+	-
800	<i>TCC1</i>	Factor de transcripción (putativa)	-	-	+	-
801	<i>C3_07470W_A</i>	Proteína de membrana plasmática (putativa)	+	+	+	+
802	<i>TPI1</i>	Triosa-fosfato isomerasa	+	+	+	+
803	<i>C3_07420W_A</i>	Ortólogo Tif3 <i>S. pombe</i> factor de inicio de la traducción	-	-	+	-
804	<i>KRS1</i>	tRNA-Lys sintetasa (putativa)	-	+	+	-
805	<i>C3_07390C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
806	<i>SLK19</i>	Proteína de la membrana plasmática álcali-inducida	-	-	+	-
807	<i>UBI4</i>	Precursor de ubiquitina (poliubiquitina)	-	-	-	+
808	<i>PRO2</i>	Gamma-glutamil fosfato reductasa (putativa)	-	-	+	-
809	<i>C3_07170C_A</i>	Componente regulador de la geranylgeraniltransferasa (putativa)	-	-	+	-
810	<i>RPS12</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	-
811	<i>TIM50</i>	Componente de la translocasa de la membrana mitocondrial interna (complejo TIM23)	-	-	+	-
812	<i>RPD31</i>	Histona deacetilasa (putativa)	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
813	<i>C3_06970W_A</i>	Ortólogo SRP68 localización proteínas al RE	-	-	+	-
814	<i>TPD3</i>	Fosfatasa serina/treonina	-	+	+	-
815	<i>TDH3</i>	NAD-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	+	+	+	+
816	<i>FMA1</i>	Oxidorreductasa (putativa)	-	-	+	-
817	<i>ICL1</i>	Isocitrato liasa	-	-	+	-
818	<i>PHO85</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Pho85p	-	-	+	-
819	<i>YHM1</i>	Transportador mitocondrial (putativa)	-	-	+	-
820	<i>ATP1</i>	Subunidad alfa de ATP sintetasa	+	+	+	+
821	<i>VPH1</i>	H(+)-ATPasa vacuolar	-	-	+	-
822	<i>C2_05550W_A</i>	Proteína con dominio de unión al cytochrome b5-hemo/esteroide	-	-	+	-
823	<i>C2_05560W_A</i>	Metilglioxal reductasa NADPH-dependiente (putativa)	-	-	+	-
824	<i>RPL25</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	-
825	<i>RPS8A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
826	<i>PNG2</i>	Péptido N-glicanasa (putativa)	-	+	+	-
827	<i>OSM1</i>	Subunidad de flavoproteína de fumarato reductasa (putativa)	+	+	+	+
828	<i>C2_05710C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	+
829	<i>C2_05720C_A</i>	Proteína de unión a oxisterol (putativa)	-	+	+	+
830	<i>PLB1</i>	Fosfolipasa B	-	+	+	-
831	<i>RFC1</i>	Subunidad del factor C de replicación del DNA	-	-	+	-
832	<i>GCN3</i>	Iniciador de traducción (putativa)	-	-	+	-
833	<i>ASC1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
834	<i>GPD2</i>	Proteína de superficie similar a la 3-P glicerol deshidrogenasa	-	-	+	-
835	<i>HTB1</i>	Histona H2B	-	+	-	-
836	<i>SAP9</i>	GPI aspartil proteasa	-	+	+	+
837	<i>MEU1</i>	Metiltioadenosina fosforilasa (putativa)	-	-	+	-
838	<i>PHB1</i>	Prohibitina (putativa)	-	-	+	-
839	<i>YST1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
840	<i>DNM1</i>	GTPasa relacionada con la dinamina (putativa)	-	-	+	-
841	<i>PRE3</i>	Subunidad beta-1 de proteasoma (putativa)	-	-	+	-
842	<i>BAT22</i>	Aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada (putativa)	-	-	+	-
843	<i>C7_01030C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
844	<i>RPP0</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	+	+	+	+
845	<i>RPS18</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
846	<i>GPH1</i>	Glicógeno fosforilasa (putativa)	+	+	+	+
847	<i>SSR1</i>	Proteína de pared celular de dominio CFEM anclada por GPI	-	+	+	+
848	<i>RFC2</i>	Subunidad del factor C heteropentámico de la replicación (putativa)	-	-	+	-
849	<i>C7_00790W_A</i>	Ortólogo MVPI con actividad de unión fosfatidilinositol-3-fosfato, transporte de proteínas	-	-	+	-
850	<i>RTF1</i>	Subunidad del complejo Paf1 asociado a RNA polimerasa II (putativa)	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
851	<i>RPS28B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	-	+	-
852	<i>NOP15</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
853	<i>GUS1</i>	Glutamina-RNAt ligasa (putativa)	-	-	+	-
854	<i>RPA135</i>	RNA polimerasa I subunidad A135 (putativa)	-	-	+	-
855	<i>GLN4</i>	tRNA-Gln sintetasa (putativa)	-	-	+	-
856	<i>C7_00520W_A</i>	Ortólogo CTR9 Factor de transcripción	-	-	+	-
857	<i>LEU2</i>	Isopropil malato deshidrogenasa	-	-	+	-
858	<i>SPL1</i>	Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Spl1p	-	-	+	-
859	<i>C7_00350C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
860	<i>C7_00340C_A</i>	Ortólogo KAP14 con actividad de transportador de proteínas	-	-	+	-
861	<i>PUP2</i>	Subunidad alfa5 del proteasoma 20S	-	-	+	-
862	<i>C7_00150W_A</i>	D-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa	-	-	+	-
863	<i>SOD3</i>	Superóxido dismutasa	+	+	+	-
864	<i>RVS161</i>	Proteína necesaria para la endocitosis	-	-	+	-
865	<i>C7_04280C_A</i>	Catecol o-metiltransferasa (putativa)	-	-	+	-
866	<i>C7_04210C_A</i>	Proteína similar a <i>Aspergillus</i> CYSK O-acetilserina sulfhidrilasa	-	-	+	-
867	<i>SUI3</i>	Factor de iniciación de la traducción (putativa)	-	-	+	-
868	<i>HSP60</i>	Proteína de choque térmico	-	+	+	+
869	<i>PRE5</i>	Subunidad alfa6 del proteasoma 20S	-	-	+	-
870	<i>UME1</i>	Función desconocida	-	-	+	-
871	<i>MAM33</i>	Proteína ácida de la matriz mitocondrial (putativa)	-	-	+	-
872	<i>C7_03850W_A</i>	Mediador de transporte intranuclear y factor de replicación de DNA (putativa)	-	-	+	-
873	<i>SLA2</i>	Proteína de unión a actina	-	-	+	-
874	<i>MRP7</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
875	<i>C1_14030W_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
876	<i>C1_14080W_A</i>	Proteína nucleolar	-	-	+	-
877	<i>RPL4B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
878	<i>RBE1</i>	Proteína de unión esterol	-	+	+	+
879	<i>C1_14240W_A</i>	Componente del complejo RSC de producción de cromatina (putativa)	-	-	+	-
880	<i>TIF35</i>	Factor de iniciación de la traducción putativa	-	-	+	-
881	<i>DDI1</i>	Proteína de unión a DNA (putativa)	-	-	+	-
882	<i>GDI1</i>	Rab inhibidor de regulación de tráfico vesicular (putativa)	-	-	+	-
883	<i>C1_14460W_A</i>	Subunidad de metaloproteasa del proteasoma 26S	-	-	+	-
884	<i>C1_14500C_A</i>	Poliamina acetiltransferasa (putativa)	-	-	+	-
885	<i>RPN7</i>	Subunidad de la partícula reguladora del proteosoma	-	-	+	-
886	<i>ARP2</i>	Componente del complejo Arp2/3	-	-	+	-
887	<i>CR_09010C_A</i>	Cistionina gamma-sintetasa (putativa)	-	-	+	-
888	<i>CR_07190W_A</i>	Ortólogo RGD2 interviene en el mantenimiento de la polaridad del citoesqueleto de actina	-	-	+	-
889	<i>CR_09100C_A</i>	Aldo-ceto reductasa	-	-	+	-
890	<i>TUB1</i>	Alfa tubulina	+	+	+	+
891	<i>CR_09140C_A</i>	Proteína que interviene en la recombinación meiótica	-	+	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	<i>Δpir1</i>	<i>Δglx3</i>
892	<i>ERG13</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintetasa	-	+	+	-
893	<i>CBP1</i>	Proteína de unión a corticosteroides	-	-	+	-
894	<i>PHO88</i>	Proteína transportadora de fosfato	+	-	+	-
895	<i>CR_09330C_A</i>	Proteína con dominio nucleasa estafilocócico	-	+	+	-
896	<i>ELF1</i>	Proteína de exportación mRNA (putativa)	-	-	+	-
897	<i>PRE8</i>	Subunidad putativa alfa-2_sc del proteasoma	-	-	+	-
898	<i>GLK1</i>	Glucokinasa (putativa)	+	+	+	-
899	<i>C3_05760W_A</i>	Ortólogo CAB2 interviene en procesos de biosíntesis del citosol	-	-	+	-
900	<i>C3_05880C_A</i>	Ortólogo PUP1 interviene en la unión a mRNA nucleolar	-	-	+	-
901	<i>MYO5</i>	Miosina clase I	-	-	+	-
902	<i>CAM1</i>	Factor de alargamiento de traducción eEF1 gamma (putativa)	+	+	+	+
903	<i>DED1</i>	RNA helicasa ATP dependiente	-	+	+	+
904	<i>GDA1</i>	GDPasa de la membrana de Golgi	+	+	+	-
905	<i>C3_06280W_A</i>	L-serina (L-treonina) desaminasa catabólica	-	-	+	-
906	<i>TSA1</i>	Proteína de la familia TSA/hidroperóxido alquil-peroxidasa C (AhPC)	+	+	+	-
907	<i>CYP5</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (putativa)	-	-	+	-
908	<i>UBA1</i>	Enzima activadora de la ubiquitina	-	+	+	-
909	<i>LYS9</i>	Saccaropina deshidrogenasa	+	+	+	-
910	<i>VAC8</i>	Proteína implicada en la distribución vacuolar	-	-	+	-
911	<i>ACC1</i>	Acetil-coenzima-A carboxilasa (putativa)	+	-	+	-
912	<i>ARG1</i>	Argininosuccinato sintetasa	-	-	+	-
913	<i>YRB1</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Yrb1p	-	-	+	-
914	<i>CR_00570W_A</i>	Ortólogo con actividad antioxidante	-	-	+	-
915	<i>MDH1</i>	Malato deshidrogenasa mitocondrial	+	+	+	+
916	<i>CRM1</i>	Homólogo funcional de <i>S. cerevisiae</i> Crm1	-	-	+	-
917	<i>ADE1</i>	Fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintetasa	-	-	+	-
918	<i>LEU1</i>	3-isopropilmalato deshidratasa	-	-	+	-
919	<i>NAP1</i>	Proteína de ensamblaje de nucleosomas	-	-	+	-
920	<i>CR_00310C_A</i>	Función desconocida	-	-	+	-
921	<i>KIN2</i>	Proteína con semejanza a <i>S. cerevisiae</i> Kin2p	-	-	+	-
922	<i>PCK1</i>	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	+	+	+	+
923	<i>CHT1</i>	Quitinasa	-	+	-	-
924	<i>POT1</i>	Peroxisomal 3-oxoacil CoA tiolasa (putativa)	-	-	+	-
925	<i>MKC1</i>	MAP quinasa	-	-	+	-
926	<i>YBN5</i>	P-loop ATPasa con similitud a OLA1 humano y YchF bacteriano	-	+	+	+
927	<i>ALO1</i>	D-Arabinono-1,4-lactona oxidasa	-	-	+	-
928	<i>SAP7</i>	Aspartil proteasa secretada insensible a la Pepstatina A	-	+	+	+

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
929	<i>SIK1</i>	Proteína U3 snoRNP (putativa)	-	+	+	+
930	<i>UBC4</i>	Ortólogo <i>S. cerevisiae</i> con actividad de unión a la ubiquitina	-	-	+	-
931	<i>MSS51</i>	Factor de maduración del mRNA (putativa)	-	-	+	-
932	<i>CR_10020C_A</i>	Unión de oligosacáridos	-	+	-	-
933	<i>INO1</i>	Inositol-1-fosfato sintetasa	-	+	+	-
934	<i>CHT3</i>	Quitinasa secretada	+	+	+	+
935	<i>SEC21</i>	Ortólogo <i>S. cerevisiae</i> interviene en el transporte de RE a Golgi	-	-	+	-
936	<i>CR_10140W_A</i>	NADH-ubiquinona oxidorreductasa (putativa)	-	+	+	-
937	<i>FAA4</i>	Acil CoA sintetasa	+	-	+	-
938	<i>CR_10200W_A</i>	Proteína de la familia de la fosfoglicerato mutasa	-	+	-	-
939	<i>FDH3</i>	Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión	+	-	+	-
940	<i>AHA1</i>	HSP90p co-chaperona (putativa)	-	-	+	-
941	<i>PTP3</i>	Tirosina fosfatasa (putativa)	-	-	+	-
942	<i>TRX1</i>	Thioredoxin	-	-	+	-
943	<i>CTM1</i>	Citocromo c lisina metiltransferasa (putativa)	-	-	+	-
944	<i>EIF4E</i>	Factor de iniciación de la traducción eIF4E	-	-	+	-
945	<i>DRS1</i>	Proteína nucleolar (putativa)	-	-	+	-
946	<i>CPR6</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (putativa)	-	-	+	-
947	<i>RPO21</i>	RNA polimerasa II	-	-	+	-
948	<i>RFC4</i>	Subunidad del factor C de la replicación heteropentámica (putativa)	-	-	+	-
949	<i>XYL2</i>	D-xilulosa reductasa	+	+	+	-
950	<i>LPG20</i>	Proteína de la familia de aldo-ceto reductasa	-	-	+	-
951	<i>LYS21</i>	Homocitrato sintetasa	-	+	+	-
952	<i>PIL1</i>	Endocitosis	+	+	+	+
953	<i>HAT1</i>	Subunidad Hat1-Hat2 de la histona acetiltransferasa	-	-	+	-
954	<i>PYC2</i>	Piruvato carboxilasa (putativa)	-	-	+	-
955	<i>TAF14</i>	Factor de transcripción (putativa)	-	-	+	-
956	<i>UGA1</i>	GABA transaminasa (putativa)	-	-	+	-
957	<i>C2_04120C_A</i>	Ortólogo NOP12 interviene en la maduración de LSU-rRNA	-	-	+	-
958	<i>HSP21</i>	Proteína pequeña de choque térmico	-	-	+	-
959	<i>GCD7</i>	Iniciador de traducción (putativa)	-	-	+	-
960	<i>RPL39</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	+	+	+
961	<i>RPS9B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	+	+	+	+
962	<i>RPL21A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)	-	+	+	+
963	<i>YIM1</i>	Proteína similar a la proteasa de la membrana interna mitocondrial	-	-	+	-
964	<i>C6_00850W_A</i>	Glutatión peroxidasa (putativa)	-	+	+	-
965	<i>C2_03560C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
966	<i>ILV5</i>	Ketol-ácido reductoisomerasa	-	-	+	-
967	<i>C2_03410W_A</i>	Ortólogo STB3 relacionado con la vesícula COPII	-	-	+	-
968	<i>HSP78</i>	Proteína de choque térmico	-	-	+	-

	GEN	FUNCIÓN	SC5314 37°C	SC5314 28°C	$\Delta pir1$	$\Delta glx3$
969	<i>PAN1</i>	Proteína esencial implicada en endocitosis y crecimiento polarizado	-	-	+	-
970	<i>C2_03360W_A</i>	AMP desaminasa (putativa)	-	-	+	-
971	<i>HOG1</i>	MAP quinasa	-	-	+	-
972	<i>HEM2</i>	Porfobilinógeno sintetasa (putativa)	-	-	+	-
973	<i>GPM1</i>	Fosfoglicerato mutasa	+	+	+	+
974	<i>ERG11</i>	Familia del lanosterol 14 - alfa - desmetilasa citocromo P450	+	-	+	-
975	<i>THR1</i>	Homoserina quinasa (putativa)	-	-	+	-
976	<i>SAM51</i>	Componente del complejo SAM implicado en la importación de proteínas mitocondriales	-	-	+	-
977	<i>PET9</i>	Proteína portadora de ADP/ATP mitocondrial	+	+	+	+
978	<i>C5_00560W_A</i>	Ortólogo UBC13 conjugación ubiquitina	-	-	+	-
979	<i>SEC14</i>	Proteína esencial	+	-	+	-
980	<i>C5_00260W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
981	<i>FAS1</i>	Subunidad beta de la sintetasa de ácidos grasos	+	+	+	+
982	<i>PHO8</i>	Fosfatasa alcalina vacuolar (putativa)	-	+	-	-
983	<i>C1_10470W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
984	<i>SNL1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma	-	-	+	-
985	<i>GCA2</i>	Glucoamilasa extracelular	+	+	+	+

La figura 3.10 muestra los componentes celulares y funciones que desempeñan, las proteínas comunes encontradas en los exosomas de *C. albicans*, SC5314 a 37°C y 28°C (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), así como sus respectivas frecuencias de aparición. Como puede observarse, el mayor porcentaje corresponde a componentes citoplasmáticos, de membrana, mitocondriales y de pared celular. En cuanto a las funciones que desempeñan, son, en su mayor parte, hidrolasas, transferasas, estructurales y de unión a RNA y proteínas.

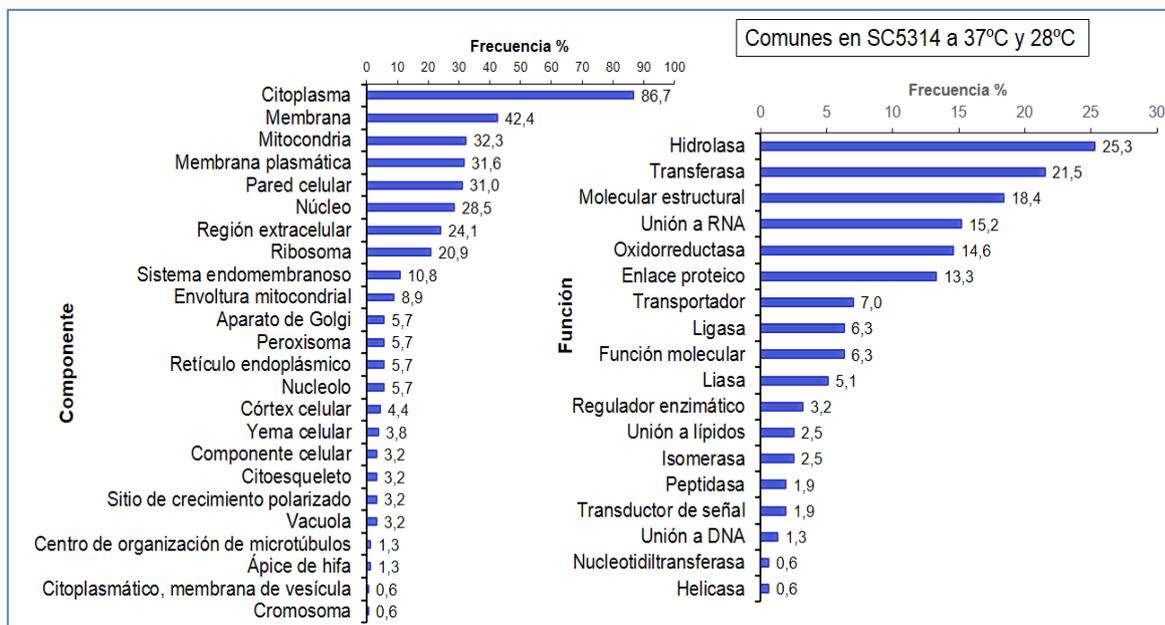


Figura 3.10. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 37 °C y 28 °C (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.

En la figura 3.11 se muestran los componentes celulares y funciones que desempeñan, las proteínas comunes encontradas en los exosomas de *C. albicans*, SC5314 a 28°C y el mutante $\Delta glx3$ (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), así como sus respectivas frecuencias de aparición. Se observa que el mayor porcentaje corresponde a componentes citoplasmáticos, de membrana, de pared celular, mitocondriales, ribosomales y nucleares. Respecto de las funciones que desempeñan, son, principalmente, estructurales, hidrolasas, transferasas, de unión a RNA y proteínas.

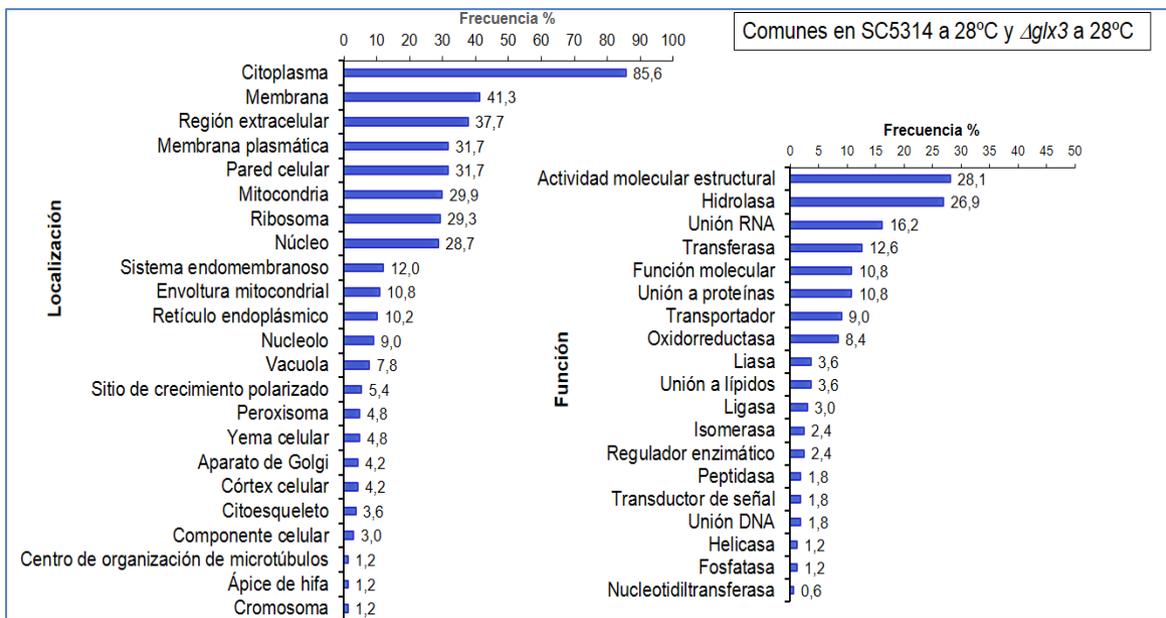


Figura 3.11. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 28°C y del mutante $\Delta glx3$ (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.

En la figura 3.12 aparecen la localización celular y funciones que desempeñan, las proteínas comunes encontradas en los exosomas de *C. albicans*, SC5314 a 28°C y del mutante $\Delta pir1$ (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), así como sus respectivas frecuencias de aparición. Se puede apreciar que el mayor porcentaje corresponde a componentes citoplasmáticos, de membrana, nucleares, mitocondriales, de pared y ribosomales. En cuanto a las funciones, son las más frecuentes, las enzimáticas, tales como hidrolasas, transferasas u oxidoreductasas, así como las estructurales y de unión a RNA y proteínas.

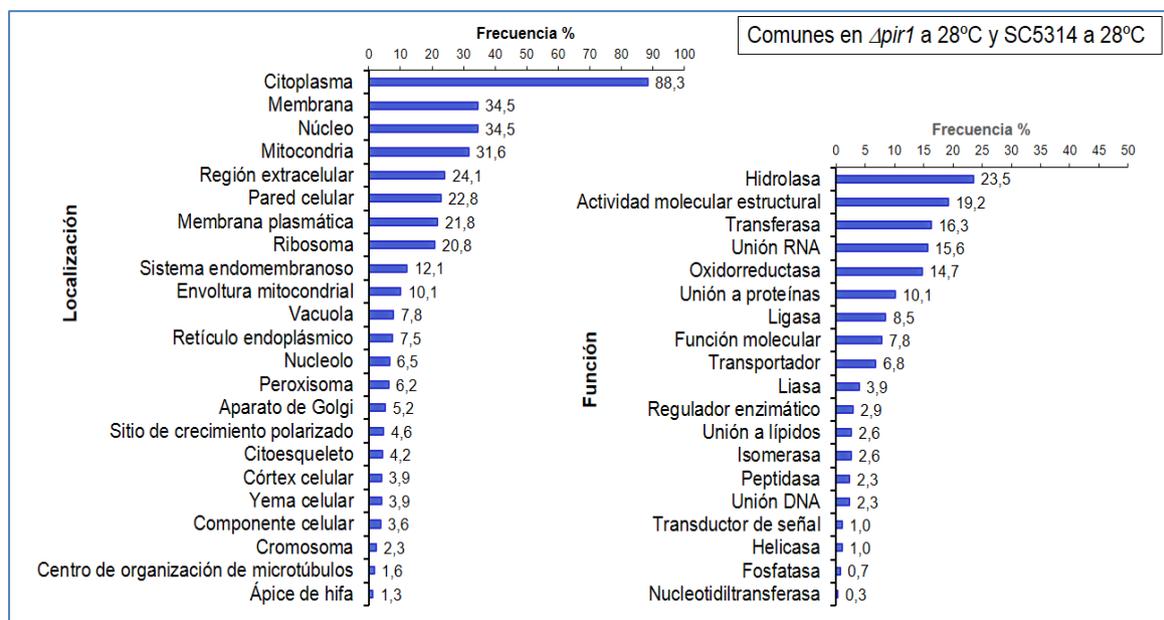


Figura 3.12. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 28°C y del mutante $\Delta pir1$ (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.

En la figura 3.13 aparecen la localización celular y funciones que desempeñan, las proteínas comunes encontradas en los exosomas de los mutantes *Δglx3* y *Δpir1* (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), así como sus respectivas frecuencias de aparición. El mayor porcentaje corresponde a componentes citoplasmáticos, de membrana, de pared, mitocondriales, ribosomales y nucleares. En cuanto a las funciones, son las más frecuentes, las enzimáticas, tales como hidrolasas, transferasas u oxidoreductasas, así como las estructurales y de unión a RNA y proteínas y de transporte.

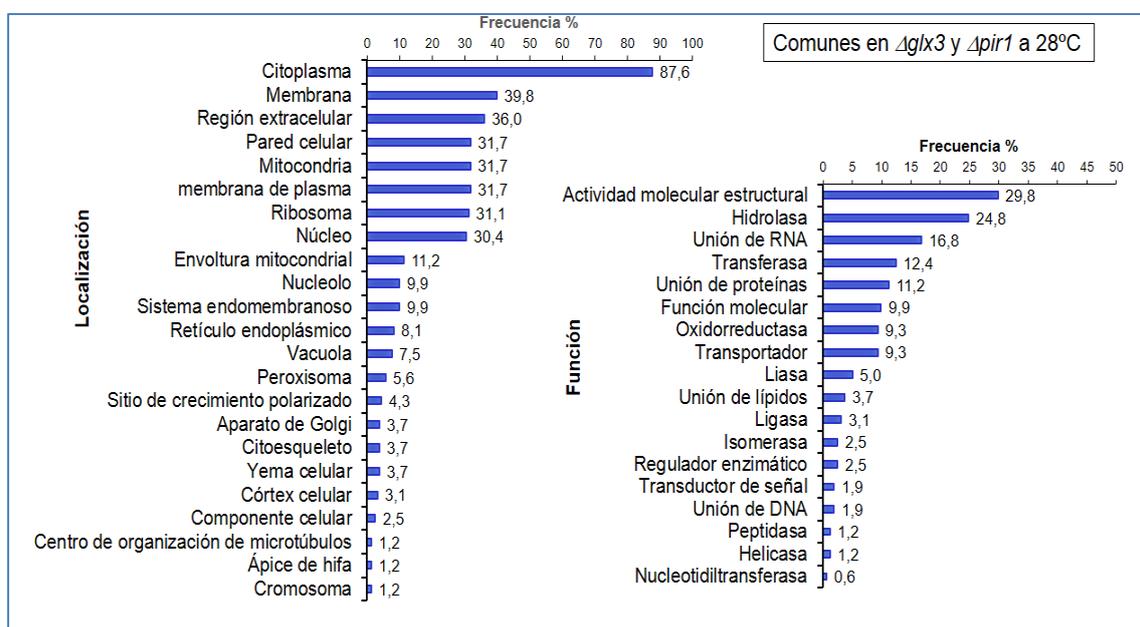


Figura 3.13. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de los mutantes *Δglx3* y *Δpir1* (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.

En la Tabla 3.4 se disponen las proteínas comunes identificadas en los exosomas de las cepas *C. albicans* SC5314, Δ *pir1* y Δ *glx3*, crecidas a 28°C. Son solamente 158 y representan tan solo un 16,0 % del total, pero a la vista de las funciones descritas para la mayoría de ellas, podríamos considerar que son fundamentales para la producción y secreción de vesículas extracelulares.

Tabla 3.4. Proteínas comunes identificadas en los exosomas obtenidos de *C. albicans* SC5314 a 28 °C, y de los mutantes Δ *pir1* y Δ *glx3*, incluyendo la denominación del gen y la función descrita en el ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database (www.candidagenome.org).

	Gen	Función de la Proteína Codificada
1	<i>POR1</i>	Poros de la membrana externa mitocondrial
2	<i>SSA2</i>	Hsp70 chaperona de la pared celular
3	<i>GAD1</i>	Glutamato descarboxilasa (putativa)
4	<i>PLB4.5</i>	Fosfolipasa B
5	<i>MSB2</i>	Proteína similar a la adhesina de la familia de la mucina
6	<i>RPL3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
7	<i>RPL12</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
8	<i>MNT1</i>	2-manosil transferasa
9	<i>TFP1</i>	Subunidad de H(+)-ATPasa vacuolar
10	<i>TOS1</i>	Proteína similar a la subunidad de anclaje de alfa aglutinina
11	<i>RPS7A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
12	<i>CYC1</i>	Citocromo C
13	<i>MP65</i>	Manoproteína de la pared celular, adhesina
14	<i>SSC1</i>	Proteína de choque térmico
15	<i>PGA52</i>	Proteína GPI
16	<i>KAR2</i>	Similar a Hsp70 de la familia de las chaperonas
17	<i>HGT6</i>	Transportadora de glucosa de alta afinidad MFS (putativa)
18	<i>HGT7</i>	MFS transportadora de glucosa (putativa)
19	<i>ILS1</i>	Isoleucil-tRNA sintetasa (putativa)
20	<i>RPL2</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
21	<i>RPS17B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
22	<i>URA2</i>	Carbamoilfosfato sintetasa-aspartato-transcarbamilasa bifuncional (putativa)
23	<i>DPS1-1</i>	tRNA-Asp sintetasa (putativa)
24	<i>MSI3</i>	Proteína de la familia Hsp70 esencial
25	<i>C1_05720W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
26	<i>CSP37</i>	Proteína de la pared celular de hifas
27	<i>QCR2</i>	Ubiquinol-citocromo-c reductasa
28	<i>CRH11</i>	Transglicosilasa de pared celular anclada por GPI
29	<i>RHO1</i>	Pequeña GTPasa de la familia Rho
30	<i>RPL28</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
31	<i>C4_06620C_A</i>	Proteína de función desconocida
32	<i>PDC11</i>	Descarboxilasa
33	<i>RPL10</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
34	<i>SNZ1</i>	Proteína de fase estacionaria relacionada con la síntesis de vitamina B
35	<i>XOG1</i>	Exo-1,3-beta-glucanasa
36	<i>RPL13</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
37	<i>RPS16A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
38	<i>RPS1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
39	<i>RPL6</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
40	<i>ECM33</i>	Proteína de pared celular anclada por GPI
41	<i>ENG1</i>	Endo-glucanasa-1,3-beta

	Gen	Función de la Proteína Codificada
42	<i>UBI3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
43	<i>LSP1</i>	Endocitosis
44	<i>TIF1</i>	Factor de iniciación de la traducción
45	<i>RPS21</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
46	<i>SUR7</i>	Proteína necesaria para la pared celular normal
47	<i>RPL32</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
48	<i>CYT1</i>	Citocromo C1
49	<i>C2_05410W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
50	<i>CDC19</i>	Piruvato quinasa
51	<i>YWP1</i>	Proteína de pared de levadura
52	<i>SUN41</i>	Glicosidasa de pared celular
53	<i>PGK1</i>	Fosfoglicerato quinasa
54	<i>C1_02330C_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
55	<i>RPL24A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
56	<i>TEF2</i>	Factor 1-alfa de traducción elongación
57	<i>PHR1</i>	Glicosidasa (actúa sobre β -1,3-glucano antes de la unión β -1,6-glucano)
58	<i>PGI1</i>	Glucosa-6-fosfato isomerasa
59	<i>SCW11</i>	Proteína de la pared celular
60	<i>CHT2</i>	Quitinasa unida a GPI
61	<i>SAH1</i>	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa
62	<i>ENO1</i>	Enolasa
63	<i>ADH1</i>	Alcohol deshidrogenasa
64	<i>C5_05230C_A</i>	Ubiquinol-citocromo-c reductasa (putativa)
65	<i>PGA4</i>	Proteína beta-1,3 glucosil transferasa de superficie celular anclada por GPI
66	<i>C5_01540W_A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
67	<i>CEF3</i>	Factor 3 de traducción elongación
68	<i>RPS13</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
69	<i>RPS5</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
70	<i>GRS1</i>	tRNA-Gly sintetasa (putativa)
71	<i>TAL1</i>	Transaldolasa
72	<i>RPL17B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
73	<i>BGL2</i>	1,3-beta-glucosiltransferasa de la pared celular
74	<i>MDH1-1</i>	Precursor de malato deshidrogenasa
75	<i>FBA1</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa
76	<i>RPL20B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
77	<i>RPS6A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
78	<i>DAG7</i>	Proteína secretora
79	<i>COX5</i>	Subunidad V de citocromo oxidasa
80	<i>MLS1</i>	Malato sintetasa
81	<i>MIR1</i>	Transportador de fosfato mitocondrial (putativa)
82	<i>RPL15A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
83	<i>HSP70</i>	Hsp70 chaperona (putativa)
84	<i>ACT1</i>	Actina
85	<i>GND1</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa
86	<i>SIM1</i>	Proteína similar a la adhesina
87	<i>COI1</i>	Proteína externa
88	<i>TKL1</i>	Transketolasa (putativa)
89	<i>ADH2</i>	Alcohol deshidrogenasa
90	<i>PDH1</i>	Proteína disulfuro-isomerasa (putativa)
91	<i>RPL27A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
92	<i>PST3</i>	Flavodoxina (putativa)
93	<i>RHD3</i>	Proteína de pared celular de levaduras (Pga29) anclada por GPI
94	<i>RPS4A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
95	<i>PMA1</i>	H(+)-ATPasa de la membrana plasmática
96	<i>RPS24</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
97	<i>GSP1</i>	Pequeña proteína G de RAN
98	<i>ATP2</i>	F1 subunidad beta del complejo F1F0 ATPasa

	Gen	Función de la Proteína Codificada
99	<i>THS1</i>	Treonil-tRNA sintetasa (putativa)
100	<i>EFT2</i>	Factor de elongación 2 (eEF2) GTPasa
101	<i>LHS1</i>	Proteína similar a Hsp70p de <i>S. cerevisiae</i>
102	<i>RPL19A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
103	<i>RPS15</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
104	<i>FAS2</i>	Subunidad alfa de la sintetasa de ácidos grasos
105	<i>RPL35</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
106	<i>RPL18</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
107	<i>RPS19A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
108	<i>RPL8B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
109	<i>TUB2</i>	Beta-tubulina
110	<i>PHR2</i>	Glicosidasa
111	<i>CR_07460C_A</i>	Función desconocida
112	<i>SRB1</i>	GDP-manosa pirofosforilasa
113	<i>RBT4</i>	Proteína de la familia Pry
114	<i>ATC1</i>	Trehalasa ácida de pared celular
115	<i>RPS14B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
116	<i>RPS3</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
117	<i>HET1</i>	Proteína de transferencia de esfingolípidos (putativa)
118	<i>SSB1</i>	Proteína de choque térmico de la familia Hsp70
119	<i>ACO1</i>	Aconitasa
120	<i>HSP90</i>	Chaperona
121	<i>RPL5</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
122	<i>SAM2</i>	S-adenosilmetionina sintetasa
123	<i>VMA2</i>	ATPasa vacuolar H(+)
124	<i>RPS25B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
125	<i>C3_07470W_A</i>	Proteína de membrana plasmática (putativa)
126	<i>TPI1</i>	Triosa-fosfato isomerasa
127	<i>TDH3</i>	NAD-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
128	<i>ATP1</i>	Subunidad alfa de ATP sintetasa
129	<i>RPS8A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
130	<i>OSM1</i>	Subunidad de flavoproteína de fumarato reductasa (putativa)
131	<i>C2_05720C_A</i>	Proteína de unión a oxisterol (putativa)
132	<i>ASC1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
133	<i>SAP9</i>	GPI aspartil proteasa
134	<i>YST1</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
135	<i>RPP0</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
136	<i>RPS18</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
137	<i>GPH1</i>	Glicógeno fosforilasa (putativa)
138	<i>SSR1</i>	Proteína de pared celular de dominio CFEM anclada por GPI
139	<i>HSP60</i>	Proteína de choque térmico
140	<i>RPL4B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
141	<i>RBE1</i>	Proteína de unión a esterol
142	<i>TUB1</i>	Alfa tubulina
143	<i>CAM1</i>	Factor de alargamiento de traducción eEF1 gamma (putativa)
144	<i>DED1</i>	RNA helicasa ATP dependiente
145	<i>MDH1</i>	Malato deshidrogenasa mitocondrial
146	<i>PCK1</i>	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa
147	<i>YBN5</i>	P-loop ATPasa con similitud a OLA1 humano y YchF bacteriano
148	<i>SAP7</i>	Aspartil proteasa secretada insensible a la Pepstatina A
149	<i>SIK1</i>	Proteína U3 snoRNP (putativa)
150	<i>CHT3</i>	Quitinasa
151	<i>PIL1</i>	Endocitosis
152	<i>RPL39</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
153	<i>RPS9B</i>	Constituyente estructural de Ribosoma
154	<i>RPL21A</i>	Constituyente estructural de Ribosoma (putativa)
155	<i>GPM1</i>	Fosfoglicerato mutasa

	Gen	Función de la Proteína Codificada
156	<i>PET9</i>	Proteína portadora de ADP/ATP mitocondrial
157	<i>FAS1</i>	Subunidad beta de la sintetasa de ácidos grasos
158	<i>GCA2</i>	Glucoamilasa extracelular

La figura 3.14 muestra, de modo general, la localización celular y funciones que desempeñan, las 158 proteínas comunes encontradas en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 28°C y de los mutantes $\Delta glx3$ y $\Delta pir1$ (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), así como sus respectivas frecuencias de aparición. El porcentaje más elevado corresponde a componentes citoplasmáticos, de membrana, extracelulares, de pared, mitocondriales, ribosomales y nucleares. En cuanto a las funciones, son las más frecuentes, las estructurales, así como las enzimáticas, tales como hidrolasas, transferasas u oxidoreductasas, de transporte y de unión a RNA y proteínas.

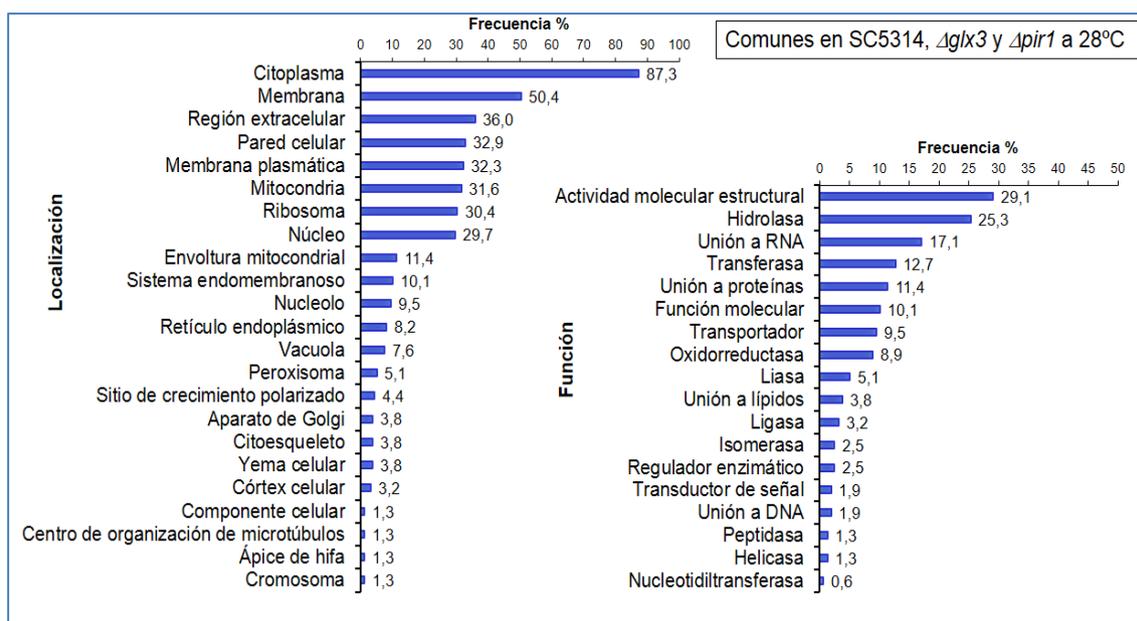


Figura 3.14. Localización celular y funciones que desempeñan las proteínas comunes obtenidas en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 28°C y en los mutantes $\Delta glx3$ y $\Delta pir1$ (ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database, www.candidagenome.org), con indicación de sus respectivas frecuencias de aparición.

Del conjunto de proteínas comunes identificadas, es conveniente destacar el hecho de que predominen las que poseen funciones tales como ligasa o hidrolasa, como la glucosidasa de pared celular (Sun41), quitinasa (Cht2, Cht3), exo 1,3-β-glucanasa (Xog1), endo 1,3-β-glucanasa (Eng1), aspartil proteasa (Sap9) o glucosidasas (Phr1,

Phr2); proteínas de pared ancladas por GPI, con función transferasa, tales como glucanosiltransferasa (Pga4, Pga52), o transglicosilasa (Crh11); las que se localizan en regiones de membrana, que se ubicarían en la superficie de las microvesículas, tales como, β -1,3-glucanosiltransferasa (Bgl2), aglutinina (Tos1), proteínas de membrana (Csp37), manoproteína de superficie celular (MP65, es una adhesina), proteína de pared (Sim1, es una adhesina), proteína de pared aglutinin-like (Ecm33), ATPasas de membrana (Pma1), proteínas de pared de levaduras, secretadas (Ywp1); diversas proteínas citoplasmáticas con distintas funciones, tales como, chaperonas (Hsp70, Hsp90, Ssb1, Ssa2), transketolasa (Tk11) o proteínas de choque térmico (Ssr1), entre otras (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Proteínas comunes más representativas, identificadas en los exosomas obtenidos de *C. albicans* SC5314 a 28 °C, y de los mutantes *Δpir1* y *Δglx3*.

	Proteína	FUNCIÓN
1	Hsp70	Chaperona
2	Sun41	Glycosidasa de pared celular
3	Pga4	β -1,3-glucanosiltransferasa anclada por GPI
4	Bgl2	β -1,3-glucanosiltransferasa
5	Ssb1	Familia de Hsp70
6	Tos1	Aglutinina
7	Rhd3	Proteína de pared celular de levaduras (Pga29) anclada por GPI
8	Csp37	Proteína de membrana
9	Cht2	Quitinasa unida a GPI
10	Cht3	Quitinasa
11	Phr2	Glicosidasa
12	Phr1	Glicosidasa (actúa sobre β -1,3-glucano antes de la unión β -1,6-glucano)
13	Tk11	Transketolasa
14	Pga52	Proteína GPI
15	Ssa2	Hsp70 Chaperona de la pared celular
16	Xog1	Exo 1,3-beta-glucanasa
17	Sim1	Proteína similar a la adhesina
18	Sap9	GPI aspartil proteasa
19	Rbe1	Proteína de unión esterol
20	Crh11	Transglicosilasa de pared celular anclada por GPI
21	Ssc1	Proteína de choque térmico
22	Ywp1	Proteína de pared de levadura, secretada
23	Eng1	Endo-glucanasa-1,3-beta
24	Ecm33	Proteína de pared celular anclada por GPI
25	Ssr1	Proteína de pared celular de dominio CFEM anclada por GPI
26	Hsp90	Chaperona
27	MP65	Manoproteína de la pared celular, adhesina
28	Scw11	Proteína de la pared celular

3.7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE miRNAs DE EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*

Mediante un bioanalizador Agilent 2100, se detectó la presencia de miRNA en la muestra de exosomas de *C. albicans* en los laboratorios de los Dres. Vilella y Moreno, de la Fundación IVI (Instituto Valenciano de Infertilidad) (figura 3.15), realizando posteriormente la secuenciación, en el Servicio de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de Valencia.

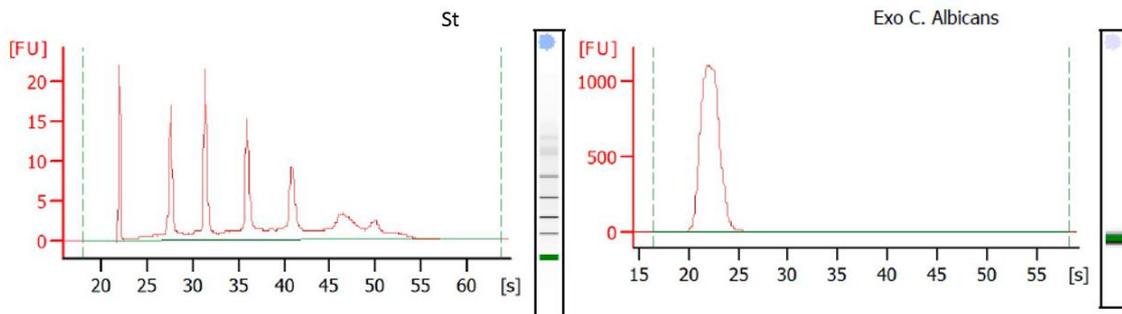


Figura 3.15. Fracciones de miRNA detectadas en la muestra de exosomas de *C. albicans*.

De las $30 \cdot 10^6$ secuencias obtenidas en los exosomas de *C. albicans* SC5314 cuando se crece a 37°C, aplicando los mecanismos de filtrado correspondientes, obtenemos 32 miRNAs específicas de *C. albicans* y 2 que presentan, además, homología completa con humanos. En la tabla 3.6 se disponen los específicos de *C. albicans*, con sus respectivas secuencias de bases y la identificación del cromosoma en que se ubican, según la información disponible en el ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database (www.candidagenome.org).

Tabla 3.6. Secuencias de bases obtenidas en el análisis de los miRNAs específicos de *C. albicans*, encontrados en los exosomas producidos por la cepa SC5314 cuando se crece a 37°C y cromosomas en que se encuentran.

	miRNA	Secuencia	Cromosoma ^a	Nº de bases
1	CA 28639-2	UACCCUGUAUAAACACUGAUUAAGG AGCAGCU	chrM	33
2	CA 29895-2	UAUCUCCUGUAACUCGGA	chrM	18
3	CA 36614-1	AUUCAGACUUGUUAAAGCCUC	chr1	21
4	CA 37870-1	CAAGUACUGUUUCAAACUGCUU	chr1	23
5	CA 42398-1	CACAAUAGAACAUAAGAAUAAU	chr6	22
6	CA 42766-1	UAUAUAUAUUUGUUUAUA	chr5	18
7	CA 46788-1	AUAUACUAAGGUACUAGA	chrM	18
8	CA 48658-1	UUUAUUUCAAGUUGUACUAGC	chr7	21
9	CA 50723-1	CAUAGAUCUCGGGUGGACUC	chrM	20
10	CA 51144-1	CUAAAAUAAAAGGAUGGCAUG	chrR	22

	miRNA	Secuencia	Cromosoma ^a	Nº de bases
11	CA 53133-1	CAUAUACUAAGGUACUAGA	chrM	19
12	CA 53327-1	UAUUAACCCGGAAUUGCUUACUAAU ACUUUCA	chr1	34
13	CA 53812-1	UAGAAUUGUGUAGAAUUGCA	chr2	20
14	CA 54535-1	UUCAUUCUGUGUUAAGGUGGACUCUC AGU	chrR	29
15	CA 55848-1	UAGAAUGUAUACACUUUGUUAAGUUG AU	chrM	28
16	CA 60249-1	AUUCAUUAACUUUUGUUCUGGA	chr1	22
17	CA 60716-1	AGGUUGAUUUCUGGUUCUUGC	chrR	21
18	CA 70545-1	AUCACAAUUCACUAUGGCGA	chr2	20
19	CA 73101-1	AAGGUGGACUCUCAGCUGGGA	chrR	21
20	CA 76370-1	CUAGUAUACUCGUAGUCU	chrM	18
21	CA 82162-1	ACUGAAGAGGCUGUUGA	chrR	17
22	CA 82658-1	ACUCGGACAUAGUUCAUUAUCCU	chr4	23
23	CA 83102-1	CCUGUUAUAUGUUAUAGACUUUUGUU AUCAU	chrM	32
24	CA 84046-1	UUAUUGGCUUUGACUGGAGA	chrR	20
25	CA 85000-1	CUCCGGAUUAUAGAUUCUAGUAU	chrM	23
26	CA 87404-1	UAGGAUGUAUAUCUGCAUUC	chrM	20
27	CA 90356-1	UAUUUUUUUUUGGUGGAC	chr2	19
28	CA 90969-1	AUAUUGAUUAUUAUAAAAGCCAUUA	chrM	26
29	CA 91261-1	UGCUUCACAAAUUAGGACA	chr1	19
30	CA 91963-1	CAAGUUGAUUAUAGACAUUCUUGUA UUUAU	chrR	32
31	CA 92021-1	AUGUAGUAUUCUAAUUCGGUGGUA	chr1	24
32	CA 95313-1	UUGGUCUUAACUUCUUGGC	chr6	19

En la figura 3.16 se disponen los valores de número de bases y frecuencias con que aparecen, para los 32 miRNAs obtenidos en los exosomas de *C. albicans* SC5314 crecida a 37°C. Como se puede apreciar los que aparecen con mayor frecuencia son los que poseen un número de bases inferior a 30, que representan el 84,8 % de los casos, siendo los de más de 40 bases, tan solo un 3 %.

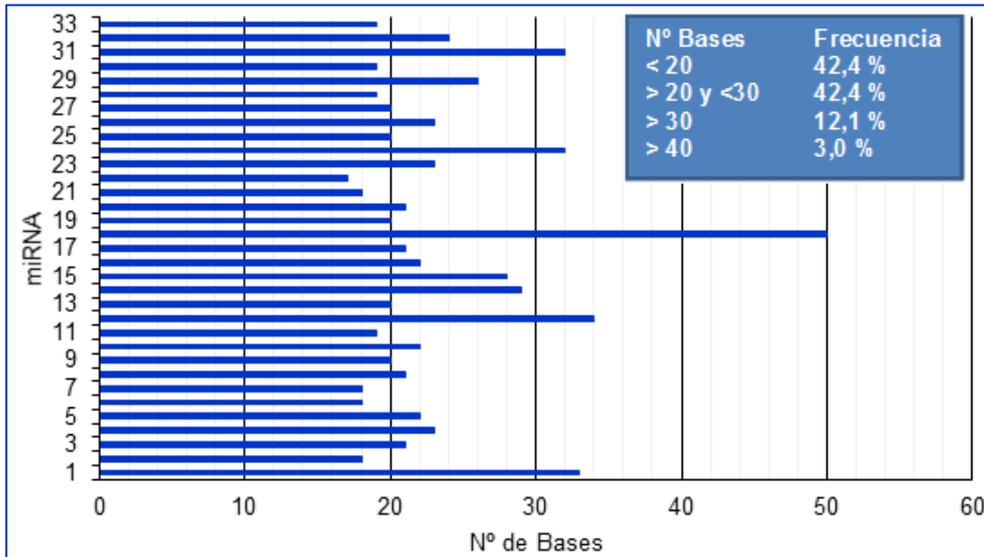


Figura 3.16. Número de bases y frecuencias con que aparecen para los 32 miRNAs encontrados en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 37°C.

La figura 3.17 muestra la frecuencia de ubicación de los 32 miRNAs en los cromosomas, según la información dispuesta en la tabla 3.6 anterior. Los valores correspondientes a la ubicación en los cromosomas M, R y 1 son los que presentan mayor frecuencia.

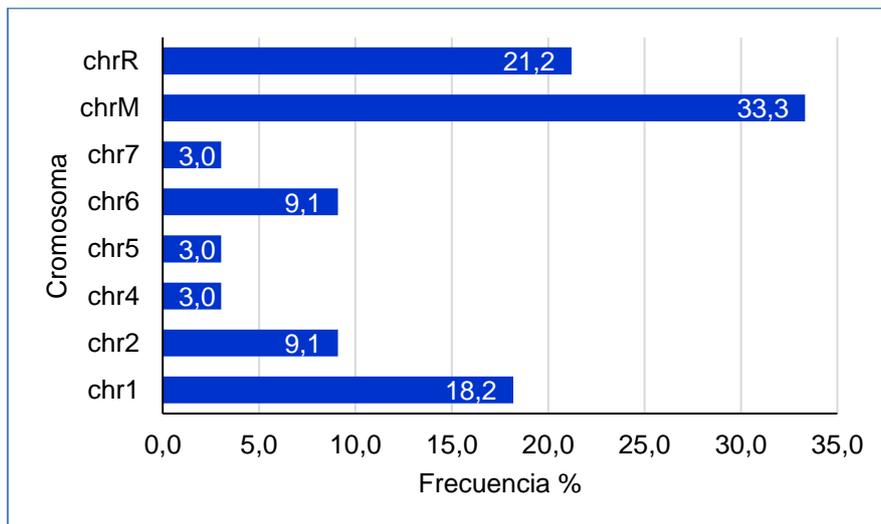


Figura 3.17. Cromosomas en los que se localizan los miRNAs encontrados en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 37°C y sus valores de frecuencia.

Los 32 miRNAs identificados se encuentran en regiones intergénicas, por lo que procedimos a realizar una búsqueda de los genes flanqueantes y las funciones principales descritas para los mismos, así como las distancias de pares de bases, antes y después de la pauta de lectura abierta, según el ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database (www.candidagenome.org) (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. miRNAs y genes flanqueantes, con sus funciones principales y distancias respectivas 5' y 3'.

miRNA	Gen flanqueante ^a	Función del Gen ^b	Distancia a 5' ^c	Distancia a 3' ^d
CA 28639-2	<i>RRNL</i>	RNA Ribosomal Mitochondrial subunidad grande	Interno	
CA 29895-2	<i>RRNS</i>	RNA Ribosomal Mitochondrial subunidad pequeña	Interno	
CA 36614-1	<i>C1_11010C_A</i>	Tamaño peroxisoma	12	
CA 37870-1	<i>C1_11460W_A (iota-1a)</i>	LTR	73	
	<i>DPP1/C1_11470C_A</i>	Síntesis de fosfolípidos	828	150
CA 42398-1	<i>ALS5</i>	Adhesina	3535	
	<i>ALS1</i>	Adhesina	1244	
CA 42766-1	<i>ECM331</i>	Anclaje en GPI	121	
CA 46788-1	<i>NAD3</i>	Respiración	-	362
	<i>COB</i>	Respiración	378	
CA 48658-1	<i>WHI3</i>	Unión a RNA	-	433
CA 50723-1	<i>tR(ACG)3mt</i>	tRNA mitocondrial	Adyacente	
	<i>NAD2</i>	Respiración	14	
CA 51144-1	<i>CR_05040W_A</i>	Biofilm	641	
CA 53133-1	<i>NAD3</i>	Respiración	-	361
	<i>COB</i>	Respiración	378	
CA 53327-1	<i>BBC1</i>	Dominio SH3	-	584
	<i>C1_07450W_A (snR42a)</i>	RNA nucleolar pequeño (snoRNA)	666	
CA 53812-1	<i>C2_05640W_A</i>	Formación de hifas	-	473
	<i>VPS35/C2_05650W_A</i>	Expulsión vacuolar	265	
CA 54535-1	<i>CR_01780W_A</i>	Metiltransferasa	214	
CA 55848-1	<i>COX II</i>	Respiración	-	71
	<i>tN(GUU)5mt</i>	tRNA mitocondrial	Adyacente	
CA 60249-1	<i>C1_08960W_A (snR190)</i>	RNA nucleolar pequeño (snoRNA)	-	84
	<i>(snR128)</i>	RNA nucleolar pequeño (snoRNA)	251	
CA 60716-1	<i>CR_06620W_A</i>	Membrana externa mitocondrial		728
	<i>CR_06630W_A (snR66)</i>	RNA nucleolar pequeño (snoRNA)	1864	
CA 70545-1	<i>tE(CUC)1</i>	tRNA mitocondrial	-	1161
	<i>SAP99</i>	Aspartil proteasa	116	
CA 73101-1	<i>CR_01780W_A</i>	Metiltransferasa	-	227
CA 76370-1	<i>tL(UAG)1mt</i>	tRNA mitocondrial	-	120
	<i>NAD4</i>	Respiración	Interno (89 desde el inicio)	
CA 82162-1	<i>OPT4/CR_02490W_A</i>	Transportador oligopeptídico	1339	

miRNA	Gen flanqueante ^a	Función del Gen ^b	Distancia a 5' ^c	Distancia a 3' ^d
	<i>OPT3/CR_02220C_A</i>	Transportador oligopeptídico	Interno (258 desde el inicio)	
CA 82658-1	<i>HWPI/C4_03570W_A</i>	Formación de hifas	-	360
CA 83102-1	<i>tP(UGG)6mt</i>	región de genes de tRNA mitocondrial	458; 535; 692	
	<i>CM_00220W (CaalfMp08.1)</i>	Endonucleasa	29	
CA 84046-1	<i>CR_06130C_A</i>	Biofilm	3671	
CA 85000-1	<i>NAD3</i>	Respiración	-	332
	<i>COB</i>	Respiración	403	
CA 87404-1	<i>NNAD4</i>	Respiración	Interno (1119 desde el inicio)	
		Región de genes de tRNA mitocondrial	765; 839;917; 995; 1085	
CA 90356-1	<i>C2_07780W_A</i>	Metabolismo de lípidos	-	488
	<i>C1_13500C_A (snR3a)</i>	RNA nucleolar pequeño (snoRNA)	19	
CA 90969-1	<i>tK(UUU)6mt</i>	región de genes de tRNA mitocondrial	-	1866; 1106; 1016; 938; 860
	<i>ATP9</i>	ATP sintasa mitocondrial	13	
CA 91261-1	<i>DPP1</i>	Síntesis de fosfolípidos	-	624
	<i>C1_11460W_A (iota-1a)</i>	LTR	-	280
CA 91963-1	<i>ASG1</i>	Factor de transcripción Gal4	-	77
	<i>CR_02550C_A</i>	U4 snRNA (catálisis de reacciones de unión)	268	
CA 92021-1	<i>C1_09470C_A</i>	Proteína transportadora de tricarbóxilato	10	
	<i>PPT2</i>	Biofilm	146	
CA 95313-1	<i>ALG11</i>	Manosiltransferasa	-	15
	<i>SEC27</i>	Unión a ubiquitina	443	

a) Ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database (www.candidagenome.org).

b) función principal del gen flanqueante, descrita en ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database.

c) pares de bases antes de la pauta de lectura abierta.

d) pares de bases después de la pauta de lectura abierta.

La figura 3.18 muestra las diferentes funciones descritas para los genes flanqueantes antes citados, con sus respectivas frecuencias de aparición, destacando entre todas ellas las, de Respiración con un 17,9 % y las relacionadas con la formación de Biofilms y tRNA mitocondrial con un 7,1 %, entre las más reseñables.

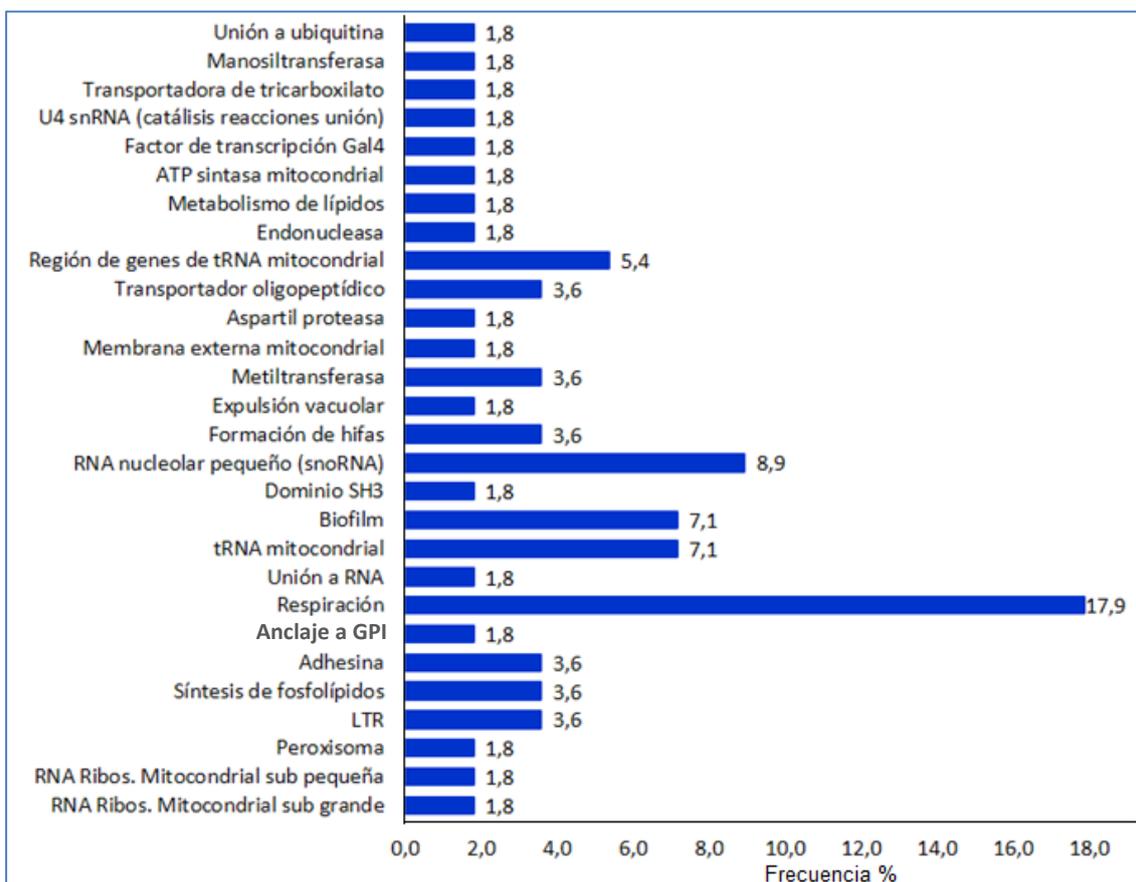


Figura 3.18. Funciones descritas para los genes flanqueantes a los miRNAs y sus respectivas frecuencias de aparición.

En la tabla 3.8 se disponen los dos miRNAs que presentan homología completa con humanos, con sus secuencias y cromosomas en que se encuentran.

Tabla 3.8. Secuencias de bases obtenidas en el análisis de los miRNAs de *C. albicans*, que presentan homología completa con humanos, encontrados en los exosomas producidos por la cepa SC5314 cuando se crece a 37°C y cromosomas en que se encuentran.

	miRNA	Secuencia	Cromosoma ^a	Nº de bases
1	CA 92930-1	AUCACAUUGCCAGGGAAUU	chr3	18
2	CA 39423-1	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGC	chr2	20

a) Ensamblaje 22 de *Candida* Genome Database (www.candidagenome.org).

3.8. POSIBLE MECANISMO DE SECRECIÓN DE LOS EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*

Según la hipótesis propuesta por Nimrichter y colaboradores (2016), para que los exosomas puedan atravesar la pared celular del hongo y sean secretados, precisan de una remodelación de la estructura de la pared mediante la hidrólisis de polisacáridos y manoproteínas, lo que expone componentes internos al exterior y posteriormente reconstruir nuevamente la integridad de la pared. Los resultados experimentales de los análisis proteómicos realizados confirman dicha propuesta teórica, dado que el conjunto de las proteínas comunes descritas en los exosomas de las cepas analizadas, incluyendo la presencia de miRNA, así como sus funciones más relevantes y las respectivas localizaciones, tanto en el interior de las microvesículas, como en disposición transmembrana o en la superficie de las mismas, permitirían la lisis y posterior regeneración de la pared, necesarias para la secreción de los exosomas, a la vez que mantener la integridad de la levadura.

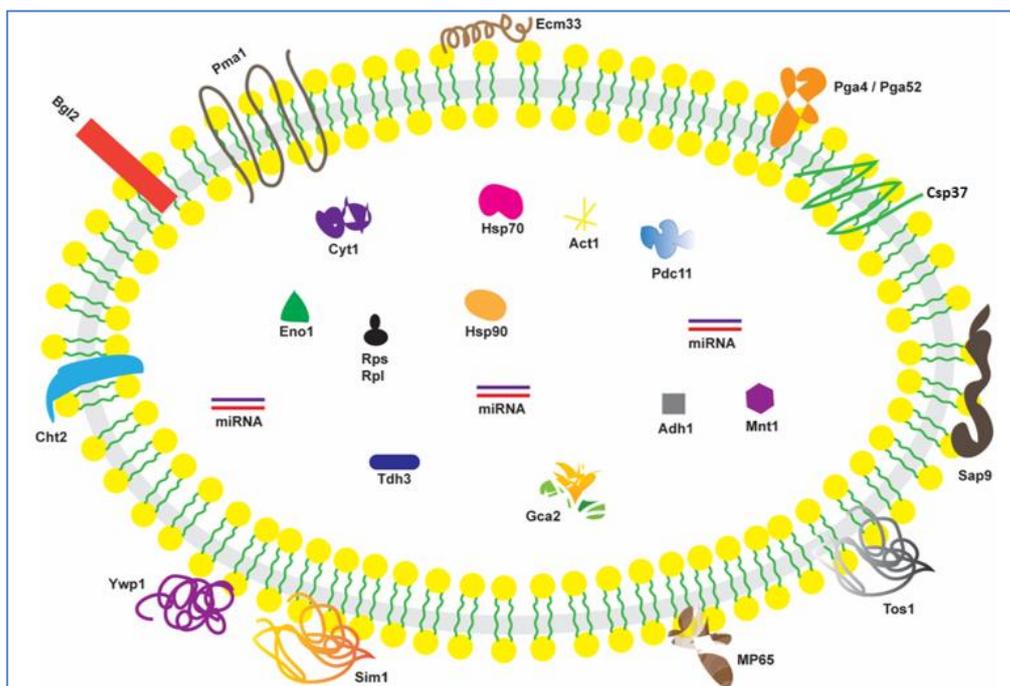
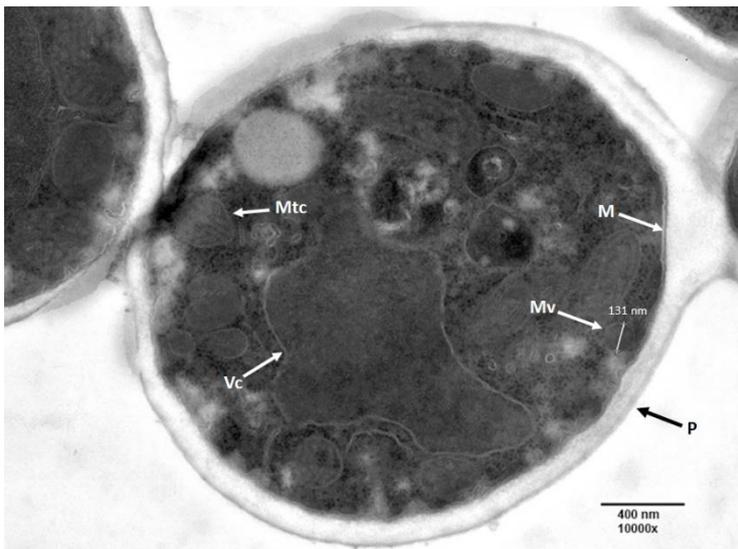


Figura 3.19. Esquema general de la composición de proteínas comunes, identificadas en los exosomas purificados de *C. albicans* SC5314 (28°C), Δ glx3 y Δ pir1, que presentan las funciones más relevantes y sus correspondientes ubicaciones.

En la figura 3.19, mostramos la distribución general que adoptarían las proteínas comunes con funciones más significativas, de entre todas las identificadas en los exosomas de las cepas crecidas a 28°C.

Un hecho importante es la comprobación de dichos hallazgos y del posible mecanismo de secreción de los exosomas, mediante microscopía electrónica. Para lo cual preparamos un cultivo puro de *C. albicans* SC5314 a 37°C, que procesamos por idéntico procedimiento al descrito para la obtención de exosomas, pero omitiendo los filtrados por tamaños de poro 0,45 y el de 0,20 μm , posterior a la concentración mediante el mecanismo Vivaflow®, para comprobar, por una parte, la necesidad de dichos procesos de filtración, evitando la aparición de componentes celulares para conseguir preparaciones de exosomas de elevada pureza y por otra, para esclarecer los posibles mecanismos de secreción de dichas microvesículas a través de la pared celular. El sedimento obtenido por ultracentrifugación, se resuspendió en PBS, para incluir en las resinas y realizar la observación por microscopía electrónica de transmisión. En efecto, como se puede apreciar en la imagen (Figura 3.20), encontramos elementos celulares, en los que se pueden observar diferentes estructuras, tales como, mitocondrias, una gran vacuola central, la membrana citoplasmática y la pared celular, además, de otra estructura,



de un tamaño de 131 nm, compatible con una microvesícula, que se encontraría preformada en el citoplasma.

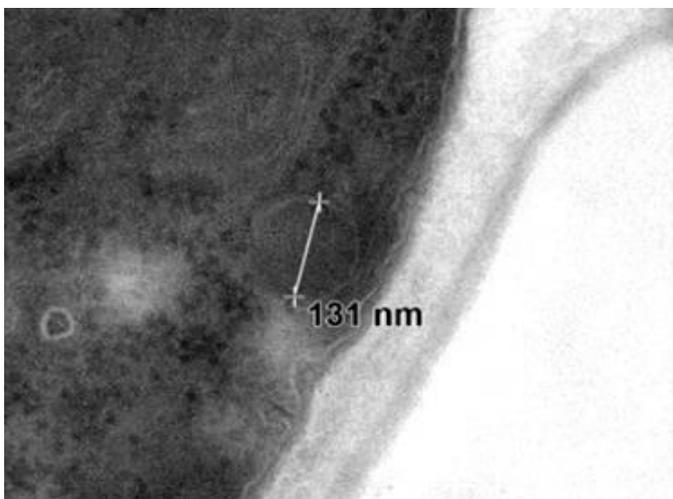


Figura 3.20. La imagen superior muestra una levadura de *C. albicans* (10000x), donde se aprecian estructuras tales como mitocondrias (Mtc), una gran vacuola central (Vc), la membrana plasmática (M) y la pared celular (P), así como una estructura compatible con una microvesícula (MV) de 131 nm de diámetro, que se aprecia en detalle, ampliada en la imagen izquierda.

La figura 3.21 muestra dos imágenes de la misma estructura celular, con diferentes aumentos (12000x y 50000x), en que se aprecia una microvesícula ocupando una invaginación entre la membrana citoplasmática y la pared celular.

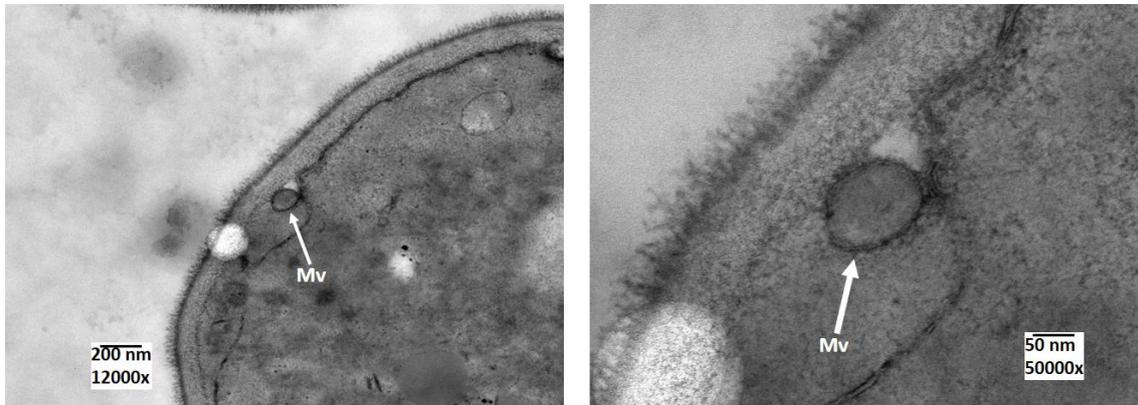


Figura 3.21. Microvesícula (Mv) ocupando una invaginación creada entre la membrana plasmática y la pared celular de una levadura de *C. albicans*.

En la figura 3.22 y 3.23, aparecen imágenes de estructuras celulares correspondientes a levaduras de *C. albicans* en que se aprecian varias estructuras con microvesículas (Mv) contiguas a la pared celular, de tamaños entre los 105 y 124 nm.

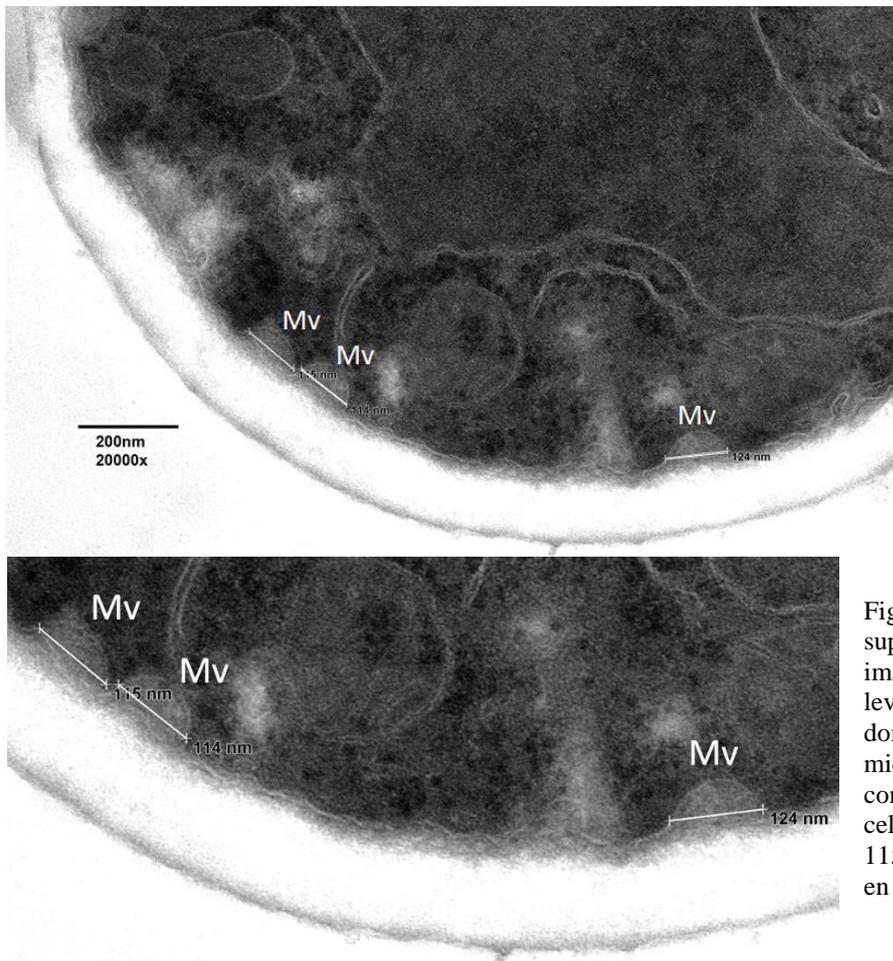


Figura 3.22. La imagen superior muestra la imagen parcial de una levadura de *C. albicans*, donde se aprecian microvesículas (Mv) contiguas a la pared celular, de tamaños 114, 115 y 124 nm (Aumentada en la imagen izquierda).

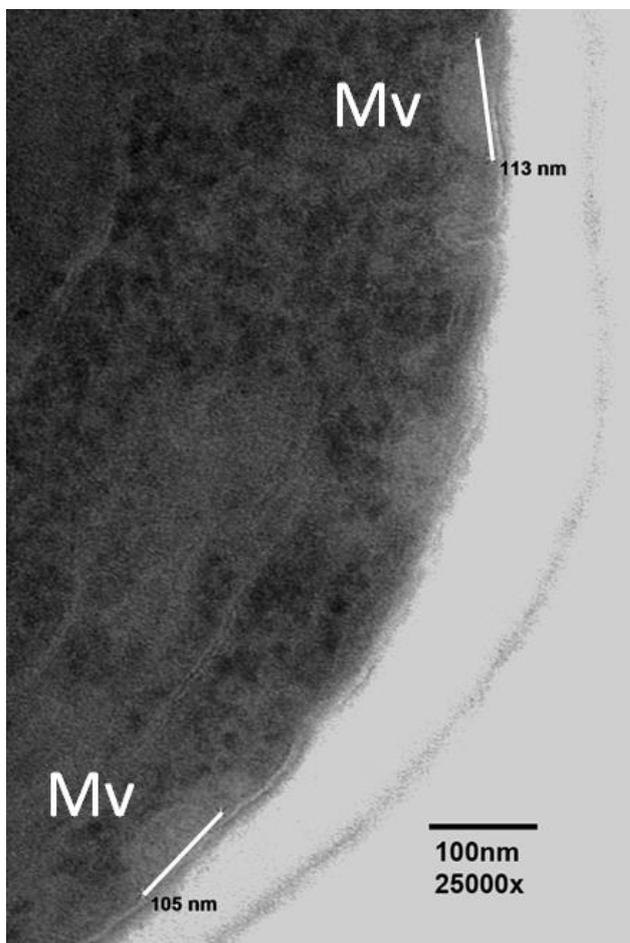
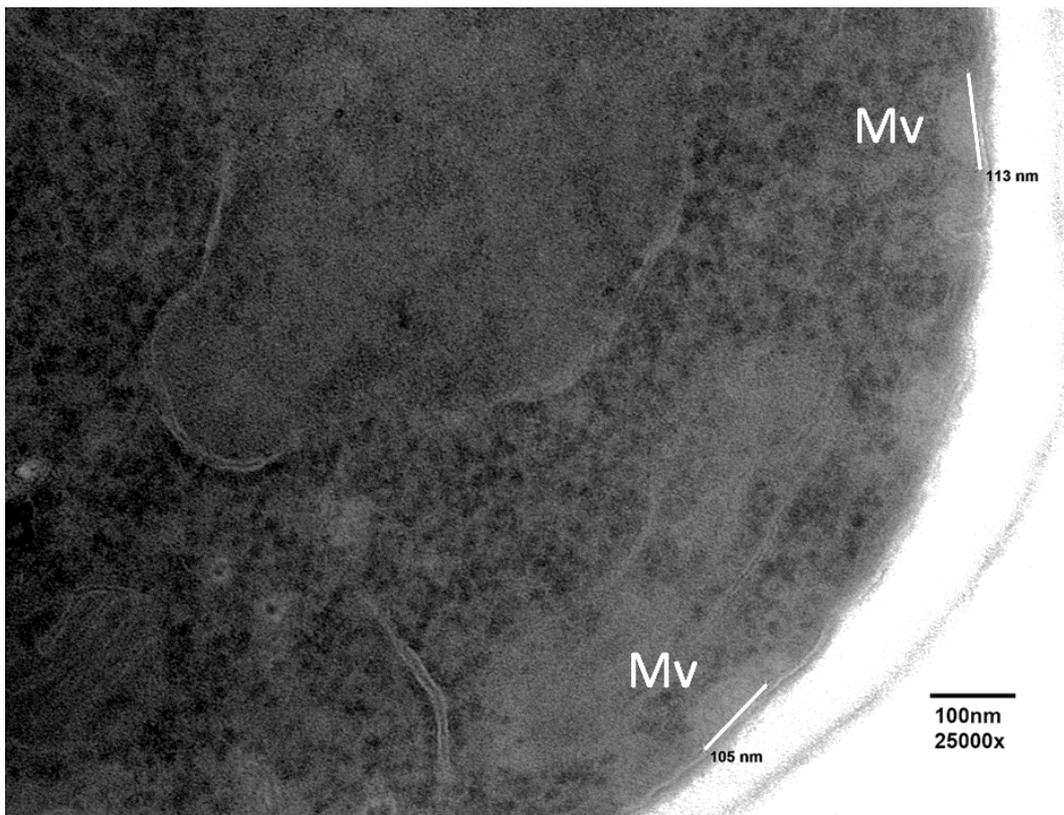


Figura 3.23. Levadura de *C. albicans*, donde se aprecian microvesículas (Mv) junto a la pared celular de tamaños 105 y 113 nm (Aumentada en la imagen izquierda).

En ambas figuras incluimos ampliaciones de las imágenes, en que se puede apreciar con mayor detalle la presencia de estructuras semiesféricas contiguas a la pared celular, que parece que la estuviesen atravesando y que, debido a la mayor densidad de esta, no permiten visualizar el resto de la estructura de la microvesícula (Mv), oculta bajo la pared y que no podría verse completa hasta ser secretada al exterior ya que el grosor de la pared es similar o incluso mayor al de la propia vesícula.

Las imágenes que aparecen en la figura 3.24, muestran sendas microvesículas extracelulares junto a la pared celular de levaduras de *C. albicans*. Se puede apreciar la estructura de doble membrana de los exosomas, junto a la de manoproteínas y glucano constituyentes de la pared celular.

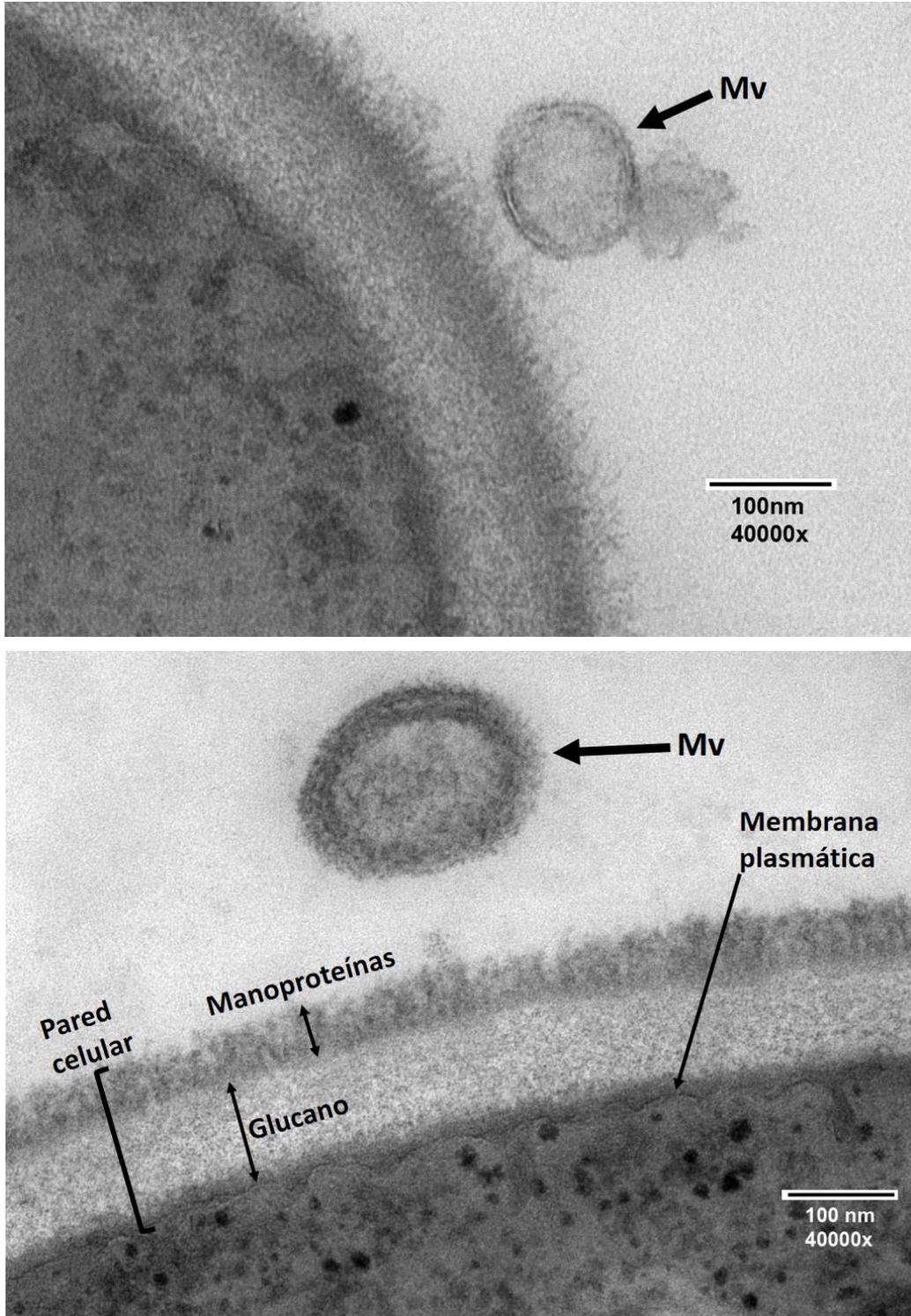


Figura 3.24. Imágenes de microvesículas (Mv) de *C. albicans*, donde se aprecia su estructura de doble membrana, junto a la pared celular, con glucano y manoproteínas.

La secuencia de imágenes de microscopía electrónica mostradas, apoyan el mecanismo de secreción propuesto por Nimrichter y colaboradores (2016), confirmándose la presencia de cuerpos vesiculares preformados en el interior de la levadura, que ocupan el espacio periplásmico situándose en invaginaciones de la membrana, contiguas a la pared celular, para atravesar dicha estructura y ser posteriormente secretada al exterior. En la figura 3.25 se disponen fragmentos de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica, que resumen el mecanismo de secreción propuesto, superpuesto al esquema de la hipótesis propuesta por Nimrichter.

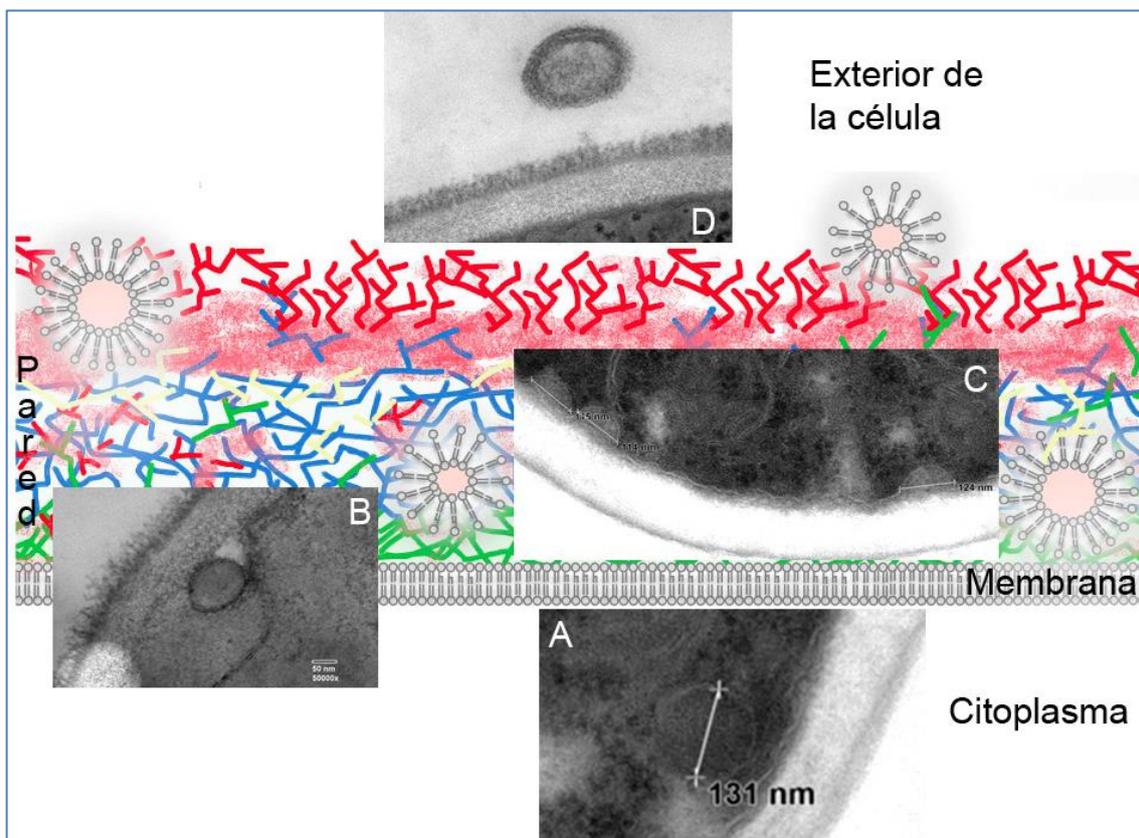


Figura 3.25. Secuencia de imágenes de microscopía electrónica que muestran: (A) cuerpo vesicular citoplasmático; (B) microvesícula ocupando el espacio periplásmico contiguo a la pared celular; (C) cuerpos vesiculares semiesféricos a punto de atravesar la pared celular; (D) microvesícula en el exterior de la levadura.

4. DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y TÉCNICAS NTA

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, han permitido, validar el método de obtención de exosomas, a la vez que ratificar la pureza de las preparaciones, apreciándose estructuras vesiculares extracelulares con doble membrana con tamaños comprendidos entre 100 y 200 nm (ver figura 3.4) en las muestras correspondientes a *C. albicans* SC5314 a 37°C, que coinciden con las observadas por técnicas NTA, en que se obtenían espectros de partículas de tamaños comprendidos entre 125 y 165 nm, con un tamaño medio de 146,1 nm, no apareciendo dispersión apreciable para otros tamaños diferentes, lo que ratifica el elevado grado de pureza de las muestras obtenidas.

Similares resultados se consiguieron para las preparaciones realizadas con otras especies del género *Candida*, como *C. krusei* y *C. parapsilosis*, para las que se obtuvieron, con el método descrito, preparaciones de exosomas de elevada pureza según se puede apreciar en las imágenes de microscopía electrónica (ver figuras 3.5 y 3.6), lo que permite ratificar la eficacia del procedimiento propuesto, si bien con dichas especies, no se continuaron realizando estudios más en profundidad.

4.2. RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS EN LOS EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*

El protocolo descrito se ha mostrado altamente eficaz como método de obtención de exosomas con un elevado grado de pureza, tal como han mostrado las observaciones de microscopía electrónica y las técnicas NTA, con un rango de tamaño, morfología y concentraciones, compatibles con la presencia de microvesículas extracelulares, aunque, según algunos autores (Daaboul, et al. 2016), es conveniente realizar una caracterización más extensa, empleando biocarmadores (Campoy, et al. 2016) que permitan discriminar las nanopartículas de diferentes orígenes, como por ejemplo los exosomas, de los agregados proteicos o lipídicos de similar tamaño.

Para comprobar la pureza de las preparaciones obtenidas, se procedió a realizar la separación electroforética de proteínas y posterior Western blot, empleando anticuerpos marcadores de vesículas extracelulares y marcadores de fracción citosólica que reconocen componentes fibrilares de citoesqueleto, ausentes en los exosomas,

descartando así la contaminación celular. Se han analizado tanto proteínas transmembrana, como citoplasmáticas y secretadas al medio extracelular.

Como proteínas transmembrana, se analizaron tetraspaninas tales como CD9, CD63 y CD81, presentes en la superficie celular de organismos eucarióticos superiores y que poseen cuatro dominios transmembranales, regiones terminales intracitoplásmicas, y dos lazos extracelulares de distinto tamaño, así como residuos polares conservados en los dominios transmembranales (Martin, 2005). La proteína CD9 se asocia a procesos de adhesión celular, la CD63 se localiza en los endosomas tardíos y lisosomas y se ve implicada en el transporte intracelular de proteínas y la CD81 participa en una gran variedad de funciones celulares, como por ejemplo el ensamblaje de la membrana basal.

Las tres proteínas han sido estudiadas en paralelo mediante WB, comparando la fracción purificada de exosomas con el lisado de los cultivos de *C. albicans* SC5314. Las tres tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), son consideradas biomarcadores de vesículas extracelulares por diversos autores (Kumar, et al. 2015, Daaboul, et al. 2016, Deregibus, 2016, Yuan, et al. 2017), por lo que el resultado positivo en la fracción correspondiente a las mismas y su ausencia en el lisado celular, permite asegurar la pureza de los exosomas obtenidos y la inexistencia de contaminantes celulares (ver figura 3.1). Es necesario insistir que el resultado positivo frente a dichos biomarcadores, no significa su identificación en los exosomas de *C. albicans*, sino que, en los mismos existen proteínas que migran electroforéticamente en las mismas zonas y se unen a estos anticuerpos, por lo que deben ser tenidos en cuenta, en este caso, como indicadores de pureza, ratificando la inexistencia de contaminación celular.

Del mismo modo, se analizó mediante WB, la presencia de Calnexina (proteína localizada en el retículo endoplasmático), obteniéndose resultado negativo en la fracción correspondiente a las vesículas extracelulares, siendo positivo únicamente en la fracción correspondiente al lisado celular (Campoy, et al. 2016), lo que permite ratificar la pureza de los exosomas obtenidos y la ausencia de posible contaminación por fragmentos celulares (ver figura 3.1).

Se analizaron además otros biomarcadores tales como Enolasa (2-fosfoglicerato hidrolasa), importante enzima glicolítica, localizada en la pared de *C. albicans*. Es un antígeno proteico termoestable y citoplasmático, producido por todas las especies de *Candida spp.*, biomarcador de invasión tisular profunda, detectable incluso en ausencia de candidemia y descrito como altamente inmunógeno. Por tratarse de una proteína cuya

localización principal es de pared, aunque también se puede localizar en citoplasma, al realizar el WB, se detectó únicamente en las vesículas extracelulares y no en el sobrenadante de la ultracentrifugación, lo que ratifica la pureza de los exosomas obtenidos y la inexistencia de componentes celulares en el citado sobrenadante de la ultracentrifugación (ver figura 3.2) (Kruger, et al. 2014).

La proteína Hsp70 también se analizó mediante WB. Es una proteína chaperona que se expresa de forma ubicua en todos los organismos vivos, implicada en procesos de maduración y plegamiento de proteínas celulares, transporte de las mismas, eliminación de proteínas desnaturalizadas y además presenta actividad ATPasa, por todo ello se considera necesaria para el correcto desarrollo celular. Su localización es normalmente citoplasmática y nuclear, aunque también es secretada al exterior y se ve incrementada bajo situaciones de stress celular (Mayer, et al. 2005). Por este motivo el WB nos muestra resultado positivo tanto en la fracción correspondiente a las vesículas extracelulares como en el sobrenadante de la ultracentrifugación (ver figura 3.2).

En última instancia la muestra de exosomas y el sobrenadante de la ultracentrifugación se enfrentaron, mediante WB, a un anticuerpo policlonal anti-pared, obtenido por inoculación a conejos, de un lisado purificado de pared celular de *C. albicans*, obteniéndose resultado positivo con elevada polidispersión, en la muestra de vesículas extracelulares, lo que ratifica la presencia de manoproteínas de pared en las mismas, siendo su desplazamiento electroforético marcadamente influenciado por el diferente grado de glicosilación que pueden presentar y la variabilidad que ello implica en la relación carga/masa de las mismas, no encontrándose dicho hallazgo en el caso de la muestra correspondiente al sobrenadante de la ultracentrifugación (ver figura 3.3).

4.3. RECONOCIMIENTO DE MANOPROTEÍNAS EN LOS EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*, MEDIANTE CONCANAVALINA A-FERRITINA

La Concanavalina A-ferritina, es una lectina que se utiliza para detectar los restos de manosa de las glicoproteínas, por lo que constituye una comprobación de la eficacia en la especificidad de la unión de los biomarcadores empleados en el análisis WB, a la hora de asegurar la pureza de las microvesículas analizadas, tanto por dichas técnicas como por la microscopía electrónica. En efecto, el análisis de muestras de exosomas de *C. albicans* SC5314 (37°C), tratadas y no tratadas con dicha lectina, puso en evidencia la

presencia de un punteado negro de Concanavalina A-ferritina (ver figura 3.7), que indica la presencia de manosa en las microvesículas, lo que confirma el resultado obtenido mediante WB, al detectar anticuerpos anti-manano, que reconocen de forma selectiva las microvesículas y por tanto la presencia de manoproteínas en las mismas.

4.4. INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MOLECULAR DE LOS EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*

Los resultados que aparecen en la tabla 3.3, difieren de los obtenidos por otros autores (Vargas, et al. 2015), que tan solo identificaban 57 proteínas en vesículas extracelulares de *C. albicans*, mientras que en nuestro caso, hemos identificado un elevado número de proteínas en los exosomas purificados, obtenidos de las cuatro cepas estudiadas, siendo el total de 985, de las cuales 181 se encuentran en *C. albicans* SC5314, cuando se crece a 37°C, aumentando hasta 350 cuando dicha cepa se crece a 28°C. El citado incremento, puede estar relacionado con el estrés, que la modificación en la temperatura de incubación provoca y que puede afectar a la pared celular de las levaduras, haciendo que sea más permeable y facilite la secreción de los exosomas. En todos los casos se ha tomado como límite de corte, 5 péptidos, lo que proporciona una confianza en la identificación, superior al 99%.

Las proteínas identificadas en los exosomas purificados del mutante *Δpir1*, representan el mayor número de todas ellas, 932 (94,6% del total de proteínas), que puede estar relacionado con la alteración de las proteínas estructurales de pared que dicha cepa mutante presenta, lo que permite una mayor permeabilidad de la misma y por tanto facilita notablemente la producción y posterior salida al exterior de las microvesículas.

Del conjunto de proteínas identificadas, tan solo 158 (el 16,0%) son comunes a las tres cepas crecidas a 28°C (SC5314, y mutantes *Δglx3* y *Δpir1*). De entre ellas, predominan las que poseen funciones ligasa o hidrolasa, las que poseen función transferasa, las que se localizan en regiones de membrana, que se ubicarían en la superficie de las microvesículas, adhesinas, proteínas de pared y diversas proteínas citoplasmáticas con distintas funciones (ver Tabla 3.4).

4.5. INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS DE LOS miRNAs OBTENIDOS EN LOS EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*

La secuenciación de los miRNA tras aplicar los mecanismos de filtrado, permitió obtener un total de 34 miRNA, de los que 32 son específicos de *C. albicans* y 2 presentan, además, homología completa con humanos. Todos ellos se encuentran en regiones intergénicas, por lo que procedimos a estudiar los genes flanqueantes sobre los que pudiesen tener algún tipo de influencia, tomando una distancia máxima de 4000 pares de bases.

Entre las funciones descritas, destacan las de respiración con un 17,9 % y las relacionadas con la formación de biopelículas y tRNA mitocondrial con un 7,1 %.

En cuanto a los dos que presentan homología completa con humanos, el 92930-1 es 100% homólogo a miRNA-23b humano, que contribuye al aumento de la población de células madre en carcinomas de colon y también se asocia con un mal pronóstico en los casos de cáncer gástrico. El 39423-1 es 100% homólogo a miRNA-320 humano, considerado como diana molecular para prevenir el cáncer esofágico y un potencial biomarcador para el carcinoma colo-rectal.

4.6. HIPÓTESIS SOBRE EL MECANISMO DE SECRECIÓN DE LOS EXOSOMAS DE *CANDIDA ALBICANS*

El análisis proteómico realizado en los exosomas purificados, obtenidos en la totalidad de las cepas y en especial en las crecidas a 28°C, ponen en evidencia que las funciones descritas para las 158 proteínas comunes a las tres cepas, son fundamentales para la producción y secreción de las vesículas extracelulares, ya que en ellas se incluyen las funciones de lisis, que mediante la hidrólisis de polisacáridos y manoproteínas, permitirán remodelar la estructura de la pared, lo que facilita la salida de las microvesículas al exterior, regenerando posteriormente la integridad de la pared celular.

Con todo lo expuesto, las proteínas identificadas en los exosomas analizados, corresponden principalmente a componentes citoplasmáticos, de membrana, extracelulares, de pared, mitocondriales, ribosomales y nucleares, siendo las funciones más frecuentes, las enzimáticas, tales como hidrolasas, transferasas u oxidoreductasas, las estructurales, de transporte y de unión a RNA y proteínas. Dichas proteínas estarían

ubicadas, tanto en el interior de las microvesículas (incluyendo la presencia de miRNA), como en localización transmembrana o bien en la superficie de las mismas.

La secuencia de imágenes de microscopía electrónica, en muestras que contenían elementos celulares y microvesículas, apoyan el mecanismo de secreción propuesto por Nimrichter, confirmándose la presencia de cuerpos vesiculares preformados en el interior de la levadura, que ocupan el espacio periplásmico situándose en invaginaciones de la membrana, contiguas a la pared celular, para atravesar dicha estructura y ser posteriormente secretada.

La secreción de exosomas a través de la pared celular de los hongos, es por tanto un proceso complejo, que requiere de la intervención de un gran número de mecanismos, en los que se ven implicados un elevado número de proteínas, por lo que las microvesículas extracelulares podrían ser consideradas como una plataforma multi-antigénica que serviría de punto de partida en la preparación de nuevas vacunas. Además, dicho mecanismo podría ser tenido en cuenta en el diseño de nuevos fármacos antifúngicos, al producirse, en el proceso de secreción, una remodelación de la estructura de la pared celular que haría que la levadura fuese más vulnerable.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método de obtención de exosomas, a partir de cultivos de levaduras del género *Candida*, que se ha mostrado altamente eficaz por la homogeneidad y pureza de las microvesículas obtenidas.
2. Mediante microscopía electrónica de transmisión y técnicas de detección de nanopartículas, basadas en métodos de dispersión de luz (NTA), se ha podido constatar la presencia de microvesículas de tamaños comprendidos entre 100 y 200 nm, mostrando espectros de distribución de elevada homogeneidad y pureza, en torno a los tamaños indicados.
3. La caracterización de proteínas llevada a cabo por técnicas de Western blot, ha puesto de manifiesto la elevada pureza de los exosomas obtenidos, no existiendo contaminación celular en las preparaciones, tal y como lo indican el resultado positivo frente a calnexina en el lisado celular y negativo en las vesículas extracelulares; positivo frente a enolasa en las vesículas extracelulares y negativo en el sobrenadante de ultracentrifugación; positivo frente a las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, en las microvesículas y negativo en el lisado celular; positivo frente Hsp70, tanto en microvesículas como en el sobrenadante de ultracentrifugación y positivo, con elevada polidispersión frente a anticuerpos anti-pared, en las microvesículas.
4. El tratamiento con Concanavalina A-ferritina, ha permitido detectar la presencia de manoproteínas en las microvesículas aisladas.
5. El análisis proteómico, ha permitido identificar un elevado número de proteínas en los exosomas de las cuatro cepas analizadas, *C. albicans* SC5314 a 37°C, *C. albicans* SC5314 a 28°C y los mutantes *Δglx3* y *Δpir1*, ambos crecidos a 28°C, alcanzando un total de 985.
6. De las 985 proteínas identificadas, tan solo 181 se encuentran en los exosomas de *C. albicans* SC5314 a 37°C, aumentando hasta 350 cuando se crece a 28°C y hasta las 932 en el caso del mutante *Δpir1*, lo que pone en evidencia la influencia del estrés térmico y de la alteración de las proteínas estructurales de pared que el mutante presenta, lo que provoca una mayor permeabilidad de la misma, facilitando la salida al exterior de las microvesículas.
7. Del conjunto de proteínas identificadas en la composición de los exosomas purificados, tan solo 158 (el 16,0 %) son comunes a las tres cepas crecidas a 28°C (SC5314 y mutantes

Δglx3 y *Δpir1*) y consideramos que estas son fundamentales para la producción y secreción de las vesículas extracelulares, ya que en ellas se incluyen las funciones de lisis, que mediante la hidrólisis de polisacáridos y manoproteínas, permitirán remodelar la estructura de la pared, lo que facilita la salida de las microvesículas al exterior, recuperando posteriormente la integridad de la pared celular. Mecanismo que ha podido ser confirmado mediante microscopía electrónica de transmisión.

8. Se han detectado y secuenciado 34 miRNA, 32 de los cuales son específicos de *C. albicans* y 2 de ellos, además, poseen total homología con humanos.

9. Todos los miRNA están ubicados en regiones intergénicas. El análisis de las funciones de los genes flanqueantes, sobre los que podrían ejercer algún posible mecanismo de regulación de la expresión génica, pone de manifiesto que, en su mayor parte, poseen funciones de respiración y también relacionadas con la formación de biopelículas y con tRNA mitocondrial.

10. De los dos miRNA que presentan homología completa con humanos, uno de ellos está relacionado con el aumento de la población de células madre en carcinomas de colon y un pronóstico desfavorable en los casos de cáncer gástrico, mientras que el otro, está considerado como diana molecular para prevenir el cáncer esofágico y como un posible biomarcador en el carcinoma colo-rectal.

11. Los análisis realizados en exosomas purificados de levaduras del género *Candida*, indican que su génesis y secreción, requieren de la intervención de un gran número de proteínas, por lo que las microvesículas extracelulares podrían ser consideradas como una plataforma antigénica que serviría de punto de partida en la preparación de nuevas vacunas. Además, dicho mecanismo podría ser tenido en cuenta en el diseño de nuevos fármacos antifúngicos, al producirse, en el proceso de secreción, una significativa remodelación de la estructura de la pared celular de la levadura que la haría más vulnerable.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Aguado J, Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, et al. Guidelines for the treatment of invasive candidiasis and other yeasts. Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2010 Update. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:345-361.
- (2) Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4604.
- (3) Albert O, Toubas D, Strady C, Cousson J, Delmas C, Vernet V, et al. Reactivity of (1 → 3)-β-*D*-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2011;30(11):1453-1460.
- (4) Albuquerque P, Nakayasu E, Rodrigues M, Frases S, Casadevall A, Zancoppe-Oliveira R, et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol*. 2008;10(8):1695-1710.
- (5) Al-Fattani M, Douglas L. Biofilm of *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006; 55(8):999-2008.
- (6) Angiolella L, Facchin M, Stringaro A, Maras B, Simonetti N, Cassone A. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis*. 1996;173(3):684-690.
- (7) Arana D, Prieto D, Román E, Nombela C, Alonso-Monge R, Pla J. The role of the cell wall in fungal pathogenesis. *Microb Biotechnol*. 2009;2(3):308-320.
- (8) Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. medica panamericana. 2006:1-1628.
- (9) Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):665-670.
- (10) Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011 1;29.

-
- (11) Baillie G, Douglas L. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(3):397-403.
- (12) Baillie G, Douglas L. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol.* 1999;48(7):671-679.
- (13) Ballou E, Avelar G, Childers D, Mackie J, Bain J, Wagener J, et al. Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. *Nat Microbiol.* 2016;2(16238).
- (14) Batista B, Eng W, Pilobello K, Hendricks-Muñoz K, Mahal L. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4624-4633.
- (15) Bellingham S, Coleman B, Hill A. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(21):10937-10949.
- (16) Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(2):348-376.
- (17) Blanco M, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García A. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27(4):195-199.
- (18) Blankenship J, Mitchell A. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(6):588-594.
- (19) Briard B, Rasoldier V, Bomme P, ElAouad N, Guerreiro C, Chassagne P, et al. Dirhamnolipids secreted from *Pseudomonas aeruginosa* modify antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* by inhibiting β 1,3 glucan synthase activity. *ISME J.* 2017.
- (20) Burnett J. Aspects of the structure and growth of hyphal walls. *Fungal walls and hyphal growth* Cambridge University Press. 1979;1:1-25.
- (21) Butler G, Rasmussen M, Lin M, Santos M, Sakthikumar S, Munro C, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459(7247):657-652.

- (22) Buurman E, Westwater C, Hube B, Brown A, Odds F, Gow N. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(13):7670-7675.
- (23) Calderone A, Fonzi A. Virulence factors of *C. albicans*. Trends in microbiology. 2001;9:327-335.
- (24) Campoy I, Lanau L, Altadill T, Sequeiros T, Cabrera S, Cubo-Abert M, et al. Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols. Journal of Translational Medicine. 2016;14(180).
- (25) Cantona E, García-Rodríguez J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Guinea J. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. Enferm Infecc Microbiol Clin 2014;32(6):375-379.
- (26) Caro L, Tettelin H, Vossen J, Ram A, van den Ende H, Klis F. In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 1997;13(15):1477-1489.
- (27) Castillo L, Martínez A, Garcerá A, Elorza M, Valentín E, Sentandreu R. Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. Yeast. 2003;20:973-983.
- (28) Castrillón Rivera L, Palma Ramos A, Padilla Desgarenes C. Factores de virulencia en *Candida spp*. Dermatología Rev Mex. 2005;49:12-27.
- (29) Cervera C. Candidemia y candidiasis invasora en el adulto. Formas clínicas y tratamiento. Elsevier Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30:483-491.
- (30) Chaffin W. *Candida albicans* cell wall proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 2008;72:495-544.
- (31) Chaffin W, López-Ribot J, Casanova M, Gozalbo D, Martínez J. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(1):130-180.
- (32) Chandra J, Kuhn D, Mukherjee P, Hoyer L, McCormick T, Ghannoum M. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drugresistance. J Bacteriol. 2001;183(18):5385-5394.

- (33) Chattaway F, Holmes M, Barlow A. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1968;51(3):367-376.
- (34) Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, et al. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and *non-albicans Candida species*. BMC Infect Dis 2005;5:22.
- (35) Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, Agarwal K, Prakash A, Singh P, et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. Emerg Infect Dis. 2013;19(10):1670-1673.
- (36) Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol 2009 2;19(2):43-51.
- (37) Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiology and risk factors for *non-albicans species*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(6):380-384.
- (38) Crump J, Collignon P. Intravascular catheter-associated infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(1):1-8.
- (39) Cuenca-Estrella M, Verweij P, Arendrup M, et al., ESCMID, Fungal Infection Study Group. ESCMID Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect. 2012;18(7):9-18.
- (40) Cutler J. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu Rev Microbiol. 1991;145:187-218.
- (41) Daaboul G, Gagni P, Benussi L, Bettotti P, Ciani M, Cretich M, et al. Digital Detection of Exosomes by Interferometric Imaging. Scientific Reports. 2016;6:37246.
- (42) de Groot P, Bader O, de Boer A, Weig M, Chauhan N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. Eukaryot Cell. 2013;12(4):470-481.
- (43) De Groot P, Hellingwerf K, Klis F. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. Yeast. 2003;20(9):781-796.
- (44) de la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Virulence factors of *Candida albicans* and dermatophytes in keratinized tissues infection. Rev CES Med. 2012;26(1):43-55.

- (45) Deatherage B, Cookson B. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*. 2012;80(6):1948-1957.
- (46) Delgado M, O'Connor J, Azorín I, Renau-Piqueras J, Gil M, Gozalbo D. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology*. 2001;147:411-417.
- (47) Deolindo P, Evans-Osses I, Ramirez M. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):252-257.
- (48) Deregibus M, Figliolini F, D'antico S, Manzini P, Pasquino C, De Lena M, et al. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016;38(5):1359-1366.
- (49) Diekema D, Messer S, Brueggemann A, Coffman S, Doern G, Herwaldt L, et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1298-1302.
- (50) Donlan R. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):1-19.
- (51) Douglas L. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11(1):30-6.
- (52) Douglas L. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19(3):139-143.
- (53) Edwards S, Braley R, Chaffin W. Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;177:211-216.
- (54) Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F. A Sensitive Predictor for Potential GPI Lipid Modification Sites in Fungal Protein Sequences and its Application to Genome-wide Studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* 2004;337(2):243-253.
- (55) Emara M, Ahmad S, Khan Z, Joseph L, Al-Obaid I, Purohit P, et al. *Candida auris* candidemia in Kuwait, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(6):1091-1092.

- (56) Emori T, Culver D, Horan T, Jarvis W, White J, Olson D, et al. National nosocomial infections surveillance system (NNIS): description of surveillance methods. *Am J Infect Control*. 1991;19(1):19-35.
- (57) EUCAST. Antifungal susceptibility testing (AFST). Breakpoint tables for interpretation of MICs. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013;6(1).
- (58) Fabian M, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(6):586-593.
- (59) Ferguson S, Nguyen J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release*. 2016;228:179-190.
- (60) Fleet G, Manners D. The enzymatic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. 1977;98(2):315-327.
- (61) Fonseca-García C. Análisis de los mecanismos de regulación de diversas rutas metabólicas por medio de la vía Pal/Rim en *Ustilago maydis*. Unidad Irapuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN. 2010.
- (62) Fortún J, Meije Y, Buitrago M, Gago S, Bernal-Martinez L, Pemán J, et al. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(11):3134-3141.
- (63) Funk J, Schaarschmidt B, Slesiona S, Hallström T, Horn U, Brock M. The glycolytic enzyme enolase represents a plasminogen-binding protein on the surface of a wide variety of medically important fungal species. *International Journal of Medical Microbiology*. 2016 1;306(1):59-68.
- (64) Gale C, Bendel C, McClellan M, Hauser M, Becker J, Berman J, et al. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science*. 1998;279(5355):1355-1358.
- (65) Garcerá A, Martínez A, Castillo L, Elorza M, Sentandreu R, Valentín E. Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology*. 2003;149:2137-2145.
- (66) García de Acevedo Chávez, B., Sánchez F, Guerrero L, Odio M, García Hidalgo L, Ruiz Palacios G, et al. Epidemiología de las dermatosis en niños de 0 a 2 años de edad de un área de la Ciudad de México. *Dermatología Rev Mex*. 2005;49(1):8-11.

- (67) Gaspar GG, Meneguetti MG, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Martinez R. Evaluation of the predictive indices for candidemia in an adult intensive care unit. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(1):77-82.
- (68) Gaynes RP, Culver DH, Emori TG, Horan TC, Banerjee SN, Edwards JR, et al. The national nosocomial infections surveillance system: Plans for the 1990s and beyond. *The American Journal of Medicine*. 1991;91(3):116-120.
- (69) Gelis S, de Groot P, Castillo L, Moragues M, Sentandreu R, Gómez M, et al. Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence. *Fungal Genet Biol*. 2012;49(4):322-331.
- (70) Geraldine B, Rasmussen M, Lin M, Santos M, Sakthikumar S, Munro C, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009;459:657-662.
- (71) Ghannoum M. Cloning and disruption of caPLB1, a B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):122-143.
- (72) Ghannoum M. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):122-143.
- (73) Ghannoum M. *M27-S4 Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility Testing of Yeast*. Clinical and laboratory standards institute. Clinical and laboratory standards institute. 2012:1-32.
- (74) Gibbins D, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1143-1149.
- (75) Gil M, Dagan S, Eren R, Gozalbo D. Evaluation of the usefulness of anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibodies as a treatment for invasive candidiasis in a murine model. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006;89(3):345-350.
- (76) Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra C, Vivanco F, Nombela C, Monteoliva L, et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res*. 2015;14(1):142-153.
- (77) Goudjil S, Kongolo G, Dusol L, Imestouren F, Cornu M, Leke A, et al. (1–3)- β -D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26(1):44-48.

- (78) Gow NAR, Brown AJP, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(4):366-371.
- (79) Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(4):406-412.
- (80) Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorín I, Renau-Piqueras J, Martínez J, Gil M. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun.* 1998;66(5):2052-2059.
- (81) Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande-Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocoial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003;37(9):1172-1177.
- (82) György B, Szabó T, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667-2688.
- (83) Han B, Chen J, Yu YQ, Cao YB, Jiang YY. Antifungal activity of *Rubus chingii* extract combined with fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Microbiol Immunol.* 2016;60(2):82-92.
- (84) Harding C, Heuser J, Stahl P. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol.* 2013;4(4):367-371.
- (85) Haynes K. Virulence in *Candida species*. *Trends Microbiol.* 2001;9(12):591-596.
- (86) Hostetter M. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(1):29-42.
- (87) Hoyer L, Green C, Oh S, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family-a sticky pursuit. *Med Mycol.* 2008;46(1):1-15.
- (88) Huang S, Wu C, Chang Y, Kwon-Chung K, Brown R, Jong A. *Cryptococcus neoformans*-Derived Microvesicles Enhance the Pathogenesis of Fungal Brain Infection. *PLoS One.* 2012;7(11).
- (89) Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol.* 2000;174(5):362-374.

- (90) Ibrahim A, Mirbod F, Filler S, Banno Y, Cole G, Kitajima Y, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1995;63(5):1993-1998.
- (91) Imbert C, Lassy E, Daniault G, Jacquemin J, Rodier M. Treatment of plastic and extracellular matrix components with chlorhexidine or benzalkonium chloride: effect on *Candida albicans* adherence capacity *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(2):281-287.
- (92) Inal J, Ansa-Addo E, Lange S. Interplay of host-pathogen microvesicles and their role in infectious disease. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):258-262.
- (93) Ishibashi K, Yoshida M, Nakabayashi I, Shinohara H, Miura NN, Adachi Y, et al. Role of anti- β -glucan antibody in host defense against fungi. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(1):99-109.
- (94) Jabra-Rizk M, Falkler W, Merz W, Baqui A, Kelley J, Meiller T. Cell Surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18(1):17-22.
- (95) Jeffery C. An introduction to protein moonlighting. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(6):1679-1683.
- (96) Jin L, Bai X, Luan N, Yao H, Zhang Z, Liu W, et al. A designed tryptophan and lysine/arginine-rich antimicrobial peptide with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistance *Candida albicans* vaginitis. *J Med Chem* 2016;59(5):1791-1799.
- (97) Jong A, Chen S, Stins M, Kim K, Tuan T, Huang S. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*. 2003;52(8):615-622.
- (98) Kapteyn J, Hoyer L, Hecht J, Muller W, Andel A, Verjleij A, et al. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall defective mutants. *Mol Microbiol*. 2000;35:601-611.
- (99) Kapteyn J, Montijn R, Dijkgraaf G, Klis F. Identification of β -1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol*. 1994;65:402-407.
- (100) Klis F, de Groot P, Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2001;39(1):1-8.

- (101) Klis F, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. . FEMS Microbiol Rev. 2002;26:239-256.
- (102) Kollár R, Petráková E, Ashwell G, Robbins P, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall: the linkage between chitin and $\beta(1,3)$ -glucan. J Biol Chem. 1995;270(3):1170-1178.
- (103) Kopecká M, Phaff H, Fleet G. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. J Cell Biol. 1974;62(1):66-76.
- (104) Kruger S, Elmageed Z, Hawke D, Wörner P, Jansen D, Abdel-Mageed A, et al. Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. BMC Cancer. 2014;14(44).
- (105) Kumamoto C. *Candida* biofilms. Curr Opin Microbiol. 2002;5(6):608-611.
- (106) Kumar D, Gupt D, Shankar S, Srivastava R. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer. Oncotarget. 2015;20(6):3280-3291.
- (107) Kuster B, Schirle M, Mallick P, Aebersold R. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(7):577-583.
- (108) Laforet L, Moreno I, Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Martínez J, Argüelles J, et al. Pga26 mediates filamentation and biofilm formation and is required for virulence in *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2011;11(5):389-397.
- (109) Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Clin Infect Dis. 2012;54(5):633-643.
- (110) Lee W, Shin J, Uh Y, Kang M, Kim S, Park K, et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. J Clin Microbiol. 2011;49(9):3139-3142.
- (111) Leidich S, Ibrahim A, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. J Biol Chem. 1998;273(40):26078-26086.

- (112) Leroy O, Bailly S, Gangneux J-, Mira J-, Devos P, Dupont H, et al. Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. *Ann Intensive Care*. 2016;6(1):1-11.
- (113) Li F, Ma C, Shi L, Lu J, Wang Y, Huang M, et al. Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. *BMC Infect Dis*. 2013;13:253.
- (114) Li Wq, Hu Xc, Zhang X, Ge Y, Zhao S, Hu Y, et al. Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine*. 201;29(33):5526-5533.
- (115) Lim C, Rosli R, Seow H, Chong P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(1):21-31.
- (116) Lockhart S, Diekema D, Pfaller M. CHAPTER 1 - The epidemiology of fungal infections. In: Anaissie E, McGinnis M, Pfaller M, editors. *Clinical Mycology (SECOND EDITION)* Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009. p. 1-14.
- (117) López-Ribot J, Chaffin W. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1996;178:4724-4726.
- (118) Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, et al. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):532-538.
- (119) Magobo R, Corcoran C, Seetharam S, Govender N. *Candida auris*-associated candidemia, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(7):1250-1251.
- (120) Mah T, O'Toole G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9(1):34-39.
- (121) Manners D, Masson A, Patterson J, Björndal H, Lindberg B. The structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J*. 1973;135(1):31-36.
- (122) Marcilla A, Elorza M, Mormeneo S, Rico H, Sentandreu R. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymoliasis, chitinase and β -mercaptoethanol. *Arch Microbiol*. 1991:312-319.

- (123) Marcilla A, Trelis M, Cortés A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez M, et al. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*. 2012;7(9).
- (124) Martin E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6:801-811.
- (125) Martone W, Gaynes R, Horan T, Danzig L, Emori T, Monnet D, et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) semiannual report, May 1995. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Am J Infect Control*. 1995;26(3):377-385.
- (126) Mayer M, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005;2:670-684.
- (127) Merzendorfer H. Chitin biosynthesis in fungi. *Eur J Cell Biol*. 2011;90(9):759-769.
- (128) Miranda RG, Gusman HD, Colombo AP. Antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus PDT against intracanal *Candida albicans*: an ex vivo study. *Braz Oral Res*. 2015;29(1):1-7.
- (129) Mitchell A. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 1998 12;1(6):687-692.
- (130) Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(5):328-335.
- (131) Molina M, Gil C, Pla J, Arroyo J, Nombela C. Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc Res Tech*. 2000;51(6):601-612.
- (132) Montagnoli C, Sandini S, Bacci A, Romani L, La Valle R. Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis. *Med Mycol*. 2004;42(4):319-324.
- (133) Moukadiri I, Zueco J. Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Res*. 2001;1(3):241-245.
- (134) Munro C, Gow N. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2001;39(1):41-53.

- (135) Munro C, Selvaggini S, de Bruijn I, Walker L, Lenardon M, Gerssen B, et al. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2007;63(5):1399-1413.
- (136) Naglik J, Challacombe S, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):400-428.
- (137) Nguyen M, Wissel M, Shields R, Salomoni M, Hao B, Press E, et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012;54(9):1240-1248.
- (138) Nguyen DB, Thuy Ly TB, Wesseling MC, Hittinger M, Torge A, Devitt A, et al. Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells. *Cell Physiol Biochem* 2016 Mar 4;38(3):1085-1099.
- (139) Nieuwland R, Sturk A. Why do cells release vesicles? *Thromb Res*. 2010;125(1):49-51.
- (140) Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Makihira S, Samaranayake L. Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation in vitro. *Mycopathologia*. 1998;144(3):125-129.
- (141) Nimrichter L, de Souza M, Del Poeta M, Nosanchuk J, Joffe L, Tavares Pde M, et al. Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells. *Front Microbiol*. 2016;7:1034.
- (142) Nogueira S, Fonseca F, Rodrigues M, Mundodi V, Abi-Chacra E, Winters M, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun*. 2010;78(9):4040-4050.
- (143) Nolte-'t Hoen E, Buermans H, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben M, 't Hoen P. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(8):9272-9285.
- (144) Nombela C, Gil C, Chaffin W. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol*. 2006;14:15-21.
- (145) Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, del Castillo L, Valentin E, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. *Mycopathologia*. 2010;169(4):269-278.

- (146) Nuoffer C, Horvath A, Riezman H. Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidyl inositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem*. 1993;268(14):10558-10563.
- (147) Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*. 1995;345(8941):17-20.
- (148) Obayashi T, Yoshida M, Tamura H, Aketagawa J, Tanaka S, Kawai T. Determination of plasma (1-3)-beta-D-glucan: a new diagnostic aid to deep mycosis. *J. Med. Vet. Med*. 1992;30:275-280.
- (149) Orlean P, Ammer A, Watzele M, Tanner W. Synthesis of an O-glycosilated cell surface protein induced in yeast by alpha-factor. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1986;83:6263-6266.
- (150) Osawa K, Shigemura K, Yoshida H, Fujisawa M, Arakawa S. *Candida* urinary tract infection and *Candida species* susceptibilities to antifungal agents. *J Antibiot* 2013;66(11):651-654.
- (151) Pannuti C, Gingrich R, Pfaller M, Wenzel R. Nosocomial pneumonia in adult patients undergoing bone marrow transplantation: A 9-year study. *J Clin Oncol*. 1991;9(1):77-84.
- (152) Pappas P, Kauffman C, Andes D, Clancy C, Marr K, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis. Infectious Diseases Society of America. 2016.
- (153) Pardini G, De Groot P, Coste A, Karababa M, Klis F, de Koster C, et al. The *CRH* family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence in *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 2006;281(52):40399-40411.
- (154) Pasqualotto AC, Nedel WL, Machado TS, Severo LC. Risk factors and outcome for nosocomial breakthrough candidaemia. *J Infect*. 2006;52(3):216-222.
- (155) Pasqualotto AC, Nedel WL, Machado TS, Severo LC. A comparative study of risk factors and outcome among outpatient-acquired and nosocomial candidaemia. *J Hosp Infect*. 2005 6;60(2):129-134.

- (156) Pedreño Y, Maicas S, Argüelles J, Sentandreu R, Valentín E. The *ATC1* gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 2004;279:40852-40860.
- (157) Peman J, Quindós G. Current aspects of invasive diseases caused by *Candida* and other yeast fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2016;33(3):133-139.
- (158) Peman J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasivas por hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(4):213-218.
- (159) Peman J, Salavert Lletía M. Prevention and control of nosocomial and health-care facilities associated infections caused by species of *Candida* and other yeasts. *Rev Esp Quimioter*. 2013;26:298-311.
- (160) Perumal P, Mekala S, Chaffin W. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(7):2454-2463.
- (161) Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1-53.
- (162) Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-163.
- (163) Pfaller M, Diekema D. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3551-3557.
- (164) Pfaller M, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida Species* to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1366-1377.
- (165) Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2(4):596-618.
- (166) Pontón J. Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 2009;26:8-14.

- (167) Popolo L, Ragni E, Carotti C, Palomares O, Aardema R, Back J, et al. Disulfide bond structure and domain organization of yeast $\beta(1,3)$ -glucanoyltransferases involved in cell wall biogenesis. *J Biol Chem*. 2008;18553-18565.
- (168) Poulain D, Jouault T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7(4):342-349.
- (169) Ramage G, Wickes B, Lopez-Ribot J. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab*. 2001;20(7):42-44.
- (170) Ramón A, Valentín E, Maicas S, Sentandreu R. Expression of *YWPI*, a gene that encodes a specific *Yarrowia lipolytica* micelial cell wall protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol*. 1997;22:77-83.
- (171) Rapaso G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-383.
- (172) Ratajczak MZ, Ratajczak J. Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):7.
- (173) Richard M, Plaine A. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(2):119-133.
- (174) Rodrigues M, Nakayasu E, Oliveira D, Nimrichter L, Nosanchuk JM, Almeida I, et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell*. 2008;7(1):58-67.
- (175) Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Nosanchuk JD, Casadevall A. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? *Lipid Insights*. 2008:27-40.
- (176) Rodriguez-Tudela J, Alastruey-Izquierdo A, Gago S, Cuenca-Estrella M, León C, Miro J, et al. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(2):183-189.
- (177) Ruiz-Herrera J. *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly*. CRC Press. 1992;1:1-256.
- (178) Ruiz-Herrera J. Chemical components of the cell wall of *Aspergillus species*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1967;122(1):118-125.

- (179) Ruiz-Herrera J, Elorza M, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(1):14-29.
- (180) Salavert Lletía M, Jarque Ramos I, Peman García J. Aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clínico-terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24(1):36-45.
- (181) Santos MAS, Cheesman C, Costa V, Moradas-Ferreira P, Tuite MF. Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida spp.* *Mol Microbiol.* 1999;31(3):937-947.
- (182) Saputo S, Chabrier-Rosello Y, Luca F, Kumar A, Krysan D. The RAM network in pathogenic fungi. *Eukaryot Cell.* 2012;11(6):708-717.
- (183) Sarthy A, McGonigal T, Coen M, Frost D, Meulbroek J, Goldman R. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the *BGL2* gene encoding a 1,3- β -glucosyltransferase. *Microbiology.* 1997;143:367-376.
- (184) Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris spp. nov.*, a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009;53(1):41-44.
- (185) Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2010;9(7):991-1008.
- (186) Sharkey L, McNemar M, Saporito-Irwin S, Sypherd P, Fonzi W. *HWPI* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1* and *RBF1*. *J Bacteriol.* 1999;181(17):5273-5279.
- (187) Shaw J, Mol P, Bowers B, Silverman S, Valdivieso M, Durán A, et al. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 1991;114(1):111-123.
- (188) Shematek E, Broatz J, Cabib E. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of $\beta(1\rightarrow3)$ glucan synthetase. *Journal of Biological Chemistry.* 1980;255(3):888-894.
- (189) Shevchenko A, Jensen O, Podtelejnikov A, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;1996(93):25-14440.

- (190) Shifrin D, Demory Beckler M, Coffey R, Tyska M. Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Mol Biol Cell*. 2013;24(9):1253-1259.
- (191) Shilov I, Seymour S, Patel A, Loboda A, Tang W, Keating S, et al. 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*. 2007;6(9):1638-1655.
- (192) Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;36(2):288-305.
- (193) Silveira C, Piffer A, Kmetzsch L, Fonseca F, Soares D, Staats C, et al. The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. *Fungal Genet Biol*. 2013;60:53-63.
- (194) Silverman J, Clos J, de Oliveira C, Shirvani O, Fang Y, Wang C, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci*. 2010;123(6):842-852.
- (195) Silverman J, Clos J, Horakova E, Wang A, Wiesgigl M, Kelly I, et al. *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 2010;185(9):5011-5022.
- (196) Silverman J, Reiner N. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol*. 2011;13(1):1-9.
- (197) Silverman J, Reiner N. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2011;1(26).
- (198) Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähns B, Neuber K, et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res*. 2004;4(4-5):401-408.
- (199) Sturtevant J, Calderone R. *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol*. 1997;14(3):90-97.
- (200) Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317-324.

- (201) Sudbery P. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9:737-748.
- (202) Sudbery P. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ringlocalization. *Mol Microbiol*. 2001;41(1):19-31.
- (203) Sugiyama T, Thillainadesan G, Chalamcharla VR, Meng Z, Balachandran V, Dhakshnamoorthy J, et al. Enhancer of Rudimentary Cooperates with Conserved RNA-Processing Factors to Promote Meiotic mRNA Decay and Facultative Heterochromatin Assembly. *Mol Cell*. 2016;61(5):747-759.
- (204) Sun J, Solis N, Phan Q, Bajwa J, Kashlev H, et al. Host Cell Invasion and Virulence Mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLOS Pathogens*. 2010;6(11).
- (205) Sundstrom P, Aliaga G. A subset of proteins found in culture supernatants of *Candida albicans* includes the abundant, immunodominant, glycolytic enzyme enolase. *J Infect Dis*. 1994;169(2):452-456.
- (206) Sundstrom P, Jensen J, Balish E. Humoral and cellular immune responses to enolase after alimentary tract colonization or intravenous immunization with *Candida albicans*. *J Infect Dis*. 1994;170(2):390-395.
- (207) Surarit R, Gopal P, Shepherd M. Evidence for a glucosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 1988;134(6):1723-1730.
- (208) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee J, Lötvall J. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-659.
- (209) Valentín E, Herrero E, Pastor F, Sentandreu R. Solubilization and analysis of mannoproteins molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. 1984;130:1419-1428.
- (210) Valentín E, Herrero E, Rico H, Miragall F, Sentandreu R. Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. 1987;148(2):88-94.
- (211) Vallejo M, Matsuo A, Ganiko L, Medeiros L, Miranda K, Silva L, et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -Galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell*. 2011;10(3):343-351.

- (212) van Deventer HJ, Goessens WH, van Vliet AJ, Verbrugh HA. Anti-enolase antibodies partially protective against systemic candidiasis in mice. *Clinical Microbiology and Infection*. 1996 8;2(1):36-43.
- (213) van Dongen HM, Masoumi N, Witwer KW, Pegtel DM. Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(2):369-386.
- (214) van Doormaal F, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller H, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med*. 2009;67(7):266-273.
- (215) Vargas G, Rocha J, Oliveira D, Albuquerque P, Frases S, Santos S, et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*. 2015;17(3):389-407.
- (216) Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Pontón J, Quindós G, Aoki S, et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20(2):52-54.
- (217) Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:2980.
- (218) Vlassov A, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):940-948.
- (219) Weinberger M, Leibovici L, Perez S, Samra Z, Ostfeld I, Levi I, et al. Characteristics of candidaemia with *Candida-albicans* compared with *non-albicans Candida* species and predictors of mortality. *J Hosp Infect* 2005 10;61(2):146-154.
- (220) Wey S, Mori M, Pfaller M, Woolson R, Wenzel R. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*. 1988;148(12):2642-2645.
- (221) Winner H, Hurrey R. *Candida albicans*. *Candida albicans*. 1964.
- (222) Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S, Seifert H, Wenzel R, Edmond M. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39(3):309-317.

- (223) Wolf J, Espadas-Moreno J, Luque-Garcia J, Casadevall A. Interaction of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles with the cell wall. *Eukaryot Cell*. 2014;13(12):1484-1493.
- (224) Wysoczynski M, Ratajczak M. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer*. 2009;125(7):1595-1603.
- (225) Yuan Z, Kolluri K, Gowers K, Janes S. TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1).
- (226) Yuan MJ, Maghsoudi T, Wang T. Exosomes Mediate the Intercellular Communication after Myocardial Infarction. *Int J Med Sci*. 2016;13(2):113-116.