



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Optimización del proceso de obtención de muestra de Candidalisina para su estudio posterior por Resonancia Magnética Nuclear y evaluación de daño celular provocado por esta muestra en comparación con la Candidalisina silvestre.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALESI MIRANDA MADRID



CDMX, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado

Presidente: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Vocal: Gutiérrez Ramos Abel

Secretario: Berrón Ruiz Laura

Suplente 1: García Lozano Alberto

Suplente 2: González Ibarra Misael

Asesor:

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Lab 115 Departamento de Bioquímica

Edificio E, Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México,

Coyoacán, CDMX. C.P. 04510

México

Supervisor Técnico y sitio donde se realizó el trabajo

Dr. Nessim Kichik Rodríguez

Centre for Host Microbiome Interactions (Naglik Laboratory)

Faculty of Dentistry, Oral & Craniofacial Sciences

King's College London, SE1 9RT

Reino Unido

Agradecimientos

En primera instancia agradezco infinitamente a mi asesor el Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar y a mi supervisor técnico el Dr. Nessim Kichik por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en el Laboratorio Naglik en King's College London, lo cual fue un honor, una experiencia increíble e inolvidable. Su ayuda incondicional fue imprescindible para obtener los resultados importantes descritos en esta tesis, así como para tener el gran logro académico de haber participado en este proyecto que me encanta y me ha permitido aprender muchísimo. Gracias Dr. Kichik por su tiempo, su amabilidad y paciencia, su dedicación a este trabajo, sus conocimientos, confianza y dirección.

También quiero agradecer al Dr. Julian Naglik por su apoyo, por permitirme trabajar en su laboratorio y formar parte de su maravilloso equipo por un tiempo. Asimismo quisiera agradecer a la Dirección General de Cooperación e Internacionalización de la UNAM por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo mediante la Beca UNAM-DGECI Estancias Cortas de Capacitación e Investigación (otoño 2019).

Por la revisión cuidadosa de este trabajo y su orientación, agradezco al Dr. Alejandro Magallanes Puebla.

Gracias a mi familia y amigos por todo su apoyo durante la carrera y para poder realizar mi viaje a Londres que me permitió participar en este proyecto tan importante y especial para mí. Por último quiero hacer una mención muy importante a mis padres que siempre han impulsado y motivado mi desarrollo académico y personal, muchas gracias.

Indice

Agradecimientos.....	3
Indice.....	4
Definiciones de abreviaturas del presente texto.....	11
Resumen.....	15
1. Introducción.....	16
1.1 Infecciones causadas por hongos oportunistas.	16
1.1.1 Candidiasis.....	17
1.1.1.1 Candidiasis mucocutánea.....	18
1.1.1.1.1 Candidiasis oral.....	18
1.1.1.1.2 Candidiasis genital.....	19
1.1.1.2 Candidiasis cutánea.....	20
1.1.1.3 Candidiasis mucocutánea crónica.....	21
1.1.1.4 Candidiasis invasiva.....	21
1.1.1.5 <i>Candida albicans</i>	24
1.1.1.5.1 Interacción de <i>Candida albicans</i> con las superficies epiteliales.....	29
1.1.1.5.1.1 Adhesión.....	29
1.1.1.5.1.2 Reconocimiento epitelial.....	32
1.1.1.5.1.3 Invasión a las barreras mucosas.....	36
1.1.1.5.2 Generación de Candidalislina y su papel en el daño epitelial e inmunidad innata.	39
1.1.1.5.3 Funcionalidad dual de Candidalislina.....	44
1.2 Antecedentes del trabajo.....	47
1.2.1 Expresión de proteínas sin células (EPSC).....	47

1.2.1.1 Expresión recombinante de proteínas.....	50
2. Justificación.....	51
3. Hipótesis.....	51
4. Objetivo general	52
4.1 Objetivos particulares.....	52
4.1.1 Optimizar la reccion de síntesis de candidalisina sin células.	52
4.1.2 Optimizar la purificacion y preparacion de la candidalisina recombinante.	52
4.1.3 Realizar una comparación de la actividad biologica de la candidalisina recombinante resultante y la candidalisina silvestre.	52
5. Metodología y Procedimiento experimental.....	52
5.1 Técnicas generales.....	52
5.1.1 Electroforesis en geles de Agarosa.....	52
5.1.2 SDS Page	53
5.1.3 Western Blot.....	55
5.1.4 Cuantificacion de la proteina	57
5.2 Optimizacion de la reaccion sin células para la produccion recombinante de candidalisina.	58
5.2.1 Obtención del material genético modelo para el sistema de síntesis de proteínas sin células.....	58
5.2.1.1 Diseño de la plantilla genética con el gen	58
5.2.1.2 Reaccion de PCR para la produccion de material genetico.	64
5.2.1.3 Purificacion del producto de reaccion de PCR.	66
5.2.1.4 Reacción de hibridación de ADN.....	66
5.2.2 Sintesis de candidalisina por EPSC.	67
5.2.3 Purificacion y preparación de las construcciones.....	68

5.2.3.1 Purificación IMAC.....	68
5.2.3.2 Desalado/intercambio de tampon por exclusion molecular	69
5.2.3.3 Digestiones enzimaticas.....	70
5.2.3.4 Concentracion de la muestra por liofilización	71
5.3 Evaluación de la actividad biológica de la construcción p99	72
5.3.1 Propagacion de celulas TR146	72
5.3.2 Restricción de suero.....	73
5.3.3 Infecciones celulares.....	73
5.3.4 Recolección de sobrenadantes y proteínas	74
5.3.5 Evaluación del daño celular por ensayo de LDH.....	74
5.3.6 Cuantificación de proteína por ensayo BCA. ¡Error! Marcador no definido.	
6. Resultados	76
6.1 Optimización de la reacción de síntesis de Cdl sin células	77
6.1.1 Generación del templado de ADN para la reacción <i>in vitro</i> por medio de la técnica de amplificación por PCR.....	77
6.1.2 Optimización del volumen de la mezcla de reacción y de las condiciones de almacenamiento del producto.	78
6.1.3 Identificación de la construcción óptima: Evaluacion de eficacia de expresión, purificación y digestiones enzimaticas de las contrucciones diseñadas.....	79
6.2 Optimización del protocolo de producción de muestras por EPSC para estudios estructurales por RMN.....	87
6.2.1 Primer procedimiento	87
6.2.2 Ensayo de actividad de p99p obtenido a partir del procedimiento 1 vs Candidalisina WT.....	90
6.2.3 Segundo procedimiento	91

6.3.4 Ensayo de actividad de p99p obtenido a partir del procedimiento 2 vs Candidalisina WT.....	92
7. Discusión.....	94
8. Conclusiones.....	103
9. Perspectivas.....	104
Referencias	106
ANEXO.....	126
10. Material adicional	127
10.1 Apéndice A. Formación de oligómeros por candidalisina y su intercalación a modelos de la membrana celular.....	127
10.2 Apéndice B. Optimización de la generación de material genético modelo para expresión <i>in vitro</i>	129
10.3 Apéndice C. Bioinformática	131
10.4 Apéndice D. Dicroísmo circular y Cross Linking.....	133
8.5 Anexo A	135

Índice de Figuras y Tablas

Figura	Título	Página
Tabla 1	Clasificación de la candidiasis oral.	18
Figura 1	Crecimiento de <i>C. albicans</i> en candidiasis pseudomembranosa.	19
Figura 2	Diferentes tipos de Candidiasis cutánea.	20
Figura 3	Patogenia de la candidiasis invasiva.	23
Figura 4	Morfologías de levadura, hifas y pseudohifas.	26
Figura 5	Adhesión de <i>C. albicans</i> a células epiteliales del huésped.	31
Figura 6	Reconocimiento epitelial y discriminación de levadura e hifas de <i>C. albicans</i>	34
Figura 7	La internalización epitelial de las hifas de <i>C. albicans</i> .	36
Figura 8	<i>C. albicans</i> secreta de las hifas diversos factores para penetrar activamente los tejidos mucosos	37
Figura 9	Estructura de Cdl, su intercalación a la membrana y oligomerización.	39
Figura 10	Generación de Cdl y activación de células epiteliales.	41
Figura 11	Doble función de Cdl: virulencia y avirulencia.	44
Figura 12	El principio de la EPSC.	47
Tabla 2	Peso molecular y coeficiente de extinción de cada construcción.	55
Figura 13	Producción de ADN pseudocíclico siguiendo la metodología desarrollada por Wu et al	56
Figura 14	Diseño del material genético modelo.	58
Figura 15	Estructura de Cdl y formación de barriles alfa helicoidales.	59
Figura 16	Representación de la intercalación de Candidalísina a un modelo de membrana celular (DPC) y su oligomerización dependiente de la concentración de DPC.	60

Figura 17	Diferencia en las longitudes de los enlazadores y su efecto en la exposición del sitio de corte enzimático de cada construcción.	61
Tabla 3	Ciclo de PCR a usar para la producción de material genético apto para EPSC.	62
Tabla 4	Ciclo de PCR a usar para el proceso de hibridación	64
Figura 18	Método general a seguir para la purificación y preparación de muestra de Cdl para RMN.	74
Figura 19	Electroforesis de agarosa de los productos de PCR para cada construcción.	75
Figura 20	Optimización de volumen para EPSC (membrana de nitrocelulosa)	76
Figura 21	Visualización de la Purificación IMAC de los productos de EPSC de cada construcción.	77
Figura 22	Digestión enzimática de p97 y p98 visualizada por tinción Coomassie en gel de acrilamida 14%.	79
Figura 23	Digestión enzimática de p99 visualizada por tinción Coomassie en gel de acrilamida 14%.	80
Figura 24	Visualización de la Purificación IMAC de los productos de la digestión enzimática. Tinción	81
Figura 25	Procedimiento de purificación, procesamiento y preparación de la muestra con 3 pasos de desalado o cambio de tampón y con un rendimiento final de 87 μ M.	84
Figura 26	Visualización de la Purificación IMAC de p99, producto de una reacción EPSC de 5 ml.	85
Figura 27	Digestión enzimática de p99 visualizada por tinción Coomassie en gel de acrilamida 14%.	86
Figura 28	Visualización de la Purificación IMAC de los productos de la digestión enzimática. Tinción	87
Figura 29	Evaluación de daño celular por Ensayo LDH de p99p del Procedimiento 1.	88

Figura 30	Procedimiento de purificación, procesamiento y preparación de la muestra optimizado.	89
Figura 31	Evaluación de daño celular por Ensayo LDH de p99p del Procedimiento 2.	90
Figura 32	Ultracentrifugación analítica de Cdl en diferentes proporciones de péptido a detergente.	124
Figura 33	Evaluación del experimento de cross-linking de Cdl en diferentes concentraciones de detergente.	125
Figura 34	Evaluación del uso de plásmidos pET y pRSETA para la expresión in vitro de GFP.	127
Figura 35	Evaluación del uso de diferentes modelos de material genético para la expresión in vitro de GFP.	127
Figura 36	Secuencia de candidalislina.	128
Figura 37	Predicción de la estructura secundaria de candidalislina a partir de su secuencia.	128
Figura 38	Se predice una estructura mayoritariamente α -helical a partir de la secuencia de Cdl.	129
Figura 39	Se muestra la probabilidad de que ciertas partes de la secuencia sean transmembranales a través del programa TMHMM.	129
Figura 40	Cdl tiene un cambio conformacional en su estructura secundaria en presencia de un modelo de membrana celular (DPC).	131
Figura 41	La estructura α -helical de Cdl aumenta en proporción en presencia de DPC	130
Figura 42	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción p97.	132
Figura 43	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción p98.	133
Figura 44	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción p99.	134

Definiciones de abreviaturas del presente texto

<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
Spp	especies
Sp	especie
CVV	Candidiasis vulvovaginal
CVVR	Candidiasis vulvovaginal recurrente
IL	interleucina
CI	Candidiasis invasiva
UCI	Unidades de cuidados intensivos
Cdl	Candidalisina
pH	Potencial de hidrógeno
CO ₂	Dióxido de Carbono
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
Hwp1p	proteínas de pared hifal
ALS	secuencias tipo aglutinina
Als3p	Proteína 3 de la familia de proteínas con secuencias tipo aglutinina
Als1p	Proteína 1 de la familia de proteínas con secuencias tipo aglutinina
Als5p	Proteína 5 de la familia de proteínas con secuencias tipo aglutinina
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
STAT1	gen transductor de señal y activador de la transcripción 1
Her2	receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano
Ssa1p	proteína de choque térmico
Ywp1p/Pga24p	proteína 1 de pared de levadura
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos

TLR	receptores tipo Toll
CLR	receptores de lectina de tipo C
NLR	receptores ricos en leucina del dominio de unión a nucleótidos
EphA2	receptor 2 de efrina epitelial tipo A
ROS	especies reactivas de oxígeno
MAPK	proteína quinasas activadas por mitógenos
NF-kB	cadena ligera kB de los linfocitos B activados
PI3K	fosfoinositida 3-quinasa
JNKs	quinasas c-Jun N-terminal
ERK1 y ERK2	quinasas reguladas por señalización extracelular 1 y 2
Akt	serina/treonina proteína quinasa B
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero
LDH	lactato deshidrogenasa
MKP1	Fosfatasa 1 de proteína quinasa activada por mitógenos
EGFR/HER2	heterodímero del receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
Caco-2	células de adenocarcinoma de colon
SAP	Proteasa Aspártica Secretada
Sap5p	proteína 5 de la familia SAP
Sap2p	la proteína 2 de la familia SAP
ECE1	extensión del gen de alargamiento celular
Ece1p	proteína codificada por el gen ECE1
G-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
hBD	humano-defensina
RMN	espectroscopia de resonancia magnética nuclear RMN
<i>in vivo</i>	dentro de un organismo
<i>in vitro</i>	fuera de un organismo
ARNP	ARN-polimerasas

IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
pRSETA	Bacterial vector for high-level expression of proteins with a cleavable 6xHis tag.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
GB1	dominio B1 de la proteína estreptocócica G
IMAC	cromatografía de afinidad con metal inmovilizado
DPC	detergente dodecilsulfocolina
NEB	New England Biolabs
Ni-NTA	ácido níquel-nitrilotriacético
IL	interleucina
Fig	Figura
p97	construcción de ADN con sitio de corte enzimático para enteroquinasa y secuencia enlazadora corta (5 aminoácidos)
p98	construcción de ADN con sitio de corte enzimático para trombina y secuencia enlazadora corta (5 aminoácidos)
p99	construcción de ADN con sitio de corte enzimático para trombina secuencia enlazadora larga (10 aminoácidos)
ng	nanogramos
μ l	microlitro
ml	mililitro
μ M	micromolar
mM	milimolar
dGTP	desoxirribosa trifosfato de guanina
dTTP	desoxirribosa trifosfato de timina
dCTP	desoxirribosa trifosfato de citosina
dATP	desoxirribosa trifosfato de adenina
EtOH	Etanol
TEA	tampón para los ensayos de daño celular que contiene 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 3 mM DPC (TEA).
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
NaCl	cloruro de sodio

Asp	aspartato
Lys	lisina
CaCl ₂	cloruro de calcio
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate-buffered saline)
ATP	Adenosin trifosfato
<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i>
<i>Pichia pastoris</i>	<i>P.pastoris</i>
C(s)	Coeficiente de sedimentación
SDS Page	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
INT	cloruro de 2-(4-yodophenyl)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
TBS	tampón solución salina con Tris
WT	silvestre
PA	Péptidos antimicrobianos

Resumen

La candidiasis es una enfermedad infecciosa causada por levaduras del género *Candida*, la especie más comúnmente implicada es *Candida albicans*. Por lo general, esta es una levadura comensal inofensiva que se encuentra comúnmente en los tractos gastrointestinales, respiratorios y genitourinarios. Sin embargo, puede convertirse en un organismo patógeno en personas inmunodeprimidas o inmunodeficientes.

Se descubrió en 2016 la primera toxina peptídica asociada a un hongo, la Candidalisina, que es secretada de las hifas de la forma patogénica de *C.albicans*. Esta toxina origina la patogenicidad del hongo mediante la inducción de daño celular, afectando el desarrollo de una respuesta inmune a través de las células epiteliales.

En el presente proyecto se purificó una muestra de Candidalisina mediante un sistema de expresión libre de células optimizado para su estudio posterior por RMN. Se evaluó la actividad del péptido resultante en un ensayo de daño celular y se comparó con Candidalisina silvestre.

Los resultados demuestran que el péptido p99p ocasiona un nivel de daño celular comparable al de Candidalisina silvestre, además de que la construcción permitió la caracterización de la toxina por RMN, lo cual proporciona información importante para continuar la investigación de su estructura y dinámica, lo cual podría llevar al desarrollo de intervenciones dirigidas para el tratamiento de la candidiasis.

1. Introducción

1.1 Infecciones causadas por hongos oportunistas.

Las infecciones fúngicas son un problema de salud mundial; se estima que mil millones de personas en el mundo tienen infecciones en piel, uñas y cabello provocadas por hongos. Más de 150 millones de personas tienen infecciones fúngicas graves que tienen un impacto significativo en sus vidas o pueden llegar a ser mortales (Bongomin et al., 2017). La frecuencia global de las enfermedades fúngicas está en aumento debido a varios factores, el principal consta en que el número de pacientes en riesgo de contraer estas infecciones incrementa cada año, incluidas las personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana, los receptores de trasplantes, los pacientes con cáncer, los pacientes que reciben inmunomoduladores, neonatos prematuros y ancianos. Otros factores son el aumento y la frecuencia de los viajes y de los cambios de clima, ya que provocan cambios en la distribución geográfica de los hongos (Vallabhaneni et al., 2016).

Las infecciones fúngicas son causadas principalmente por hongos oportunistas que aprovechan un sistema inmune debilitado local o sistémicamente para proliferar en el huésped humano y causar enfermedades (Pfaller & Diekema, 2004). Los patógenos fúngicos oportunistas incluyen organismos "comensales" como *Candida albicans* (*C. albicans*) y otras especies del género *Candida* que son levaduras que colonizan diferentes ubicaciones corporales en huéspedes sanos (d'Enfert, 2009). Las levaduras oportunistas normalmente se encuentran en una relación de tipo comensal con el huésped, ya que de esta forma pueden obtener beneficios nutricionales sin causar posibles afectaciones a los humanos (Hall & Noverr, 2017). Los microorganismos oportunistas pueden surgir tanto de organismos comensales o de microorganismos adquiridos del medio ambiente (Brown et al., 2012). Muchos microorganismos que se encuentran en el ambiente pueden ser patógenos para individuos inmunocomprometidos, incluidos hongos de la especie *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus* o *Fusarium* spp (Pfaller & Diekema, 2004).

En el mundo, las cuatro "grandes" infecciones de levaduras oportunistas son la criptococosis, la tricosporonosis, la geotricosis y la candidiasis, siendo esta última la más común (Vázquez-González et al., 2013).

1.1.1 Candidiasis

Las candidiasis incluyen a infecciones cutáneas, de mucosas y en órganos profundos causadas por levaduras del género *Candida* spp que pueden presentarse a cualquier edad y generalmente ocurren en individuos con factores de riesgo de infección que son fácilmente identificables (Pappas et al., 2018). Las infecciones por *Candida* representan el 80% de todas las infecciones por hongos en el entorno hospitalario, incluidas las infecciones del torrente sanguíneo, del tracto urinario y del sitio quirúrgico. Las infecciones del torrente sanguíneo son ahora un desafío importante para los hospitales terciarios en todo el mundo debido a sus altas tasas de prevalencia y mortalidad (Colombo et al., 2013).

Una proporción considerable de individuos sanos presenta una detectable colonización de *Candida* en la piel y las mucosas oral, gastrointestinal y genitourinaria, pero muy pocos manifiestan candidiasis. Se reporta la presencia de levaduras de *Candida* en el 25% al 75% de la población sana con ausencia de lesiones o signos de candidiasis (Maródi, 2014).

Durante el embarazo, debido a alteraciones en la respuesta inmune, flora bacteriana, niveles de glucógeno y valores de pH, aumenta la prevalencia de *Candida* en la vagina (Masri et al., 2015). Los trabajadores de la salud comúnmente presentan *Candida* en sus manos, en un estudio de Nueva York en unidades de cuidados intensivos neonatales, un 29% de los trabajadores de la salud produjeron cultivos de vigilancia positiva en una o más ocasiones (Saiman et al., 2001; Schwartz et al., 2018). Los neonatos nacidos de madres colonizadas o atendidos por trabajadores de la salud colonizados tienen mayor probabilidad de adquirir *Candida*. La transmisión del hongo desde el nacimiento provoca que los microorganismos del género *Candida* spp participen en la educación temprana del sistema inmune. El primer sitio de contacto con *Candida* por la mayoría de los recién nacidos es mucocutáneo (Poulain, 2015; Rowen, 2003).

1.1.1.1 Candidiasis mucocutánea

1.1.1.1.1 Candidiasis oral

La mucosa en la cavidad oral es el tejido más susceptible a una enfermedad sistémica adquirida. Miles de enfermedades pueden presentarse inicialmente en la mucosa oral, además de que pueden surgir trastornos de la mucosa oral como consecuencia de enfermedades sistémicas. El más notable de estos es la candidiasis oral, la infección micótica más común de la cavidad oral en humanos (L. Hu et al., 2019). Las levaduras de *Candida* son parte de la microbiota oral de individuos sanos. Se estima que está presente en 45-65% de infantes y en 30-55% de adultos. La candidiasis oral se manifiesta como consecuencia de una variedad de factores tanto locales como sistémicos (Millsop & Fazel, 2016). *C. albicans* es la especie más comunmente asociada con infecciones orales, representando más del 90% de los aislados clínicos (Colombo et al., 2013).

Los pacientes con candidiasis oral pueden ser asintomáticos o tener una sensación de ardor o estomatodinia, también conocida como síndrome de la boca ardiente (Giannini & Shetty, 2011). Las lesiones orales de la candidiasis se presentan en varias formas clínicas y tienen apariencia diferente. En la Tabla 1, se muestra una clasificación de la candidiasis oral basada en términos clínicos realizada Holmstrup y T. Axell en 1990 (Parihar, 2011; Singh et al., 2014).

Tabla 1. Clasificación de la candidiasis oral. Se divide en tipos agudo y crónico y se subdivide de acuerdo a sus distintas presentaciones clínicas (Singh et al., 2014)

Aguda	Seudomembranoso
	Eritematoso
Crónica	Seudomembranoso
	Eritematoso
	Hiperplásico
	Nodular
	Apariencia de placa
Lesiones asociadas a <i>Candida</i>	Quelitis angular
	Estomatitis por dentadura postiza
	Glositis romboide mediana

La candidiasis oral más frecuente es la forma pseudomembranosa. Este tipo de infección generalmente se caracteriza por una película blanca similar al requesón, que clínicamente se puede limpiar para revelar una base eritematosa y que a veces sangra (**Figura 1**) (Telles et al., 2017). Esta forma de candidiasis se observa con mayor frecuencia en lactantes y pacientes inmunocomprometidos. También se reconoce como la segunda infección oportunista más común que define el Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida después de la neumonía por *Pneumocystis carinii* y resulta en una morbilidad significativa en términos de pérdida de peso, malestar y calidad de vida reducida (Giannini & Shetty, 2011).



Figura 1. Crecimiento de *C. albicans* en candidiasis pseudomembranosa. A simple vista se observa a el crecimiento de la levadura como una capa pseudomembranosa en la lengua del paciente (Millsop & Fazel, 2016).

1.1.1.1.2 Candidiasis genital

A diferencia de los otros tipos de candidiasis, la candidiasis vulvovaginal (CVV) se presenta en individuos inmunocompetentes. La vaginitis por *Candida* es la infección recurrente más frecuente del tracto genital en las mujeres. Se estima que el 75% de todas las mujeres presentarán al menos un episodio CVV durante su vida, y aproximadamente la mitad de éstas presentarán dos o más episodios (Peters et al., 2014). La candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) sucede en un 78% de mujeres que experimentan un primer episodio de CVV. *C. albicans* es la principal especie de *Candida* responsable de la CVV (75-90%) (Cauchie et al., 2017).

La CVV sintomática se caracteriza por punzadas, ardor y dolor en la mucosa vulvovaginal, a menudo acompañada de secreción vaginal blanca, espesa, grumosa y no olorosa (Sobel, 2007). A diferencia del epitelio oral, el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la infección durante el CVV no da como resultado la

eliminación de hongos, sino que causa una exacerbación aguda de los síntomas (Richardson et al., 2019).

La balanitis es una afección muy común que afecta al 11% de los hombres que consultan por un problema genitourinario (Lisboa et al., 2009). Afecta de forma especial a los hombres no circuncidados con un prepucio largo mal aseado (Edwards, 1996). En los climas húmedos, las balanitis son especialmente frecuentes, incluso en los varones circuncidados (Chaine & Janier, 2006). Los síntomas más comunes son ardor, prurito y descarga subprepuccial (Gabrielson et al., 2019).

1.1.1.2 Candidiasis cutánea

Se estima que entre el 20 y el 25% de la población mundial está afectada por infecciones fúngicas de la piel. Los hongos patógenos de la piel se pueden dividir en dos clases: dermatofitos y levaduras, las especies de *Candida* pertenecen a este último. Los síntomas comunes de las infecciones cutáneas por *Candida* incluyen engrosamiento de la piel, hiperqueratosis y eritema (Kühbacher et al., 2017). El hongo que causa con mayor frecuencia la candidiasis cutánea es *C. albicans* (Havlickova et al., 2008). El hongo puede afectar a casi cualquier piel del cuerpo, pero la mayoría de las veces ocurre en áreas cálidas y húmedas, como los espacios interdigitales (Bonifaz Trujillo, 2012) (**Figura 2**).

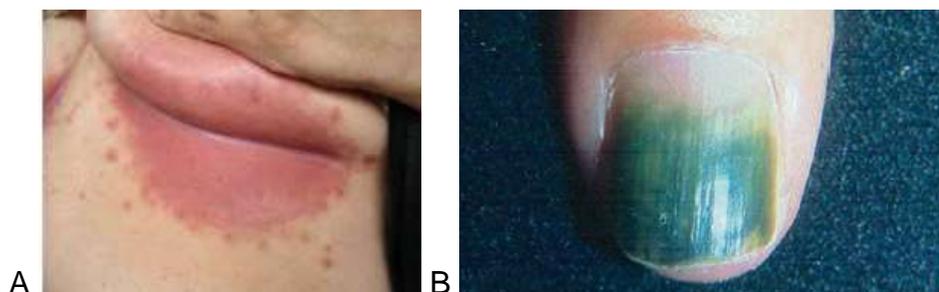


Figura 2. Diferentes tipos de Candidiasis cutánea. A. Intertriginosa. Involucra los espacios interdigitales de las manos y los pies, el pliegue submamario, la región axilar, la inguinal, el ombligo, la hendidura glútea y/o la piel perianal (Tomado de Bonifaz et al. 2012). B. Onicomicosis (paroniquia) afecta las uñas de las manos en un 85%, se desencadena por un trauma y afecta a pacientes diabéticos comúnmente (Tomado de Bonifaz et al. 2012).

1.1.1.3 Candidiasis mucocutánea crónica

Esta forma de candidiasis se presenta como una afectación a largo plazo de la mucosa, la piel y las uñas que no se logra erradicar con agentes antifúngicos tópicos (Giannini & Shetty, 2011). Existen varios trastornos de inmunodeficiencia primaria caracterizados por infecciones candidales persistentes y recurrentes de la membrana mucosa, la piel y las uñas (Maródi, 2014). Los pacientes con trastornos asociados a inmunidad deteriorada de IL-17 desarrollan candidiasis mucocutánea crónica como uno de los principales fenotipos infecciosos junto con otras manifestaciones clínicas (Okada et al., 2016).

1.1.1.4 Candidiasis invasiva

La candidiasis invasiva (CI) es la enfermedad fúngica más común entre los pacientes hospitalizados en el mundo desarrollado (Kullberg & Arendrup, 2015). Se refiere a infecciones del torrente sanguíneo con *Candida* spp (candidemia) y a infecciones profundas como absceso intraabdominal, peritonitis (inflamación del peritoneo, el tejido que cubre la pared interna del abdomen y los órganos abdominales) u osteomielitis (infección de los huesos). Es un trastorno con innumerables manifestaciones clínicas que potencialmente afectan a cualquier órgano, ya que cada *Candida* sp posee sus propias características únicas en relación con el potencial invasivo, la virulencia y la susceptibilidad antifúngica (Pappas et al., 2018). Aunque la lista de *Candida* spp que provocan CI está en aumento, se ha demostrado claramente que solo cinco especies (*C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*) representan más del 90% de los aislamientos. *C. albicans* sigue siendo la especie aislada con mayor frecuencia en todo el mundo (se detecta en el 38-70% de los casos en estudios poblacionales) (Guinea, 2014).

La CI es una infección emergente estrechamente vinculada a los avances en la tecnología médica y es ampliamente reconocida como una causa importante de morbilidad y mortalidad en el sector salud (McCarty & Pappas, 2016). De todas las formas de CI, la candidemia es la presentación clínica más frecuente que puede o no estar asociada con una invasión de tejido profundo (Morgan et al., 2005).

Tradicionalmente, los pacientes afectados con mayor frecuencia son los pacientes críticos en las unidades de cuidados intensivos (UCI), los que se someten a cirugía abdominal y pacientes neutropénicos. Las causas más frecuentes son la colonización por *Candida* de los catéteres permanentes, la translocación del intestino al torrente sanguíneo, o fuga anastomótica posterior a una laparotomía (Antinori et al., 2016).

En los hospitales de atención terciaria de todo el mundo, la infección por *Candida* es la principal causa de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo (Garbee et al., 2017). Aproximadamente el 50% de los episodios de candidemia ocurren en pacientes de la UCI, lo que refleja la complejidad de las enfermedades generalmente asociadas con esta infección (Dadar et al., 2018). Las CI son cada vez más problemáticas en estos pacientes, con resultados en la mortalidad bruta que van del 35% al 67%. El porcentaje de mortalidad directamente atribuible a candidemia se estima en 40% (Kett et al., 2011). Se ha establecido que los pacientes con candidemia pueden presentar un estado de shock séptico con una mortalidad asociada de alrededor del 60% (Kollef et al., 2012).

La patogénesis de la candidiasis invasiva se da gracias a la combinación de varios factores; un aumento de la colonización por *Candida* (generalmente atribuible al uso de antibióticos) en el tracto GI; la descomposición de la barrera mucosa, epitelial o cutánea normal; y la pérdida del mecanismo de control inmune de prevención de diseminación y proliferación en tejidos y órganos profundos (Ostrosky-Zeichner et al., 2002). En algunos casos el hongo se ve asistido por procedimientos médicos y entra directamente al torrente sanguíneo mediante la inyección de líquido contaminado o mediante catéteres intravenosos (**Figura 3**) (Van De Veerdonk et al., 2010).

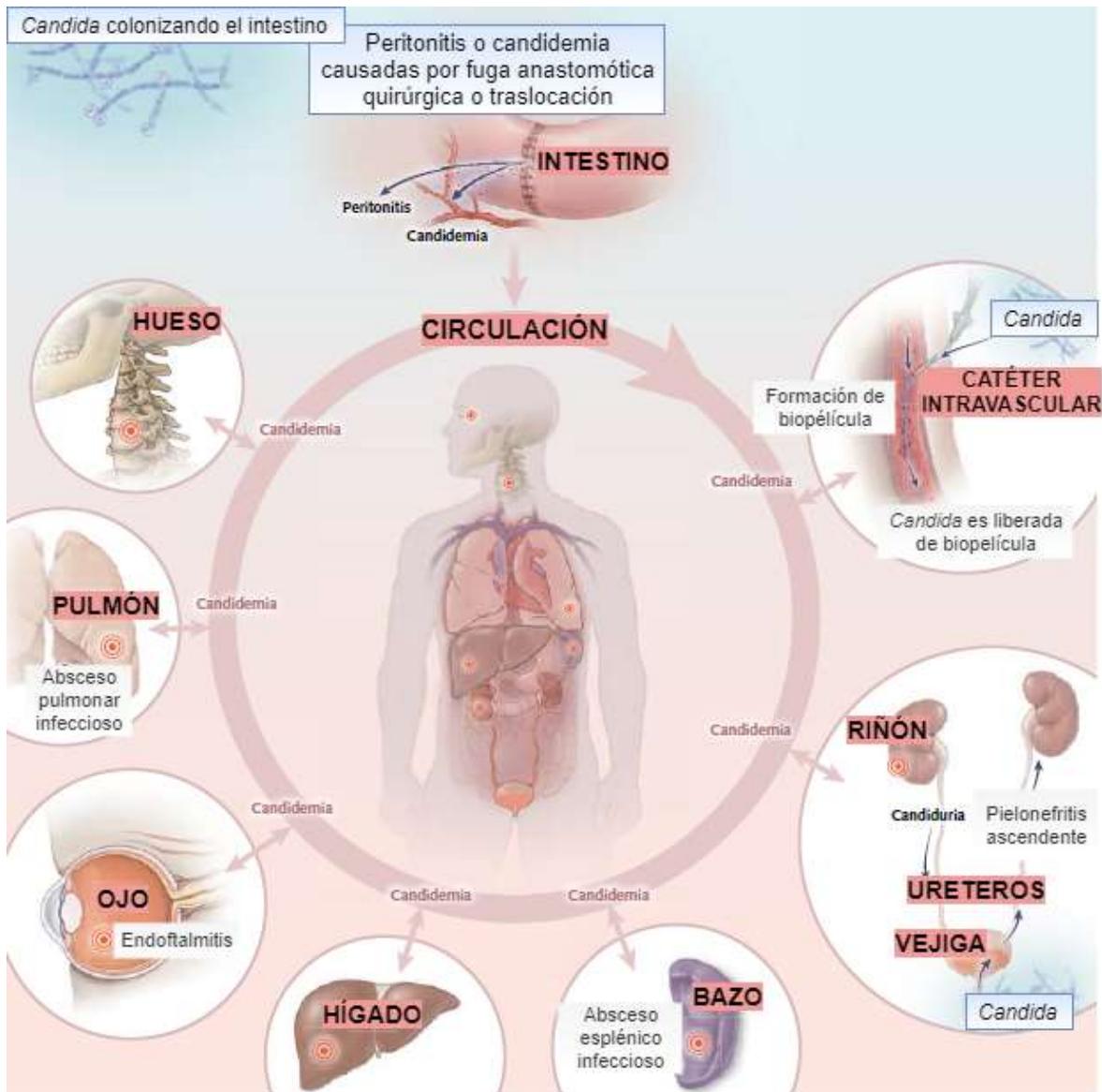


Figura 3. Patogenia de la candidiasis invasiva. En pacientes con catéteres intravasculares permanentes, la candidemia que se origina en el intestino o la piel conduce a la colonización del catéter y la formación de biopelícula. Posteriormente los hongos se liberan de esta, causando candidemia persistente. Los hongos pueden diseminarse, dando lugar a infecciones metastásicas secundarias en los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones, los huesos o los ojos. Estas infecciones profundas pueden permanecer localizadas o conducir a una candidemia secundaria (Tomado y modificado de: Kullberg y Arendrup, 2015).

Algunos de los principales factores de *C. albicans* que promueven la enfermedad invasiva son; su capacidad de intercambiar su morfología entre células de levadura unicelulares y pseudohifas e hifas (formas filamentosas multicelulares) (Felk et al.,

2002); la adherencia efectiva e invasión de las células endoteliales y epiteliales lo cual conduce su diseminación al torrente sanguíneo; las aspartil proteasas y fosfolipasas secretadas que activan la respuesta inmune innata y que son importantes para promover la invasión de tejidos y el daño a órganos (Gabrielli et al., 2016) y la Candidalisina (Cdl), toxina peptídica que daña las células de la mucosa facilitando la invasión fúngica en tejidos más profundos y tiene un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos y la virulencia fúngica durante la infección sistémica por *C. albicans* (Staniszewska, 2020; Swidergall et al., 2019).

Por otra parte, la resistencia antifúngica es un problema emergente a nivel mundial que complica aún más la selección de la terapia antifúngica adecuada. El término “*Candida* sp. resistente a múltiples fármacos” se usa para designar a cepas que son resistentes a dos clases de medicamentos antimicóticos, mientras que el término “*Candida* sp extensivamente fármaco-resistente” se refiere a cepas que son resistentes a 3 o más clases de medicamentos antimicóticos (Pappas et al., 2018).

Al igual que la gran mayoría de las infecciones sistémicas potencialmente mortales, las infecciones sistémicas por *Candida* generalmente se adquieren a través de las superficies mucosas, por lo que es fundamental mantener el equilibrio y la cinética de las respuestas inmunitarias en estas zonas para preservar la homeostasis a y las comunidades microbianas comensales mientras se eliminan los patógenos con éxito. Asimismo, es de suma importancia comprender cómo los tejidos epiteliales detectan y restringen estos patógenos a las superficies mucosas (Naglik et al., 2014; Pellon et al., 2020).

1.1.1.5 *Candida albicans*

Las *Candida* spp. son miembros comunes del microbioma humano y patógenos fúngicos oportunistas (Hallen-Adams & Suhr, 2017; Nash et al., 2017). Estos organismos pueden colonizar tanto la piel como los tractos gastrointestinales y reproductivos de los humanos. Entre el 30 y el 70% de las personas sanas portan al menos una especie de *Candida* de manera comensal (Romo & Kumamoto, 2020; P. Sudbery et al., 2004). Sin embargo, la colonización comensal benigna puede volverse patógena si los huéspedes desarrollan inmunodeficiencia, daño epitelial o

disbiosis microbiana; las especies de este género son uno de los patógenos fúngicos más comunes de los humanos. Las enfermedades van desde infecciones superficiales de la piel y membranas mucosas, hasta infecciones invasivas altamente mórbidas de los órganos internos (Bongomin et al., 2017; Brown et al., 2012; Noble et al., 2017).

C. albicans es la especie de *Candida* más comúnmente implicada en infecciones humanas y por lo mismo, la más estudiada hasta la fecha (Calderone & Fonzi, 2001). Esta especie es responsable de cientos de millones de infecciones sintomáticas cada año (Bongomin et al., 2017; Brown et al., 2012; d'Enfert, 2009). Es una levadura polimórfica diploide de las superficies mucosas y se encuentra comúnmente en los tractos gastrointestinales, respiratorios y genitourinarios. En general, es un hongo comensal inofensivo que puede aislarse de la cavidad oral de hasta el 80% de las personas sanas, pero puede convertirse en un organismo oportunista en personas inmunodeprimidas o inmunodeficientes (Cristina Cunha Villar & Dongari-Bagtzoglou, 2008).

Una de las características de *C. albicans* es que se puede adaptar para colonizar todos los segmentos, desde la cavidad oral hasta el ano (Gow & Yadav, 2017). *C. albicans* es polimórfico, cambiando a formas alternativas de crecimiento vegetativo en respuesta a condiciones ambientales como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, CO₂ y la presencia de suero *in vivo* (Noble et al., 2017). Los hongos generalmente pueden tener tres morfologías celulares: levadura, pseudohifas e hifas. La diferencia entre hifas y pseudohifas es que las primeras tienen forma de largos filamentos en forma de tubo, con lados paralelos y sin divisiones notorias entre las células, mientras que las pseudohifas son las células recién divididas a través de la gemación (**Figura 4**) (P. Sudbery et al., 2004).

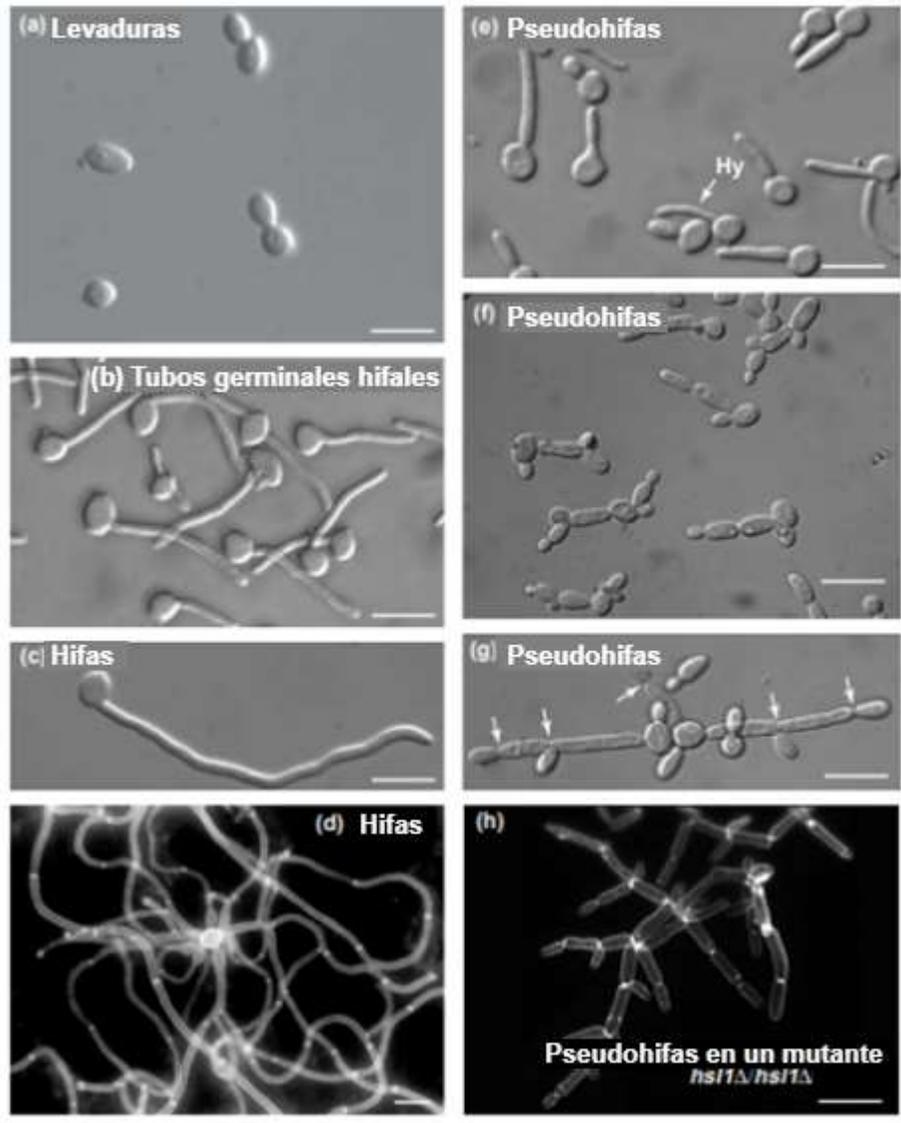


Figura 4. Morfologías de levadura, hifas y pseudohifas. (a) Células de levadura en gemación (b) Tubos germinales hifales, son más estrechos y más uniformes que (e) los brotes pseudohifales, que tienen una constricción en el cuello del brote. (c) Después de 180 minutos, las hifas continúan mostrando paredes de lados paralelos sin constricciones ni ramas. (d) Se muestran micelios hifales maduros. (e) Las pseudohifas exhiben morfologías que van desde pseudohifas cortas que parecen ser células de levadura polarizadas hasta (g) Dos pseudohifas largas que se parecen superficialmente a las hifas. (h) Micelio pseudohifal maduro. Todas las formas de pseudohifas se parecen superficialmente a las hifas, pero tienen constricciones en las posiciones de los septos (flechas) y muestran ramificaciones regulares. Todas las barras de escala representan 10 μm. (Tomado de Sudbery et. al 2004).

C. albicans también puede formar clamidosporas, que son células grandes, esféricas, de paredes gruesas que se observan en los extremos distales de los

filamentos miceliales, y sufrir un cambio fenotípico entre morfologías blancas y opacas, un evento que es importante para el apareamiento y la formación de biopelículas (Jacobsen et al., 2012).

La plasticidad morfológica de *C. albicans* es un determinante de virulencia, ya que la forma de hifa filamentosa invasiva es un factor crítico para su patogenicidad y puede llegar a provocar infección del tejido. La formación de hifas induce varios mecanismos de virulencia que promueven la adhesión y posterior invasión del hongo como las proteínas de pared hifal (Hwp1p) y la proteína 3 de la familia de proteínas con secuencias tipo aglutinina (Als3p), así como la formación de biopelículas y la producción de enzimas hidrolíticas (Dadar et al., 2018). Se ha demostrado que las cepas de *C. albicans* incapaces de producir hifas no producen biopelícula y no son patogénicas (Lo et al., 1997). Asimismo, estas cepas no son invasivas en modelos murinos e *in vitro* de infecciones en las mucosas (Dalle et al., 2010; Naglik et al., 2014).

Además de determinar el estado comensal y patogénico de *C. albicans*, la morfogénesis de levadura a hifa es un mecanismo clave de para evadir las células fagocíticas del huésped. La fagocitosis induce un cambio en la morfología de la levadura a hifas, lo cual provoca la secreción de una serie de factores que provocan la lisis, además de que físicamente se alargan y perforan la membrana de los macrófagos (Krysan et al., 2014; P. E. Sudbery, 2011).

La forma de levadura comensal es tolerada por la respuesta inmune del huésped y se mantienen en la superficie de las células epiteliales a pesar de la presencia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados por las células del sistema inmune innato (Cauchie et al., 2017). *C. albicans* se mantiene en su estado comensal debido a una interacción tripartita que involucra al organismo, la microbiota y la inmunidad del huésped. Si este equilibrio es alterado, por ejemplo, debido a inmunosupresión, deterioro de la integridad de la barrera mucosa o alteración de la microbiota bacteriana por antibióticos, *C. albicans* puede causar infecciones tanto locales como diseminadas (Kullberg & Arendrup, 2015).

Las infecciones de la mucosa por *C. albicans* pueden manifestarse en todos los segmentos que son colonizados por este hongo y frecuentemente están asociados con factores de riesgo específicos para un sitio, que no predisponen a infecciones en otros sitios. Lo anterior es indicativo de la complejidad y especificidad de nicho que tienen las interacciones huésped-patógeno que controlan el cambio de comensal a patógeno en *C. albicans* (Jacobsen et al., 2020). Por ejemplo el desarrollo de candidiasis orofaríngea (oral) es muy común en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y con frecuencia es uno de los primeros signos de una infección por VIH subyacente, sin embargo, estos pacientes no tienen un riesgo elevado para adquirir candidiasis en sus otras formas (Fidel, 2011).

Para la CVV hay una variedad de factores de predisposición como el uso de anticonceptivos orales, el embarazo, uso de esteroides, terapia de reemplazo hormonal, diabetes mellitus no controlada y tratamiento a largo plazo de antibióticos de amplio espectro (Cassone, 2015). Una ligera alteración en la microbiota o factores inmunes de mujeres con otras infecciones vaginales puede conducir a CVV oportunista ya que es muy probable que *C.albicans* u otras *Candida* spp. se encuentren en esa zona como comensales (Pramanick et al., 2019).

La CVV afecta al 75% de las mujeres al menos una vez en su vida, presentando CVVR en el 10% de los casos (Sobel, 2007), y la candidiasis oral ocurre en 50-95% de pacientes de VIH (Goulart et al., 2018). Los números anteriores evidencian lo frecuente que la colonización de *C.albicans* en los humanos, como la fuente de la mayoría de las infecciones por *Candida* es endógena, la colonización del tracto gastrointestinal y otras superficies mucosas presenta un factor de riesgo importante de infección (Poulain, 2015).

Un factor de riesgo para infecciones recurrentes de la boca, la piel y otras superficies mucosas es la inmunidad asociada a células Th17 deteriorada, específicamente por mutaciones en el gen transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) o por enfermedades que conducen a la presencia de autoanticuerpos específicos contra las citocinas de la respuesta Th17, esto da como resultado CMC (Liu et al., 2011; Okada et al., 2016; Puel et al., 2011; Takezaki et al., 2012).

La infección sistémica en particular puede surgir a partir de la diseminación del hongo desde el tracto digestivo o mediante la introducción de *C. albicans* por rutas externas, a través de catéteres venosos centrales, procedimientos quirúrgicos, nutrición parenteral, catéter urinario, etc (Dadar et al., 2018).

1.1.1.5.1 Interacción de *Candida albicans* con las superficies epiteliales

Las superficies del cuerpo (piel, superficies mucosas, vasos sanguíneos, órganos) están compuestas por una o más capas de células epiteliales y definen la interfaz principal entre el medio ambiente y el huésped (Rast et al., 2016). Es de suma importancia el entendimiento de los mecanismos de defensa que ocurren durante la interacción del huésped con el hongo en estas superficies ya que ahí es donde sucede la transición del estado comensal al patogénico de *C. albicans*. Asimismo, estos conocimientos pueden contribuir a la prevención de la propagación sistémica de patógenos una vez que sucede una infección localizada (Conti & Gaffen, 2010; Naglik et al., 2014).

Las células epiteliales se encuentran en la parte exterior de las superficies del cuerpo, son sensores dinámicamente activos que tienen un papel activo en la inmunidad, la reparación del daño y esencialmente en la discriminación entre microorganismos comensales y patógenos (Rast et al., 2016; Zhu & Filler, 2010).

1.1.1.5.1.1 Adhesión

El contacto entre *C. albicans* y las células epiteliales puede darse directamente con la unión física al epitelio o indirectamente con la asociación física del hongo con microbios cocolonizantes o sustancias abióticas (Richardson et al., 2019). Debido a que las superficies celulares tanto de la levadura como de la célula epitelial tienen una carga neta negativa, el contacto inicial requiere una variedad de fuerzas atractivas para vencer esta repulsión que impide la asociación física con fuerzas de atracción, incluidas las fuerzas de van der Waals (Williams et al., 2013). La virulencia de *C. albicans* es incrementada por una mayor expresión de hidrofobinas en su superficie, la hidrofobicidad de la superficie celular influye en varias etapas de la patogenicidad incluyendo la adhesión inespecífica (R. Goswami et al., 2017).

Una vez unido a la superficie de la mucosa, la adhesión se refuerza por numerosas interacciones con los componentes de la matriz extracelular del huésped, sin embargo la adhesión fúngica se da principalmente gracias a las adhesinas de *C. albicans* (Williams et al., 2013).

Gran parte del contacto inicial de *C. albicans* con el huésped involucra la forma de levadura y la formación de la hifa ocurre ya en contacto con el epitelio. Este cambio es un rasgo de virulencia importante ya que la fuerza de adhesión y las adhesinas involucradas varían dependiendo del estado morfológico. En la forma hifal, las adhesinas y las proteínas de síntesis de pared celular son reguladas positivamente lo cual resulta en una adhesión más fuerte en comparación con la forma de levadura (Chaffin, 2008).

Los receptores del huésped con los que interactúa el hongo incluyen componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno, vitronectina, etc.), y receptores expresados en la superficie, como las integrinas, cadherinas y el receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2) que interactúa con Als3p y la proteína de choque térmico Ssa1p19 de *C. albicans*. (Chaffin, 2008; Zhu et al., 2012).

Las adhesinas Als3p, proteína 1 de la familia Als (Als1p) y Hwp1p son las principalmente involucradas en la adhesión de *C. albicans* a las células epiteliales (Staab et al., 2013). Estas pueden unirse a receptores celulares (como Als3p con E-cadherina) o unirse covalentemente a la superficie celular después del procesamiento por las enzimas de la célula huésped (como Hwp1p por las transglutaminasas) (**Figura 5B**) (Nikou et al., 2019).

Als3p es la proteína con secuencias tipo aglutinina (Als) más importante en la adherencia de las hifas de *C. albicans* a las células epiteliales y en la posterior invasión de las células huésped (Phan et al., 2007). La familia de adhesinas Als reconoce y se une a una variedad de ligandos estructuralmente no relacionados, esta flexibilidad permite que *C. albicans* se adhiera a superficies con diferentes composiciones que incluyen células bacterianas o de mamíferos y a superficies abióticas como dispositivos médicos. Estas proteínas también pueden interactuar

entre sí para formar grupos de proteínas Als de gran peso molecular, denominados nanodominios, que están implicados en la agregación de las hifas de *C. albicans*, la formación de biopelículas y la adhesión celular (Hoyer & Cota, 2016).

Hay otras proteínas involucradas en la adhesión de *C. albicans* que no son asociadas a la forma hifal. La proteína 5 de la familia Als (Als5p) media la adhesión inicial de las levaduras de *C. albicans* a las células epiteliales bucales por medio de numerosos ligandos epiteliales y promueve la agregación de levadura a levadura (Rauceo et al., 2006). La proteína 1 de pared de *C. albicans* en estado levaduriforme (Ywp1p/Pga24p) es una glucoproteína ligada a glicosilfosfatidilinositol que se expresa altamente durante este estado morfológico, su papel es en la dispersión de la levadura para facilitar la diseminación ya que tiene un efecto antiadhesivo (Granger, 2012) (**Figura 5A**).

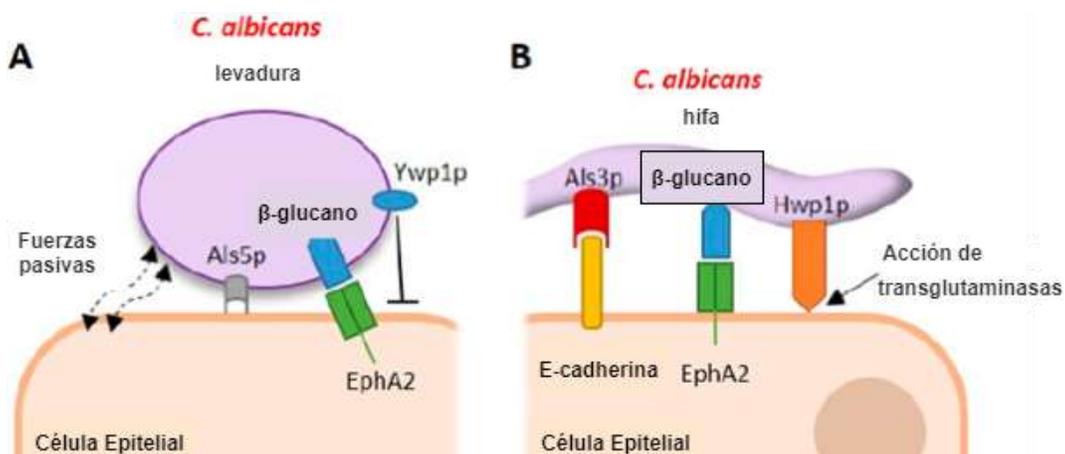


Figura 5. Adhesión de *C. albicans* a células epiteliales del huésped. (A) En forma de levadura, *C. albicans* usa las fuerzas pasivas de atracción electrostática y Als5p para adherirse a las células epiteliales. El β-glucano es reconocido por EphA2. Ywp1p se expresa y tiene propiedades antiadhesivas. Aún no se ha identificado un receptor huésped para Ywp1p. (B) Posteriormente, la transición a la morfología de la hifa da como resultado la expresión de adhesinas adicionales como Als3p, que interactúa con E-cadherina, y Hwp1p, que actúa como un sustrato para las enzimas transglutaminasa del huésped. El beta glucano en fase hifal también es reconocido por EphA2 (Tomado y modificado de Nikou et al. 2019).

Mientras que la forma de levadura es la más inmunogénica en el entorno sistémico, las hifas son el morfotipo activador de las superficies mucosas (Pellon et al., 2020).

1.1.1.5.1.2 Reconocimiento epitelial

Para desarrollar una respuesta inmune contra *C. albicans* debe de haber un reconocimiento del hongo por el huésped. Esto se da en las células epiteliales ya que interaccionan los PRR con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Gow et al., 2012). Los PAMP fúngicos pueden ser proteínas de la pared celular que tienen motivos estructurales extracelulares y moléculas intracelulares como los ácidos nucleicos (Dambuza et al., 2017).

Los receptores tipo Toll (TLR), los receptores de lectina de tipo C (CLR) y los receptores ricos en leucina del dominio de unión a nucleótidos (NLR) comprenden las tres principales clases de PRR que se expresan en células mieloides asociadas a infecciones fúngicas (Patin et al., 2019). De estos receptores, los TLRs y CLRs son expresados en las células epiteliales que componen las barreras mucosas (Naglik et al., 2017). Las células epiteliales interaccionan con *C. albicans* a través de TLR 1-4 y TLR6; TLR4 y TLR2 se inducen en candidiasis cutánea, TLR4 en candidiasis oral y TLR2 en CVV (Kühbacher et al., 2017; Nikou et al., 2019; Weindl et al., 2007). El receptor 2 de efrina epitelial tipo A (EphA2) es un PRR no clásico que se une a β -glucanos expuestos de levaduras e hifas de *C. albicans*, detecta la carga fúngica y media las respuestas inmunitarias tanto de las células epiteliales como de neutrófilos y es necesario para la respuesta inflamatoria máxima de la mucosa contra *C. albicans* ya que aumenta respuestas antifúngicas como las especies reactivas de oxígeno (ROS) e inmunidad tipo 17 (Swidergall, 2019; Swidergall et al., 2018). Sin embargo, esta interacción convencional entre PAMP y PRR no desencadena en la respuesta inmune de células epiteliales contra *C. albicans*.

La relevancia de los PRRs bien puede ser diferente en la mucosa en comparación al entorno sistémico (Swidergall, 2019). Por ejemplo, la dectina-1 es crítica durante las infecciones sistémicas (Taylor et al., 2007), sin embargo, su papel durante la candidiasis orofaríngea es menor (Verma et al., 2017).

Las superficies mucosas están en contacto constante con el microbioma y una función importante de las células epiteliales es identificar y responder a los

microorganismos oportunistas cuando se vuelven patógenos para generar una respuesta adecuada del huésped. El proceso de reconocimiento debe funcionar de manera que discrimine entre la fase comensal y patógena de *C. albicans* para poder identificar y responder al patógeno que causará enfermedades y daño (Moyes et al., 2015; Rast et al., 2016).

Las células epiteliales tienen un mecanismo que les permite discriminar entre la levadura colonizadora y la forma hifal invasiva de este hongo, con una respuesta transitoria temprana a la levadura seguida de una respuesta más fuerte a las hifas, que a su vez conduce a la activación de las células epiteliales y a la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios (Moyes et al., 2010, 2011). Esta discriminación se hace a través de una activación bifásica de la vía inmune de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La primera fase de la respuesta epitelial bifásica es independiente de la morfología, lo que resulta en una activación débil de la cadena ligera κ B de los linfocitos B activados (NF- κ B), fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) y las tres vías MAPK (proteínas quinasas p38 activadas por mitógenos, quinasas c-Jun N-terminal (JNKs) y quinasas reguladas por señalización extracelular ERK1 y ERK2) (Moyes et al., 2015). La activación de la ruta del factor nuclear potenciador de NF- κ B por componentes de la pared celular fúngica (manano, quitina y glucano) es sostenida durante la colonización comensal y la activación de la señalización de MAPK en esta fase es transitoria, lo cual da como resultado la activación del regulador transcripcional c-Jun en ausencia de cargas significativas de hifas. Esta es la respuesta epitelial predominante a la morfología de la levadura de *C. albicans* -por lo tanto- puede considerarse como una respuesta del huésped a la colonización comensal inofensiva, ya que no produce daño epitelial ni la inducción de una respuesta proinflamatoria (Moyes et al., 2010, 2011, 2015).

Las cargas elevadas de hifas invasivas desencadenan la segunda fase de la respuesta epitelial bifásica, que se caracteriza por una activación más intensa y sostenida de las vías MAPK p38, JNK y ERK1/2, que consecuentemente activan al factor de transcripción c-Fos a través de p38. MKP1, una fosfatasa de MAPK,

también se activa a través de la vía ERK1/2 y regula la señalización de MAPK y a su vez de p38 y JNK. Juntas, las vías de señalización ERK/MKP1 y p38/c-Fos alertan a los tejidos circundantes de la presencia de hifas invasivas de *C. albicans*, un proceso que se conoce como la "respuesta al peligro". Esto conduce a la producción de citocinas proinflamatorias, activando así la respuesta inmune a *C. albicans* (Moyes et al., 2010, 2011, 2015; Naglik et al., 2014). La vía PI3K también está involucrada en la activación inmune, su función principal es la protección de las células epiteliales contra el daño inducido por hifas y se le conoce como el mecanismo de "protección al daño" (**Figura 6**) (Moyes et al., 2014).

Juntas, las vías de "respuesta al peligro" y de "protección al daño" son críticas para identificar que este hongo normalmente comensal se ha convertido en patógeno (Naglik et al., 2019).

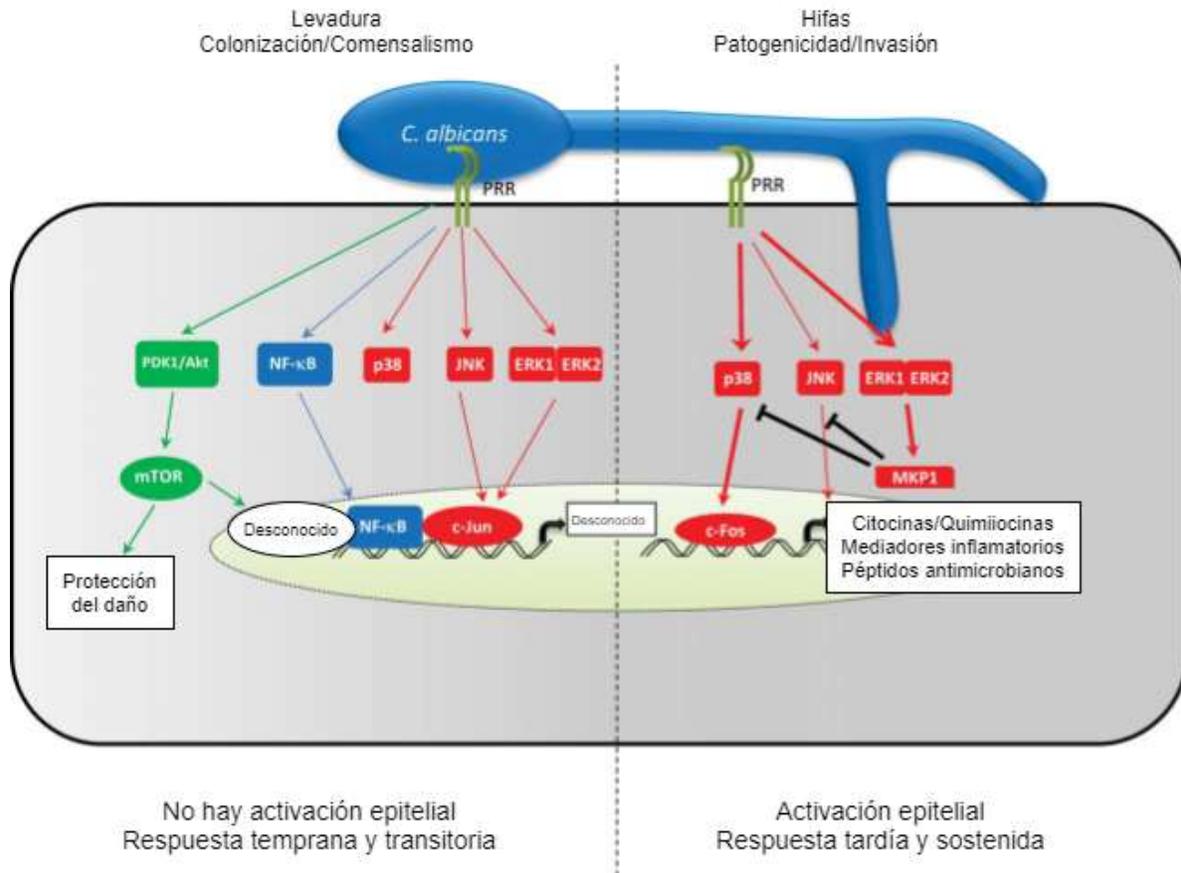


Figura 6. Reconocimiento epitelial y discriminación de levadura e hifas de *C. albicans*. Hay 2 fases de activación por *C. albicans*. En la fase 1, las células se reconocen de forma morfológicamente independiente, la señalización de PI3K/Akt/mTOR conduce al inicio de las respuestas de protección del daño celular y la activación de bajo nivel de las 3 vías MAPK conduce a la activación del factor de transcripción c-Jun. Cuando se alcanza un umbral de carga hifal de *C. albicans*, se desencadena la fase 2, donde existe una intensa activación de las 3 vías MAPK, que lleva a la expresión de c-Fos, que junto con NF-κB y un factor de transcripción inducido por mTOR, regula la producción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios. (Tomado y modificado de Moyes et al. 2015).

La activación de c-Fos (fosfatasa 1 de proteína quinasa activada por mitógenos) MKP1, la liberación de citocinas y el daño de las células epiteliales (medido por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)) están relacionados con cargas hifales, lo cual indica que se requiere un nivel umbral de infección para la activación epitelial completa. Por debajo de un cierto nivel de umbral, incluso la presencia de hifas no es detectable. Sin embargo también es importante destacar que diferentes tejidos (orales y vaginales) muestran sensibilidad diferencial (Moyes et al., 2010).

Hasta este momento es muy claro que la respuesta inmune a *C. albicans* es dependiente de la formación de hifas. Mientras que el reconocimiento epitelial del β -glucano de *C. albicans* está mediado por EphA2, el (los) factor(es) involucrados en la señalización c-Fos/MKP1, la activación inmune y del daño epitelial permanecieron sin identificar durante muchos años.

1.1.1.5.1.3 Invasión a las barreras mucosas

La invasión en las células huésped por *C. albicans* que permiten que el hongo acceda a los tejidos epiteliales superficiales y subyacentes se basa en dos mecanismos posiblemente complementarios: endocitosis inducida por receptores y penetración activa (Mayer et al., 2013; Naglik et al., 2011).

1.1.1.5.1.3.1 Endocitosis inducida por receptores del huésped

La endocitosis es un mecanismo complejo y dinámico conducido por el huésped. La señalización de los receptores específicos conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina, formando procesos de membrana que endocitan las hifas adherentes a la superficie en un mecanismo dependiente de clatrina. Cabe mencionar que esta reorganización no se desencadena por interacciones con células de levadura (Dalle et al., 2010; Zhu & Filler, 2010). La viabilidad de *C. albicans* no es importante en el proceso de endocitosis, más bien se requiere que las células huésped tomen parte activa del proceso para iniciar el mecanismo de remodelamiento del citoesqueleto de actina que facilita la internalización del hongo (Naglik et al., 2011; Wächtler et al., 2012).

La endocitosis puede ser inducida por el contacto de las invasinas fúngicas Als3p y Ssa1p con receptores como el heterodímero del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/HER2) expresado en células epiteliales o el receptor E-cadherina (**Figura 7**) (Phan et al., 2007; J. N. Sun et al., 2010). También se puede activar el proceso a través de un mecanismo que involucra a las guanosinas trifosfatasa del huésped y la proteína de uniones estrechas ZO-1 (Atre et al., 2009). Aunque EGFR y Her2 parecen funcionar como un heterodímero para inducir estas respuestas, también son capaces de funcionar independientemente (Chaffin, 2008).

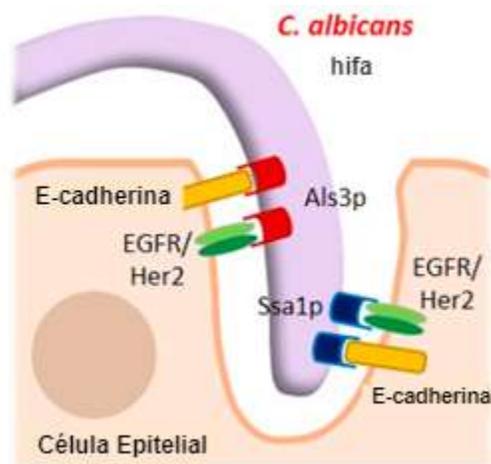


Figura 7. La internalización epitelial de las hifas de *C. albicans* está mediada por las invasinas Als3p y Ssa1p que interactúan con E-cadherina y EGFR/Her2. En este proceso no es importante la viabilidad del hongo, sino que requiere de la participación activa del huésped (Tomada y modificada de Nikou et al. 2019).

La contribución de la endocitosis inducida a la invasión epitelial depende del tejido o del tipo celular. La endocitosis inducida puede contribuir potencialmente a la invasión inicial de la mucosa oral. Sin embargo, los enterocitos intestinales y las células de adenocarcinoma de colon (Caco-2) utilizadas como modelo de la barrera epitelial intestinal no internalizan *C. albicans* mediante este mecanismo, ya que el hongo necesita penetrar activamente en el tejido (Dalle et al., 2010). Dado que la epidermis de la piel es un epitelio estratificado protegido por una capa densa de queratinocitos muertos, es probable que esta barrera solo pueda romperse mediante la penetración activa. En cualquier caso, la penetración activa es el proceso predominante de invasión epitelial (Kühbacher et al., 2017).

1.1.1.5.1.3.2 Penetración activa

Las superficies epiteliales varían en su estructura y composición celular dependiendo de su ubicación dentro del cuerpo. La piel y las mucosas orales y vaginales están formadas por barreras epiteliales estratificadas o capas de células epiteliales. Las células en la capa más externa están terminalmente diferenciadas, no proliferan y, por lo tanto, son menos capaces de soportar la invasión fúngica a través de la endocitosis inducida (Dalle et al., 2010; Southern et al., 2008). Para

invadir una barrera mucosa que no internaliza fácilmente las hifas, *C. albicans* utiliza el proceso alternativo de penetración activa.

A diferencia de la endocitosis inducida por receptores, donde el hongo permanece pasivo durante la absorción, la penetración activa de la mucosa del huésped por las hifas de *C. albicans* requiere de un hongo viable y depende de atributos físicos como la presión de turgencia hifal, el avance físico de la punta de la hifa y la secreción de enzimas hidrolíticas que facilitan la invasión fúngica a través o entre células epiteliales al degradar los sustratos del huésped (Richardson et al., 2019).

Además de la formación y el mantenimiento de las hifas, otros factores fúngicos que facilitan la invasión por este proceso son la familia de la Proteasa Aspártica Secretada (SAP) (Moyes et al., 2015). La proteína 5 de la familia SAP (Sap5p) puede degradar la E-cadherina, un componente importante de las uniones estrechas de células epiteliales adherentes, mientras que la proteína 2 de la familia SAP (Sap2p) puede degradar las mucinas que recubren todos los tejidos mucosos (**Figura 8**) (Colina et al., 1996; C. C. Villar et al., 2007).

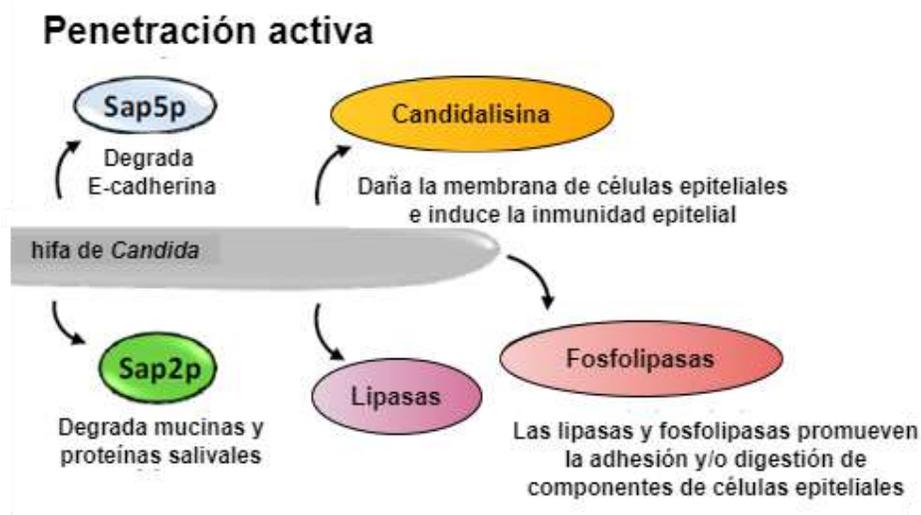


Figura 8. *C. albicans* secreta de las hifas diversos factores para penetrar activamente los tejidos mucosos. Estos factores incluyen a las proteínas asparticas (Sap2p, Sap5p), lipasas y fosfolipasas (Tomada y modificada de Richardson, Ho, et al., 2018).

C. albicans se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de manera comensal, sin embargo, la translocación a través de la mucosa gastrointestinal se correlaciona positivamente con la infección sistémica (Nucci & Anaissie, 2001). Existen diferencias en la respuesta epitelial específicas al tejido, mientras que en células epiteliales orales es posible la invasión por ambos mecanismos, en los enterocitos (células epiteliales del intestino) se da principalmente por penetración activa (Dalle et al., 2010). A pesar de que la invasión ocurre también por endocitosis a las células M a través de un mecanismo que involucra invasinas asociadas a hifas que incluyen a la proteína de choque térmico Ssa1 y Als3, la ruta predominante de translocación gastrointestinal por *C. albicans* es transcelular en lugar de paracelular, un proceso facilitado por la toxina peptídica Cdl (ver Sección 1.1.1.5.1) (Albac et al., 2016; Nikou et al., 2019).

Aunque los procesos son distintos, es probable que se requiera una combinación de la endocitosis inducida por receptores y la penetración activa para la invasión total de las barreras epiteliales estratificadas. Se cree que la penetración activa a través de las capas epiteliales más externas (terminalmente diferenciadas) ocurre primero, y esto es seguido por endocitosis, cuando el hongo invasor alcanza las células epiteliales subyacentes (no terminalmente diferenciadas) (Dalle et al., 2010; Wächtler et al., 2012).

1.1.1.5.2 Generación de Candidalisina y su papel en el daño epitelial e inmunidad innata.

Cdl es una toxina peptídica anfipática de doble función codificada por la extensión del gen de alargamiento celular ECE1 asociado a la formación de hifas. Esta toxina citolítica secretada por las hifas de *C. albicans* durante la infección provoca el daño a las superficies mucosas y es responsable de la “respuesta al peligro” (Moyes et al., 2016; Richardson, Willems, et al., 2018).

La proteína codificada por el gen ECE1 es Ece1p y tiene características estructurales particulares. Dispersos a lo largo de la proteína se encuentran 7 sitios lisina-arginina (KR), estos sitios KR son sitios de procesamiento para la kexina Kex2p que escinde a Ece1p en 8 péptidos más pequeños que son secretados

(Bader et al., 2008; Naglik et al., 2019). De estos péptidos se identificó uno de 32 aminoácidos que posteriormente se reduce a un péptido maduro de 31 aminoácidos por la eliminación de la arginina terminal por la carboxipeptidasa Kex1p. El péptido maduro resultante fue nombrado Cdl, y es responsable de la inducción del daño, la activación de c-Fos/MKP1 y la producción de citocinas en la infección por *C. albicans* (Richardson, Mogavero, et al., 2018).

Cdl es la primera toxina peptídica citolítica que ha sido identificada en un patógeno fúngico. Es un péptido anfipático y adopta una conformación de α -hélice en solución que provoca que se intercale entre membranas plasmáticas de las células epiteliales, formando una lesión que desestabiliza la estructura de la membrana causando la entrada de calcio y liberación de contenido intracelular como la enzima LDH (**Figura 9**) (Naglik et al., 2017).

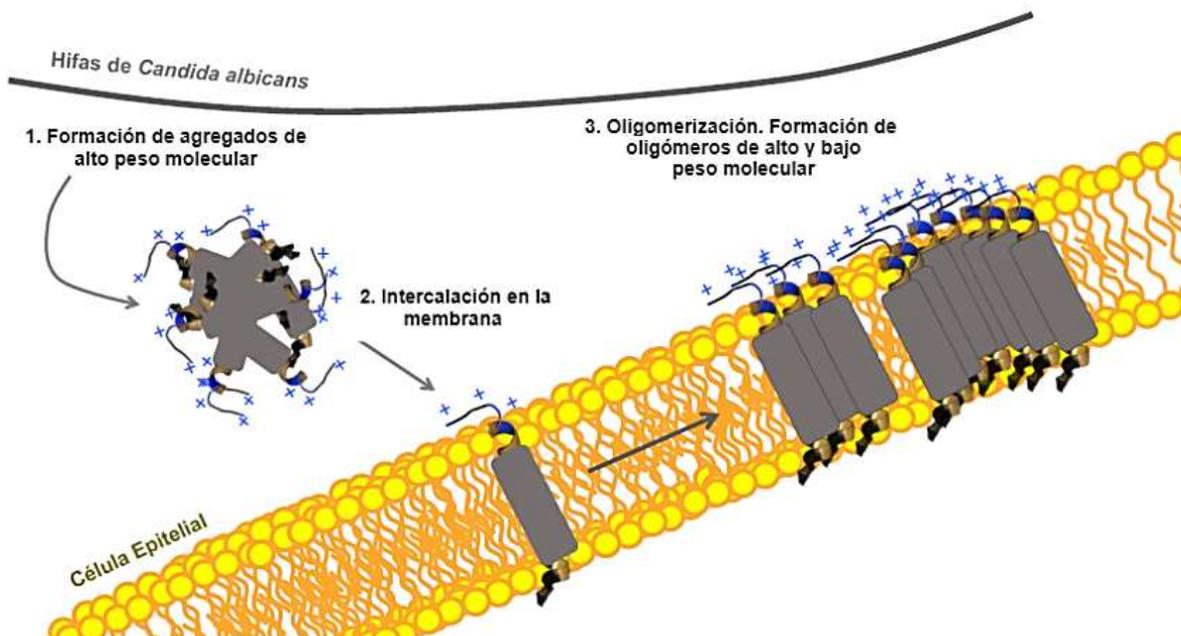


Figura 9. Estructura de Cdl, su intercalación a la membrana y oligomerización. En el laboratorio Naglik se han realizado experimentos para estudiar la estructura y dinámica de Cdl en los que se ha determinado la formación de agregados de alto y bajo peso molecular que se insertan en la membrana celular formando una lesión (poros) y provocando daño a las células epiteliales y la activación de la respuesta inmune contra *C.albicans* (ver Apéndice A).

La Cdl activa a EGFR a través de mecanismos indirectos que incluyen el desprendimiento de ligandos EGFR, la activación de metaloproteinasas de matriz y la entrada de calcio como consecuencia de la formación de los poros de Cdl. EGFR (ErbB1/Her1) es una tirosina quinasa unida a la membrana, que se distribuye de manera diversa en el cuerpo y puede activar la señalización a través de varias vías, principalmente asociadas con el crecimiento, la proliferación celular, la supervivencia, la angiogénesis, la diferenciación y la motilidad, incluida la señalización MAPK, una vía clave activada por Cdl (Ho et al., 2017; Wang, 2017). A través de la señalización MAPK inicia la inmunidad de la mucosa, activando las vías p38 y ERK1/2 que a su vez activan el factor de transcripción c-Fos y MKP1 respectivamente, alertando al huésped sobre la transición de la levadura colonizadora a hifas invasivas productoras de toxinas. La liberación posterior de citocinas induce respuestas inmunitarias innatas, incluido el reclutamiento de neutrófilos que es fundamental para la protección contra la candidiasis en superficies mucosas (**Figura 10**) (Ho et al., 2019).

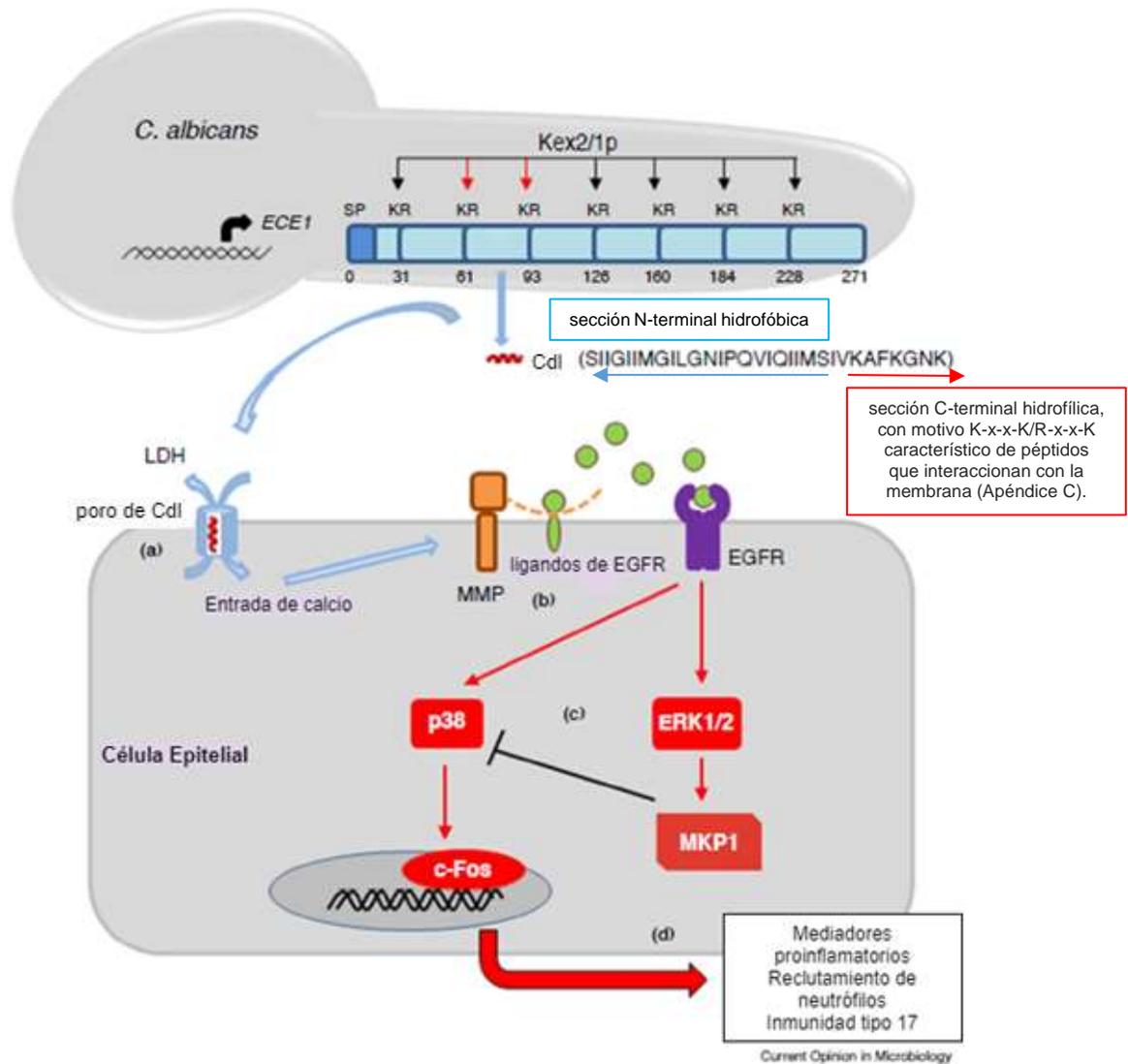


Figura 10. Generación de Cdl y activación de células epiteliales. El aumento de carga fúngica y la formación de hifas invasivas conduce a la expresión de la proteína Ece1p que, al ser procesada, genera la Cdl madura (hélice roja) que al intercalarse y oligomerizarse forma estructuras similares a poros que dañan de la membrana. Esto provoca la activación de EGFR que induce la señalización de MAPK (a través de p38, ERK1/2) y la activación de c-Fos. MKP1 contribuye a la regulación de la respuesta inmune epitelial (Tomado y modificado de Naglik et al., 2019).

Aún no se ha identificado un receptor en las células del huésped para la señalización inducida por Cdl. Se sabe que el péptido puede permeabilizar las bicapas lipídicas sintéticas que no contienen un receptor endógeno, lo que sugiere que la toxina puede dañar las células epiteliales y activar las respuestas inmunes innatas a través de distintos mecanismos (Richardson et al., 2019). Se ha demostrado recientemente

que durante la infección de la mucosa las hifas de *C. albicans* invaden la superficie epitelial y crean un "bolsillo" de invasión en el que se secreta la toxina Cdl. Una combinación de varios factores de virulencia trabaja en conjunto para administrar Cdl a la bolsa de invasión a través de la punta de la hifa pero principalmente la formación y extensión de hifas permiten que la candidalinas se acumule en concentraciones suficientes para inducir el daño epitelial y la inmunopatología subsiguiente (Mogavero et al., 2021).

Esta citolisina tiene un efecto dual, ya que es involucrada en la inducción del daño celular y en el desarrollo de una respuesta inmune a través de las células epiteliales (Naglik et al., 2019). Aunque EphA2 lleva a cabo el reconocimiento inicial de β -glucano de *C. albicans*, para el desarrollo de una respuesta inmune adecuada se requieren estímulos secundarios a través de diferentes circuitos de señalización (Swidergall et al., 2018).

La patogenicidad de *C. albicans* se relaciona con su habilidad de provocar daño e inducir respuestas inmunes predominantemente a través de la actividad de Cdl. Cepas de *C. albicans* mutantes que carecen del gen ECE1 o de la sección que codifica a Cdl son capaces de formar hifas y de invadir las células epiteliales de manera normal, pero no activan las citocinas pro-inflamatorias ni causan daño epitelial (Moyes et al., 2016). Las citocinas liberadas como resultado de la activación de las células epiteliales inducida por Cdl incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (Moyes et al., 2016; Richardson, Willems, et al., 2018).

Cdl induce estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y muerte de las células epiteliales, que se produce predominantemente a través de una vía necrótica (Blagojevic et al., 2021). Adicionalmente, se identificó a Cdl como un potente estímulo de varias alarminas y péptidos antimicrobianos (PA) clave secretados por células epiteliales, incluidos S100A8, la humano-defensina (hBD) 2, hBD3, la catelicidina LL37 y adenosin trifosfato (ATP) (Ho et al., 2020).

Los mutantes de *C. albicans* ECE1 y Cdl inducen niveles significativamente más bajos de neutrófilos en el sitio de infección *in vivo* en comparación con los controles WT. Lo anterior identifica a la toxina Cdl como la conductora de la patología en candidiasis vulvovaginal CVV. Esta enfermedad se caracteriza por punzadas, ardor y dolor en la mucosa vulvovaginal, a menudo acompañado de flujo vaginal inodoro. A diferencia del epitelio oral, el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la infección durante el CVV no da como resultado la eliminación de hongos, sino que causa una exacerbación aguda de los síntomas (Richardson, Willems, et al., 2018).

La Cdl es indispensable para impulsar resultados proinflamatorios en células epiteliales y endoteliales (Moyes et al., 2016; Richardson, Willems, et al., 2018; Swidergall et al., 2019). En cuanto a infecciones sistémicas, se sabe que Cdl es fundamental para la activación inmune *in vivo* (Naglik et al., 2019). Adicionalmente, la principal fuente de candidiasis sistémica es la traslocación mediada por Cdl de la población intestinal comensal de *C. albicans* (Nucci & Anaissie, 2001). La translocación transcelular de *C. albicans* a través de la barrera intestinal requiere del daño epitelial inducido por Cdl, esta es la primera vez que se muestra una translocación mediada por una toxina peptídica de un patógeno humano *in vitro* (Allert et al., 2018).

1.1.1.5.3 Funcionalidad dual de Candidalisina

Un dato muy importante es que la respuesta a Cdl es dependiente de la dosis de la toxina. Esto concuerda con el concepto que se ha mencionado anteriormente de que la respuesta del huésped a *C. albicans* durante la infección requiere un nivel umbral de cargas hifales (Moyes et al., 2010, 2015, 2016; Richardson, Willems, et al., 2018).

Las bajas concentraciones de Cdl (<5 μ M) desencadenan la liberación de citocinas proinflamatorias pero no causan daño epitelial, mientras que las concentraciones más altas (>15 μ M) de toxina inducen respuestas proinflamatorias y causan un daño extenso, lo que demuestra que Cdl tiene una doble funcionalidad de manera dependiente de la concentración (Richardson et al., 2019).

Aunque durante la colonización asintomática de las superficies mucosas humanas se encuentran presentes morfologías de levadura e hifas (Naglik et al., 1999, 2003), se ha establecido que el estado comensal de *C. albicans* se correlaciona inversamente con la morfogénesis (Moyes et al., 2015). Por lo tanto, la reducción de la formación de hifas acompañada de bajos niveles de secreción de Cdl promueve el estado comensal de *C. albicans* en el cual puede adquirir nutrientes de fuentes intracelulares. Se promueve la patogenicidad cuando hay un aumento en la formación de hifas de *C. albicans* ya que esto provocará una mayor secreción de Cdl y con esto el daño y la activación inmune, lo que finalmente conducirá a la eliminación de los hongos o a inmunopatología (Naglik et al., 2019).

Al dañar las células del huésped directamente, Cdl es un factor de virulencia clásico; es también un factor de avirulencia ya que es una molécula inmunomoduladora que es detectada por el huésped para iniciar una respuesta protectora a través de neutrófilos e inmunidad tipo 17. El equilibrio de estas respuestas (la inducción de daño versus la protección inmune) determina el resultado de la infección (**Figura 11**) (Naglik et al., 2019).

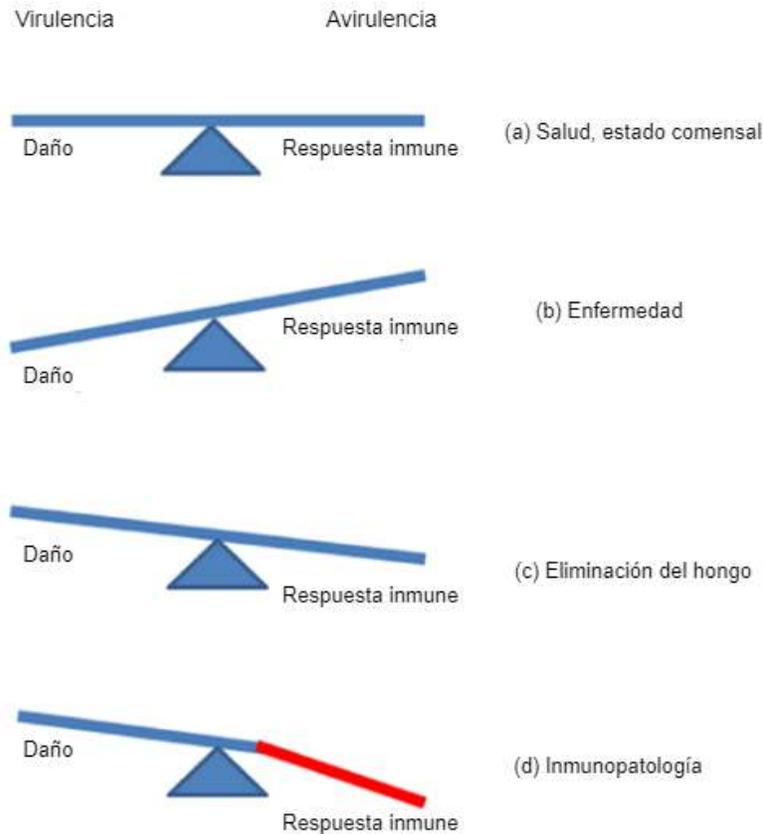


Figura 11. Doble función de Cdl: virulencia y avirulencia. (a) En condiciones de salud, *C. albicans* actúa como un comensal, produciendo bajos niveles de Cdl necesarios para un estilo de vida eficiente. (b) En condiciones que permiten la proliferación de *C. albicans*, Cdl daña las células y tejidos del huésped (enfermedad). (c) El aumento de los niveles de Cdl conduce a la activación de respuestas innatas protectoras. (d) En ciertas infecciones (vaginales) y cuando la respuesta inmune está desregulada, el aumento de los niveles de Cdl puede conducir a una inmunopatología (Tomado y modificado de Naglik et al., 2019)

Se ha reportado esta funcionalidad dual para toxinas peptídicas de otras especies (Lewis & Garcia, 2003). Los péptidos catiónicos con estructura alfa helical son una clase de PA que se encuentran en venenos y son fuertes candidatos para reemplazar los antibióticos clásicos para el tratamiento de infecciones resistentes a los medicamentos, que son un desafío mundial rápidamente emergente (Torres et al., 2018). Estos pequeños péptidos anfipáticos adoptan su estructura característica al tener contacto con las membranas de microorganismos y presentan una alta toxicidad por su actividad hemolítica, por lo que su uso potencial terapéutico representaba dificultades hasta que se implementó la estrategia de generar péptidos

sintéticos que carecen de toxicidad y muestran potentes actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras (Silva et al., 2020).

En el presente trabajo se realizó la expresión recombinante de la Cdl con el etiquetado isotópico ^{15}N y ^{13}C por el sistema de síntesis de proteínas sin células, del inglés “cell-free”, y posteriormente se llevo a cabo su purificación para su estudio posterior por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). También se evaluó el daño celular provocado por la Cdl resultante y se comparó con la Cdl WT.

1.2 Antecedentes del trabajo

1.2.1 Expresión de proteínas sin células (EPSC)

Para realizar el etiquetado isotópico de la Cdl con el objetivo de obtener una proteína en óptimas condiciones para el estudio de su estructura por resonancia magnética nuclear, se realizaron varios intentos previos de expresión recombinante del péptido en *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pichia pastoris* (*P. pastoris*). La producción de proteínas recombinantes en organismos unicelulares es comúnmente utilizada y ampliamente estudiada. Este enfoque tiene una limitación sustancial, en que las células deben mantenerse viables para poder llevar a cabo la expresión y el plegamiento de proteínas (Jin & Hong, 2018).

Existen varios tipos de proteínas que son difíciles de expresar en organismos vivos debido al escaso crecimiento de la célula huésped, la formación de cuerpos de inclusión, la inactividad de las proteínas y el bajo rendimiento de producción. La complicación en la expresión de las toxinas en particular recae en que las células pueden inhibir su producción o inactivar la toxicidad de la proteína para que no mueran (Rosano & Ceccarelli, 2014; Saida et al., 2006).

Debido a que Cdl es una toxina fúngica, intentos previos en el laboratorio no tuvieron éxito en la expresión de las construcciones en los experimentos realizados con *E. coli* y *P. pastoris* (ver Apéndice B) por lo que sería deseable explorar otras opciones para la expresión de productos génicos como el sistema de síntesis de EPSC.

La EPSC utiliza extractos o lisados celulares que contienen la maquinaria y elementos relacionados para dirigir la síntesis de las proteínas a partir de un material

genético modelo. Los lisados proporcionan la mayoría de las moléculas para la mezcla de reacción incluyendo ARN polimerasas para la transcripción del ARNm, ribosomas, ARNt y aminoácidos para la traducción, así como cofactores enzimáticos, fuentes de energía y componentes celulares esenciales para el correcto plegamiento de las proteínas. Los extractos celulares se generan del cultivo de células, posteriormente se lisan y se eliminan moléculas grandes como el ADN y ARNm endógeno con varios pasos de lavados y centrifugación. Es fundamental imitar el entorno citoplasmático para habilitar e incrementar la síntesis de proteínas por lo que se suplementa a los lisados con componentes energéticos y aminoácidos libres adicionales para finalmente añadir a la mezcla de reacción el ADN o ARNm modelo y que se desencadene el proceso de síntesis de proteínas (He et al., 2011; Jin & Hong, 2018).

La EPSC puede ser una “reacción acoplada” o una “reacción vinculada”, en el primer caso se agrega a la mezcla de reacción ADN como material genético modelo y los procesos de transcripción y traducción se llevan a cabo simultáneamente (**Figura 12**), mientras que al agregar ARNm a la mezcla de reacción, se están realizando dos reacciones secuenciales separadas y es cuando se le refiere como “reacción vinculada”. (Zemella et al., 2015)

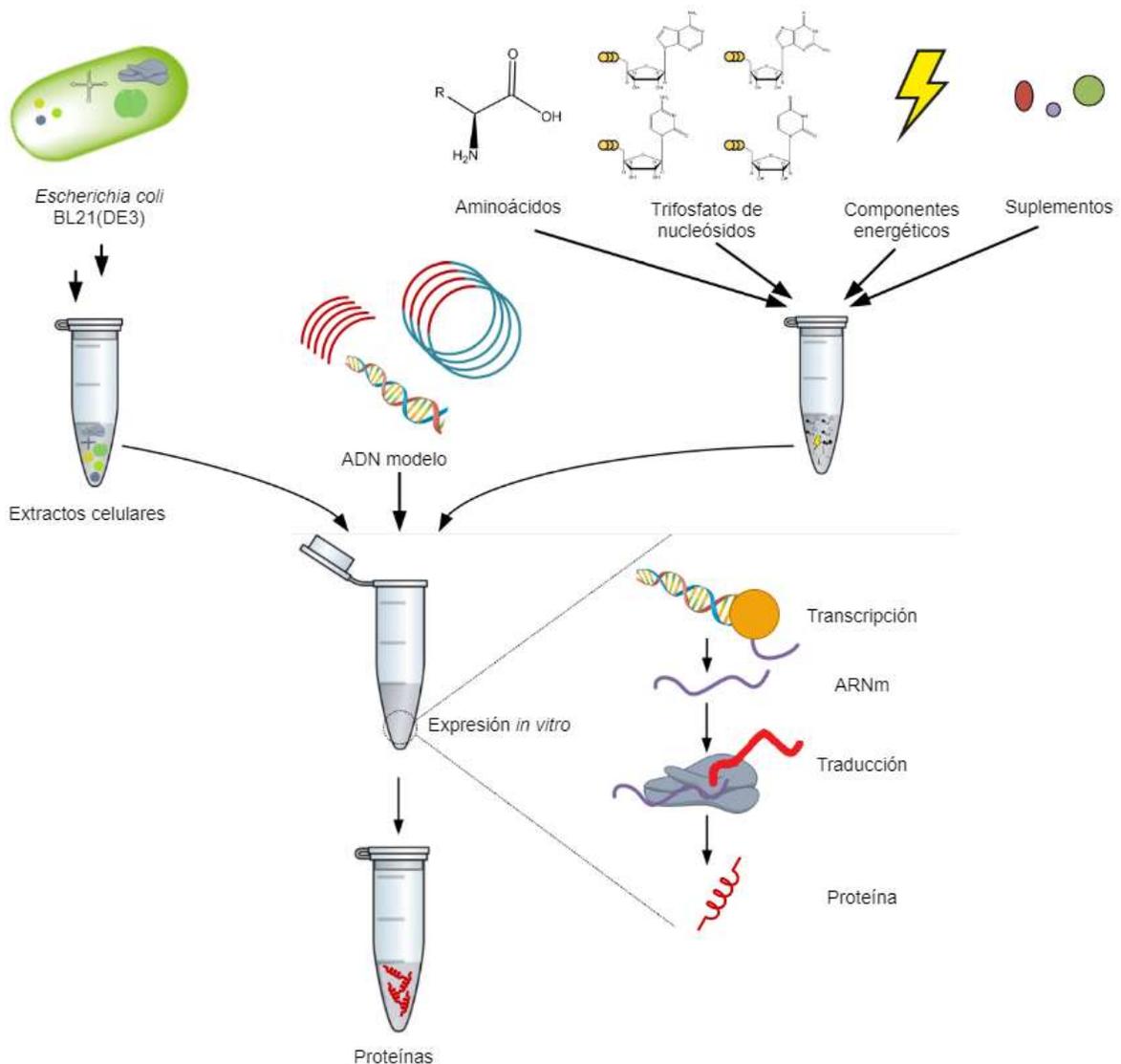


Figura 12. El principio de la EPSC. El extracto celular contiene la maquinaria para la reacción acoplada de transcripción y traducción; se prepara mediante la lisis de las células y la eliminación de moléculas grandes. La mezcla energética contiene componentes básicos para la síntesis de ARNm y proteínas, así como componentes para la regeneración de energía y sustancias suplementarias. Los iones son esenciales para la actividad de muchas enzimas. El glutamato es uno de los aniones principales del citoplasma de *E. coli* y su adición ayuda a imitar el entorno celular para favorecer la síntesis (Tomado y modificado de Rolf et al., 2019).

La EPSC ofrece una serie de ventajas sobre los sistemas basados en células en la producción de proteínas. Además de ser un método simple y rápido para convertir genes en proteínas plegadas en cuestión de horas, proporciona condiciones de

reacción versátiles debido a la ausencia de restricciones que podrían tenerse en el sistema *in vivo* (Wu et al., 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de proteínas *in vivo* tiene limitaciones ligadas a la viabilidad celular. Principalmente que parte de la energía suministrada debe usarse en el crecimiento y el metabolismo celular, lo que reduce la eficiencia del sistema, y el alcance de las condiciones de reacción aceptables se restringe a los entornos tolerados por la célula, lo que limita las opciones de disolventes, fuerza iónica, productos tóxicos o intermediarios tóxicos y temperaturas de reacción. La ausencia de paredes celulares en la expresión *in vitro* también elimina muchas limitaciones de transporte en el sistema *in vivo*. Este sistema permite un mayor control sobre el entorno de la reacción, una purificación del producto más sencilla, y es mejor para productos con bajas tasas de secreción (Wilding et al., 2018).

Adicionalmente, los sistemas libres de células permiten el etiquetado directo de proteínas recién sintetizadas, proporcionando un método rápido para producir directamente proteínas marcadas para la determinación estructural mediante cristalografía de rayos X o RMN (He et al., 2011).

1.2.1.1 Expresión recombinante de proteínas

Uno de los métodos más utilizados para la expresión de proteínas en forma heteróloga se basa en el protocolo descrito por Sun et al. para obtener el lisado celular a partir de células competentes *E. coli* BL21(DE3) (Z. Z. Sun et al., 2013). Al igual que otras cepas B parentales, las células BL21 son deficientes en la proteasa Lon, que degrada proteínas no propias. Otro gen ausente en el genoma de los antepasados de BL21 es el que codifica la proteasa de membrana externa OmpT, cuya función es degradar las proteínas extracelulares. Estas modificaciones genéticas son esenciales para el uso de la cepa para la expresión de proteínas recombinantes ya que se evita su degradación por Lon dentro de la célula y por OmpT después de la lisis celular. Además, se evita la pérdida de plásmido interrumpiendo su metilación y degradación gracias a la mutación *hdsSB* ya presente en la cepa parental (B834) que dio lugar a BL21. En la cepa BL21 (DE3),

el profago λ DE3 se insertó en el cromosoma de BL21 y contiene el gen T7 RNAP bajo el promotor lacUV5. El BL21 (DE3) y sus derivados son las cepas más utilizadas para la expresión de proteínas (Rosano & Ceccarelli, 2014).

En el presente trabajo de tesis se decidió utilizar las técnicas de expresión de proteínas mencionadas anteriormente, con la finalidad de obtener un producto de expresión con isótopos estables que permita su posterior caracterización utilizando técnicas de RMN.

2. Justificación

Cdl fue la primera toxina peptídica fúngica descubierta y tiene funciones muy importantes durante la infección por *C. albicans* (Blagojevic et al., 2021; Camilli et al., 2020; Ho et al., 2019, 2020, 2021; Kasper et al., 2018; Mogavero et al., 2021). Sin embargo, no todas las funciones de Cdl han sido elucidadas y por esto es importante entender los mecanismos moleculares a través de los cuales Cdl le permite a *C. albicans* establecer una relación comensal o patogénica.

Descubrimientos recientes sugieren que la inducción del daño que lleva a cabo la toxina es mediante la desestabilización de la membrana plasmática (Mogavero et al., 2021) ya que existe evidencia que demuestra que Cdl es capaz de unirse a modelos de la membranas celulares (ver Apéndice A). Lo anterior infiere que un receptor endógeno no es necesario para que Cdl se intercale en la membrana, forme oligómeros y provoque el daño celular que procede a la invasión de los tejidos provocando infección. Esto resalta la importancia de elucidar la estructura de Cdl para que posteriormente sea posible desarrollar mecanismos para inactivarla.

3. Hipótesis

Si la Cdl sintetizada a partir del sistema sin células presenta actividad citotóxica, entonces esta provocará daño celular de la misma manera que la Cdl WT.

4. Objetivo general

Optimizar el proceso de síntesis recombinante de Cdl marcada isotópicamente con ^{15}N y ^{13}C por el método sin célula y determinar la citotoxicidad del péptido obtenido y compararla con Cdl salvaje.

4.1 Objetivos particulares

4.1.1 Optimizar la reacción de síntesis de candidalísina sin células.

- Generar el modelo de ADN para la reacción de síntesis de proteínas sin células por medio de la técnica de amplificación por PCR para cada una de las construcciones p97, p98 y p99.
- Establecer la construcción con la que se obtenga un mejor rendimiento de la reacción de expresión *in vitro*.
- Determinar la eficiencia y especificidad de las enzimas trombina y enteroquinasa para la escisión de las construcciones.

4.1.2 Optimizar la purificación y preparación de la candidalísina recombinante.

- Estandarizar el método de purificación del péptido obtenido.
- Identificar las condiciones metodológicas para concentrar la construcción de candidalísina.
- Identificar el mejor método de intercambio con solución amortiguadora de trabajo.

4.1.3 Realizar una comparación de la actividad biológica de la candidalísina recombinante resultante y la candidalísina silvestre.

- Determinar la citotoxicidad de la construcción generada y de la toxina silvestre mediante un ensayo de LDH en la línea celular TR146 como modelo de la mucosa humana.

5. Metodología y Procedimiento experimental

5.1 Técnicas generales

5.1.1 Electroforesis en geles de Agarosa

Reactivos y materiales:

Preparar tampón TAE 1X (Tris, acetato y EDTA)

1. A partir del tampón TAE 50X de la marca Severn Biotech, diluir a una concentración 1X.

Preparar el gel de agarosa 1%

2. En el volumen adecuado de tampón TAE 1X, agregar la cantidad de agarosa suficiente para obtener una concentración de 1% (0.3 g para 30 ml)
3. Calentar en microondas hasta que la agarosa esté completamente disuelta, verificar la solución en intervalos de 30 segundos y mezclar para evitar que se caliente demasiado y se evapore el tampón
4. Dejar enfriar por 5 min.

Preparar la tinción de ácidos nucleicos 1X

5. A partir del estándar de concentración 10000X de la marca GelRed, tomar el volumen adecuado de acuerdo a el volumen de solución de agarosa (3 μ l para 30 ml)
6. Adicionar tinción para ácidos nucleicos de la marca GelRed a la solución de agarosa
7. Mezclar y servir en la bandeja para el gel de la cámara de electroforesis y colocar el peine.

Protocolo:

Cargar y Correr Gel

8. Esperar 10 min a que solidifique el gel antes de retirar el peine
9. Llenar la cámara con tampón TAE 1X
10. Mezclar 5 μ l de muestra con 5 μ l de Gel de carga de la marca NEB
11. Cargar el gel con la mezcla anterior, agregar la escalera de peso molecular de DNA de la marca NEB a uno de los pocillos
12. Correr gel a 80V por 1 hora.

5.1.2 SDS Page

Reactivos y materiales:

Preparar Tampón de corrimiento 1X

1. Tomar el volumen adecuado del tampón SDS Tris glicina 10X de la marca BIO-RAD y diluir a una concentración 1X.

Preparar Muestras

2. Tomar 15 μ L de muestra en un Eppendorf de 1,5 ml
3. Añadir 10 μ L de tampón de carga de muestra Alfa Aesar Laemmli SDS 4x y mezclar bien
4. Calentar a 92 °C durante 2 minutos en el bloque térmico.

Preparar gel separador de acrilamida 14%

Se empleó el volumen de reactivos indicado en el protocolo descrito por National Diagnostics.

5. Para 2 geles (Volumen total de 12.5 ml) se ocuparon los siguientes volúmenes:

5.8 ml de ProtoGel 30% de la marca National Diagnostics.

3.26 ml de tampón ProtoGel separador de la marca National Diagnostics.

3.3 ml de H₂O

125 μ l de persulfato de amonio (APS) 10%

25 μ l de tetrametilendiamina (TEMED)

APS inicia la polimerización de la acrilamida y bis-acrilamida, TEMED actúa como catalizador de la reacción manteniendo los radicales libres.

6. Homogeneizar mezcla y vertir a los moldes
7. Agregar un pequeño volume de agua saturada con isopropanol para eliminar burbujas y crear una línea recta
8. Esperar 15 min y descartar agua con isopropanol.

Preparar gel concentrador de acrilamida 4%

9. Para 2 geles (Volumen total de 12.5 ml) se ocuparon los siguientes volúmenes:

0.39 ml de ProtoGel 30% de la marca National Diagnostics.

0.75 ml de tampón ProtoGel concentrador de la marca National Diagnostics.

- 1.83 ml de H₂O
- 15 µl de APS 10%
- 3 µl de TEMED

10. Homogeneizar mezcla y vertir a los moldes sobre el gel separador
11. Colocar los peines y esperar 10 min.

Protocolo:

Cargar y correr gel

12. Configurar el tanque en funcionamiento
13. Llenar la cámara interior con tampón de corrimiento 1X
14. Cargar 25-30 µL de las muestras y 8 µL de la escalera para proteínas Thermo Scientific™ PageRuler™ 10-180 kDa
15. Correr durante 45 min a 180 V hasta que el frente del tinte esté a ≤1 cm del extremo.

5.1.3 Western Blot

Posterior al procedimiento de SDS Page

Reactivos:

Preparar tampón de transferencia

1. Realizar una dilución a una concentración 1X a partir de Trans-Blot Turbo 5x transfer buffer de la marca Bio-Rad.

Preparar tampón solución salina con Tris TBS-Tween 20 (TBS-T)

2. Diluir a 1x la solución de 10x TBS de la marca Bio-Rad
3. Agregar Tween-20 para una concentración de 0.1%.

Preparar un tampón de bloqueo

4. Tomar la cantidad adecuada de leche en polvo para preparar una solución de leche al 5% en TBS-T y disolver.

Preparar solución de anticuerpos anti-His en leche 1%

5. Preparar una solución de leche al 1% con leche en polvo disuelta en TBST 1X

6. Agregar anticuerpos anti-His.

Preparar sustrato HRP de trabajo

7. Sacar la caja blanca del sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon Western del refrigerador y dejar calentar a temperatura ambiente antes de usarlas
8. Mezclar volúmenes iguales de reactivo de luminol y solución de peróxido (750 μ l) en un Eppendorf de 1,5 ml.

Protocolo:

Transferencia (Kit de transferencia Trans-Blot Turbo TM RTA, nitrocelulosa)

9. Agregar un poco de tampón de transferencia a las bandejas del kit de transferencia (lo suficiente para cubrir el papel de filtro)
10. Utilizar pinzas limpias para manipular el papel de filtro y la membrana de nitrocelulosa. Tomar 2 pilas de papel de filtro y colcar en una de las bandejas con el tampón
11. Colocar una membrana de nitrocelulosa en la otra bandeja con tampón
12. Sacar casete del equipo de transferencia BIO-RAD
13. Apilar los materiales de la siguiente manera, de abajo hacia arriba: papel de filtro-membrana-gel-papel de filtro
14. Cerrar e insertar casete en el equipo, encender
15. Seleccionar la transferencia TURBO (7 min)
16. Colocar la membrana en una bandeja con tampón TBS-T y agitar durante 5 min
17. Retirar TBS-T y sustituir con tampón de bloqueo
18. Bloquear durante 1 hora en el agitador
19. Lavar con tampón TBS-T y agitar durante 5 min (lavado 1)
20. Repetir el paso 10 (lavado 2)
21. Incubar con la solución de anticuerpos durante 1 hora
22. Lavar con tampón TBS-T y agitar durante 10 min (lavado 1)
23. Repetir el paso 12, 2 veces (lavado 2 y lavado 3).

Revelado (LICOR)

24. Colocar la membrana encima de una película transparente sobre la mesa
25. Agregar el sustrato HRP de trabajo sobre la membrana lentamente (dejando caer)
26. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente
27. Drenar el exceso de sustrato
28. Colocar en la bandeja LICOR y obtenga una imagen de la membrana. 700 canales + Chemi, 2 min de adquisición cada uno.

5.1.4 Cuantificación de la proteína

1. Sistema automatizado NanoDrop. Se obtiene concentración en mg/ml.
2. Convertir a μM .

Tabla 2. Peso molecular y coeficiente de extinción de cada construcción.

Construcción	p99	p99p	p98	p98p
<i>Peso molecular (mg/mmol)</i>	12647.30	5359.28	12713.18	5302.21
<i>Coefficiente de extinción molecular ($M^{-1} cm^{-1}$ medido en agua a 280 nm)</i>	15470	5500	15470	5500
<i>Número de aminoácidos</i>	119	51	119	50

5.2 Optimización de la reacción sin células para la producción recombinante de candidalisin.

5.2.1 Obtención del material genético modelo para el sistema de síntesis de proteínas sin células.

5.2.1.1 Diseño de la plantilla genética con el gen

Estudios diversos han demostrado que las reacciones de EPSC funcionan mejor con modelos de plásmidos de ADN, que con ADN lineal. Lo anterior puede ser debido a la degradación por exonucleasas presentes en los extractos celulares (Wu et al., 2007). En un vector pET, el operón lac que se encuentra en este vector, que también tiene un promotor de la ARN polimerasa de T7, regula la expresión de la proteína de interés de manera que cuando no está presente β -d-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG), el represor lac se unirá al sitio de unión, evitando la transcripción. Para experimentos de RMN se requiere una proteína con marcaje isotópico, que se obtiene típicamente de sistemas de expresión bacteriana inducible por IPTG en un medio mínimo que contiene fuentes de nitrógeno o carbono marcadas (Crowley & Rafferty, 2019).

En la mayoría de los casos, existe una gran diferencia en el rendimiento de la reacción dependiendo del tipo de material genético. Por ejemplo, se reportan resultados de la reacción de la expresión de la cloranfenicol acetiltransferasa usando ADN lineal de 1mg/mL y con plásmidos de ADN de 6mg/mL (Kigawa et al., 1999). Por lo que en el 2007 Wu et al. presentaron el método de amplificación de ADN por PCR basado en “overhangs” o cadenas sencillas complementarias de 8 pares de bases que se agregan a cada extremo del modelo de ADN lineal para la formación de un ADN pseudocircular/pseudoplasmídico, la cual le permitió a los autores que el rendimiento de la reacción de expresión *in vitro* fuera el mismo usando los productos de esta reacción PCR que el obtenido usando ADN plasmídico (**Figura 13**) (Wu et al., 2007).

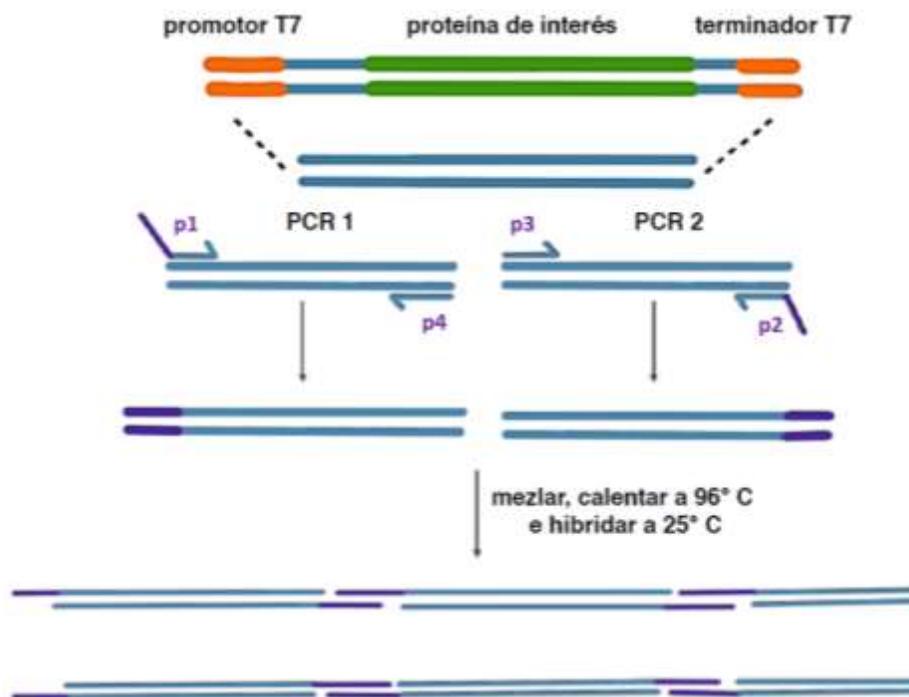


Figura 13. Producción de ADN pseudocíclico siguiendo la metodología desarrollada por Wu et al. De los 4 cebadores utilizados, el cebador directo 1 (p1) y el cebador inverso 2 (p2) son los que contaban con las cadenas sencillas adicionales complementarias, el procedimiento consiste en la realización de 2 reacciones en cadena de la polimerasa separadas, una de ellas (PCR 1) empleando los cebadores 1 y 4 (p1, p4) y la otra (PCR 2) empleando los cebadores 2 y 3 (p2, p3). Su mezcla posterior permite la hibridación para la formación del material genético modelo cíclico.

El ADN diseñado para la expresión libre de células debe contener un promotor (generalmente T7), un sitio de inicio de la traducción en la región 5' y las secuencias de terminación de la transcripción y traducción en la región 3' (He et al., 2011).

Para la optimización de la producción de candidalísina recombinante se diseñaron tres diferentes construcciones de ADN. Para los ADNs se utilizaron secuencias promotoras y de terminación de la ARN polimerasa T7. Las construcciones diseñadas para este proyecto además contienen un sitio de unión ribosomal gen 10 del bacteriofago T7.

El principal producto génico del fago T7, la ARN polimerasa T7 (T7ARNP) es una enzima de subunidad única, simple en comparación con las ARN polimerasas procariontas y eucariontas, que poseen múltiples subunidades. Es capaz de realizar

el ciclo transcripcional completo sin necesidad de proteínas adicionales y tiene una alta especificidad hacia el promotor T7 sin afinidad hacia material genético no relacionado. T7ARNP exhibe una alta procesividad ya que es capaz de polimerizar miles de nucleótidos sin disociarse del ADN molde, se alarga aproximadamente cinco veces más rápido que la ARN polimerasa de *E. coli* (Borkotoky & Murali, 2018).

Otro componente de las construcciones diseñadas previamente en el laboratorio es la secuencia de la proteína GB1. Esto es debido a que se requiere la fusión de esta proteína para la expresión más eficiente de proteínas pequeñas (como la Cdl). Se ha reportado que el dominio B1 de la proteína estreptocócica G (GB1) no solo aumenta el nivel de expresión, sino que también mejora el plegamiento de proteínas pequeñas. Este sistema basado en un pequeño compañero de fusión es comúnmente utilizado para resolver el bajo rendimiento de expresión y la pobre eficiencia de plegamiento de pequeñas proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* (Cheng & Patel, 2004).

Para fines de detección y purificación, también es necesario utilizar una etiqueta de afinidad como la que contiene una cadena de polihistidinas (His₆). En la histidina, los grupos donantes de electrones en el anillo de imidazol, forman enlaces de coordinación con matrices de metales de transición inmovilizados. Por lo tanto, los péptidos que contienen secuencias de residuos de histidina consecutivos se retienen eficientemente en matrices de columna IMAC (cromatografía de afinidad con metal inmovilizado). Después del lavado del material de la matriz, los péptidos que contienen secuencias de polihistidina pueden eluirse fácilmente ajustando el pH del tampón de columna o añadiendo imidazol libre al tampón de columna (Bornhorst & Falke, 2000).

También se introdujo en la secuencia un sitio de corte enzimático, de enteroquinasa para el caso de p97 y p98, y de trombina para p99. La finalidad de una digestión enzimática posterior a la obtención de las proteínas es la separación de la Cdl del resto del péptido, para la recuperación de ese fragmento se decidió incluir la etiqueta de polihistidinas después del sitio de corte en la construcción.

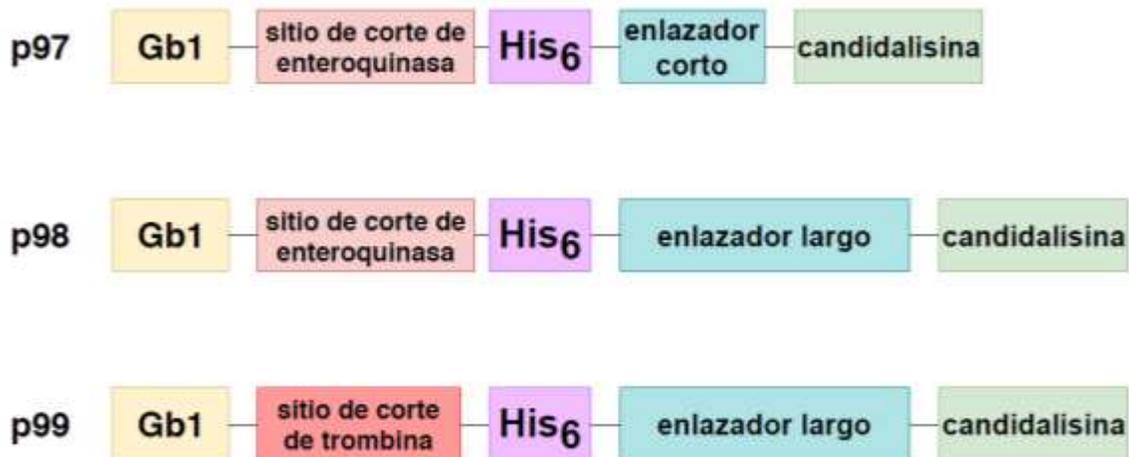


Figura 14. Características de las construcciones. Las construcciones incluyen la secuencia de la proteína GB1, un sitio de escisión enzimática de enteroquinasa o trombina, una etiqueta de polihistidinas, una secuencia enlazadora y la de Cdl. La secuencia completa de cada construcción se encuentra en el Anexo A.

De acuerdo a resultados de proyectos recientes del grupo de investigación Naglik en los que se han estudiado la estructura y dinámica de la Cdl, se ha determinado que tiene una estructura predominantemente de alfa hélice (**Figura 15**) y que tiende a la oligomerización y a la formación de agregados de muy alto peso molecular. Lo anterior se ha evidenciado mediante bioinformática (programas de predicción de estructura secundaria a partir de la secuencia), experimentos de dicróismo circular, ultracentrifugación analítica y cross linking (ver Apéndices A, C y D).

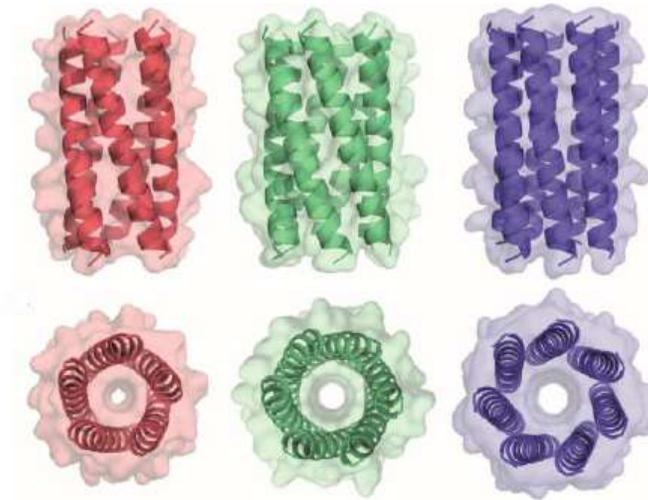


Figura 15. Estructura de Cdl. La secuencia de Cdl cuenta con repeticiones del motivo hxxhxx presente en barriles alfa helicoidales. El arreglo de los aminoácidos en el péptido anfipático favorece un comportamiento de tipo transmembranal del además de que presenta un motivo K-x-x-K/R-x-x-K característico de péptidos que interaccionan con la membrana (ver Apéndice C) (Thomson et al., 2014).

La adición del detergente dodecilsulfocolina (DPC) da como resultado la formación de micelas que representan un modelo de membrana celular huésped a la que se une la Cdl. Al unirse a las micelas, la Cdl se separa y el agregado de alto peso molecular se desintegra (ver Apéndice D) (**Figura 16**). Esto evidencia la importancia de la inclusión de DPC en los vehículos de las construcciones de Cdl en el transcurso de los experimentos ya que es necesario evitar la formación de agregados para optimizar los procesos de purificación y digestión enzimática. Tanto la enteroquinasa como la trombina se han probado con el detergente DPC y los resultados muestran que la actividad de las enzimas no se ve afectada significativamente. (Vergis & Wiener, 2011)

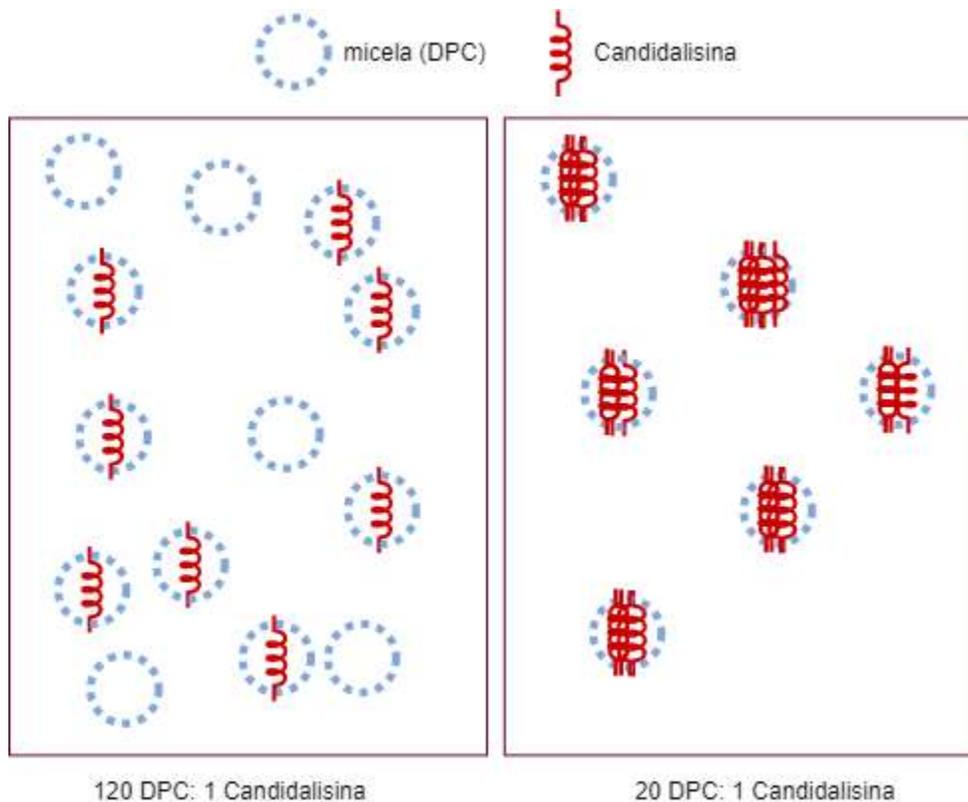


Figura 16. Representación de la intercalación de Candidalysin a un modelo de membrana celular (DPC) y su oligomerización dependiente de la concentración de DPC. En ausencia de detergente, Cdl forma agregados de pesos moleculares > 1 GDa (resultado no mostrado). Cdl forma oligómeros de diferentes tamaños dependiendo de la proporción de péptido a detergente. Este resultado se puede interpretar también de manera que Cdl forma oligómeros de tamaños más grandes a medida que aumenta la concentración de la toxina. Cdl forma oligómeros de bajo peso molecular (dímeros y trímeros) y oligos de alto peso molecular (6, 7, 8, 9, 10-meros oligos) (ver Apéndice A).

Durante el diseño de las construcciones utilizadas en este proyecto se tomó en cuenta el impedimento estérico provocado por la micela y la manera en la que podría estar afectando la reacción de escisión enzimática, es por esta razón que se incluyeron enlazadores. El enlazador corto que se encuentra en p97 consta de 5 residuos y el largo que forma parte de p98 y p99 contiene 10 residuos, el propósito de este enlazador es proporcionar más longitud a la construcción para evitar el impedimento estérico causado por la interacción de Cdl con las micelas y facilitar la unión de la enzima con su sitio de corte (**Figura 17**).

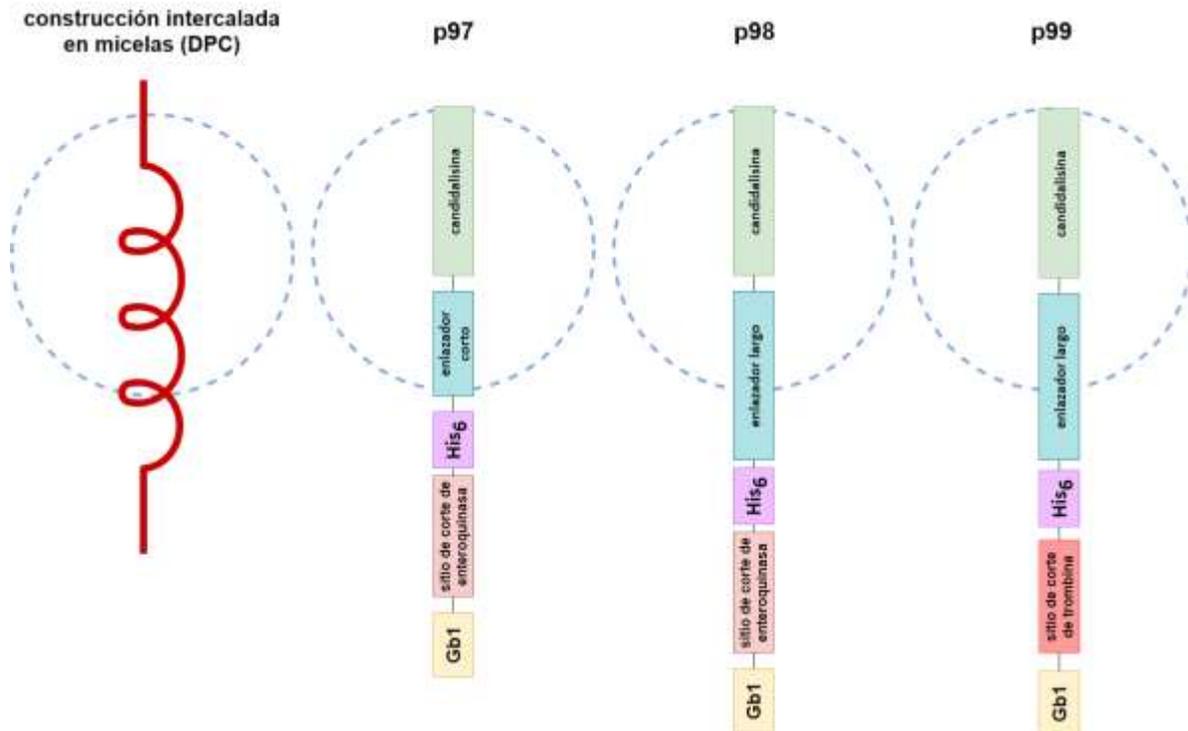


Figura 17. Diferencia en las longitudes de los enlazadores y su efecto en la exposición del sitio de corte enzimático de cada construcción. En las tres construcciones el sitio de corte se encuentra fuera de la micela y con disponibilidad suficiente para que se lleve a cabo la reacción de escisión por su enzima correspondiente debido a los enlazadores.

5.2.1.2 Reacción de PCR para la producción de material genético.

Se utilizó el método por Wu et al. basado en el uso de cebadores con cadenas sencillas complementarias de 8 pares de bases con la finalidad de que el producto de la reacción en cadena de la polimerasa contara con estas cadenas y sea posible la formación del modelo de ADN pseudocíclico insensible a exonucleasas característico de la técnica para conseguir en la reacción de EPSC un rendimiento comparable al que se obtiene usando un modelo de ADN plasmídico (Wu et al., 2007). Las secuencias de ADN utilizadas están descritas en el Anexo A.

Reactivos:

Las construcciones de ADN y los cebadores utilizados se obtuvieron de la compañía Invitrogen. Se prepararon soluciones en agua esteril de 0.25 ng/μl para el ADN y de 10 μM para los cebadores. El resto de los reactivos se obtuvieron de la marca NEB:

deoxinucleosido trifosfatos (dNTPs: dGTP, dTTP, dCTP y dATP, diluidos a 10mM en agua), 5x tampon de reaccion Q5, 5X solucion potenciadora y la ADN polimerasa de alta fidelidad Q5.

Protocolo:

Se empleó el volumen de reactivos indicado en el protocolo descrito por NEB tomando en cuenta que se requieren 2 PCRs para cada construcción de ADN a amplificar. Se comenzó por una reacción de 25 µl usando 4 construcciones para confirmar la veracidad del metodo y posteriormente se aumentó la escala de la reacción a 400 µl.

1. Para 25 µl de reaccion se mezclan los reactivos de la siguiente manera:

- 5 µl tampon de reacción 5X
- 0.5 µl dNTPs 10 mM
- 1.25 µl 1cebaor FW 10 mM
- 1.25 µl 10 cebador RV 10 mM
- 0.5 µl ADN 0.25 ng/µl
- 0.25 µl ADN polimerasa de alta fidelidad Q5
- 5 µl potenciador
- 11.25 µl H₂O

2. Utilizar el siguiente programa de PCR:

Tabla 3. Ciclo de PCR a usar para la producción de material genético apto para EPSC.

Paso	Temperatura	Tiempo
<i>Desnaturalización inicial</i>	98°C	30 segundos
<i>35 Ciclos</i>	98°C	10 segundos
	66°C	20 segundos
	72°C	30 segundos
	72°C	2 minutos
<i>Extensión final</i>	72°C	2 minutos
<i>Almacenamiento</i>	4–10°C	

3. Comprobar el exito de la reacción por electroforesis de agarosa.

5.2.1.3 Purificación del producto de reacción de PCR.

Para la concentración y purificación de los productos de las PCRs, se realizó la precipitación con etanol.

Reactivos:

AcONa 3M y EtOH 3M.

Protocolo:

1. Adicionar 10% del volumen total de la reacción de PCR de AcONa 3M (por ejemplo, adicionar 40 μ l 3M AcONa a 400 μ l de reacción de PCR de la sección 1.1.1)
2. Adicionar 3.1 volúmenes de 90 % EtOH frío
3. Almacenar a -80°C por la noche
4. Peletear ADN a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C
5. Separar sobrenadante
6. Dejar secar por 30 minutos (dejar tubos Eppendorf abiertos en la mesa para que se evapore el exceso de EtOH).
7. Redisolver ADN en 100 μ l de agua

5.2.1.4 Reacción de hibridación de ADN

Después de haber purificado las reacciones PCR 1 y PCR 2 para cada construcción de ADN se debe realizar una mezcla de partes iguales de los productos purificados para que se lleve a cabo la hibridación de las cadenas cortas complementarias adicionadas en los extremos y se forme el modelo de material genético pseudocíclico.

1. Sistema automatizado NanoDrop. Se obtiene concentración en ng/ μ l. Determinar concentración de cada producto de PCR y mezclar en partes iguales las PCR de cada construcción.
2. Ajustar a 100 nM
3. Utilizar el siguiente programa de PCR.

Tabla 4. Ciclo de PCR a usar para el proceso de hibridación

<i>Paso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
<i>Desnaturalización inicial</i>	96°C	5 minutos
<i>Hibridación</i>	25°C	5 minutos
<i>Almacenamiento</i>	4–10°C	

5.2.2 Síntesis de candidalísina por EPSC.

La preparación de los reactivos necesarios para la solución energética y el extracto celular de células se efectuó con anticipación ya que estos procedimientos consumen una cantidad de tiempo considerable. Por esta razón se produjo tanto el extracto celular como la solución energética y la solución de aminoácidos en una mayor cantidad para posteriormente ser almacenadas en alícuotas apropiadas para la realización de reacciones de aproximadamente 200 µl. Después de optimizar la reacción se aumentó su escala a 1 ml y posteriormente hasta 5 ml.

Protocolo:

1. Para 200 µl de reacción se mezclan los reactivos de la siguiente manera:
 - 40.6 µl H₂O
 - 10.4 µl glutamato de potasio 2.5 M
 - 10 µl diglutamato de magnesio 150 mM
 - 12.8 µl 14x solución energética
 - 40 µl solución de aminoácidos 5 mM
 - 8 µl Polietilenglicol 8000 50%
 - 20 µl 100 nM ADN
 - 66.6 µl extracto celular
2. Adicionar 100 o 50 µl de la mezcla anterior a cada pozo de una placa de 96 pozos.
3. Mantener la placa en incubación por 5 horas a 800 rpm y 30°C.

5.2.3 Purificación y preparación de las construcciones

5.2.3.1 Purificación IMAC

Una vez sintetizada la construcción con candidalisina, es necesario extraerla de los productos obtenidos de la reacción de EPSC utilizando la etiqueta de histidinas. Se implementó la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) para la purificación de proteínas recombinantes con una etiqueta de polihistidina.

Reactivos y materiales:

Preparar tampón de trabajo

1. Por cada 1.0 ml de reacción de expresión *in vitro*, preparar 11 ml de Tampón de trabajo de concentración 20mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 3 mM DPC, 10 mM imidazol.

Preparar tampón de elución

2. Por cada 1.0 ml de reacción de expresión *in vitro*, preparar 3 ml de Tampón de elución de concentración 10mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 3 mM DPC, 250 mM imidazol.

Preparar la resina para la purificación.

La capacidad de union a proteínas de la resina Ni-NTA es de 5-10 mg de construcción con la etiqueta de afinidad polihistidinas por 1 ml de resina (resina QIAgen).

3. Emplear 250 μ l de Ni-NTA por cada ml de reacción libre de células (asumiendo un rendimiento 1 mg/ml). Al volumen total necesario de resina dependiendo del volumen de reacción de expresión *in vitro* se le refiere como "volumen de columna".
4. Transferir resina a las columnas y lavar con 20 volúmenes de columna de agua (la resina se almacena en EtOH al 20% en una suspensión al 50% en volumen, es decir, transferir 500 μ l de suspensión por 250 μ l de resina)
5. Equilibrar la columna con 10 CV de tampón de trabajo.

Protocolo:

6. Mezclar 1 ml de tampón de trabajo 2x con 1 ml de reacción in vitro. Guardar 10 μ l para la muestra 0 de análisis de electroforesis
7. Cargar la muestra en dos resinas Ni-NTA, recoja el flujo.
8. Vuelva a cargar el flujo a través de la columna de Ni-NTA y recoja.
9. Agregue 16 volúmenes de columna del tampón de lavado

Eluir la proteína marcada con His.

10. Añadir 1 volumen de columna del tampón de elución.
11. Recoger el líquido con un Eppendorf etiquetado como E1
12. Repita el paso anterior 5 veces. (E2-E6)
13. Mezclar E1-E4 para intercambio de tampón.
14. Comprobar el éxito de la reacción por SDS-PAGE y tinción Coomassie.

5.2.3.2 Desalado/intercambio de tampon por exclusion molecular

Para favorecer la actividad enzimática de la enteroquinasa se necesita un paso de desalinización para eliminar el imidazol, disminuir la concentración de NaCl y agregar CaCl_2 2 mM.

Reactivos y materiales:

Se usaron las columnas de desalación PD-10 para un volumen de desalación de 2.5 ml.

Preparar tampón adecuado para la digestión enzimática.

1. Preparar el tampón de digestión con la concentración de Tris 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, DPC 3 mM, CaCl_2 2 mM.

Preparar la columna de desalación PD-10

2. Retirar la tapa superior y vertir la solución de almacenamiento de la columna.
3. Retirar el filtro superior con unas pinzas.
4. Cortar el extremo sellado de la columna por la muesca.
5. Colocar la columna de desalación PD-10 en un tubo de 50 ml usando el adaptador de columna.

Equilibrio de columna

6. Llenar la columna con tampón de digestión y dejar que entre completamente.
7. Repetir 3 veces y deseche el flujo.
8. Llenar la columna por quinta vez con tampón de digestión y centrifugar a 1000 xg durante 2 minutos.
9. Desechar el flujo.

Protocolo:

Aplicación de muestra

10. Añadir la muestra (2.5 ml por columna) lentamente en medio de la cama empacada.

Elución

11. Coloque la columna de desalación PD-10 en un nuevo tubo de 50 ml.
12. Eluir por centrifugación 1000 xg durante 2 minutos.
13. Recoger

5.2.3.3 Digestiones enzimáticas

Una vez que la muestra obtenida de la EPSC se encontraba en un tampón adecuado para la reacción enzimática se llevó a cabo la digestión de las construcciones con las enzimas respectivas a su sitio de ecisión.

La enteroquinasa es una proteasa específica que escinde después de la lisina en su sitio de escisión Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. La enteroquinasa de NEB (New England Biolabs) utilizada en el presente trabajo tiene una concentración de 16,000 unidades/ml. Una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para escindir 25 µg de un sustrato MBP-EK-paramiosina-ΔSal hasta completar el 95% en 16 horas a 25 °C en un volumen de reacción total de 25 µl.

Para cada ml de reacción EPSC se tiene una producción de aproximadamente 1mg de proteína.

Método:

1. Se adiciona 20 μ l de enteroquinasa por cada ml de reacción de expresión in vitro.
2. Se incubó a 25 °C en baño de agua por la noche.
3. Se comprobó el éxito de la reacción por SDS-PAGE y tinción Coomassie.

La trombina es una valiosa herramienta bioquímica debido a su alta especificidad proteolítica. Su sitio de escisión Leu-Val-Pro-Arg-II-Gly-Ser (donde II denota el sitio de escisión) se incorpora ampliamente dentro de la región enlazadora de proteínas recombinantes etiquetadas por afinidad. La trombina de GE Healthcare usada en este proyecto se preparó a una concentración de una unidad por μ l. Una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para escindir más del 90% de 100 μ g de proteínas prueba en PBS a 22°C por 16 horas. La escisión generalmente se completa después de tratamiento por la noche con menos de 10 unidades por mg de proteína.

Método:

1. Se adicionó 20 μ l de trombina por cada ml de reacción de expresión in vitro.
2. Se incubó a 25 °C por la noche.
3. Se comprobó el éxito de la reacción por SDS-PAGE y tinción Coomassie.

5.2.3.4 Concentración de la muestra por liofilización

Para obtener volúmenes apropiados a las concentraciones requeridas para los experimentos de actividad biológica en cultivos celulares se liofilizó la muestra.

1. Introducir la muestra en nitrógeno líquido (-196°C) para congelarla
2. Introducir la muestra congelada en uno de los recipientes de la cámara de sublimación y conectar el vacío.
3. Dejar la muestra por la noche y resuspender en el volumen correspondiente.

5.3 Evaluación de la actividad biológica de la construcción p99

5.3.1 Propagación de células TR146

Se utiliza en el laboratorio la línea celular TR146 como un modelo de la mucosa humana. Las células forman un epitelio estratificado indiferenciado, no queratinizado, que comparte muchas características de la mucosa bucal.

Reactivos:

1. Preparación de medio DMEM que contiene 15% FBS (suero bovino fetal) con 1% Pen/Strep (Penicilina-Estreptomicina) en condiciones de esterilidad.

Protocolo:

División de células

2. Las celdas deben tener una confluencia del 90-100% en frascos de cultivo celular con un volumen de 25 mL de medio DMEM.
3. Retirar todo el medio del frasco de cultivo celular y lavar con 10 ml de PBS.
4. Retirar y agregar 4 ml de tripsina a 25°C
5. Incubar durante aproximadamente 20 minutos
6. Comprobar que las células se hayan desprendido
7. Agregar 8 ml de medio
8. Desprender células mezclando con pipeta
9. Transferir a un nuevo frasco de cultivo celular de 25 ml el volumen indicado de suspensión celular como se indica a continuación.
10. Vol de suspensión celular (del matraz completamente confluyente) para agregar/días hasta que esté del 90-100% confluyente
 - 1 ml = 4 días
 - 2 ml = 3 días
 - 3 ml = 2 días
 - 6 ml = 1 día
11. Completar el volumen de cada matraz a 25 ml
12. Incubar a 5% CO₂ y 37°C por el tiempo requerido.

Conteo de células: Método de contador celular automatizado

1. Repetir el proceso de división de células hasta el paso 8 y transferir suspensión celular a un tubo falcon
2. Agregar 10 μ l de suspensión celular a un tubo eppendorf
3. Agregar 10 μ l de azul tripano al mismo tubo y mezclar
4. Agregar 15 μ l de solución en cada lado de la placa para conteo celular
5. Encender el contador y colocar placa en el contador
6. Realizar un promedio de dos conteos
7. Agregar a un nuevo tubo falcon el volumen necesario para preparar una suspensión celular de la concentración adecuada para los experimentos posteriores
8. Agregar el volumen de medio requerido para llegar a dicha concentración.
9. Transferir suspensión celular a las placas para los experimentos
10. Incubar a 5% CO₂ y 37° por 24 horas.

5.3.2 Restricción de suero.

Aunque el suero proporciona condiciones óptimas para el crecimiento celular, su composición variable representa un factor indeseable al realizar bioensayos. La eliminación del suero del medio de cultivo elimina las incógnitas conocidas y desconocidas, reduce la interferencia analítica y proporciona condiciones experimentales más reproducibles. Además de reducir la actividad celular basal y hacer que la población de células en proliferación sea más homogénea (Pirkmajer & Chibalin, 2011).

1. Retirar la placa de la incubadora
2. Reemplazar el medio de las placas con medio sin suero
3. Incubar a 5% CO₂ y 37°C por 24 horas.

5.3.3 Infecciones celulares

1. Adicionar a las placas los tratamientos correspondientes al experimento. Se adiciona a los pozos el volumen indicado de construcción y de Cdl WT para llegar a las concentraciones de 15 μ M y 40 μ M. Adicionalmente, se utilizan H₂O y el vehículo de la construcción como tratamientos control.

2. Incubar cada placa a 5% CO₂ y 37° por los tiempos seleccionados de infección.

5.3.4 Recolección de sobrenadantes y proteínas

1. Preparar el volumen suficiente de tampón de lisis (inhibidor de proteasas 2% en tampón RIPA) para todos los pozos de la placa
2. Enfriar tubos Eppendorf indicados para almacenar el sobrenadante
3. Retirar la placa de la incubadora al tiempo indicado, mantener la placa en hielo para evitar la degradación de las proteínas
4. Recoger el sobrenadante de los pozos y transferir a los tubos Eppendorf pre enfriados
5. Centrifugar tubos Eppendorf a 1500 rpm por 10 min y posteriormente transferir el sobrenadante a nuevos tubos Eppendorf, descartar sedimento
6. El sobrenadante puede ser almacenado a -20 °C o puede ser usado de inmediato
7. Agregar PBS frío a los pozos de la placa para detener el funcionamiento de las células y esperar 5 min
8. Eliminar PBS y agregar tampón de lisis (RIPA + inhibidor de proteasas). El inhibidor de proteasa evita que las proteasas de la célula degraden las proteínas. Esperar 5 minutos
9. Raspar la placa para eliminar las proteínas del fondo
10. Transferir contenido a tubos Eppendorf
11. Mantener en hielo durante 30 minutos
12. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y recolectar los lisados celulares (sobrenadante), descartar sedimento.

5.3.5 Evaluación del daño celular por ensayo de LDH

La medición de la actividad de las enzimas citoplasmáticas liberadas por las células dañadas es un método común para evaluar citotoxicidad. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima estable que se encuentra en el citoplasma de todas las células y se libera rápidamente cuando la membrana plasmática es dañada. La actividad de LDH se puede cuantificar utilizando el nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)

producido durante la conversión de lactato en piruvato para reducir un segundo compuesto en una reacción acoplada a un producto con propiedades cuantificables. Este protocolo mide la reducción de una sal de tetrazolio amarilla, cloruro de 2-(4-yodophenyl)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT), por NADH en un tinte rojo de clase formazán soluble en agua por absorbancia a 492 nm. La cantidad de formazán es directamente proporcional a la cantidad de LDH en el cultivo, que, a su vez, es directamente proporcional al número de células muertas o dañadas(Kumar et al., 2018).

Protocolo: Kit de ensayo de lactato deshidrogenasa

1. Preparar una dilución 1:8000 del estándar en F-PBS
2. Agregar 100 μ L de la dilución estándar en los pocillos A1 y A2 de la placa
3. Agregar 50 μ L de F-PBS en los pocillos restantes de las 2 primeras columnas.
4. Realizar una dilución en serie transfiriendo 50 μ L de A1 a B1 y repetir hasta G1. Desechar los 50 μ L restantes dejando H1 libre para que el PBS actúe como una solución en blanco (para la curva estándar)
5. Repetir el paso anterior de la dilución en serie para la columna 2
6. Agregar 90 μ L de PBS y 10 μ L de la muestra (100 μ L en total) en las columnas 3, 5 y 7
7. Las muestras se preparan por duplicado: transferir 50 μ L de solución de las columna 3 a la columna 4, transferir 50 μ L de solución de las columna 5 a la columna 6, transferir 50 μ L de solución de las columna 7 a la columna 8
8. Agregar 50 μ L de sustrato INT (para preparar, agregue 12 ml de tampón de ensayo a la botella para disolverlo)
9. Incubar en la oscuridad durante 20 minutos
10. Añadir 50 μ L de solución de paro y medir.

6. Resultados

Con la finalidad de presentar los resultados obtenidos en forma secuencial, estos se presentan en tres secciones. En la primera se identificó la construcción que presenta mejores rendimientos de EPSC y mayor eficacia al procesamiento enzimático. En la segunda sección se optimizó el protocolo de producción de muestras por EPSC para estudios estructurales por RMN. Por último, se evaluó la actividad biológica de la muestra obtenida para confirmar su similitud con la Cdl WT. Las construcciones fueron diseñadas para encajar en la siguiente estructura de purificación y preparación de la muestra para RMN (**Figura 18**).

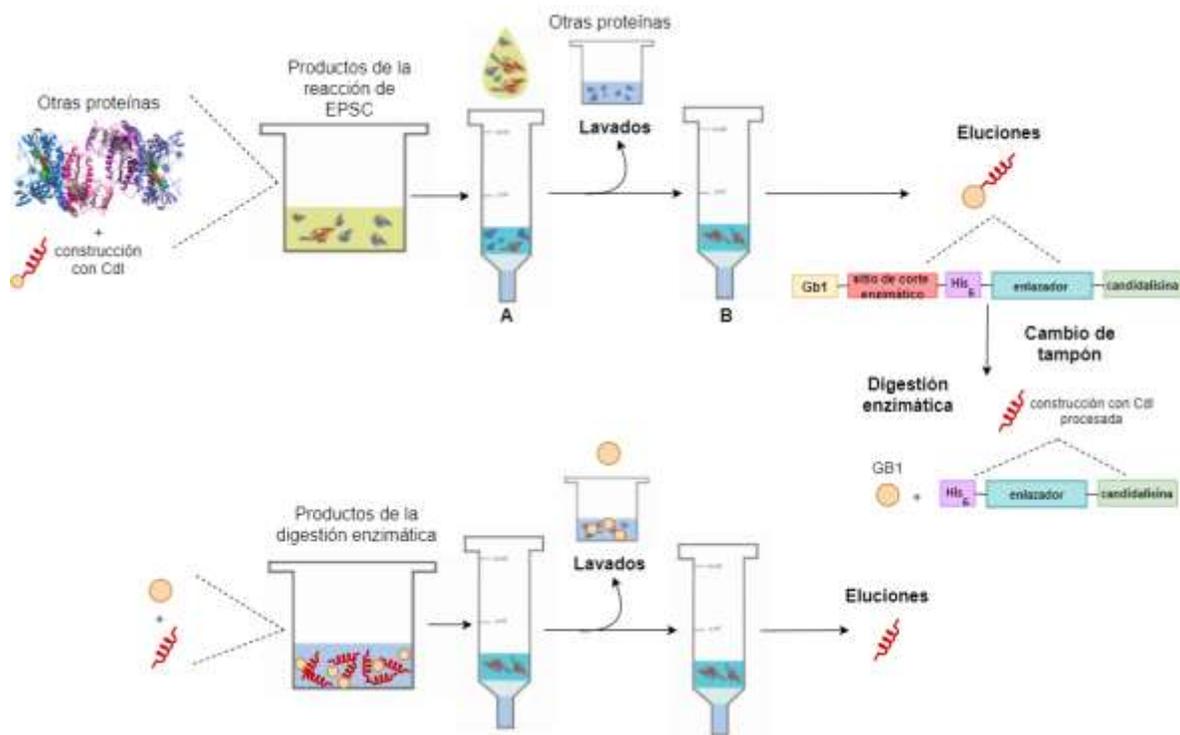


Figura 18. Método general a seguir para la purificación y preparación de muestra de Cdl para RMN. En primera instancia, se expresa la construcción por EPSC a una cantidad suficiente y se purifica por IMAC con la etiqueta de histidinas, posteriormente se lleva a cabo un cambio del tampón de trabajo ya que, es necesario crear las condiciones óptimas para una escisión enzimática de las construcciones y así obtener la construcción procesada. A continuación, con la finalidad de recuperar la sección de la construcción en donde se encuentra la secuencia de la candidalislina después de la digestión enzimática, se realiza otra purificación por afinidad.

6.1 Optimización de la reacción de síntesis de Cdl sin células

Para la optimización del proceso de síntesis recombinante de Cdl se llevaron a cabo experimentos destinados a la determinación de la construcción óptima para obtener el mayor rendimiento.

6.1.1 Generación del templado de ADN para la reacción *in vitro* por medio de la técnica de amplificación por PCR.

En un principio se intentó realizar la reacción *in vitro* con un vector pET y no se expresó la Cdl. Se realizó un ensayo en donde se comparó la EPSC de proteína fluorescente verde (GFP) con material genético plasmídico pET, pRSETA y ADN lineal amplificado por PCR en donde se determinó que este último tenía mayor expresión de GFP (Gráfica en sección de Material Adicional). Es por lo anterior que se decidió usar el método de amplificación de ADN para obtener el material genético a usar en la reacción de síntesis de proteínas sin células.

Se hicieron 2 PCRs por construcción: Una con los cebadores 1 y 4 y otra reacción con los cebadores 2 y 3. Se comprobó por electroforesis de agarosa el éxito de la reacción de PCR de 400 μ l antes del paso de hibridación necesario para la formación del ADN pseudocíclico de cada construcción. En el gel (**Figura 19**) se observaron las líneas en los carriles para cada una de las PCRs en la posición correspondiente al tamaño de las construcciones. En la amplificación de cada versión de las tres construcciones, se obtuvo con éxito material genético de todas para proseguir con el procedimiento de EPSC.

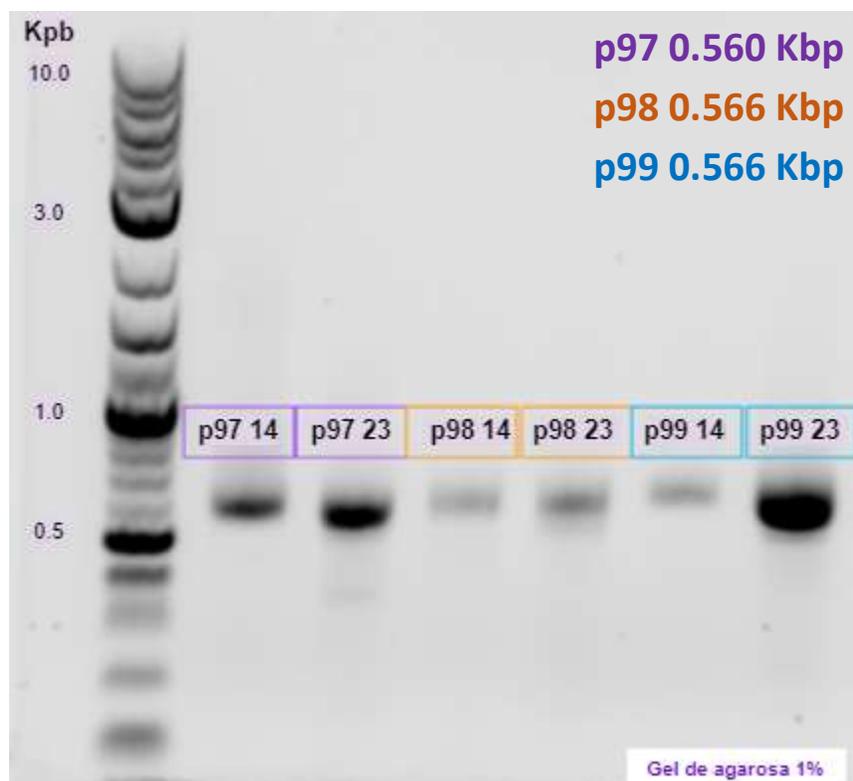


Figura 19. Electroforesis de agarosa de los productos de PCR para cada construcción.

6.1.2 Optimización del volumen de la mezcla de reacción y de las condiciones de almacenamiento del producto.

Se hicieron pruebas para la reacción de EPSC en donde se agregaron 50 y 100 μ l de la mezcla de reacción a los pozos de placa. De igual forma se realizó una comparación visual de un producto de reacción EPSC inmediatamente después de su obtención (**Figura 20A**) con un producto de reacción almacenado a -20°C por la noche (**Figura 20B**). Se realizó SDS Page y Western Blot para visualizar el éxito de la reacción EPSC y determinar la condición de almacenamiento y el volumen con el cual se obtiene un mejor rendimiento. Se observó un rendimiento mejor con el volumen de 50 μ l en ambas condiciones de almacenamiento, por lo que se decidió continuar usando este volumen para procedimientos posteriores (**Figura 20 A y B**). Asimismo, se observó la agregación de p99 en el caso de la congelación de la muestra para su almacenamiento por la noche y descongelación posterior (**Figura 20B**). Como consecuencia se optó por programar los procesos de EPSC y purificación 1 en el mismo día para evitar la pérdida de producto por su agregación.

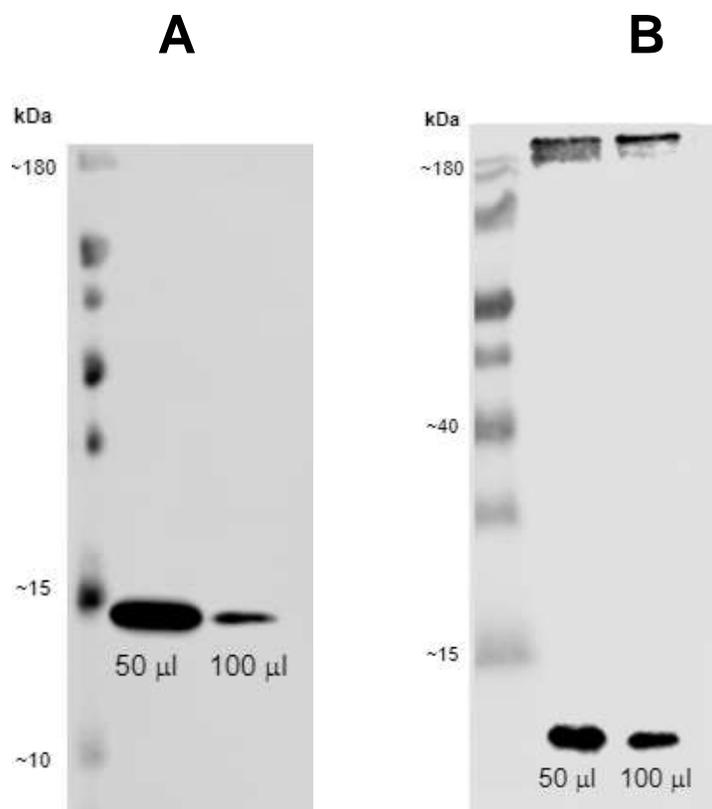


Figura 20. Inmunodetección de la construcción p99. Se probó una reacción de 200 µl de EPSC adicionando volúmenes de 50 µl y 100 µl a la placa y en diferentes condiciones de almacenamiento para la construcción p99. A. Producto de EPSC del día 2. B. Producto de EPSC del día anterior (día 1) que se almacenó a -20°C por la noche.

6.1.3 Identificación de la construcción óptima: Evaluación de eficacia de expresión, purificación y digestiones enzimáticas de las construcciones diseñadas.

Se hizo una comparación del rendimiento de la reacción de EPSC de las 3 construcciones. Se llevó a cabo la reacción de p97, p98 y p99 en mezclas de reacción con volumen total de 200 µl. Se visualizó el éxito de la reacción, el progreso de la purificación y el rendimiento por SDS Page, tinción Coomassie y Western Blot (**Figura 21**).

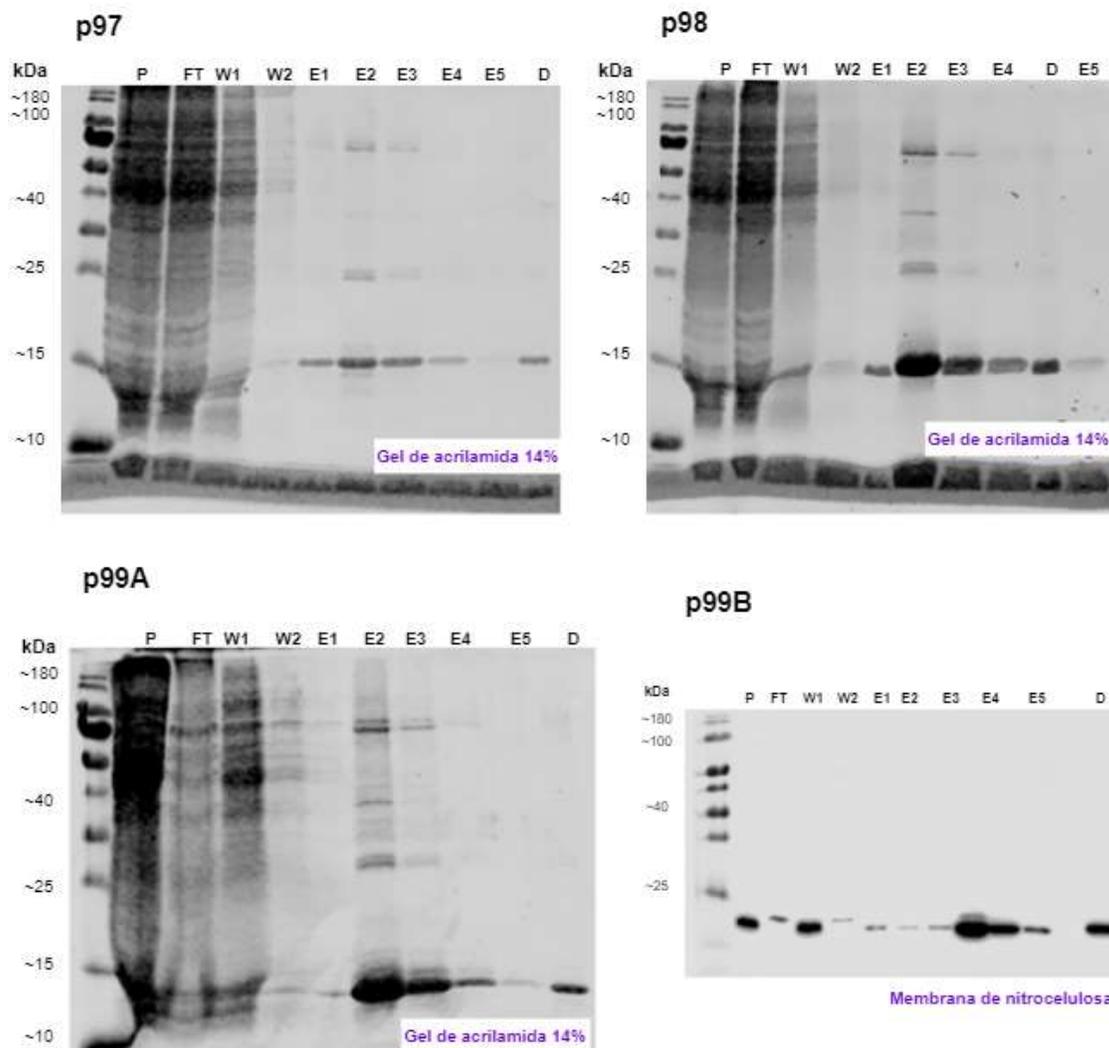


Figura 21. Visualización de la Purificación IMAC de los productos de EPSC de cada construcción. Tinción de Coomassie para las construcciones p97, p98 y p99 A. Western Blot anti-His (P99 B). P= Producto de la reacción EPSC, FT= Flow through: fracción que no se unió a la columna. W= Lavados. E= Eluciones. D= después de los procedimientos de desalado/cambio de tampón para la digestión enzimática por columnas PD-10.

Los rendimientos de la reacción EPSC de 200 μ l para cada construcción después de los procedimientos de desalado (Fracción D) se presentan a continuación:

p97: 0.274 mg/ml

p98: 0.484 mg/ml

p99: 0.512 mg/ml

En las imágenes anteriores se observa que para el caso de las 3 construcciones la reacción de EPSC se llevó a cabo con éxito y se obtuvo el péptido deseado a partir de las construcciones de ADN (**Figura 21**). Asimismo, se aprecia el progreso del

proceso de purificación en los geles teñidos con azul de Coomassie y se confirma la presencia de la construcción de interés en el WB anti His (**Figura 21 p99B**).

Para el caso de la construcción p97 se observó que en las eluciones se detectó mucho menos péptido en comparación a las fracciones E de p98 y p99 (**Figura 21**). Estas dos últimas tienen un resultado similar, mostrando la elución de una mayor cantidad de construcción en la segunda elución. Por la intensidad de las líneas que se observan en los geles, se obtuvo una cantidad de p98 y p99 similar de las fracciones E en conjunto. En cuanto al rendimiento final, posterior al proceso de desalado, se observa un mejor rendimiento en el caso de la construcción p99 ya que la línea en el carril D es mucho más oscura que en los geles de otras construcciones, lo anterior se confirma con los resultados numéricos obtenidos donde se observa que se produce casi el doble de esta construcción que de p97.

Se probaron las enzimas trombina y enterocinasa con sus respectivas construcciones (p97 y p98 tienen un sitio de corte de enteroquinasa y p99 de trombina) y se evaluó la cinética de la reacción para determinar con cuál de las construcciones la reacción se lleva a cabo al 100% en la menor cantidad de tiempo. Las construcciones originales se escinden de manera que se separa la sección del péptido que contiene la Cdl, los enlazadores y la etiqueta de histidinas (construcción procesada: p97p, p98p, p99p) de la sección con la secuencia de GB1 y del sitio de corte enzimático (GB1).

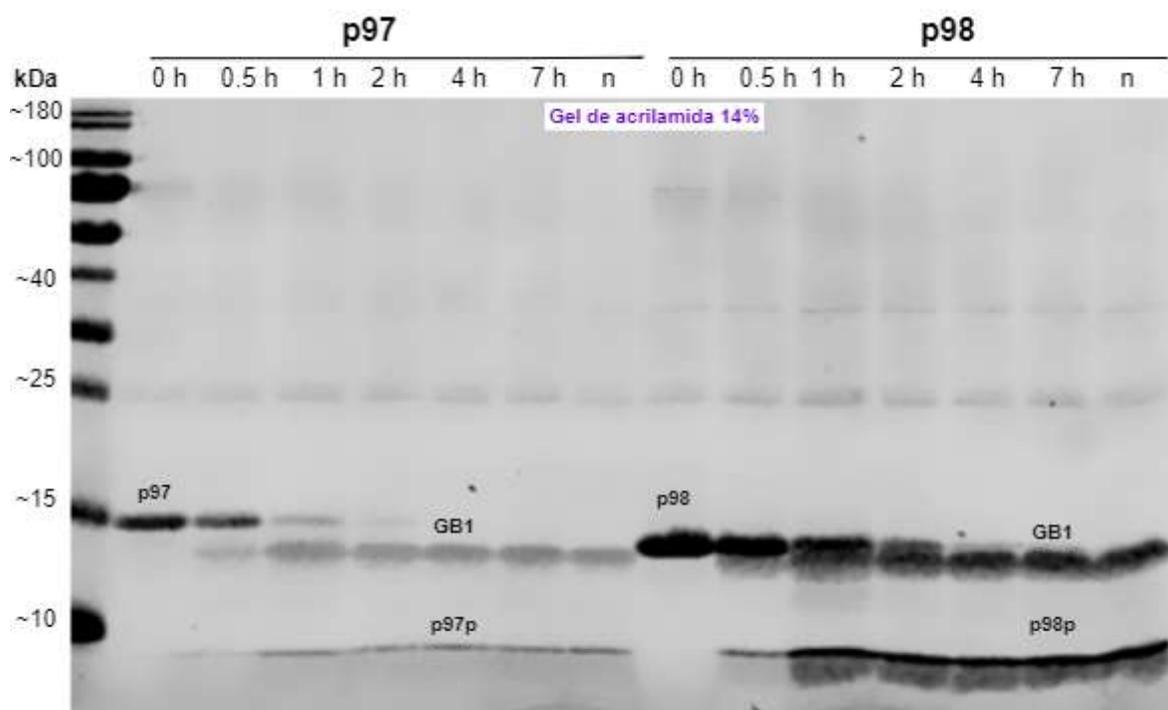


Figura 22. Digestión enzimática de p97 y p98 visualizada por tinción con azul de Coomassie. Se tomaron muestras a los tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4, 7 horas y n=al día siguiente.

Como se observa en el gel de p97, la escisión enzimática por enteroquinasa inició desde las 0.5 horas y la digestión del péptido terminó a las 4 horas, ya que en este carril no se observó la banda del péptido original. Para la construcción p98 se observó que las líneas fueron mucho más gruesas e intensas que las de p97, lo cual evidenció un mejor rendimiento de la reacción de EPSC. En este caso la reacción con trombina inició también desde las 0.5 horas y en el carril de la muestra que se recolectó a las 7 horas se observa la escisión completa. La fracción más grande es la de GB1 (antes de los sitios de corte de las enzimas) y la línea de menor peso molecular de hasta abajo del gel fue la Cdl con los enlazadores y la etiqueta de histidinas (p97p o p98p) (**Figura 22**).

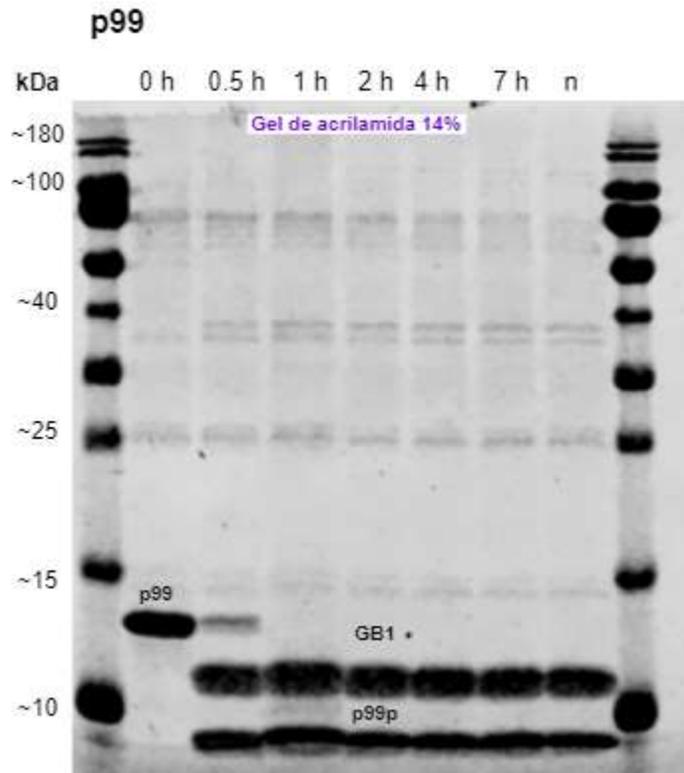


Figura 23. Digestión enzimática de p99 visualizada por tinción con azul de Coomassie en gel de acrilamida 14%. Se tomaron muestras a los tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4, 7 horas y n=al día siguiente.

La reacción enzimática de escisión de p99 con trombina fue muy rápida ya que, como se observa en el gel, la digestión del péptido comenzó inmediatamente y a las 0.5 horas se observó que queda sólo un poco de la construcción original, la reacción es completada en el transcurso de una hora lo cual determina que p99 es la construcción con la que se lleva a cabo la escisión más rápidamente. En estos geles se observó también la diferencia en cantidad de producto obtenido por la reacción de EPSC, p97 tuvo un rendimiento menor que p98 y p99. Al comparar las construcciones p98 y p99 se observó que se obtuvo mayor cantidad de producto en el caso de la reacción de síntesis de p99 sin células, ya que las líneas de la parte inferior del gel, que corresponden a la parte del péptido que contiene a la Cdl, fueron más gruesas y oscuras que las de p98 (**Figura 23**).

Después de la digestión enzimática se realizó otra purificación por afinidad para recuperar el fragmento del péptido que contiene la candidalislina, ya que el fragmento que contiene la etiqueta de histidinas es el mismo contiene la Cdl.

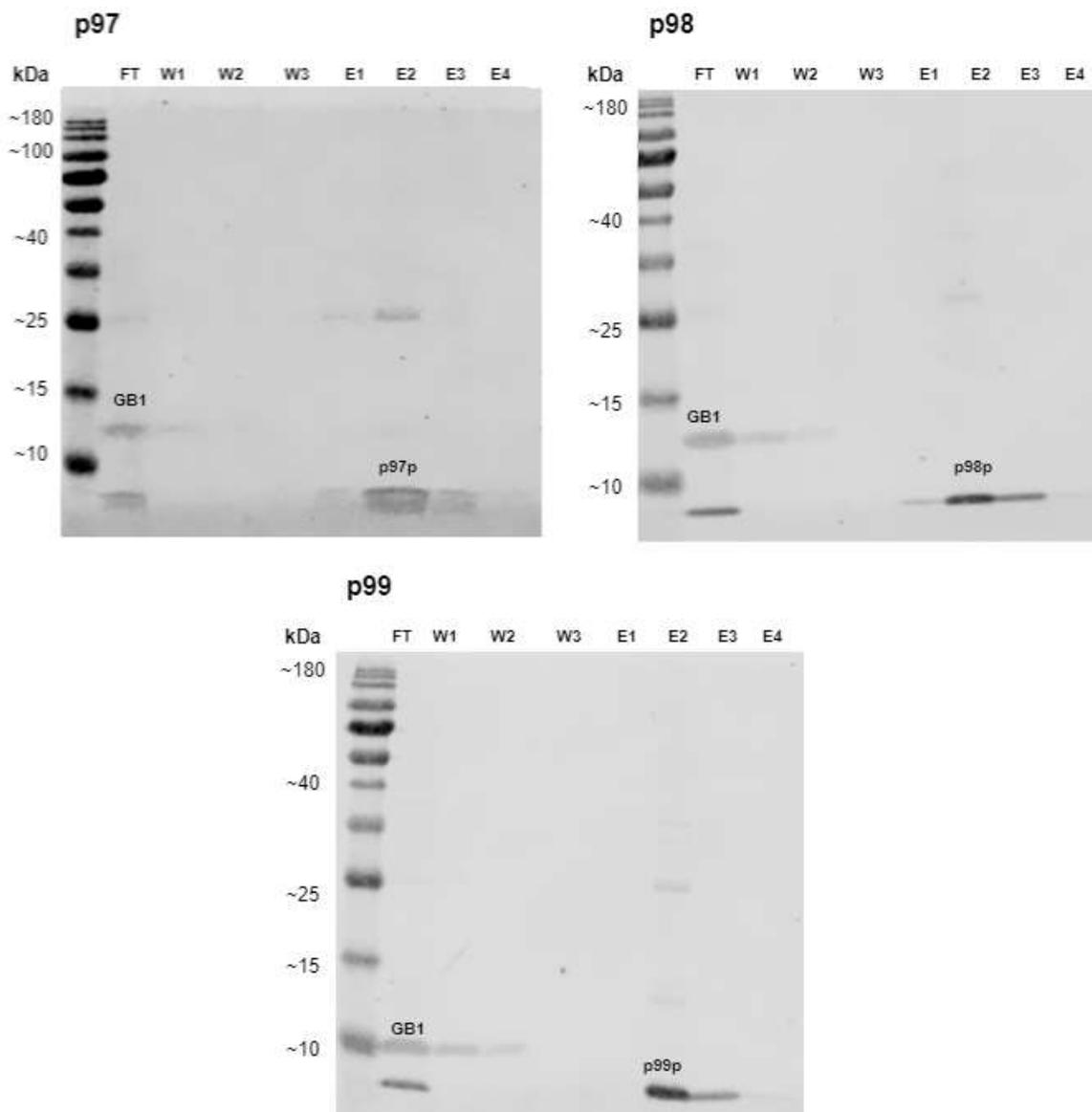


Figura 24. Visualización de la Purificación IMAC de los productos de la digestión enzimática. Tinción con azul de Coomassie. FT= Flow through: fracción que no se unió a la columna. W= Lavados. E= Eluciones.

Se logró de manera eficiente la separación de las construcciones procesadas de la sección GB1 después de la escisión enzimática. Se observó en los tres geles que

en los carriles FT, W1 y W2 fue cuando eluyó la sección GB1 y en las eluciones 2 y 3 fue donde eluyó la mayor parte de las construcciones procesadas. De nuevo se distinguió una menor intensidad en las líneas de la purificación de p97, lo cual es consistente con los resultados en procedimientos anteriores que evidencian una menor cantidad de péptido obtenido en comparación con p98 y p99. En el caso de las últimas dos construcciones, no se observó una diferencia en cuanto a la intensidad de las líneas para este procedimiento de purificación (**Figura 24**).

Se determinó el gasto económico que implicaría cada una de las enzimas como consideración para la elección de la mejor construcción.

Asumiendo una recuperación de 1 mg de producto (p99p) por cada ml de EPSC.

$$\begin{aligned}
 X_{\mu\text{mol p99p}} &= \left(\frac{1\mu\text{mol}}{10^{-6}\text{ mol}}\right) \left(\frac{1\text{ mol}}{5359.26\text{ g}}\right) \left(\frac{10^{-3}\text{ g}}{1\text{ mg}}\right) \left(\frac{1\text{mg}}{1\text{ml}}\right) (5\text{ ml cell free rxn}) \\
 &= 0.933\ \mu\text{mol p99p se obtiene por cada EPSC de 5 ml}
 \end{aligned}$$

La enzima que escinde a p99 es la trombina. La indicación del fabricante es la siguiente: 1 U es la cantidad de enzima requerida para escindir más del 90% de 100 µg de proteínas prueba (fusión de 38 kDa) en PBS a 22°C por 16 horas.

$$\begin{aligned}
 X_{\mu\text{mol proteina prueba (pp)}} &= \left(\frac{1\mu\text{mol}}{10^{-6}\text{ mol}}\right) \left(\frac{1\text{ mol}}{38\text{ g}}\right) \left(\frac{10^{-6}\text{ g}}{1\ \mu\text{g}}\right) (100\ \mu\text{g pp}) \\
 &= 2.63\ \mu\text{mol pp}
 \end{aligned}$$

1 U de trombina es requerida para escindir más del 90% de 2.63 µmol pp. Para escindir 0.933 µmol de p99p se requieren:

$$X\ U = \left(\frac{1\ U}{2.63\ \mu\text{mol pp}}\right) (0.933\ \mu\text{mol p99p}) = 0.355\ U\ \text{se necesitan por cada 5 ml EPSC}$$

El precio registrado de esta enzima de la marca utilizada GE Healthcare es de \$0.274 por U (\$137 USD/ 500 U)

0.355 U = \$0.0973 USD costo de trombina para cada EPSC de 5 ml.

Asumiendo una recuperación de 1 mg de producto (p98p) por cada ml de EPSC.

$$\begin{aligned}
 X_{\mu\text{mol p99p}} &= \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{10^{-6} \text{ mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{5302.21 \text{ g}} \right) \left(\frac{10^{-3} \text{ g}}{1 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \right) (5 \text{ ml cell free rxn}) \\
 &= 0.943 \mu\text{mol p98p se obtiene por cada EPSC de 5 ml}
 \end{aligned}$$

La enzima que escinde a p98 es enterocinasa. La indicación del fabricante es la siguiente: 1 U cantidad de enzima requerida para escindir 25 μg de un sustrato MBP-EK-paramiosina- ΔSal (42.5 kilodaltons Maltose Binding Protein) hasta completar el 95% en 16 horas a 25 °C en un volumen de reacción total de 25 μl .

$$\begin{aligned}
 X_{\mu\text{mol proteina prueba (pp)}} &= \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{10^{-6} \text{ mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{42.5 \text{ g}} \right) \left(\frac{10^{-6} \text{ g}}{1 \mu\text{g}} \right) (25 \mu\text{g pp}) \\
 &= 0.588 \mu\text{mol pp}
 \end{aligned}$$

1 U cantidad de enteroquinasa es requerida para escindir el 95% de 0.588 $\mu\text{mol pp}$. Para escindir 0.943 μmol de p98p se requieren:

$$X U = \left(\frac{1 U}{0.588 \mu\text{mol pp}} \right) (0.943 \mu\text{mol p99p}) = 1.60 U \text{ se necesitan por cada 5 ml EPSC}$$

El precio registrado de esta enzima de la marca utilizada NEB es de \$0.19 per U (\$487 USD/ 2560 U).

1.60 U = \$0.301 costo de enteroquinada por cada 5 ml de EPSC

El uso de la trombina implica un gasto menor de acuerdo a los resultados anteriores.

Después del procedimiento anterior, se escaló la reacción EPSC a 5 ml y se optó por la construcción p99 ya que es con la que se obtuvo una mayor cantidad de proteína de acuerdo a los geles de la primera purificación IMAC y la digestión enzimática. Adicionalmente, los resultados obtenidos indican que con esa construcción la digestión enzimática con trombina se completó más rápido e implica un menor precio, lo cual podría favorecer la experimentación de manera práctica y económica.

6.2 Optimización del protocolo de producción de muestras por EPSC para estudios estructurales por RMN.

6.2.1 Primer procedimiento

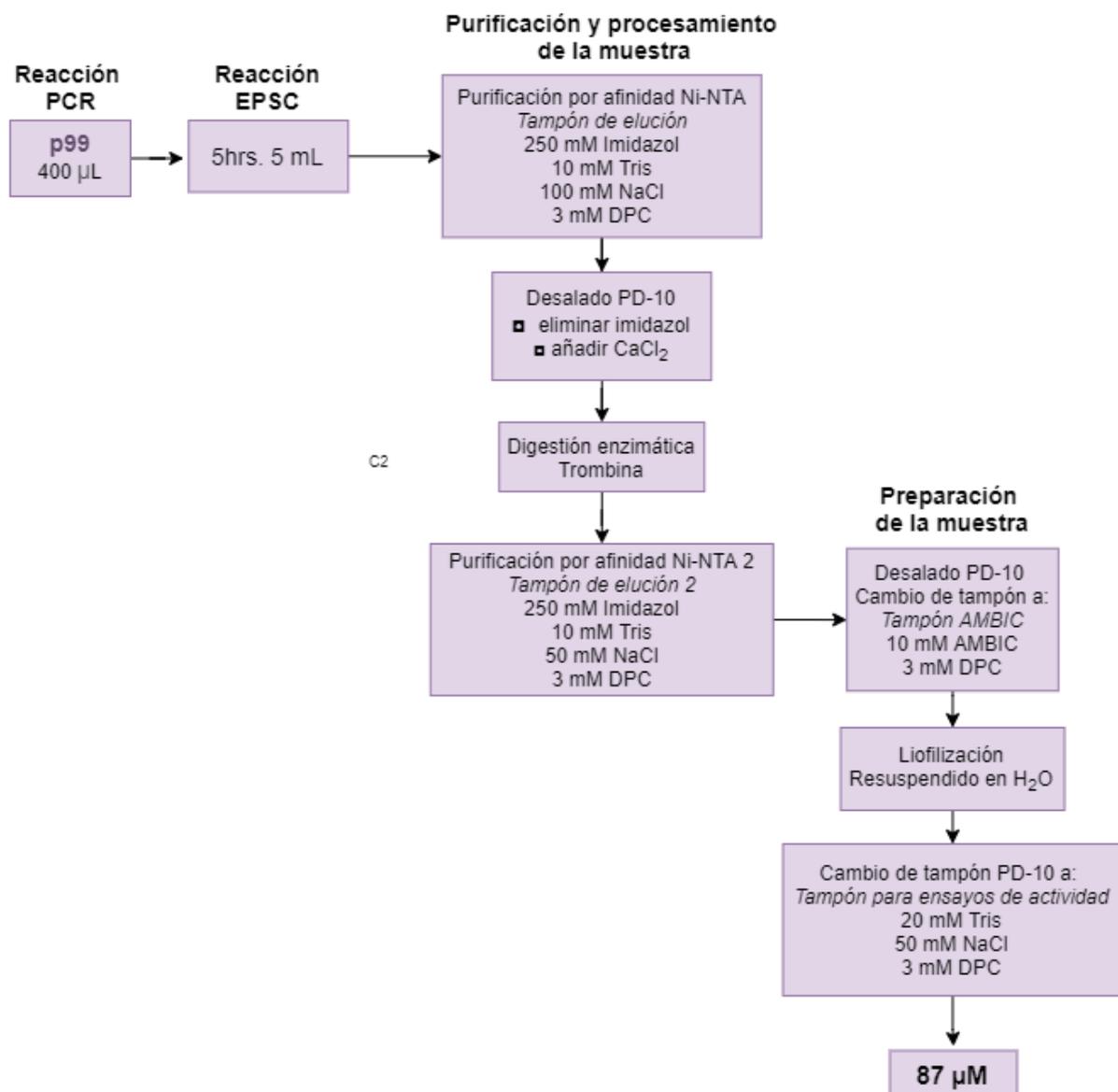


Figura 25. Procedimiento de purificación, procesamiento y preparación de la muestra. El procedimiento se llevó a cabo en 3 pasos de desalado o cambio de tampón y con un rendimiento final de 87 µM.

A partir de una reacción PCR de 400 µl de p99 se llevó a cabo la EPSC de 5 ml y la primera purificación por afinidad para recuperar el péptido obtenido.

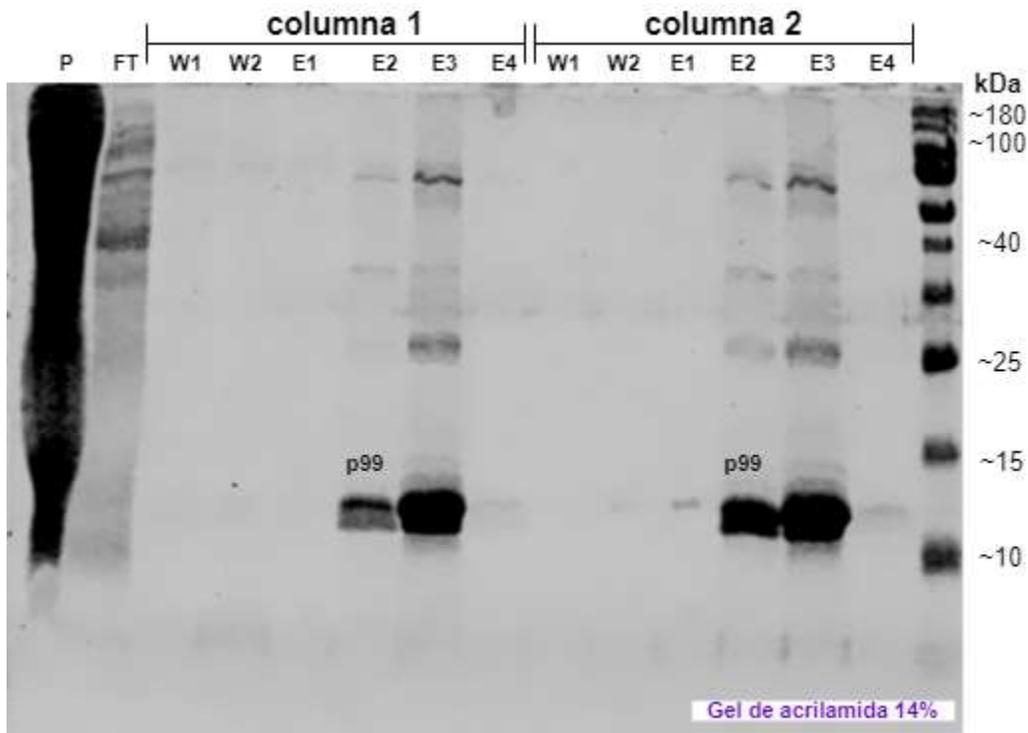


Figura 26. Visualización de la Purificación IMAC de p99, producto de una reacción EPSC de 5 ml cuya purificación se realizó en 2 columnas Ni-NTA de 2.5 ml cada una. Tinción Coomassie. P= Producto de la reacción EPSC, FT= Flow through: fracción que no se unió a la columna. W= Lavados. E= Eluciones.

Se observó en el gel la obtención exitosa de muestra suficiente del péptido p99 a partir de la EPSC de 5 ml así como el progreso de su purificación en cada una de las fracciones. Se observó la presencia del péptido expresado de interés principalmente en las eluciones 2 y 3 (**Figura 26**).

Se llevó a cabo un desalado a partir de columnas PD-10 y posteriormente la reacción de digestión enzimática de la construcción.

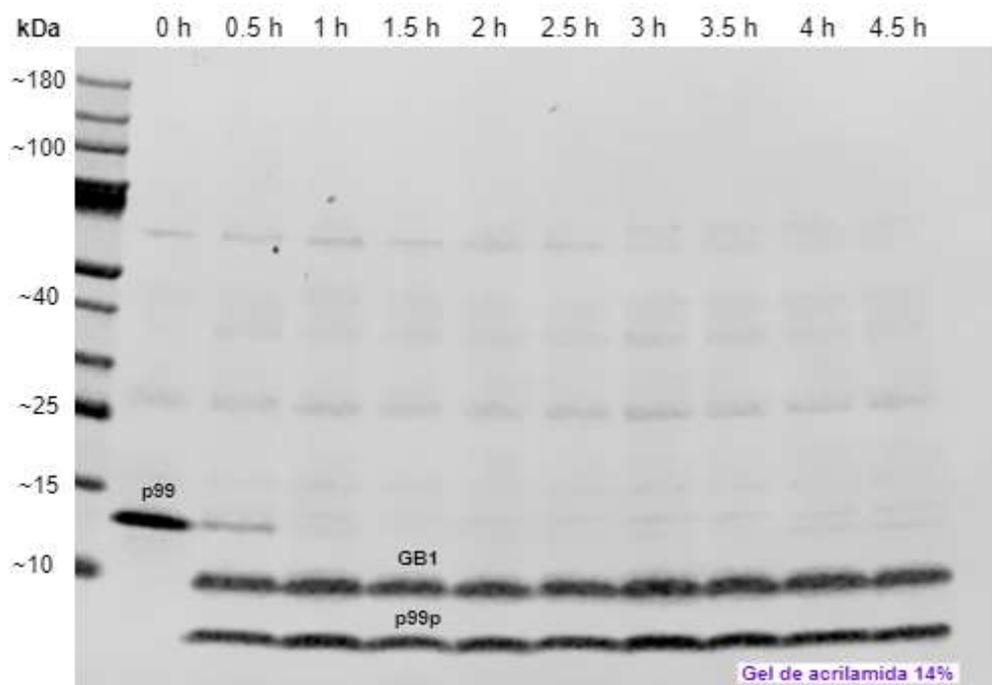


Figura 27. Digestión enzimática de p99 visualizada por tinción Coomassie en gel de acrilamida 14%. Se tomaron muestras a los tiempos: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y 4.5 horas.

Se observó en la imagen del gel de acrilamida que la reacción se completó desde la primera hora y de hecho tiene un progreso casi completo desde los 30 min (**Figura 27**). Se obtuvo de manera exitosa el fragmento p99p, que contiene la secuencia de Cdl, del péptido p99.

El péptido p99 es escindido en los fragmentos p99p y GB1, para recuperar la muestra de Cdl para estudios posteriores se realizó la segunda purificación por afinidad.

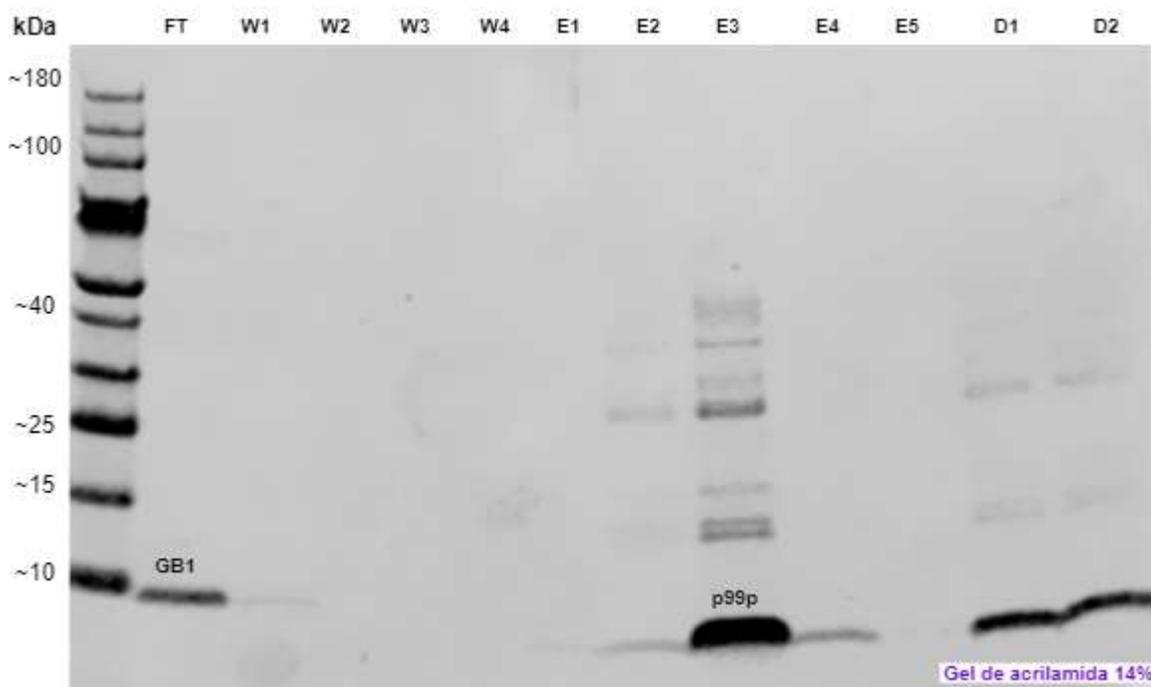


Figura 28. Visualización de la Purificación IMAC de los productos de la digestión enzimática. Tinción con azul de Coomassie. FT= Flow through: fracción que no se unió a la columna. W= Lavados. E= Eluciones. D= producto del cambio de tampón o desalado por PD-10.

Se visualizó la separación exitosa de los fragmentos obtenidos de la escisión enzimática de p99, se observa la presencia de GB1 en la fracción que no se unió a la columna y a p99p en las eluciones E2 a E4 (**Figura 28**). Después de la recuperación de p99p se realizó un cambio de tampón a tampón AMBIC, se liofilizó la muestra para la evaporación del AMBIC y se cambió de nuevo el tampón a uno apropiado para los experimentos posteriores que contiene 20 Mm Tris, 50 mM NaCl, 3 mM DPC (TEA).

Al cuantificar la muestra obtenida del procedimiento 1 se obtuvo una muestra con concentración 87 μ M.

6.2.2 Ensayo de actividad de p99p obtenido a partir del procedimiento 1 vs Candidalisina WT.

Se evaluó el daño celular por el ensayo LDH de p99p obtenido a partir del procedimiento anterior, que aún cuenta con DPC en el tampón TEA. Se realizaron

2 repeticiones de un experimento de 4 tratamientos en los cultivos celulares: p99p en TEA (15 μ M), TEA, Cdl (15 μ M) en TEA, H₂O.

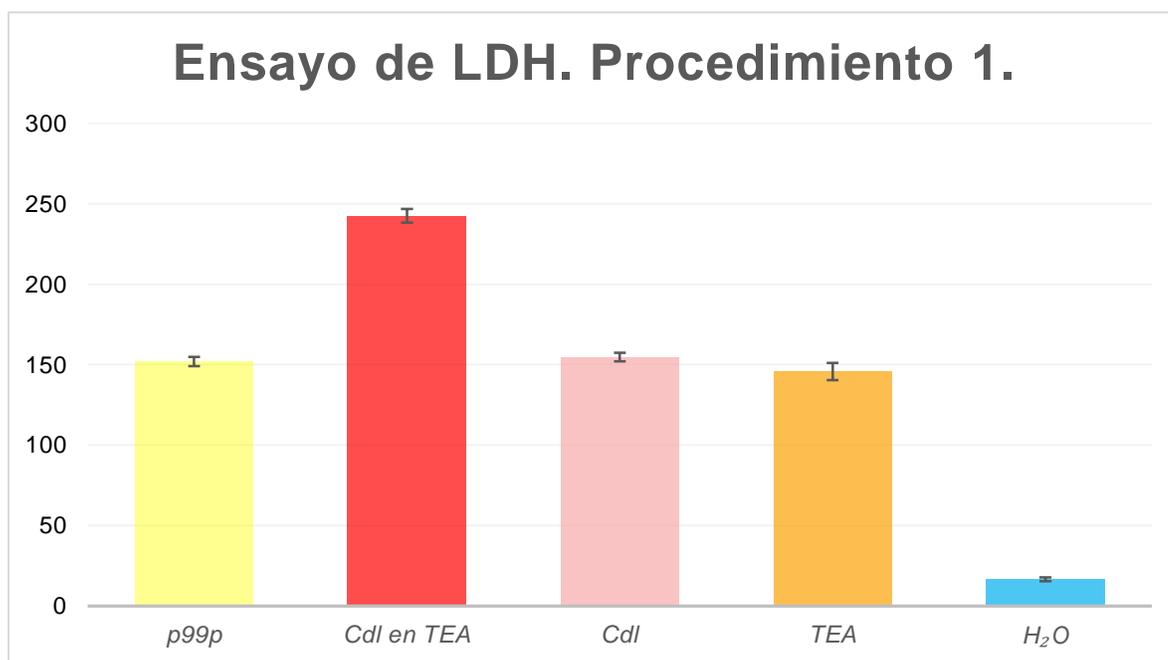


Figura 29. Evaluación de daño celular por Ensayo LDH de p99p del Procedimiento 1. Los resultados muestran el promedio de 2 determinaciones \pm E.E.

Se reporta una alta concentración de LDH en los tratamientos de las células con el TEA únicamente, la toxicidad de los compuestos presentes en él provoca ruido en el experimento y no fue posible determinar el daño celular de Cdl y p99p, ya que estas muestras también contienen TEA y éste provoca daño a los tejidos por sí solo (**Figura 29**).

6.2.3 Segundo procedimiento

Para evitar los contratiempos del procedimiento anterior se procedió con un diseño de purificación sin pasos de cambio de tampón y se optó por una dilución del imidazol para favorecer la reacción enzimática y reducir la pérdida de péptido por los desalados con columnas PD-10.

Para los ensayos de actividad se cambió el tampón a agua para descartar el daño celular por el vehículo como en los ensayos de actividad anteriores.

Al cuantificar la muestra obtenida del procedimiento 1 se obtuvo 211 μM .

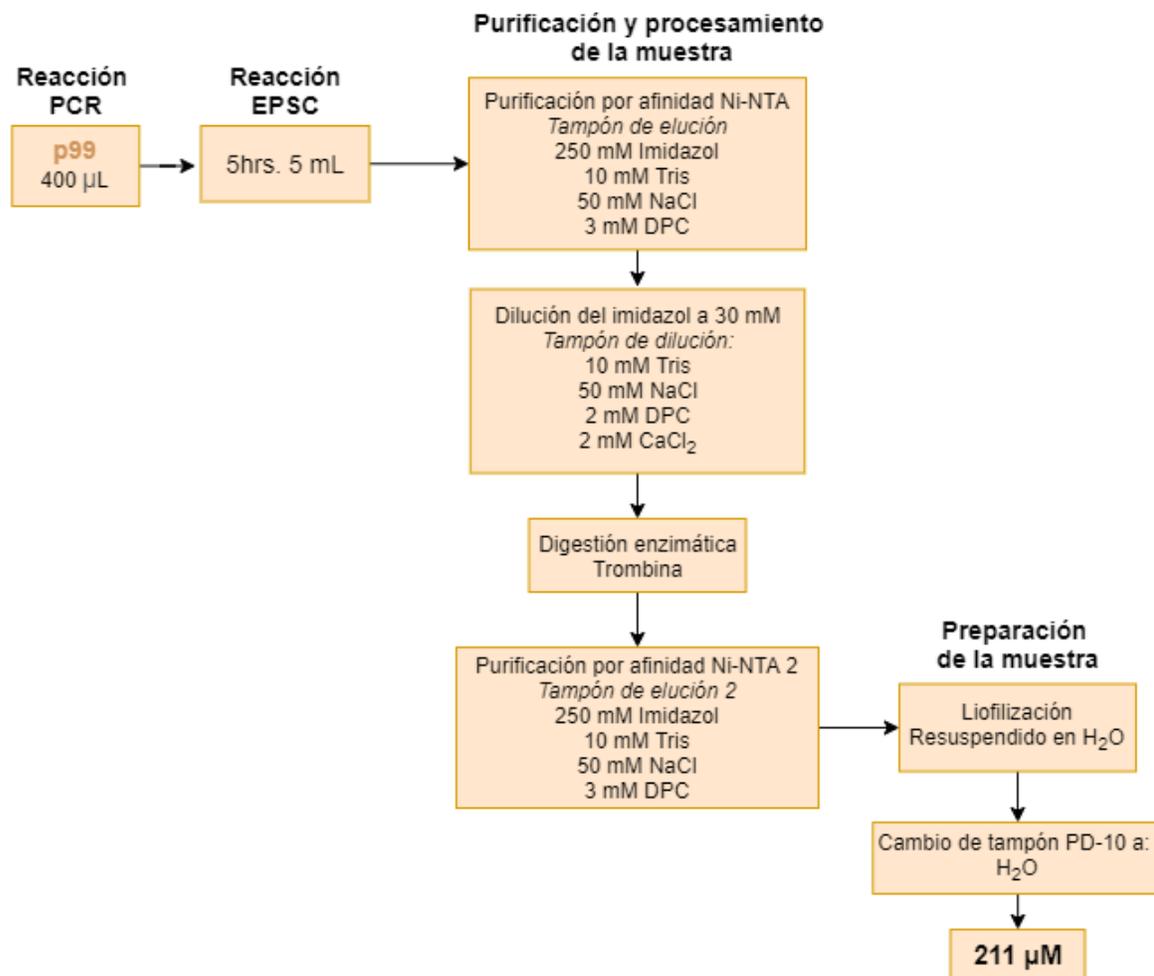


Figura 30. Procedimiento de purificación, procesamiento y preparación de la muestra optimizado.

6.3.4 Ensayo de actividad de p99p obtenido a partir del procedimiento 2 vs Candidalisina WT.

Para este ensayo se utilizó agua como vehículo de p99 y Candidalisina WT por lo que se incluyó un tratamiento con únicamente H₂O. Se realizó también un tratamiento con Tritón, un detergente ampliamente utilizado para la lisis celular. Este último tratamiento consiste en un control de 100% lisis celular ya que se libera la máxima cantidad de LDH, usando este resultado como referencia, se expresan los resultados del resto de los tratamientos en % lisis celular.

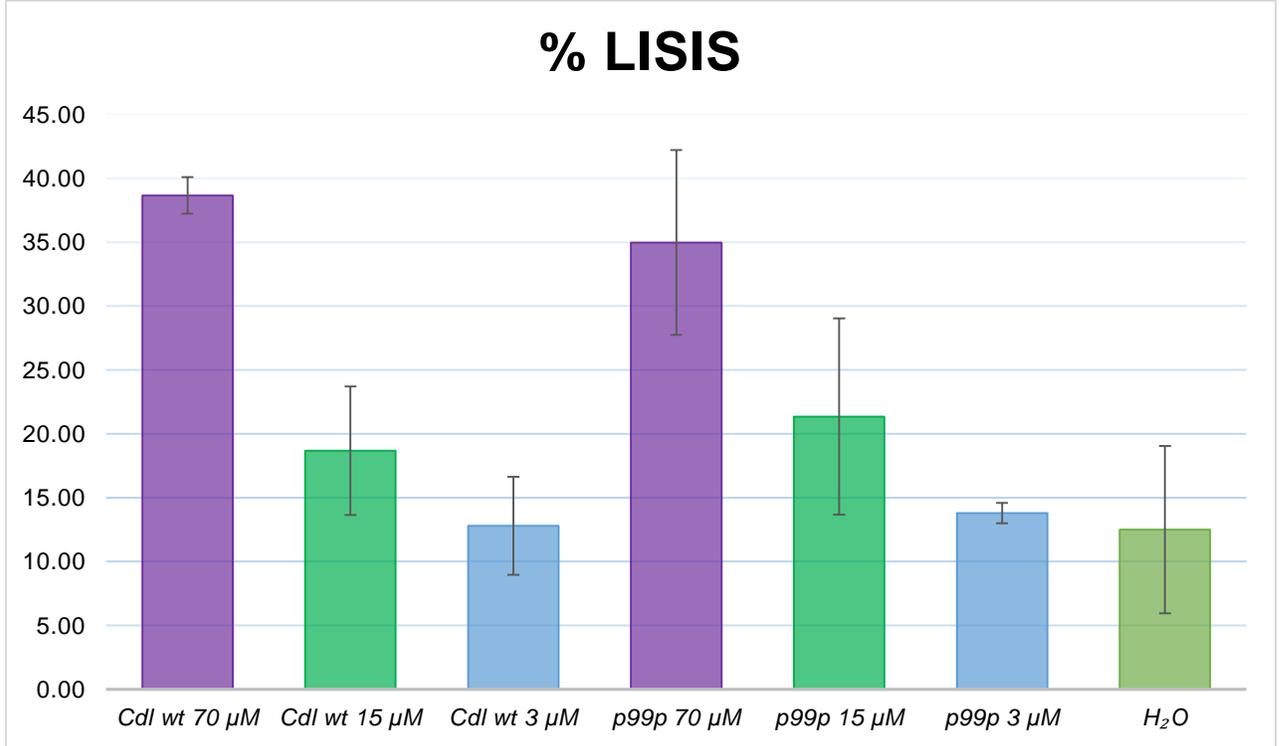


Figura 31. Evaluación de daño celular por Ensayo LDH de p99p del Procedimiento 2. Los resultados muestran el promedio de 3 determinaciones \pm E.E.

Se observa que el tratamiento con mayor lisis celular es el de la Cdl WT a 70 μ M seguido por p99p a la misma concentración. En la concentración de 15 μ M se observa una similitud en el daño celular provocado por Cdl y p99p mientras que en la menor concentración de 3 μ M se observa un daño mayor provocado por p99p comparado con la Cdl WT (**Figura 31**).

7. Discusión

C. albicans es uno de los hongos patógenos humanos más importantes, ya que provoca una amplia variedad de infecciones en millones de personas en el mundo. Éstas varían desde infecciones superficiales mucocutáneas hasta infecciones invasivas y diseminadas con alta mortalidad, principalmente en individuos inmunocomprometidos (Camilli et al., 2020). La candidiasis oral es la infección micótica más común de la cavidad oral en humanos y *C. albicans* representa más del 90% de los aislados clínicos (Colombo et al., 2013; L. Hu et al., 2019). La mucosa en la cavidad oral es el tejido más susceptible a una enfermedad sistémica adquirida por lo que es de extrema importancia el entendimiento de la interacción compleja entre *C. albicans* con el huésped en las superficies mucosas y los factores que determinan el estado comensal y patogénico del hongo (L. Hu et al., 2019).

C. albicans también se ha relacionado con una variedad de enfermedades inflamatorias, a las que anteriormente se se ha considerado incidental. Sin embargo, estudios recientes proporcionan perspectivas que sugieren la capacidad de *C. albicans* de potenciar la patología en estos casos. El potencial de la infección para contribuir a varias comorbilidades se hace cada vez más evidente conforme aumentan los conocimientos respecto a este hongo. La inducción de la señalización mediada por la IL-17, la ruptura de las barreras epiteliales y la activación de factores asociados al cáncer son los ejemplos más convincentes de su capacidad para contribuir a la enfermedad (Ho et al., 2021).

En el 2016, Moyes et al. descubrieron la Cdl, la primera toxina citolítica peptídica que ha sido identificada en cualquier patógeno fúngico humano. Su identificación y estudio por el Laboratorio Naglik en King's College London se reconoce como un avance pionero en el campo de la microbiología con gran influencia en temas de salud pública e investigación. La Cdl es secretada por la forma patogénica de *C. albicans* y facilita la patogenicidad al actuar como un factor de virulencia clásico, pero también contribuye a las respuestas inmunitarias antifúngicas.

Esta nueva toxina fue identificada como la clave que representa el enlace del daño celular con la formación de las hifas. La hipótesis actual es que Cdl daña la

membrana de células epiteliales directamente por intercalación, formación de poros y permeabilización, provocando la liberación de constituyentes del citoplasma. Se ha determinado que la toxina es tanto un activador de caspasa-1 dependiente del inflammasoma NLRP3 via eflujo de potasio, como conductora clave de la citólisis independiente del inflammasoma de macrófagos y células dendríticas. Asimismo, se ha identificado como inductora de alarminas y PA clave para la defensa antifúngica. Además de que tiene un papel crítico en la inflamación, reclutamiento de neutrófilos y patología en candidiasis vulvovaginal (Ho et al., 2020; Kasper et al., 2018).

Es de gran importancia el estudio de la Cdl por biología estructural ya que esto nos permite obtener más información con resolución atómica para comprender sus funciones y su comportamiento con la finalidad de que en un futuro cercano se desarrollen vacunas o inmunoterapias para combatir las infecciones por las *Candida* spp.

Debido a que la Cdl tiene funciones muy importantes durante la infección por *C. albicans*, existe interés en su estudio mediante biología estructural por el grupo del Dr. Naglik. La capacidad de dilucidar la estructura y la función de las moléculas biológicas tiene gran importancia en diversos ámbitos. Principalmente en la posibilidad de abordar problemas de salud pública como lo es la candidiasis y, en este caso, la identificación de agentes terapéuticos o mecanismos para inactivar la Cdl.

El descubrimiento de esta toxina plantea múltiples preguntas respecto a la patogenicidad de los hongos. Por lo tanto, es fundamental descifrar la estructura del péptido ya que ello podría ayudar a elucidar su función y el papel que tiene en la infección (Boodhun, 2018).

La finalidad del presente proyecto fue la optimización del proceso de obtención de muestras apropiadas para RMN mediante la expresión recombinante de la Cdl con el etiquetado isotópico ^{15}N y ^{13}C por el sistema de EPSC, del inglés cell-free. Además de determinar la actividad biológica de ésta Cdl resultante y compararla con la Cdl WT.

Anterior a este trabajo de tesis, se intentó en el laboratorio Naglik la expresión de Cdl tanto en bacteria (*E. coli*) como en levadura (*P. pastoris*) sin éxito debido a su toxicidad. Se han publicado anteriormente bajos rendimientos en la expresión de proteínas recombinantes en organismos vivos, particularmente de toxinas ya que las células frecuentemente inhiben su producción o inactivan su toxicidad para su supervivencia (Rosano & Ceccarelli, 2014; Saida et al., 2006). El sistema de EPSC tiene muchas ventajas ya que elimina esta inconveniencia junto con muchas otras limitaciones asociadas a la viabilidad celular, además de que permite mayor control de la reacción y una purificación más sencilla. Asimismo, con este sistema se producen directamente proteínas marcadas para la posterior determinación estructural por RMN (He et al., 2011; Wilding et al., 2018).

El método de amplificación por PCR utilizado para generar un modelo de material genético insensible a nucleasas fue importante, ya que el uso de las cadenas cortas complementarias para inducir la ciclación del ADN da como resultado un modelo pseudocíclico con rendimientos en la reacción EPSC mucho mejores que con la utilización de ADN plasmídico en experimentos realizados en el laboratorio por el Dr. Kichik. El ADN pseudocíclico es más estable ya que se encuentra protegido de la degradación por enzimas presentes en el extracto celular. Debido a esto, las construcciones creadas con la secuencia de Cdl fueron amplificadas por este método para su uso posterior como modelo de material genético de EPSC.

Es posible que la diferencia en cantidad de producto de la reacción EPSC de acuerdo al volumen de mezcla de reacción se atribuya a la diferencia en oxigenación de las reacciones. Al tener un menor volumen dentro de un pozo comparado a otro, el pozo con menor contenido tendrá mayor cantidad de espacio vacío al ser tapado, por lo que la oxigenación en el transcurso de la reacción es mayor que la del pozo que se encuentra más lleno de mezcla de reacción. El oxígeno, al estar implicado en la mayoría de los procesos bioquímicos aeróbicos, afecta las funciones celulares como la síntesis de proteínas. Específicamente se ha demostrado en estudios de análisis de la influencia de la concentración de oxígeno en el EPSC, que la reacción muestra un alto rendimiento a las condiciones atmosféricas de oxígeno y con el

aumento de la concentración de éste, dentro del rango 10% a 70%, la tasa de síntesis de proteínas aumenta también (Lin et al., 2020).

Se hicieron pruebas para determinar si era favorable el almacenamiento a -20°C por la noche del producto obtenido de la reacción EPSC. Lo anterior era conveniente experimentalmente ya que el tiempo de incubación para la EPSC es de 5 horas y el proceso de purificación inmediato a la EPSC requiere de 3 a 4 horas adicionales, por lo que se decidió verificar si el almacenamiento a -20° del producto por la noche representaba una opción para la optimización del proceso de preparación de muestras para RMN. El resultado arrojó claramente que existe una agregación de p99, ya que se observa la formación de oligómeros de alto peso molecular que se retienen en la parte superior del gel. Es posible que al congelar la muestra y disminuir la solubilidad de la mezcla de reacción p99 junto con la gran cantidad de proteínas presentes en el extracto celular, éstas tienden a agregarse irreversiblemente y precipitar en el ambiente de reacción de EPSC. Adicionalmente, ha sido demostrada la tendencia de Cdl a formar agregados de alto peso molecular (Apéndice A). Por lo anterior, es posible que p99 tienda a agregarse en el ambiente de reacción de EPSC ya que aún no se ha cambiado a un medio que incluya un componente que permita la dispersión del péptido por su intercalación a modelos de membrana celular, como lo es el detergente DPC que se incluye a partir de la purificación de p99.

Se procedió con las condiciones de volumen de reacción y almacenamiento optimizadas a realizar la EPSC son las 3 construcciones diseñadas para el proyecto. Una diferencia sustancial entre ellas es su longitud, ya que la construcción p97 mide 560 pb mientras que p98 y p99 mide 566 pb. Tomando en cuenta la obstrucción estérica provocada por la micela que representa el modelo de membrana celular que se utiliza para evitar la agregación de la Cdl en los experimentos, se agregaron enlazadores a las construcciones con la finalidad de dar longitud al péptido y que el sitio de escisión enzimática sea accesible para las enzimas respectivas. Las secuencias de las construcciones son muy similares, además de los sitios de corte enzimático para enzimas diferentes. La única diferencia es que las construcciones

p98 y p99 tienen un enlazador más largo de 30 pb que el de p97 de 15 pb (Anexo A). A lo anterior se atribuyen las diferencias en las reacciones EPSC que se observan entre las construcciones. Al ser más corto, es posible que el péptido p97 sea expresado más rápidamente, lo cual llevaría a una agregación de los péptidos en la sección de Cdl, lo cual impide que se exprese más. Otra posibilidad es que la longitud del mRNA que se transcribe a partir del ADN adicionado a la reacción EPSC sea de tamaño desfavorable para que se realice la traducción simultánea. Es probable que para este péptido no haya espacio para que los ribosomas se unan y se sintetice la proteína de manera sincrónica a la transcripción, lo cual afectaría la velocidad en la que se sintetiza el péptido más corto en comparación con los demás, que mostraron una mayor producción de péptido en la reacción. Por los resultados obtenidos en esta sección, se establece que las 3 construcciones se expresan exitosamente con el método y tanto p98 como p99 son construcciones convenientes para obtener la mayor cantidad de péptido posible. En las purificaciones se observa la presencia de las construcciones en los carriles de FT y de los lavados lo cual representa una pérdida de producto por una retención ineficaz en la columna de las construcciones por su etiqueta de polihistidinas, lo anterior puede atribuirse a error humano en la preparación de la columna, ya que en los procedimientos posteriores no se observó esta incidencia.

Es necesaria la escisión del péptido recuperado del procedimiento anterior (p99) para obtener la construcción procesada sin la secuencia de GB1 (p99p). En cuanto a la reacción enzimática, se observó claramente en nuestras condiciones de experimentación que el uso de trombina tiene un resultado más conveniente a la enterocinasa ya que la reacción llega a completarse en un corto periodo de tiempo, lo cual permite realizar la recuperación de p99p el mismo día y acorta el proceso de producción de la muestra. El uso de trombina para la preparación de muestras para RMN en un futuro resulta favorable en el aspecto económico, ya que el precio registrado de la trombina utilizada de la marca GE Healthcare es de \$0.274 USD por U. Tomando en cuenta que se requiere 1 U para escindir 26.31 μmol de muestra, se requiere de 0.355 U para la digestión del producto de una reacción EPSC de 5 ml de p99p (aproximadamente 0.933 μmol tomando en cuenta un rendimiento de

1 mg/ml de reacción), que resulta en un total de al menos \$0.096 USD. Este precio resulta considerablemente menor al de la enterocinasa que resulta en \$0.301 USD por cada EPSC de 5 ml, ya que se necesitan 1.59 U de \$0.19 USD cada una.

Para la optimización del proceso de purificación y preparación de la muestra se usó la construcción p99 ya que además de que se obtiene mejor rendimiento tiene el sitio de corte de trombina. Se escaló la reacción EPSC a 5 ml pero se obtuvo al final una cantidad de 87 μ M de p99p en 100 μ l, lo cual no resultó suficiente para preparar los tratamientos para el experimento en cultivo celular.

En la primera purificación del producto de EPSC se observa un buen progreso de la purificación, sin pérdidas de p99 en los carriles del gel de FT y de los lavados (**Figura 24**). Lo cual indica una correcta retención del péptido en la columna por la etiqueta de histidinas. Se piensa que la pérdida de producto sucede a partir del primer paso de desalado que se realiza posterior a esta purificación. El cambio de solución reguladora de pH es importante en este paso del procedimiento, ya que es necesario crear un ambiente óptimo para la reacción enzimática, lo cual requiere la presencia de CaCl_2 y la exclusión del imidazol en alta concentración que fue requerido para la elución del péptido de la columna IMAC. Sin embargo, las columnas PD-10 utilizadas reportan un rango de recuperación del 70 al 90% por lo que es muy probable que en este paso se pierda parte del p99 obtenido en EPSC.

En las figuras de los procedimientos de purificación y digestión enzimática se observa la presencia de proteínas de peso molecular más alto a las construcciones, de aproximadamente de 25-35 y 70 kDa, que también eluyen de la columna IMAC. Un problema con el uso de etiquetas de afinidad de polihistidina es la unión no específica de proteínas sin etiquetar. Aunque la histidina ocurre con poca frecuencia (el 2% de todos los residuos de proteínas son histidina), algunas proteínas celulares contienen dos o más residuos de histidina adyacentes. Estas proteínas tienen una afinidad por la matriz IMAC y pueden combinarse con la proteína de interés, lo que resulta en una contaminación significativa del producto final (Bornhorst & Falke, 2000).

Para evitar esto, se hace un lavado con imidazol en baja concentración antes de la elución. La baja concentración de imidazol (10 mM) del tampón de lavado no eluirá las construcciones etiquetadas, pero eluye a las proteínas que no están etiquetadas pero que se unen al níquel de forma inespecífica. Después de esto, la elución se realiza con una mayor concentración de imidazol (250 mM) que eluye a las construcciones con Cdl. Es posible que las líneas de mayores pesos moleculares que se observan sean agregados de las construcciones que también se retienen en la columna y eluyen después ya que tienen la etiqueta de polihistidinas. Sin embargo, esto es poco probable, ya que se visualiza la presencia de los péptidos de alto peso molecular en el gel Coomassie p99A y estos no son identificados mediante un Western Blot utilizando el anticuerpo anti-His en p99B (**Figura 19**). El hecho de que los anticuerpos utilizados en el Western Blot no se unen a estas proteínas, sugiere que no cuentan con la etiqueta de polihistidinas y más bien se trata de proteínas con unión no específica a la columna o que se unen con baja afinidad a la Cdl.

En los trabajos posteriores a este proyecto de tesis se implementaron lavados con un gradiente de imidazol de 10 a 30 mM para las purificaciones de las construcciones (resultados no mostrados), lo cual resulta en una recuperación de p99 con un 95% de pureza.

Después de la digestión enzimática de p99, se realiza otra purificación por afinidad con la finalidad de recuperar p99p: La sección de la construcción en donde se encuentra la secuencia de la Cdl. Debido a que la etiqueta de polihistidinas se encuentra después del sitio de corte en la secuencia de las construcciones, el producto de la reacción que contiene a la Cdl se retiene en la columna (**Figura 26**).

En estas condiciones existe una elevada concentración de imidazol en el solución reguladora. Por lo anterior es necesario retirar las sales presentes en el vehículo, ya que posteriormente se realizará un procedimiento de liofilización para concentrar esta muestra y una alta cantidad de sales en el vehículo es desfavorable para ensayos celulares, ya que se deben excluir este tipo de interferencias en los experimentos. Se utilizaron nuevamente las columnas PD-10 para cambiar a la

solución reguladora con bicarbonato de amonio (AMBIC). Esta sal es volátil, lo cual facilita su eliminación posterior en la liofilización.

Es importante la liofilización para concentrar la muestra de p99 obtenida y posteriormente preparar los tratamientos de ésta a diferentes concentraciones para su comparación con la Cdl WT en cultivos celulares. Contar con preparaciones de p99 a concentraciones iguales a las de Cdl permite que los tratamientos se realicen con el mismo volumen para que sean lo más comparables posibles. Después de la liofilización, se llevó a cabo otro cambio de tampón ya que se consideró necesaria la adición de DPC a la muestra con la finalidad de evitar la agregación de Cdl.

En este primer procedimiento se llevaron a cabo 3 pasos de desalado con columnas PD-10, cada una con una recuperación del 70-90% del producto, lo cual implicó una pérdida significativa de péptido que explica el bajo rendimiento final de 87 μ M en 3.5 ml. Se recolectó más muestra de p99p a partir del mismo procedimiento para obtener la concentración necesaria para realizar los ensayos de actividad.

Los resultados obtenidos del ensayo de LDH indican que el tampón de la muestra (tampón para ensayos de actividad), sin la presencia de p99p o Cdl, provoca daño celular (Fig. 29). En los ensayos en los que se evaluaron las muestras obtenidas por este procedimiento 1, no se asocia el daño celular exclusivamente a las toxinas, por lo que su citotoxicidad no es comparable.

Es posible que el DPC presente en el vehículo haya provocado la liberación de LDH. Los detergentes son moléculas que permiten la modificación de interacciones hidrofóbicas y/o hidrófilicas entre las moléculas de muestras biológicas. Los detergentes tienen varias funciones en la investigación, como son la lisis de células, solubilización de proteínas de membrana y lípidos, entre otras. Las moléculas de detergentes permiten la dispersión de compuestos hidrofóbicos insolubles en agua ya que, al igual que los componentes de membranas celulares, tienen propiedades de asociación hidrofóbica por sus grupos no polares y son solubles en agua. Es por lo anterior que éstos componentes son muy útiles para varias aplicaciones incluyendo la extracción y solubilización de proteínas de membrana (McCaslin, 2013).

El DPC es un detergente zwitteriónico, es decir, que cuenta con grupos con carga positiva y negativa en su cabeza polar que resultan en una carga neta de cero. Este detergente es el más utilizado para la determinación de la estructura de las proteínas de membrana mediante RMN (Information, 2021; Kurauskas et al., 2018).

La fuerza de acción de los detergentes zwitteriónicos se considera intermedia entre los detergentes iónicos y no iónicos, compartiendo características con ambos tipos. Rompen eficazmente algunas interacciones entre residuos dentro de la proteína, manteniendo el estado nativo y la carga de las proteínas individuales. Por lo general, las concentraciones moderadas de estos detergentes comprometen la integridad de las membranas celulares, facilitando así la lisis de las células y la extracción de proteínas solubles, a menudo en forma nativa. Con cantidades crecientes de detergentes, las membranas pasan por varias etapas de solubilización. Con una proporción molar detergente:fosfolípidos de membrana de 0.1-1:1, la bicapa lipídica suele permanecer intacta, pero se produce una extracción selectiva de algunas proteínas de membrana. Al aumentar la cantidad de detergente se produce la solubilización de la bicapa lipídica, dando lugar a micelas mixtas fosfolípido-detergente, micelas detergente-proteína y micelas fosfolípido-detergente-proteína (Scientific, 2021).

Las interacciones del DPC con la membrana celular provocaron la solubilización de ésta en los cultivos celulares y posiblemente la liberación de componentes celulares como la LDH en el ensayo realizado. Por lo anterior se decidió agregar DPC a la solución reguladora de pH en este paso para asegurar la dispersión de Cdl y evitar su agregación. Sin embargo, tomando en cuenta que el tratamiento se aplicará en células, ya no es necesario tener un modelo de membrana celular ya que lo esperado es que p99p y Cdl presenten su actividad en las células del experimento, idealmente sin interacciones con otras moléculas como las del detergente. En otros experimentos realizados en el laboratorio se había utilizado agua como vehículo para evaluar la toxicidad de Cdl, por lo que se optó por cambiar la solución reguladora de la muestra p99p a agua en el procedimiento 2.

En el segundo procedimiento de preparación de muestra se obtuvo casi el triple de concentración 211 μM de p99p en 160 μl gracias a la omisión de los pasos de desalado posteriores a las purificaciones. La dilución del imidazol resulto efectiva para la actividad enzimática de escisión. Se decidió liofilizar la muestra para concentrarla antes de cambiar el tampón a agua para los ensayos de actividad, lo cual se considera que también tuvo relación con una pérdida menor del producto.

El hecho de que una toxina que fue sintetizada para su estudio por RMN tenga la misma actividad que la toxina WT tiene importancia, ya que se puede asumir que la toxina sintetizada presenta características similares a la Cdl secretada por las hifas de *C. albicans*. La elucidación de la estructura de Cdl es de gran importancia para comprender su funcionamiento. Datos preliminares indican que su estructura predominantemente alfa helical tiende a dañar a las células epiteliales mediante su intercalación y formación de poros, provocando permeabilización y la liberación de componentes celulares. Por lo anterior, es interesante observar el mismo comportamiento en p99p lo cual podría asegurar una determinación de su estructura y dinámica mediante RMN en relación a Cdl WT.

Finalmente, es relevante mencionar que el procedimiento desarrollado y optimizado en este trabajo de tesis ya es utilizado actualmente para el estudio por RMN de Cdl en el laboratorio Naglik en King's College London y tiene el potencial de sentar las bases para la obtención y caracterización de otro tipo de toxinas peptídicas que se encuentran en la naturaleza.

8. Conclusiones

- Se desarrolló y optimizó el proceso de síntesis recombinante de Cdl marcada isotópicamente con ^{15}N y ^{13}C con la construcción p99.
- El péptido p99p obtenido es tóxico para las células.
- El daño celular provocado es similar al de la Candidalisina WT.
- Mediante este método se produce exitosamente muestra para su estudio por RMN.

9. Perspectivas

Este trabajo fue realizado en King's College London como parte de una estancia corta de investigación y capacitación, la longitud de mi estancia en Londres fue una limitante para mi participación en este proyecto y considero que hay varias perspectivas de trabajos futuros relacionados a la presente tesis.

En primera instancia, aplicar el proceso optimizado en este trabajo para obtener muestras de Cdl para su estudio con espectros de RMN. Utilizar los datos obtenidos para la determinación y validación de su estructura y posteriormente interpretar las relaciones de la estructura con su función e interacciones. Esta información permitirá el desarrollo de mecanismos para su inactivación lo cual es muy importante considerando el hecho de que Cdl no interactúa con algún receptor blanco sino que se inserta directamente a la membrana para causar daño.

Adicionalmente, el proceso realizado en esta tesis se puede aplicar para generar muestras de otras toxinas para su estudio por RMN. Las toxinas que forman poros son un factor de virulencia crucial de una gran variedad de organismos incluyendo bacterias patógenas lo cual hace de estas moléculas un excelente blanco terapéutico, reducir su producción o neutralizar su actividad es esencial para disminuir la patogenicidad (H. Hu et al., 2021).

Una alternativa muy interesante sería la modificación de Cdl para su uso como agente terapéutico. Como se menciona en el presente trabajo respecto a Cdl, las toxinas son compuestos que pueden ser dañinos en exceso, pero pueden ser beneficiosos en dosis muy pequeñas, ya que estimulan mecanismos de defensa contra los patógenos en las células. La determinación de la estructura es un procedimiento clave en el desarrollo de terapias a base de toxinas, una vez interpretada la información de su dinámica y funciones, se pueden generar candidatos terapéuticos en base a esta información, ya sea modificando su selectividad, su actividad o creando análogos que imiten su mecanismo de acción (Norton, 2018) .

Varias características de Cdl, como su hidrofobicidad, su estructura de hélice y momento hidrofóbico, han sido identificados como determinantes clave

estructurales y fisicoquímicos de actividad antimicrobiana (Torres et al., 2018). Todos los organismos tenemos como mecanismo de defensa contra infecciones la producción de péptidos con estas características llamados PAs. Estos péptidos, como Cdl, tienen una actividad dañina no específica y podrían tener como blanco células bacterianas, fúngicas y eucarióticas. En su estudio de PAs, Torres et al. desarrollaron una estrategia para convertir un péptido tóxico en un terapéutico, en su trabajo demostraron que se pueden ajustar parámetros para obtener péptidos sintéticos no tóxicos con actividad anti-infectiva y un incremento en su potencia antimicrobiana. De la misma manera, la función biológica de toxinas encontradas en diferentes organismos pueden ser modificadas para favorecer su potencia y selectividad y ajustar sus parámetros para convertir estas moléculas en alternativas a los antibióticos para el tratamiento de infecciones microbianas (Shapira & Benhar, 2010).

Referencias

- Albac, S., Schmitz, A., Lopez-Alayon, C., D'Enfert, C., Sautour, M., Ducreux, A., Labruère-Chazal, C., Laue, M., Holland, G., Bonnin, A., & Dalle, F. (2016). *Candida albicans* is able to use M cells as a portal of entry across the intestinal barrier in vitro. *Cellular Microbiology*, 18(2), 195–210. <https://doi.org/10.1111/cmi.12495>
- Allert, S., Förster, T. M., Svensson, C. M., Richardson, J. P., Pawlik, T., Hebecker, B., Rudolphi, S., Juraschitz, M., Schaller, M., Blagojevic, M., Morschhäuser, J., Figge, M. T., Jacobsen, I. D., Naglik, J. R., Kasper, L., Mogavero, S., & Hube, B. (2018). *Candida albicans*-induced epithelial damage mediates translocation through intestinal barriers. *MBio*, 9(3), 1–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00915-18>
- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., & Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*, 34, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
- Atre, A. N., Surve, S. V., Shouche, Y. S., Joseph, J., Patole, M. S., & Deopurkar, R. L. (2009). Association of small Rho GTPases and actin ring formation in epithelial cells during the invasion by *Candida albicans*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 55(1), 74–84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00504.x>
- Bader, O., Krauke, Y., & Hube, B. (2008). Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology*, 8(1), 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-116>
- Blagojevic, M., Camilli, G., Maxson, M., Hube, B., Moyes, D. L., Richardson, J. P., & Naglik, J. R. (2021). Candidalysin triggers epithelial cellular stresses that induce necrotic death. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.13371>
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*,

3(4). <https://doi.org/10.3390/jof3040057>

Bonifaz Trujillo, A. (2012). *Micología Médica Básica* (4th ed.). McGraw Hill Education.

Boodhun, N. (2018). Seeing is believing: structures and functions of biological molecules. *BioTechniques*, 64(4), 143–146. <https://doi.org/10.2144/btn-2017-0123>

Borkotoky, S., & Murali, A. (2018). The highly efficient T7 RNA polymerase: A wonder macromolecule in biological realm. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.198>

Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in Enzymology* (pp. 245–254). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)

Brown, S. P., Cornforth, D. M., & Mideo, N. (2012). Evolution of virulence in opportunistic pathogens: Generalism, plasticity, and control. *Trends in Microbiology*, 20(7), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>

Calderone, R. a, & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *TRENDS in Microbiology*, 9(7), 327–335. <http://tim.trends.com>

Camilli, G., Griffiths, J. S., Ho, J., Richardson, J. P., & Naglik, J. R. (2020). Some like it hot: *Candida* activation of inflammasomes. *PLOS Pathogens*, 16(10), e1008975. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008975>

Cassone, A. (2015). Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122(6), 785–794. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12994>

Cauchie, M., Desmet, S., & Lagrou, K. (2017). *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 802–810. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.005>

Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology and*

Molecular Biology Reviews, 72(3), 495–544.
<https://doi.org/10.1128/mnbr.00032-07>

Chaine, B., & Janier, M. (2006). Diagnóstico y tratamiento de las balanitis. *EMC - Urología*, 38(2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s1761-3310\(06\)46526-9](https://doi.org/10.1016/s1761-3310(06)46526-9)

Cheng, Y., & Patel, D. J. (2004). An efficient system for small protein expression and refolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(2), 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.068>

Colina, A. R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P., & de Repentigny, L. (1996). Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infection and Immunity*, 64(11), 4514–4519. <https://doi.org/10.1128/IAI.64.11.4514-4519.1996>

Colombo, A. L., Guimarães, T., Camargo, L. F. A., Richtmann, R., de Queiroz-Telles, F., Salles, M. J. C., da Cunha, C. A., Yasuda, M. A. S., Moretti, M. L., & Nucci, M. (2013). Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(3), 283–312. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001>

Conti, H. R., & Gaffen, S. L. (2010). Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes and Infection*, 12(7), 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.013>

Crowley, E. L., & Rafferty, S. P. (2019). Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labelled proteins. *Protein Expression and Purification*, 157, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.01.007>

d’Enfert, C. (2009). Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.008>

Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018).

- Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117(February), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
- Dalle, F., Wächter, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., Labruère, C., Bonnin, A., & Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiology*, 12(2), 248–271. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x>
- Dambuza, I. M., Levitz, S. M., Netea, M. G., & Brown, G. . (2017). Fungal Recognition and Host Defense Mechanisms. In *Microbiology Spectrum* (Vol. 5, Issue 4, pp. 887–902). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0050-2016>
- Edwards, S. (1996). Balanitis and balanoposthitis: a review. *Sexually Transmitted Infections*, 72(3), 155–159. <https://doi.org/10.1136/sti.72.3.155>
- Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H. C., Schäfer, W., & Hube, B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infection and Immunity*, 70(7), 3689–3700. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3689-3700.2002>
- Fidel, P. L. (2011). *Candida*-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis. *Advances in Dental Research*, 23(1), 45–49. <https://doi.org/10.1177/0022034511399284>
- Gabrielli, E., Sabbatini, S., Roselletti, E., Kasper, L., Perito, S., Hube, B., Cassone, A., Vecchiarelli, A., & Pericolini, E. (2016). In vivo induction of neutrophil chemotaxis by secretory aspartyl proteinases of *Candida albicans*. *Virulence*, 7(7), 819–825. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1184385>
- Gabrielson, A. T., Le, T. V., Fontenot, C., Usta, M., & Hellstrom, W. J. G. (2019). Male Genital Dermatology: A Primer for the Sexual Medicine Physician. *Sexual Medicine Reviews*, 7(1), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2018.09.004>

- Garbee, D. D., Pierce, S. S., & Manning, J. (2017). Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(1), 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2016.09.011>
- Giannini, P. J., & Shetty, K. V. (2011). Diagnosis and management of oral candidiasis. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 44(1), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2010.09.010>
- Goulart, L. S., Souza, W. W. R. de, Vieira, C. A., Lima, J. S. de, Olinda, R. A. de, & Araújo, C. de. (2018). Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. *Einstein (São Paulo)*, 16(3), eAO4224. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082018ao4224>
- Gow, N. A. R., Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J. P., & Netea, M. G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 112–122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>
- Gow, N. A. R., & Yadav, B. (2017). Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*, 163(8), 1145–1147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000499>
- Granger, B. L. (2012). Insight into the Antiadhesive Effect of Yeast Wall Protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 11(6), 795–805. <https://doi.org/10.1128/EC.00026-12>
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6), 5–10. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
- Hall, R. A., & Noverr, M. C. (2017). Fungal interactions with the human host: exploring the spectrum of symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, 40, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.020>
- Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352–358.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1247140>

- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, *51*, 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x>
- He, M., He, Y., Luo, Q., & Wang, M. (2011). From DNA to protein: No living cells required. *Process Biochemistry*, *46*(3), 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.11.003>
- Ho, J., Camilli, G., Griffiths, J. S., Richardson, J. P., Kichik, N., & Naglik, J. R. (2021). *Candida albicans* and candidalysin in inflammatory disorders and cancer. *Immunology*, *162*(1), 11–16. <https://doi.org/10.1111/imm.13255>
- Ho, J., Moyes, D. L., Tavassoli, M., & Naglik, J. R. (2017). The Role of ErbB Receptors in Infection. *Trends in Microbiology*, *25*(11), 942–952. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.009>
- Ho, J., Wickramasinghe, D. N., Nikou, S.-A., Hube, B., Richardson, J. P., & Naglik, J. R. (2020). Candidalysin Is a Potent Trigger of Alarmin and Antimicrobial Peptide Release in Epithelial Cells. *Cells*, *9*(3), 699. <https://doi.org/10.3390/cells9030699>
- Ho, J., Yang, X., Nikou, S. A., Kichik, N., Donkin, A., Ponde, N. O., Richardson, J. P., Gratacap, R. L., Archambault, L. S., Zwirner, C. P., Murciano, C., Henley-Smith, R., Thavaraj, S., Tynan, C. J., Gaffen, S. L., Hube, B., Wheeler, R. T., Moyes, D. L., & Naglik, J. R. (2019). Candidalysin activates innate epithelial immune responses via epidermal growth factor receptor. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09915-2>
- Hoyer, L. L., & Cota, E. (2016). *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00280>
- Hu, H., Liu, M., & Sun, S. (2021). Pore-Forming Toxins During Bacterial Infection: Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Drug Design*,

Development and Therapy, Volume 15, 3773–3781.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S322393>

Hu, L., He, C., Zhao, C., Chen, X., Hua, H., & Yan, Z. (2019). Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microbial Pathogenesis*, 134(June), 103575.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103575>

Information, N. C. for B. (2021). *PubChem Compound Summary for CID 644308, Dodecylphosphocholine*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dodecylphosphocholine>.

Jacobsen, I. D., Niemiec, M. J., Kapitan, M., & Polke, M. (2020). Commensal to Pathogen Transition of *Candida albicans*. *Reference Module in Life Sciences*.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21281-8>

Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., & Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(1), 85–93. <https://doi.org/10.1586/eri.11.152>

Jin, X., & Hong, S. H. (2018). Cell-free protein synthesis for producing ‘difficult-to-express’ proteins. *Biochemical Engineering Journal*, 138, 156–164.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.013>

Kasper, L., König, A., Koenig, P.-A., Gresnigt, M. S., Westman, J., Drummond, R. A., Lionakis, M. S., Groß, O., Ruland, J., Naglik, J. R., & Hube, B. (2018). The fungal peptide toxin Candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. *Nature Communications*, 9(1), 4260. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06607-1>

Kett, D. H., Azoulay, E., Echeverria, P. M., & Vincent, J. L. (2011). *Candida* bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Critical Care Medicine*, 39(4), 665–670. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206c1ca>

Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., & Yokoyama, S.

- (1999). Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Letters*, 442(1), 15–19. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01620-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01620-2)
- Kollef, M., Micek, S., Hampton, N., Doherty, J. A., & Kumar, A. (2012). Septic shock attributed to *Candida* infection: Importance of empiric therapy and source control. *Clinical Infectious Diseases*, 54(12), 1739–1746. <https://doi.org/10.1093/cid/cis305>
- Krysan, D. J., Sutterwala, F. S., & Wellington, M. (2014). Catching Fire: *Candida albicans*, Macrophages, and Pyroptosis. *PLoS Pathogens*, 10(6), 10–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004139>
- Kühbacher, A., Burger-Kentischer, A., & Rupp, S. (2017). Interaction of *Candida* Species with the Skin. *Microorganisms*, 5(2), 32. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020032>
- Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1445–1456. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1315399>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095497. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Kurauskas, V., Hessel, A., Ma, P., Lunetti, P., Weinhäupl, K., Imbert, L., Brutscher, B., King, M. S., Sounier, R., Dolce, V., Kunji, E. R. S., Capobianco, L., Chipot, C., Dehez, F., Bersch, B., & Schanda, P. (2018). How Detergent Impacts Membrane Proteins: Atomic-Level Views of Mitochondrial Carriers in Dodecylphosphocholine. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(5), 933–938. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b00269>
- Lewis, R. J., & Garcia, M. L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(10), 790–802. <https://doi.org/10.1038/nrd1197>
- Lin, X., Zhou, C., Zhu, S., Deng, H., Zhang, J., & Lu, Y. (2020). O₂-Tuned Protein Synthesis Machinery in *Escherichia coli*-Based Cell-Free System. *Frontiers in*

Bioengineering and Biotechnology, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00312>

- Lisboa, C., Ferreira, A., Resende, C., & Rodrigues, A. G. (2009). Infectious balanoposthitis: management, clinical and laboratory features. *International Journal of Dermatology*, 48(2), 121–124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.03966.x>
- Liu, L., Okada, S., Kong, X. F., Kreins, A. Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., Toubiana, J., Itan, Y., Audry, M., Nitschke, P., Masson, C., Toth, B., Flatot, J., Migaud, M., Chrabieh, M., Kochetkov, T., Bolze, A., Borghesi, A., Toulon, A., ... Casanova, J. L. (2011). Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Experimental Medicine*, 208(18), 1635–1648. <https://doi.org/10.1084/jem.20110958>
- Lo, H. J., Köhler, J. R., Didomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939–949. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80358-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80358-X)
- Maródi, L. (2014). Mucocutaneous Candidiasis. *Stiehm's Immune Deficiencies*, 775–802. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405546-9.00040-6>
- Masri, S. N., Noor, S. M., Mat Nor, L. A., Osman, M., & Rahman, M. M. (2015). *Candida* isolates from pregnant women and their antifungal susceptibility in a Malaysian tertiary-care hospital. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 31(3), 658–661. <https://doi.org/10.12669/pjms.313.7229>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity. *Virulence*, 4(2), 119–128.
- McCarty, T. P., & Pappas, P. G. (2016). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 103–124. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>
- McCaslin, D. R. (2013). Detergent Properties. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (pp. 644–648). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00672-1>

- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>
- Mogavero, S., Sauer, F. M., Brunke, S., Allert, S., Schulz, D., Wisgott, S., Jablonowski, N., Elshafee, O., Krüger, T., Kniemeyer, O., Brakhage, A. A., Naglik, J. R., & Dolk, B. H. (2021). Candidalysin delivery to the invasion pocket is critical for host epithelial damage induced by *Candida albicans*. *Cellular Microbiology, Early view*(Online Version of Record before inclusion in an issue.). <https://doi.org/10.1111/cmi.13378>
- Morgan, J., Meltzer, M. I., Plikaytis, B. D., Sofair, A. N., Huie-White, S., Wilcox, S., Harrison, L. H., Seaberg, E. C., Hajjeh, R. A., & Teutsch, S. M. (2005). Excess Mortality, Hospital Stay, and Cost Due to Candidemia: A Case-Control Study Using Data From Population-Based Candidemia Surveillance. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 26(6), 540–547. <https://doi.org/10.1086/502581>
- Moyes, D. L., Murciano, C., Runglall, M., Islam, A., Thavaraj, S., & Naglik, J. R. (2011). *Candida albicans* Yeast and Hyphae are Discriminated by MAPK Signaling in Vaginal Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 6(11), e26580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026580>
- Moyes, D. L., Richardson, J. P., & Naglik, J. R. (2015). *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: Scratching the surface. *Virulence*, 6(4), 338–346. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1012981>
- Moyes, D. L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., Kohli, A., Islam, A., Mora-Montes, H., Challacombe, S. J., & Naglik, J. R. (2010). A Biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* in Epithelial Cells. *Cell Host & Microbe*, 8(3), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.08.002>
- Moyes, D. L., Shen, C., Murciano, C., Runglall, M., Richardson, J. P., Arno, M., Aldecoa-Otalora, E., & Naglik, J. R. (2014). Protection Against Epithelial Damage During *Candida albicans* Infection Is Mediated by PI3K/Akt and Mammalian Target of Rapamycin Signaling. *The Journal of Infectious Diseases*,

209(11), 1816–1826. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit824>

Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I., Kichik, N., ... Naglik, J. R. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, *532*(7597), 64–68. <https://doi.org/10.1038/nature17625>

Naglik, J. R., Gaffen, S. L., & Hube, B. (2019). Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current Opinion in Microbiology*, *52*, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.002>

Naglik, J. R., König, A., Hube, B., & Gaffen, S. L. (2017). *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Current Opinion in Microbiology*, *40*(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.030>

Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B., & Hube, B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection*, *13*(12–13), 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.009>

Naglik, J. R., Newport, G., White, T. C., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, J. S., Greenspan, D., Sweet, S. P., Challacombe, S. J., & Agabian, N. (1999). In Vivo Analysis of Secreted Aspartyl Proteinase Expression in Human Oral Candidiasis. *Infection and Immunity*, *67*(5), 2482–2490. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.5.2482-2490.1999>

Naglik, J. R., Richardson, J. P., & Moyes, D. L. (2014). *Candida albicans* Pathogenicity and Epithelial Immunity. *PLoS Pathogens*, *10*(8), 8–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004257>

Naglik, J. R., Rodgers, C. A., Shirlaw, P. J., Dobbie, J. L., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, D., Agabian, N., & Challacombe, S. J. (2003). Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, *188*(3), 469–479.

<https://doi.org/10.1086/376536>

- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, *5*(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Nikou, S. A., Kichik, N., Brown, R., Ponde, N. O., Ho, J., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2019). *Candida albicans* interactions with mucosal surfaces during health and disease. *Pathogens*, *8*(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020053>
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>
- Norton, R. S. (2018). Peptide Toxin Structure and Function by NMR. In *Modern Magnetic Resonance* (pp. 2081–2097). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3_120
- Nucci, M., & Anaissie, E. (2001). Revisiting the Source of Candidemia: Skin or Gut? *Clinical Infectious Diseases*, *33*(12), 1959–1967. <https://doi.org/10.1086/323759>
- Okada, S., Puel, A., Casanova, J.-L., & Kobayashi, M. (2016). Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clinical & Translational Immunology*, *5*(12), e114. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.71>
- Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H., Bennett, J., & Kullberg, B. J. (2002). Deeply invasive candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, *16*(4), 821–835. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(02\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(02)00034-X)
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(May), 1–

20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Parihar, S. (2011). Oral Candidiasis- A Review. *Webmed Central Dentistry*, 2(11), 1–18. https://www.webmedcentral.com/article_view/2498
- Patin, E. C., Thompson, A., & Orr, S. J. (2019). Pattern recognition receptors in fungal immunity. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 89, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.003>
- Pellon, A., Sadeghi Nasab, S. D., & Moyes, D. L. (2020). New Insights in Candida albicans Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00081>
- Peters, B. M., Yano, J., Noverr, M. C., & Fidel, P. L. (2014). Candida Vaginitis: When Opportunism Knocks, the Host Responds. *PLoS Pathogens*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003965>
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond Candida albicans and Aspergillus fumigatus. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 42, Issue 10, pp. 4419–4431). <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4419-4431.2004>
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., & Filler, S. G. (2007a). Als3 is a Candida albicans invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biology*, 5(3), 0543–0557. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050064>
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., & Filler, S. G. (2007b). Als3 Is a Candida albicans Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. *PLoS Biology*, 5(3), e64. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050064>
- Pirkmajer, S., & Chibalin, A. V. (2011). Serum starvation: caveat emptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301(2), C272–C279. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00091.2011>

- Poulain, D. (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 208–217. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813904>
- Pramanick, R., Mayadeo, N., Warke, H., Begum, S., Aich, P., & Aranha, C. (2019). Vaginal microbiota of asymptomatic bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis: Are they different from normal microbiota? *Microbial Pathogenesis*, 134(June), 103599. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103599>
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Lim, H. K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., Gumbleton, M., Toulon, A., Bodemer, C., El-Baghdadi, J., Whitters, M., Paradis, T., Brooks, J., Collins, M., Wolfman, N. M., ... Casanova, J.-L. (2011). Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Humans with Inborn Errors of Interleukin-17 Immunity. *Science*, 332(6025), 65–68. <https://doi.org/10.1126/science.1200439>
- R. Goswami, R., D. Pohare, S., S. Raut, J., & Mohan Karuppaiyl, S. (2017). Cell Surface Hydrophobicity as a Virulence Factor in *Candida albicans*. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 14(4), 1503–1511. <https://doi.org/10.13005/bbra/2598>
- Rast, T. J., Kullas, A. L., Southern, P. J., & Davis, D. A. (2016). Human epithelial cells discriminate between commensal and pathogenic interactions with *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 11(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153165>
- Rauceo, J. M., De Armond, R., Otoo, H., Kahn, P. C., Klotz, S. A., Gaur, N. K., & Lipke, P. N. (2006). Threonine-Rich Repeats Increase Fibronectin Binding in the *Candida albicans* Adhesin Als5p. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1664–1673. <https://doi.org/10.1128/EC.00120-06>
- Richardson, J. P., Ho, J., & Naglik, J. R. (2018). *Candida*–epithelial interactions. *Journal of Fungi*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/jof4010022>
- Richardson, J. P., Mogavero, S., Moyes, D. L., Blagojevic, M., Krüger, T., Verma, A. H., Coleman, B. M., De La Cruz Diaz, J., Schulz, D., Ponde, N. O., Carrano, G.,

- Kniemeyer, O., Wilson, D., Bader, O., Enoiu, S. I., Ho, J., Kichik, N., Gaffen, S. L., Hube, B., & Naglik, J. R. (2018). Processing of *Candida albicans* ece1p is critical for Candidalysin maturation and fungal virulence. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02178-17>
- Richardson, J. P., Moyes, D. L., Ho, J., & Naglik, J. R. (2019). *Candida* innate immunity at the mucosa. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 89, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.026>
- Richardson, J. P., Willems, H. M. E., Moyes, D. L., Shoaie, S., Barker, K. S., Tan, S. L., Palmer, G. E., Hube, B., Naglik, J. R., & Peters, B. M. (2018). Candidalysin drives epithelial signaling, neutrophil recruitment, and immunopathology at the vaginal mucosa. *Infection and Immunity*, 86(2), 1–15. <https://doi.org/10.1128/IAI.00645-17>
- Rolf, J., Rosenthal, K., & Lütz, S. (2019). Application of Cell-Free Protein Synthesis for Faster Biocatalyst Development. *Catalysts*, 9(2), 190. <https://doi.org/10.3390/catal9020190>
- Romo, J. A., & Kumamoto, C. A. (2020). On Commensalism of *Candida*. *Journal of Fungi*, 6(1), 16. <https://doi.org/10.3390/jof6010016>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rowen, J. L. (2003). Mucocutaneous candidiasis. *Seminars in Perinatology*, 27(5), 406–413. [https://doi.org/10.1016/S0146-0005\(03\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0146-0005(03)00066-1)
- Saida, F., Uzan, M., Odaert, B., & Bontems, F. (2006). Expression of Highly Toxic Genes in *E. coli*: Special Strategies and Genetic Tools. *Current Protein and Peptide Science*, 7(1), 47–56. <https://doi.org/10.2174/138920306775474095>
- Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J. D., Patterson, J. E., Rangel-Frausto, S., Wiblin, R. T., Blumberg, H. M., PFALLER, M., RINALDI, M., EDWARDS, J. E., WENZEL, R. P., & JARVIS, W. (2001). Risk factors for *Candida* species

colonization of neonatal intensive care unit patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 20(12), 1119–1124. <https://doi.org/10.1097/00006454-200112000-00005>

Schwartz, I., Smith, S., & Dingle, T. (2018). Something wicked this way comes: What health care providers need to know about *Candida auris*. *Canada Communicable Disease Report*, 44(11), 271–276. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v44i11a01>

Scientific, T. (2021). *Protein Biology Resource Library, Pierce Protein Methods: Detergents for Cell Lysis and Protein Extraction*. [thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-cen](https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-cen)

Shapira, A., & Benhar, I. (2010). Toxin-Based Therapeutic Approaches. *Toxins*, 2(11), 2519–2583. <https://doi.org/10.3390/toxins2112519>

Silva, O. N., Torres, M. D. T., Cao, J., Alves, E. S. F., Rodrigues, L. V., Resende, J. M., Lião, L. M., Porto, W. F., Fensterseifer, I. C. M., Lu, T. K., Franco, O. L., & de la Fuente-Nunez, C. (2020). Repurposing a peptide toxin from wasp venom into antiinfectives with dual antimicrobial and immunomodulatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(43), 26936–26945. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012379117>

Singh, A., Verma, R., Murari, A., & Agrawal, A. (2014). Oral candidiasis: An overview. In *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 81–85). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.141325>

Sobel, J. D. (2007). Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, 369(9577), 1961–1971. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60917-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60917-9)

Southern, P., Horbul, J., Maher, D., & Davis, D. A. (2008). *C. albicans* Colonization of Human Mucosal Surfaces. *PLoS ONE*, 3(4), e2067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002067>

Staab, J. F., Datta, K., & Rhee, P. (2013). Niche-specific requirement for hyphal wall

- protein 1 in virulence of *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 8(11), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080842>
- Staniszewska, M. (2020). Virulence Factors in *Candida* species. *Current Protein & Peptide Science*, 21(3), 313–323.
<https://doi.org/10.2174/1389203720666190722152415>
- Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 737–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7), 317–324.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>
- Sun, J. N., Solis, N. V., Phan, Q. T., Bajwa, J. S., Kashleva, H., Thompson, A., Liu, Y., Dongari-Bagtzoglou, A., Edgerton, M., & Filler, S. G. (2010). Host Cell Invasion and Virulence Mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathogens*, 6(11), e1001181. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001181>
- Sun, Z. Z., Hayes, C. A., Shin, J., Caschera, F., Murray, R. M., & Noireaux, V. (2013). Protocols for Implementing an *Escherichia coli* Based TX-TL Cell-Free Expression System for Synthetic Biology. *Journal of Visualized Experiments*, 79. <https://doi.org/10.3791/50762>
- Swidergall, M. (2019). *Candida albicans* at Host Barrier Sites: Pattern Recognition Receptors and Beyond. *Pathogens*, 8(1), 40.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8010040>
- Swidergall, M., Khalaji, M., Solis, N. V., Moyes, D. L., Drummond, R. A., Hube, B., Lionakis, M. S., Murdoch, C., Filler, S. G., & Naglik, J. R. (2019). Candidalysin Is Required for Neutrophil Recruitment and Virulence During Systemic *Candida albicans* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(9), 1477–1488.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz322>
- Swidergall, M., Solis, N. V., Lionakis, M. S., & Filler, S. G. (2018). EphA2 is an epithelial cell pattern recognition receptor for fungal β -glucans. *Nature*

Microbiology, 3(1), 53–61. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0059-5>

Takezaki, S., Yamada, M., Kato, M., Park, M., Maruyama, K., Yamazaki, Y., Chida, N., Ohara, O., Kobayashi, I., & Ariga, T. (2012). Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain. *The Journal of Immunology*, 189(3), 1521–1526. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200926>

Taylor, P. R., Tsoni, S. V., Willment, J. A., Dennehy, K. M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., & Brown, G. D. (2007). Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nature Immunology*, 8(1), 31–38. <https://doi.org/10.1038/ni1408>

Telles, D. R., Karki, N., & Marshall, M. W. (2017). Oral Fungal Infections. *Dental Clinics of North America*, 61(2), 319–349. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.12.004>

Thomson, A. R., Wood, C. W., Burton, A. J., Bartlett, G. J., Sessions, R. B., Brady, R. L., & Woolfson, D. N. (2014). Computational design of water-soluble α -helical barrels. *Science*, 346(6208), 485–488. <https://doi.org/10.1126/science.1257452>

Torres, M. D. T., Pedron, C. N., Higashikuni, Y., Kramer, R. M., Cardoso, M. H., Oshiro, K. G. N., Franco, O. L., Silva Junior, P. I., Silva, F. D., Oliveira Junior, V. X., Lu, T. K., & de la Fuente-Nunez, C. (2018). Structure-function-guided exploration of the antimicrobial peptide polybia-CP identifies activity determinants and generates synthetic therapeutic candidates. *Communications Biology*, 1(1), 221. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0224-2>

Vallabhaneni, S., Mody, R. K., Walker, T., & Chiller, T. (2016). The Global Burden of Fungal Diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.004>

Van De Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J., & Netea, M. G. (2010). Pathogenesis of invasive candidiasis. *Current Opinion in Critical Care*, 16(5), 453–459. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32833e046e>

- Vázquez-González, D., Perusquía-Ortiz, A. M., Hundeiker, M., & Bonifaz, A. (2013). Opportunistic yeast infections: Candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 11(5), 381–394. <https://doi.org/10.1111/ddg.12097>
- Vergis, J. M., & Wiener, M. C. (2011). The variable detergent sensitivity of proteases that are utilized for recombinant protein affinity tag removal. *Protein Expression and Purification*, 78(2), 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.04.011>
- Verma, A. H., Richardson, J. P., Zhou, C., Coleman, B. M., Moyes, D. L., Ho, J., Huppler, A. R., Ramani, K., McGeachy, M. J., Mufazalov, I. A., Waisman, A., Kane, L. P., Biswas, P. S., Hube, B., Naglik, J. R., & Gaffen, S. L. (2017). Oral epithelial cells orchestrate innate type 17 responses to *Candida albicans* through the virulence factor candidalysin. *Science Immunology*, 2(17), eaam8834. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam8834>
- Villar, C. C., Kashleva, H., Nobile, C. J., Mitchell, A. P., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2007). Mucosal Tissue Invasion by *Candida albicans* Is Associated with E-Cadherin Degradation, Mediated by Transcription Factor Rim101p and Protease Sap5p. *Infection and Immunity*, 75(5), 2126–2135. <https://doi.org/10.1128/IAI.00054-07>
- Villar, Cristina Cunha, & Dongari-Bagtzoglou, A. (2008). Immune defence mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10, e29. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000835>
- Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowski, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M., Wilson, D., & Hube, B. (2012). *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. *PLoS ONE*, 7(5), e36952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036952>
- Wang, Z. (2017). *ErbB Receptors and Cancer* (pp. 3–35). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_1

- Weindl, G., Naglik, J. R., Kaesler, S., Biedermann, T., Hube, B., Korting, H. C., & Schaller, M. (2007). Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI28115>
- Wilding, K. M., Schinn, S.-M., Long, E. A., & Bundy, B. C. (2018). The emerging impact of cell-free chemical biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, *53*, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.019>
- Williams, D. W., Jordan, R. P. C., Wei, X.-Q., Alves, C. T., Wise, M. P., Wilson, M. J., & Lewis, M. A. O. (2013). Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of Oral Microbiology*, *5*(1), 22434. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.22434>
- Wu, P. S. C., Ozawa, K., Lim, S. P., Vasudevan, S. G., Dixon, N. E., & Otting, G. (2007). Cell-Free Transcription/Translation from PCR-Amplified DNA for High-Throughput NMR Studies. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(18), 3356–3358. <https://doi.org/10.1002/anie.200605237>
- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., & Kubick, S. (2015). Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem*, *16*(17), 2420–2431. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500340>
- Zhu, W., & Filler, S. G. (2010). Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cellular Microbiology*, *12*(3), 273–282. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01412.x>
- Zhu, W., Phan, Q. T., Boontheung, P., Solis, N. V., Loo, J. A., & Filler, S. G. (2012). EGFR and HER2 receptor kinase signaling mediate epithelial cell invasion by *Candida albicans* during oropharyngeal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(35), 14194–14199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117676109>

ANEXO

10. Material adicional

10.1 Apéndice A. Formación de oligómeros por candidalysina y su intercalación a modelos de la membrana celular.

10.1.1 Ultracentrifugación analítica

Esta técnica mide los coeficientes de sedimentación ($c(s)$) que son proporcionales al peso molecular de la muestra observada.

Se midieron los coeficientes de sedimentación para Cdl en diferentes proporciones de péptido a detergente y sin detergente. En ausencia de detergente, la Cdl forma agregados de pesos moleculares > 1 GDa (resultado no mostrado). Cdl forma oligómeros de diferentes tamaños dependiendo de la proporción de péptido a detergente. Esto también puede interpretarse de manera que, Cdl forma oligómeros de tamaños más grandes a medida que aumenta la concentración de la toxina.

Cdl forma oligos de bajo peso molecular (dímeros y trimeros) y oligos de alto peso molecular (hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros y decámeros). Tetrámeros y pentámeros no se observan.

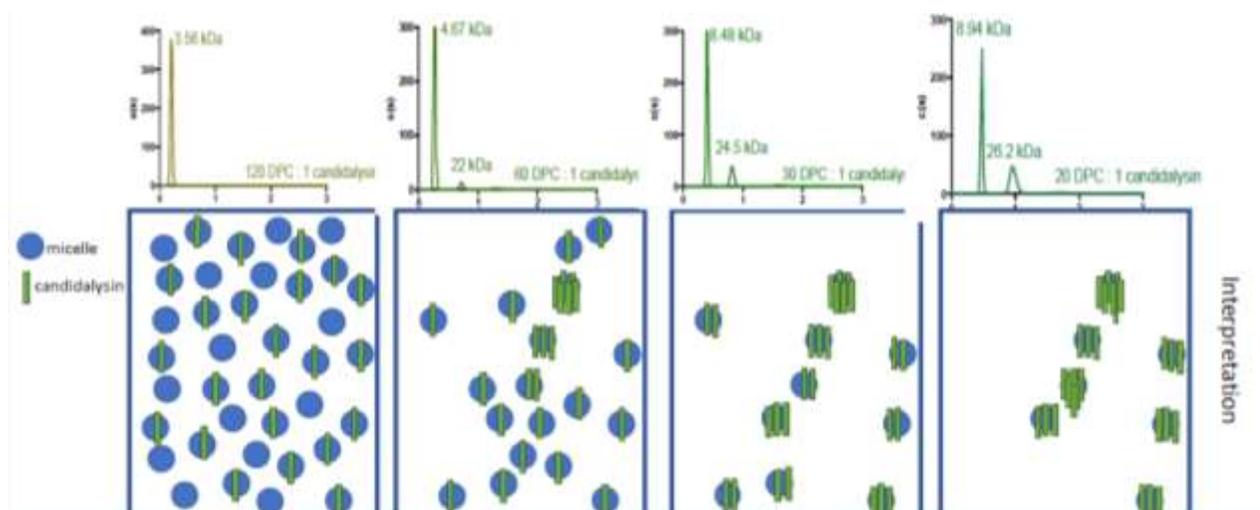


Figura 32. Ultracentrifugación analítica de Cdl en diferentes proporciones de péptido a detergente. Se observa que, si se mantiene la concentración de Cdl constante, a mayor cantidad de detergente hay una mayor disponibilidad de micelas y Cdl se dispersa y existe mayoritariamente como un monómero. Con la disminución de la cantidad de detergente y con ello de micelas disponibles, Cdl forma oligómeros de mayor peso molecular.

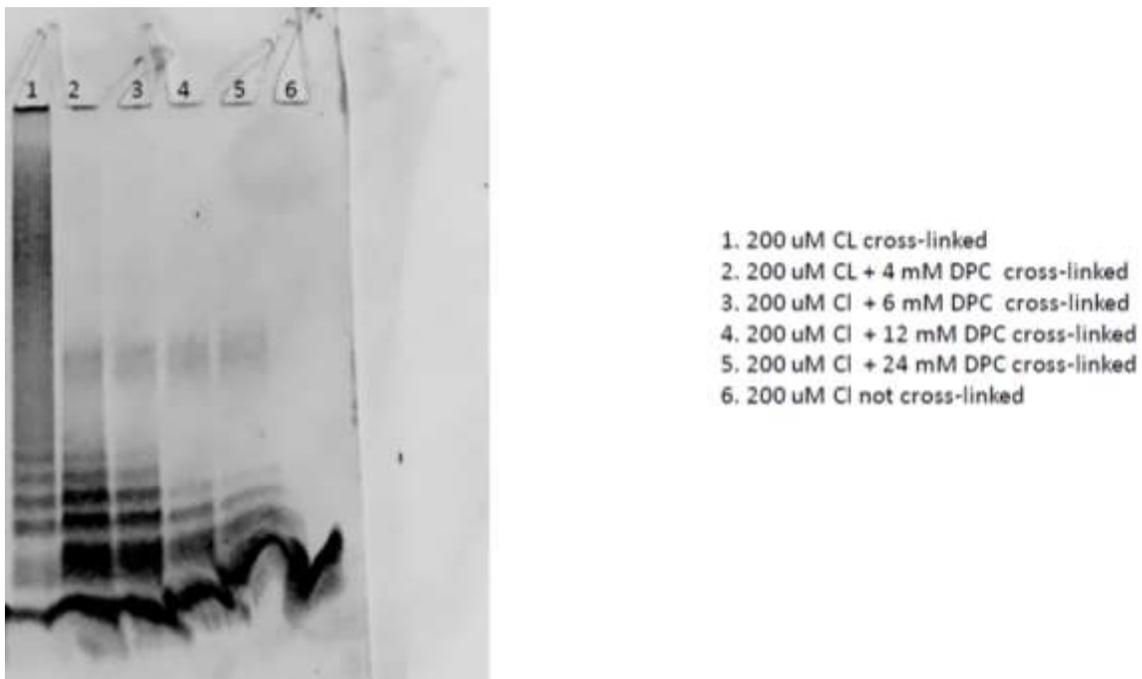
La resolución de esta técnica no es suficiente para evaluar la distribución de la población para los diferentes oligómeros, se observan $c(s)$ que representan el

peso molecular promedio de los oligos formados (este resultado también se observa con espectrometría de masas).

10.1.2 Cross linking

En esta técnica se utiliza glutaraldehído como enlazador. El enlazador forma enlaces covalentes entre aminas secundarias y terciarias que están en proximidad. Luego, las muestras vinculadas se analizan mediante SDS page (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) para monitorear la formación de complejos.

El Cdl se oligomeriza sólo en presencia de detergentes. No hay oligomerización en ausencia de detergente. El equilibrio y la población de oligomerización de Cdl depende de la cantidad de micelas disponibles.



Tinción Azul de Coomassie en gel de Poliacrilamida

Figura 33. Evaluación del experimento de cross-linking de Cdl en diferentes concentraciones de detergente. Candidalislina forma oligómeros de tamaños crecientes de manera inversamente proporcional a la cantidad de detergente.

10.2 Apéndice B. Optimización de la generación de material genético modelo para expresión *in vitro*.

Con la finalidad de generar un modelo de material genético adecuado para su uso en el sistema de síntesis de proteínas sin células y que diera rendimientos suficientes de la Cdl, se diseñaron plásmidos pET y pRSETA.

En el caso del plásmido pRSETA generado, debido a la falta de un represor en su secuencia, al clonar y transformar el plásmido con Cdl, la toxina se llega a expresar en el fondo en cantidades mínimas, suficientes para provocar una respuesta en la bacteria, ya sea destruir el plásmido o dejar de crecer. Se intentó el experimento con varias cepas y especies de microorganismos pero no se logró la propagación del pRSETA después de la clonación.

Los plásmidos pET cuentan con una secuencia represora que impide que se exprese el gen de interés hasta que se agregue al medio de reacción el agente de inducción, el cual además promueve la expresión de la polimerasa T7. En este caso sí se obtuvo material genético modelo suficiente para llevar a cabo la reacción de expresión *in vitro*, sin embargo, no hubo expresión de Cdl.

Se realizó el experimento de la expresión *in vitro* de GFP (proteína verde fluorescente) usando material genético plasmídico pET y pRSETA. Mediante la propiedad cuantificable de GFP, se pudo determinar que, el uso de plásmidos pRSETA tenía mucho mejor rendimiento para la expresión *in vitro* que los pET (**Figura 34**).

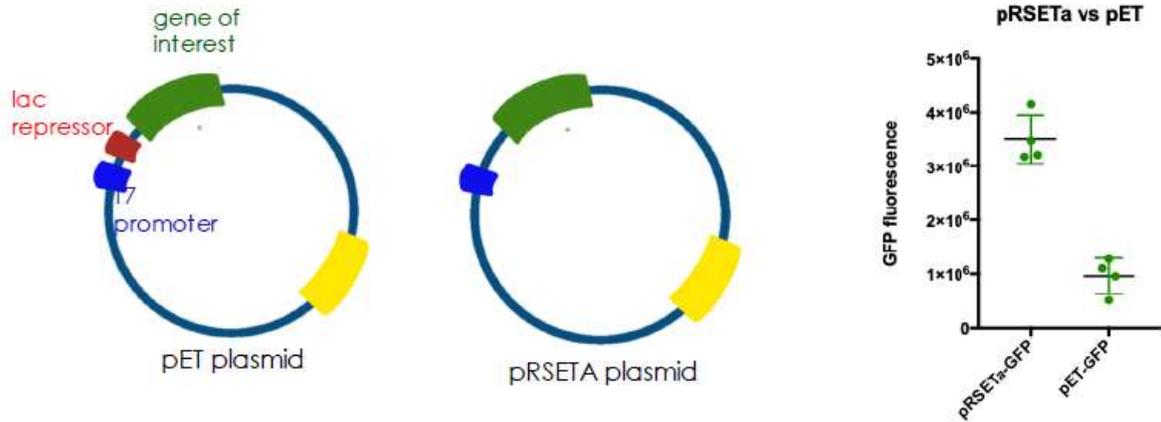


Figura 34. Evaluación del uso de plásmidos pET y pRSETA para la expresión *in vitro* de GFP. La intensidad de fluorescencia de el producto de la expresión *in vitro* usando los diferentes plásmidos indica que hubo una expresión 3 veces mayor de GFP para el caso del plásmido pRSETA.

Se repitió el experimento con la adición de la expresión *in vitro* usando material genético modelo pseudocíclico generado por el método de amplificación en PCR de Wu et al. A diferencia de los plásmidos, el aumento de la expresión de la proteína aumenta con la cantidad de ADN añadido a la reacción.

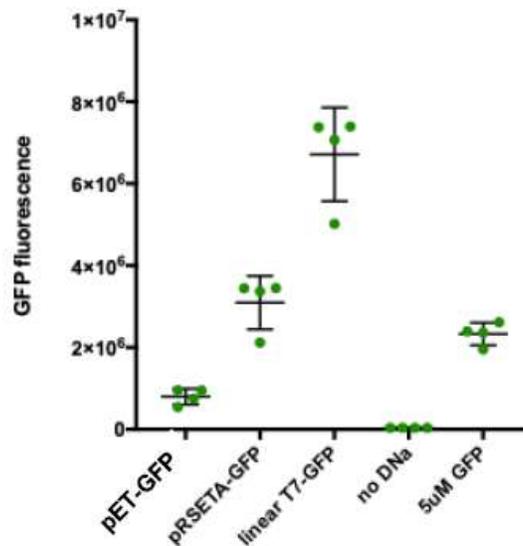


Figura 35. Evaluación del uso de diferentes modelos de material genético para la expresión *in vitro* de GFP. En la presente gráfica la concentración de cada ADN se encuentra optimizada a la concentración óptima para la máxima expresión de GFP. Se observa que mucho mayor cantidad de GFP se obtiene mediante el uso de ADN lineal (pseudocíclico).

SIIGIIMGILGNIPQVQIIMSIVKAFKGNK

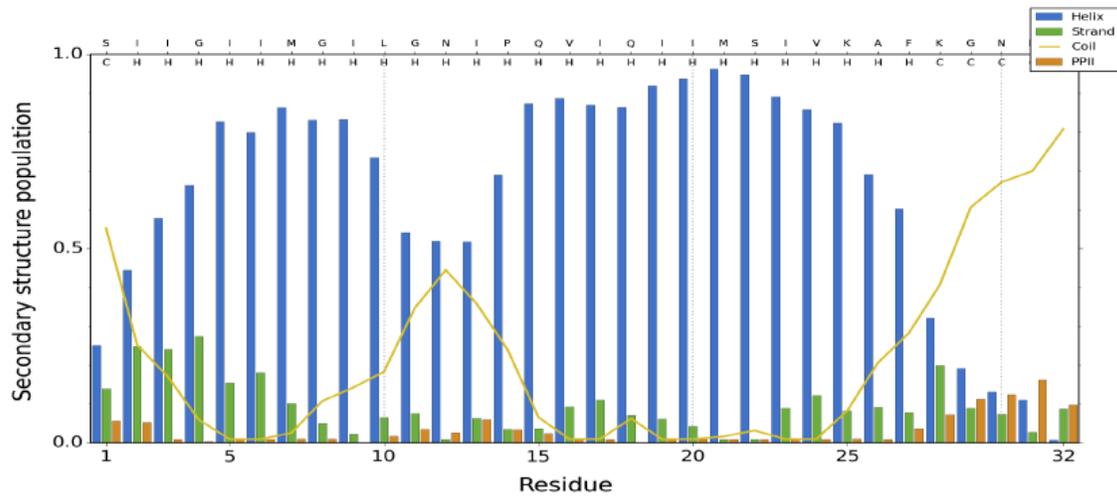


Figura 38. Se predice una estructura mayoritariamente α -helical a partir de la secuencia de Cdl.

SIIGIIMGILGNIPQVQIIMSIVKAFKGNK

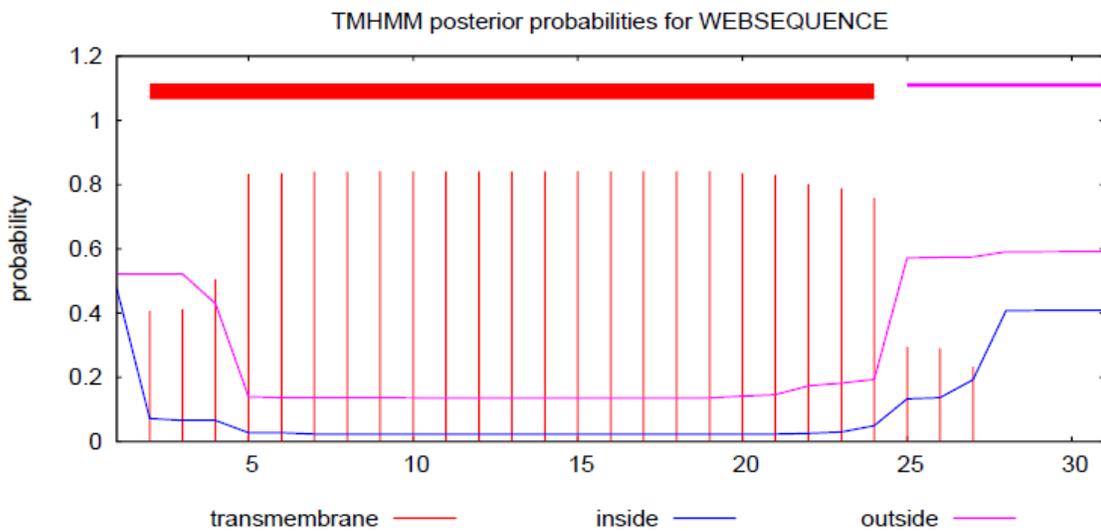


Figura 39. Se muestra la probabilidad de que ciertas partes de la secuencia sean transmembranales a través del programa TMHMM.

10.4 Apéndice D. Dicroísmo circular y Cross Linking

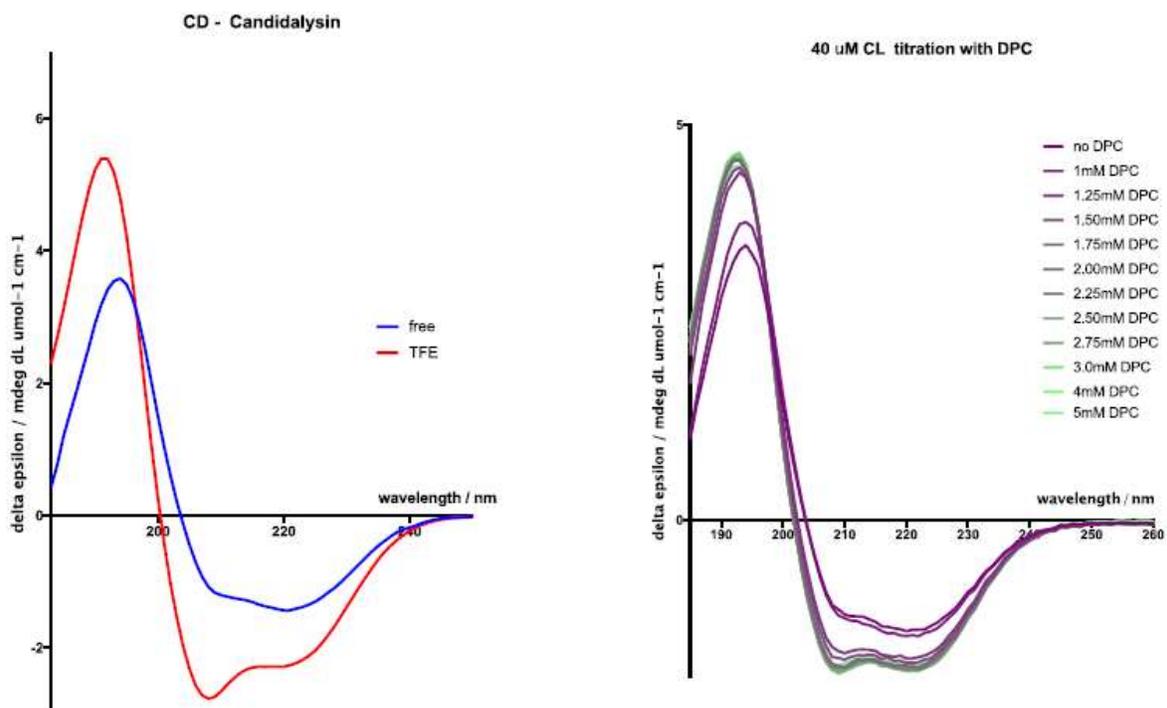


Figura 40. Cdl tiene un cambio conformacional en su estructura secundaria en presencia de un modelo de membrana celular (DPC).

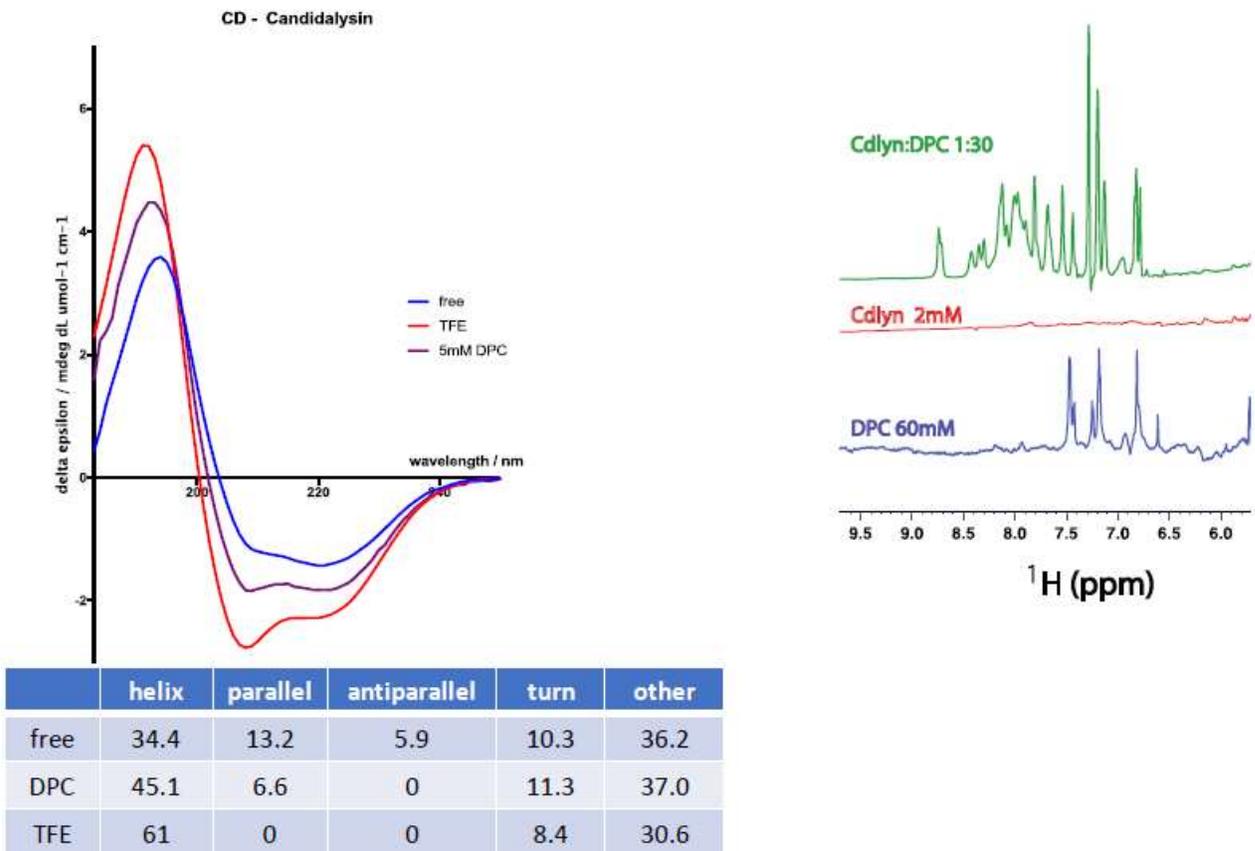


Figura 41. La estructura α -helical de Cdl aumenta en proporci3n en presencia de DPC.

8.5 Anexo A

p97 (560 bp)

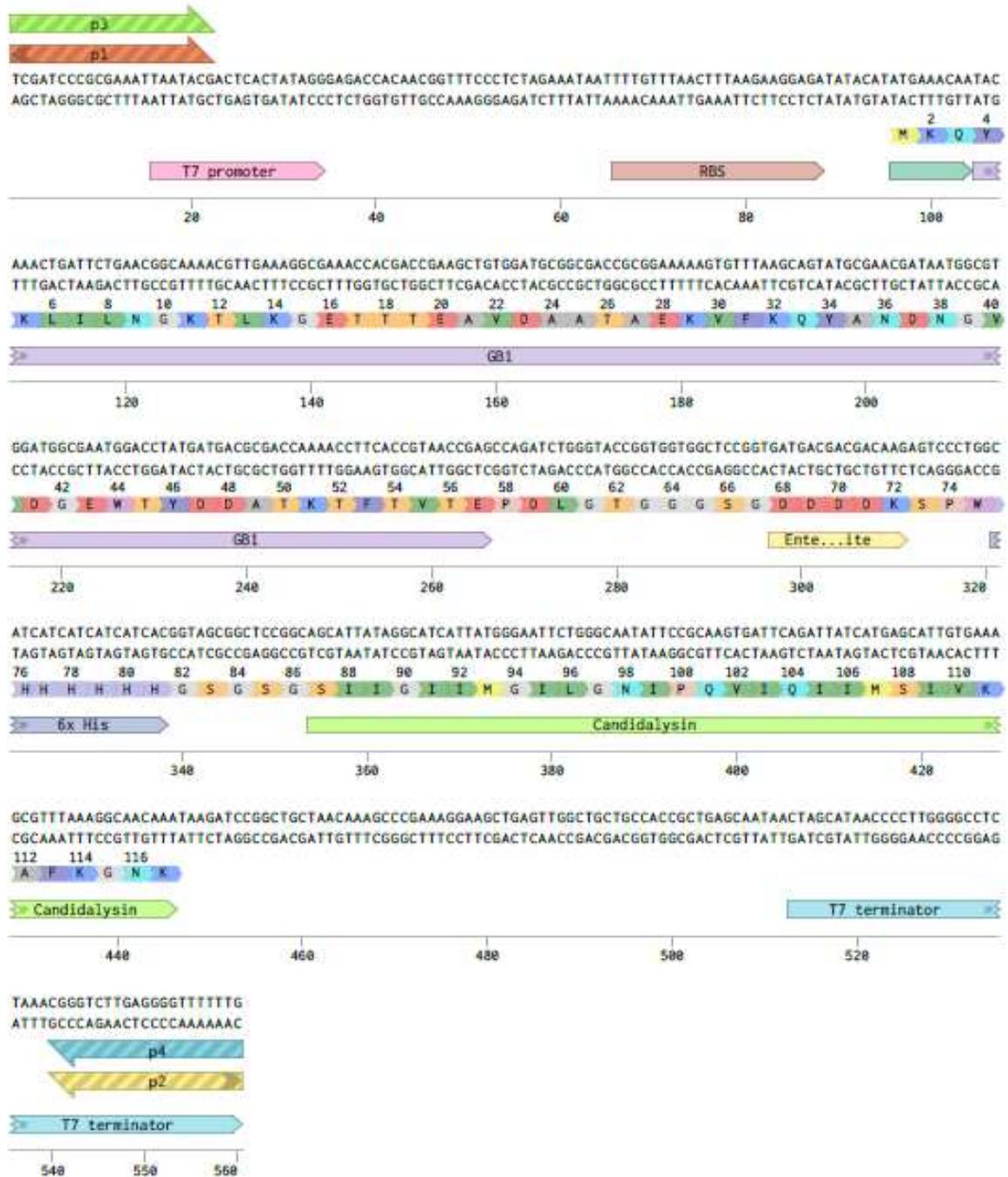


Figura 42. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción p97.

p98 (566 bp)

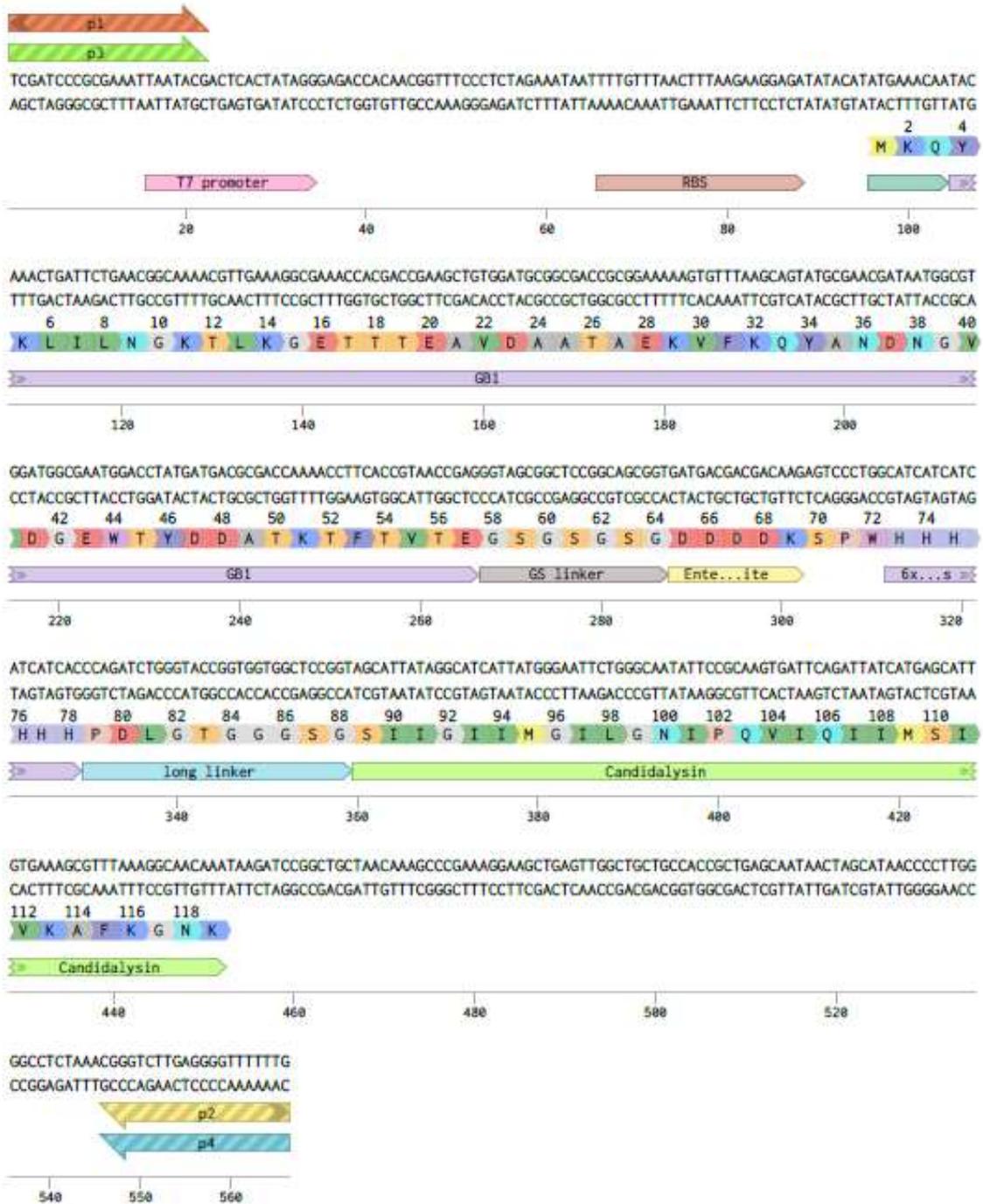


Figura 43. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción p98.

p99 (566 bp)

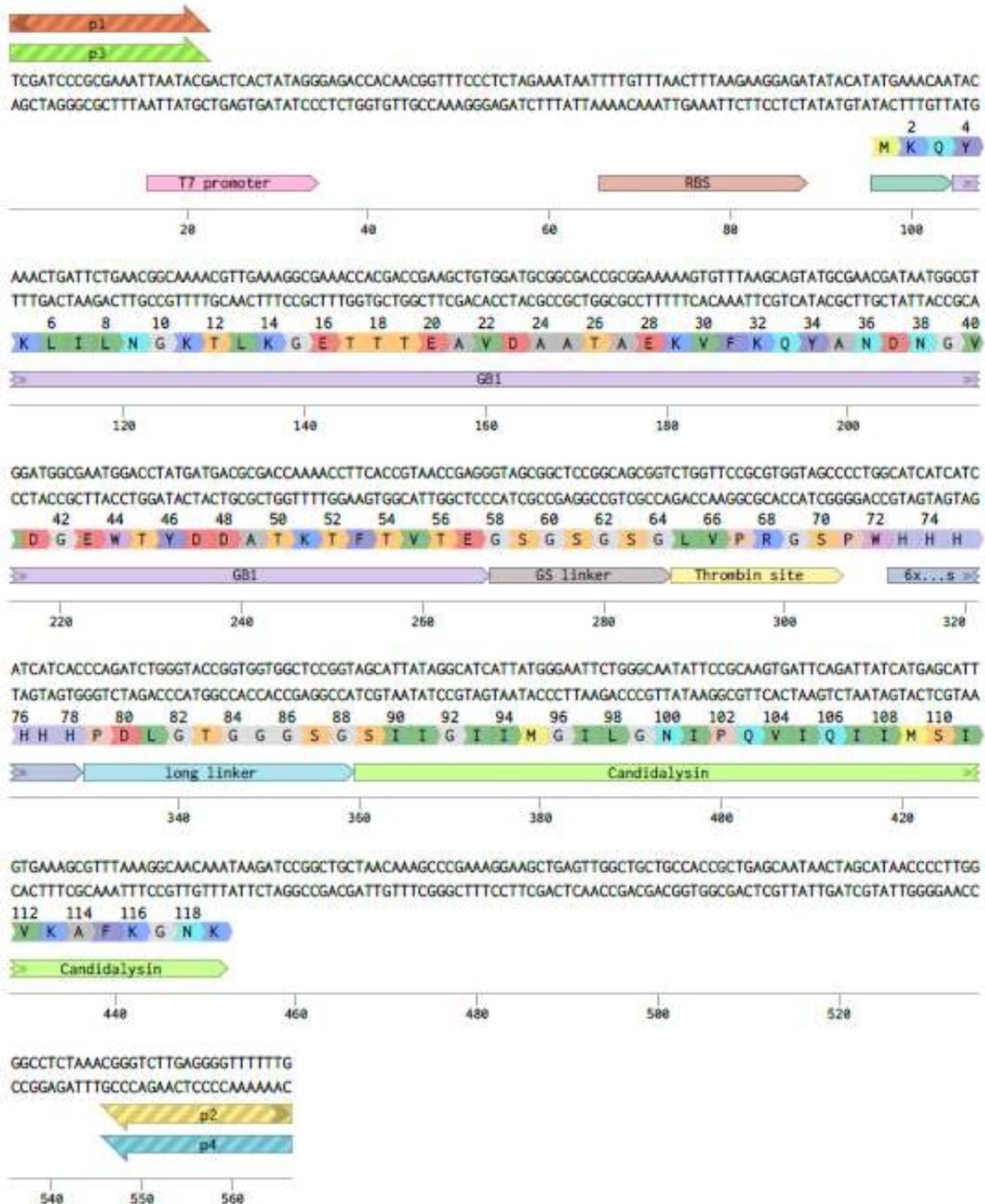


Figura 44. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción p99.