

Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*

Irene Castaño,* Brendan Cormack,** Alejandro De Las Peñas*

RESUMEN. *Candida glabrata* es un hongo patógeno oportunista responsable de aproximadamente el 15% de las candidosis hospitalarias. *C. glabrata* está más relacionada filogenéticamente con *Saccharomyces cerevisiae* que con *Candida albicans*, y algunas de las características identificadas como factores de virulencia en *C. albicans* no parecen tener un paralelo en *C. glabrata*, sin embargo ambas especies conservan algunas características que probablemente son importantes para la adaptación y supervivencia en el hospedero como comensales y patógenos oportunistas. Por ejemplo, ambas especies se adhieren a células epiteliales del hospedero con avidez. *C. glabrata* posee una familia grande de genes subteloméricos que codifican para proteínas de pared celular que median la adherencia. La expresión de estos genes está controlada por una regulación negativa que depende de la estructura de la cromatina llamada silenciamiento. *C. albicans* también posee varias proteínas de pared celular (adhesinas), pero su regulación es diferente al silenciamiento subtelomérico.

Recientemente se demostró que *C. albicans* posee un ciclo sexual críptico, y *C. glabrata* conserva intactos los genes esenciales para el apareamiento por lo que es posible que también posea un ciclo sexual altamente regulado. Tanto *C. albicans* como *C. glabrata* tienen también la capacidad de formar bio-películas, y de llevar a cabo cambios morfogenéticos que posiblemente les permita adaptarse rápidamente a los cambios dentro del hospedero y comportarse como patógenos oportunistas.

Palabras Clave: *Candida glabrata*, factores de virulencia, adherencia, silenciamiento subtelomérico, ciclo sexual críptico.

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista que normalmente se encuentra como comensal en las mucosas de individuos sanos, pero puede invadir tejidos más profundos y causar enfermedades graves cuando el sistema inmunológico del hospedero se encuentra atenuado. Algunos ejemplos son pacientes de cáncer sujetos a tratamiento de quimioterapia, pacientes de cirugía y receptores de transplantes de órganos tratados con inmuno-supresores (Krcmery, 1999).

C. glabrata además presenta una alta resistencia innata al agente fungistático fluconazol, que se utiliza como agen-

ABSTRACT. *Candida glabrata* is an opportunistic fungal pathogen that has become increasingly frequent in bloodstream and mucosal infections in immunocompromised patients. *C. glabrata* is phylogenetically more closely related to *S. cerevisiae* than to *C. albicans*, and some well identified virulence factors in *C. albicans* do not seem to be conserved in *C. glabrata*. However, other important traits are shared by both organisms, and these may play a role in the adaptation and survival in the host as opportunistic pathogens. Both species adhere tightly to host cells, and *C. glabrata* has a large family of subtelomeric genes encoding cell surface proteins that mediate this adherence. Expression of these genes is regulated by a chromatin-based negative regulation termed subtelomeric silencing. *C. albicans* also possesses several adhesins although they are not regulated by this mechanism.

C. albicans and *C. glabrata* have been considered asexual, but recent work has demonstrated the existence of a cryptic sexual cycle in *C. albicans*. The fact that *C. glabrata* contains all of the genes essential for mating suggests the possibility that *C. glabrata* might also have a tightly regulated sexual cycle. Both organisms can form biofilms and can undergo phenotypic switching which could be important for rapid adaptation to the changing environmental conditions encountered in the host as opportunistic pathogens.

Key words: *Candida glabrata*, virulence factors, adherence, subtelomeric silencing, cryptic sexual cycle.

te profiláctico en pacientes inmuno-comprometidos (Pfaller and Diekema, 2004). Las infecciones sistémicas por el género *Candida* son comunes en unidades de cuidados intensivos en hospitales tanto de Estados Unidos como en Europa y en México. El género *Candida* es responsable del 11% de todas las infecciones sistémicas hospitalarias, de las cuales más de la mitad se deben a *C. albicans* y el 15% de todas las candidosis se deben a *C. glabrata* (Almirante *et al.*, 2005; Manzano-Gayoso *et al.*, 2000; Trick *et al.*, 2002). En México también se ha reportado que el 12% de las vulvovaginitis y el 13% de las infecciones sistémicas por *Candida* se deben a *C. glabrata* (Buitrón García *et al.*, 2002; Manzano-Gayoso *et al.*, 2000).

Es importante entender a nivel molecular cuáles son los mecanismos de virulencia que le permiten a *C. glabrata* ser un patógeno tan exitoso con el fin de diseñar mejores estrategias de tratamiento para estas infecciones. A continuación revisaremos lo que sabemos actualmente acerca

* Departamento de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

** Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins University

de *C. glabrata* y los factores de virulencia que le permiten sobrevivir en su hospedero humano ya sea como comensal o como patógeno.

C. glabrata es una levadura haploide, filogenéticamente mucho más relacionada con *Saccharomyces cerevisiae* que con *C. albicans* (Wong *et al.*, 2003), por lo que todas las técnicas de biología molecular desarrolladas para *S. cerevisiae* se pueden utilizar en *C. glabrata*. Además es posible hacer estudios genéticos con facilidad ya que es haploide, y otra gran ventaja es que su genoma ha sido secuenciado totalmente y está disponible (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL/>). Con el análisis del genoma se ha determinado que el genoma de *C. glabrata* es de tamaño y características similares al de *S. cerevisiae* (Tabla 1).

Recientemente se han desarrollado herramientas de bioinformática que han permitido hacer estudios detallados de la composición genómica de *C. glabrata* comparada con los genomas ya secuenciados de otros hongos *Ascomycetes* levaduriformes. La página "Yeast Gene Order Browser" (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>) desarrollada en el laboratorio del Dr. K. Wolfe, muestra todos los genes anotados de *C. glabrata* comparados con los ortólogos correspondientes de *S. cerevisiae* y otras 3 levaduras secuenciadas. Con esta

Tabla 1. Características generales de los genomas de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.

Característica	<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Tamaño de genoma	12.3	12.1
No. de cromosomas	13	16
No. de genes	5283	5516
% contenido de G + C	38.8	38.3
% contenido de intrones	~1	~5

herramienta, encontramos que *C. glabrata* ha "especializado" su genoma, perdiendo selectivamente varios genes involucrados en ciertas vías metabólicas, es decir ha sufrido una "evolución reductiva". Así, por ejemplo *C. glabrata* ha perdido varios de los genes involucrados con la asimilación de algunos carbohidratos (sacarosa y galactosa), varios genes del metabolismo de nitrógeno, azufre y fosfato, así como muchos de los genes de la biosíntesis de las vitaminas tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (AN) (ver más adelante) (Byrne and Wolfe, 2005; Wolfe, 2006).

Por otra parte, varios patógenos eucariotes de humanos parecen no tener reproducción sexual, un ejemplo de éstos son *C. albicans* y *C. glabrata* que se han considerado asexuales desde que se describieron. Recientemente sin embargo, se descubrió que *C. albicans* posee genes similares a los que controlan el apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae* denominados *MTL* (*Mating-Type Like*), y que *C. albicans* es capaz de aparearse tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* en un modelo de candidosis sistémica de ratón (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000). El proceso de apareamiento en *C. albicans* está sujeto a mecanismos regulatorios únicos que incluyen un paso adicional de control en relación al apareamiento de *S. cerevisiae*, y se cree que el hecho de que *C. albicans* pueda aparearse tiene implicaciones en la virulencia y en la capacidad de colonizar diferentes sitios en el hospedero (Johnson, 2003). Para el caso de *C. glabrata*, que está mucho más relacionada filogenéticamente con *S. cerevisiae* que con *C. albicans*, aún no se ha encontrado un ciclo de reproducción sexual, pero igual que en el caso de *C. albicans*, recientemente se descubrió en *C. glabrata* la existencia de genes homólogos a los que controlan el apareamiento en *S. cerevisiae*, y que están dispuestos en una configuración muy similar (Srikantha *et al.*, 2003) (Fig. 1). *C. glabrata*, como *S. cerevisiae*, tiene tres loci

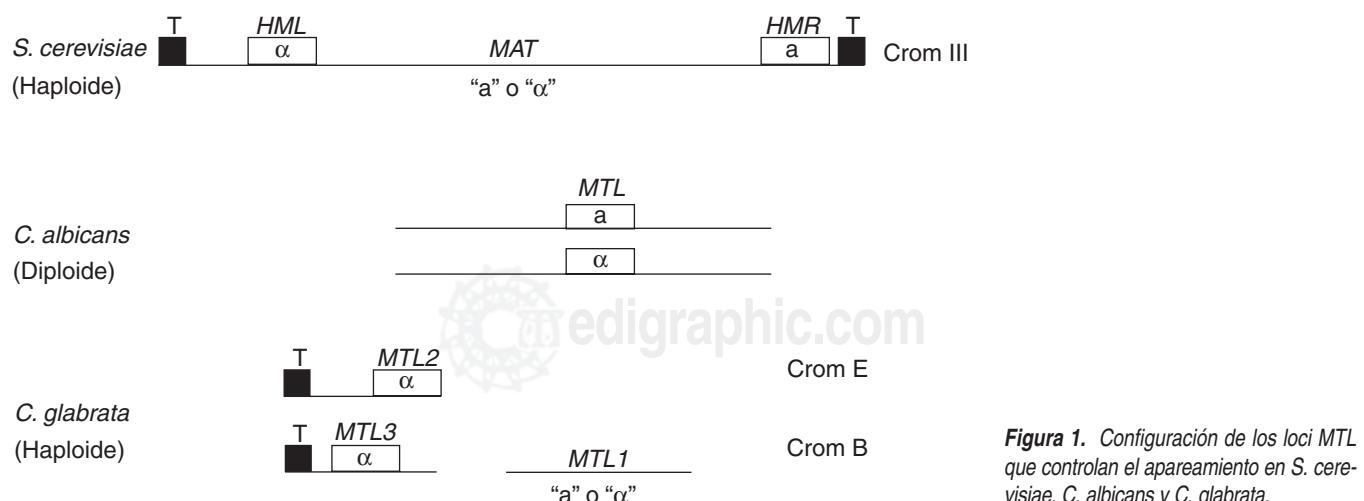


Figura 1. Configuración de los loci *MTL* que controlan el apareamiento en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata*.

que controlan el apareamiento denominados *MTL1*, *MTL2*, y *MTL3* de los cuales *MTL1* y *MTL3* se encuentran en el cromosoma B y *MTL2* en el cromosoma E. Se cree que *MTL1* es el locus que se expresa mientras que *MTL2* y *MTL3* se mantienen silenciosos. Es posible que *C. glabrata* posea un ciclo sexual críptico ya que posee todos los genes (ortólogos) indispensables para el apareamiento. La importancia de estos genes en la patogenia de *C. glabrata* aún no se conoce.

Otro de los factores de virulencia que se han identificado en *C. albicans*, es la secreción de aspartil-proteinasas extracelulares (SAPs) y fosfolipasas, sin embargo, en *C. glabrata*, la secreción de estas enzimas no parecen tener un papel tan importante en la virulencia ya que no se ha detectado actividad extracelular en aislados clínicos (Kantarcioğlu and Yucel, 2002). Otros factores importantes documentados en *C. albicans*, es por un lado la capacidad de sufrir cambios morfogenéticos que se manifiestan como colonias de diferentes formas, así como crecer forma dimórfica, es decir, bajo ciertas condiciones se induce la formación de hifas y tubos germinales. Se ha reportado que *C. glabrata* también forma pseudo hifas en respuesta a limitación de nitrógeno (Csank and Haynes, 2000), y puede sufrir cambios morfogenéticos que se observan como

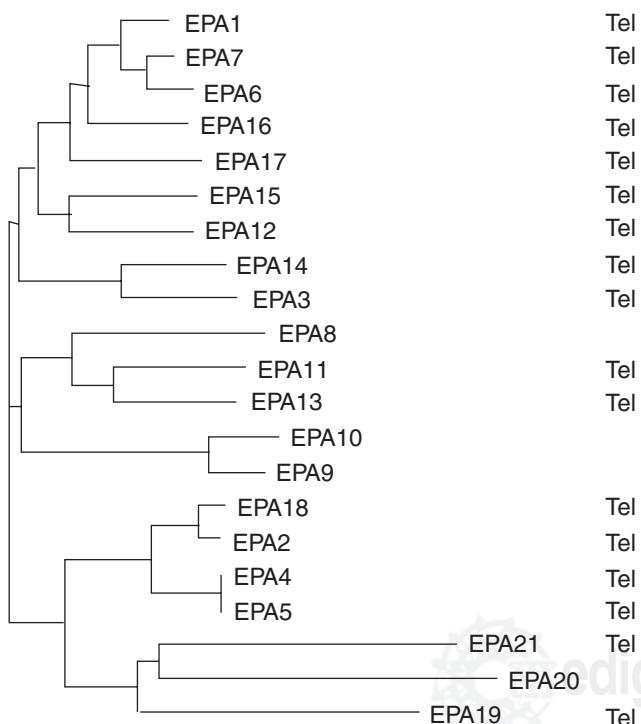


Figura 2. Familia de genes que codifica para proteínas de pared celular relacionadas con el gen *EPA1*. Muchos de ellos se encuentran localizados en regiones subteloméricas (marcados con "tel").

colonias de diferentes colores en cajas que contienen sulfato de cobre, así como otro tipo de cambios morfogenéticos (Lachke *et al.*, 2002). Será importante determinar si los cambios morfológicos son importantes para la adaptación rápida de *C. glabrata* a diferentes ambientes de estrés en el hospedero, como se ha sugerido.

Uno de los factores de virulencia que hemos identificado es la capacidad que presenta *C. glabrata* para adherirse con avidez a células epiteliales de mamíferos *in vitro*. Esta capacidad depende del gen, *EPA1* (*Epithelial Adhesin 1*), que codifica para una proteína de pared celular. Mutaciones en este gen, resultan en pérdida de la adherencia de *C. glabrata* a células epiteliales *in vitro*. Ahora sabemos que el genoma de *C. glabrata* tiene más de 20 genes homólogos a *EPA1*, algunos de los cuales hemos demostrado que codifican para adhesinas (Fig. 2). La mayoría de estos genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas del genoma y ésta localización tiene implicaciones importantes para su expresión ya que están regulados negativamente mediante silenciamiento subtelomérico, de manera que *in vitro*, todos los genes se encuentran silenciosos excepto *EPA1* (Castaño *et al.*, 2005; De Las Peñas *et al.*, 2003). El silenciamiento subtelomérico, por posición cercana al telómero (TPE), se ha descrito en *S. cerevisiae* y se sabe que participan una serie de proteínas tales como Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rap1p, Ku70p Ku80p y Rif1p (Rusche *et al.*, 2003). En *S. cerevisiae*, el silenciamiento subtelomérico comienza cuando la proteína Rap1p se une a una serie de sitios de reconocimiento en los telómeros. Rap1p recluta a su vez el complejo formado por Sir3p y Sir4p que a su vez reclutan a Sir2p. La proteína Sir2p es una desacetilasa de histonas que utiliza como cofactor NAD⁺. Esta desacetilasa quita grupos acetilo de las histonas H3 y H4 que se encuentran en los nucleosomas aledaños a los telómeros y favorece la formación de una estructura cerrada de la cromatina que no es favorable para la transcripción (cromatina silenciosa).

Tenemos evidencia de que al menos 4 telómeros en *C. glabrata* (los genes *EPA1-7*), están sujetos a silenciamiento subtelomérico controlado por los genes *SIR*, *RAP1* y *RIF1* (Castaño *et al.*, 2005; De Las Peñas *et al.*, 2003). Mutantes en estos genes eliminan el silenciamiento subtelomérico, y las células se tornan hiper-adherentes debido a que se expresan varios genes *EPA*. La expresión de adhesinas es importante para la virulencia *in vivo*, porque una cepa que lleva una delección de *sir3*, presenta un incremento de aproximadamente 3 veces en la colonización del riñón en un modelo de infección sistémica en ratones (Castaño *et al.*, 2005). Por otra parte, una cepa que no contiene ninguno de los genes *EPA1*, *EPA6*, y *EPA7*, no coloniza eficientemente el riñón y la vejiga en un modelo de infección de vías urinarias del ratón (Domergue *et al.*, 2005).

Estos datos apuntan a la importancia de las adhesinas Epa1p, Epa6p y Epa7p en la virulencia de *C. glabrata*. Interesantemente, hemos determinado que *EPA6* se induce en la vejiga y el riñón durante una infección de vías urinarias del ratón. En este caso, la señal importante para la desrepresión de *EPA6*, es la deficiencia de niacina o ácido nicotínico (AN) en orina (Domergue *et al.*, 2005).

Otra característica importante de *C. glabrata* es que presenta una alta capacidad de formar biofilms en superficies de plástico, y la adhesina más importante para este fenómeno es *EPA6*. Así mismo, mutaciones en *SIR4* (que afectan silenciamiento), forman biofilms con una mayor eficiencia, presumiblemente debido a la sobre-expresión de *EPA6* (Iraqui *et al.*, 2005). Estos resultados pueden tener importantes implicaciones clínicas ya que muchas de las infecciones están asociadas con catéteres implantados.

REFERENCIAS

- Almirante, B., Rodriguez, D., Park, B.J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A.M., Almela, M., Mensa, J., Sanchez, F., Ayats, J., Gimenez, M., Saballs, P., Fridkin, S.K., Morgan, J., Rodriguez-Tudela, J.L., Warnock, D.W., and Pahissa, A. (2005) Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 43: 1829-1835.
- Buitron Garcia, R., Romero Cabello, R., Cruz Talonia, F., Bonifaz, A., and Zarama Marquez, F. (2002) [Study on *Candida* non-albicans species and its relation to recurrent vulvovaginal candidiasis]. *Ginecol Obstet Mex* 70: 431-436.
- Byrne, K.P., and Wolfe, K.H. (2005) The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* 15: 1456-1461.
- Castaño, I., Pan, S.J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., and Cormack, B.P. (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 55: 1246-1258.
- Csank, C., and Haynes, K. (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* 189: 115-120.
- De Las Peñas, A., Pan, S.J., Castaño, I., Alder, J., Cregg, R., and Cormack, B.P. (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 17: 2245-2258.
- Domergue, R., Castano, I., De Las Penas, A., Zupancic, M., Lockatell, V., Hebel, J.R., Johnson, D., and Cormack, B.P. (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308: 866-870.
- Hull, C.M., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289: 307-310.
- Iraqui, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J.M., d'Enfert, C., and Janbon, G. (2005) The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* 55: 1259-1271.
- Johnson, A. (2003) The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol* 1: 106-116.
- Kantarcioglu, A.S., and Yucel, A. (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45: 160-165.
- Krcmery, V. (1999) *Torulopsis glabrata* an emerging yeast pathogen in cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* 11: 1-6.
- Lachke, S.A., Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K., and Soll, D.R. (2000) Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infect Immun* 68: 884-895.
- Lachke, S.A., Joly, S., Daniels, K., and Soll, D.R. (2002) Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* 148: 2661-2674.
- Magee, B.B., and Magee, P.T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTLα and MTLα strains. *Science* 289: 310-313.
- Manzano-Gayoso, P., Hernandez-Hernandez, F., Bazan-Mora, E., Mendez-Tovar, L.J., Gonzalez-Monroy, J., and Lopez-Martinez, R. (2000) [Identification and typing of yeast isolates from hospital patients in Mexico City]. *Rev Argent Microbiol* 32: 1-6.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2004) Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1: 11-23.
- Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., and Rine, J. (2003) The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 72: 481-516.
- Srikantha, T., Lachke, S.A., and Soll, D.R. (2003) Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 2: 328-340.
- Trick, W.E., Fridkin, S.K., Edwards, J.R., Hajjeh, R.A., and Gaynes, R.P. (2002) Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35: 627-630.
- Wolfe, K.H. (2006) Comparative genomics and genome evolution in yeasts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 403-412.
- Wong, S., Fares, M.A., Zimmermann, W., Butler, G., and Wolfe, K.H. (2003) Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* 4: R10.

Correspondencia:

Irene Castaño.

Departamento de Biología Molecular,
Instituto Potosino de Investigación
Científica y Tecnológica.
Camino a la Presa San José Núm. 2055
Col. Lomas 4^a 78216,
San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
Tel: (01) (444) 834-2000 ext. 2054.
FAX: (01) (444) 834-2010.
E-mail: icastano@ipicyt.edu.mx