

Sergio Redrado Hernández

Desarrollo de inmunoterapia  
basada en nanobodies frente a  
glucanosiltransferasas para el  
tratamiento de infecciones  
fúngicas invasivas

Director/es

Pardo Jimeno, Julián  
Galvez Buerba, Eva María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

## Tesis Doctoral

# DESARROLLO DE INMUNOTERAPIA BASADA EN NANOBODIES FRENTE A GLUCANOSILTRANSFERASAS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES FÚNGICAS INVASIVAS

Autor

Sergio Redrado Hernández

Director/es

Pardo Jimeno, Julián  
Galvez Buerba, Eva María

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2023





**Universidad**  
Zaragoza

## Tesis Doctoral

Desarrollo de inmunoterapia basada en  
nanobodies frente a glucanosiltransferasas para  
el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas

Autor

Sergio Redrado Hernández

Director/es

Eva María Gálvez Buerba  
Julián Pardo Jimeno

Facultad de Ciencias  
Año 2023

# Desarrollo de inmunoterapia basada en nanobodies frente a glucanosiltransferasas para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas

Autor

Sergio Redrado Hernández

Directores

Eva María Gálvez Buerba

Julián Pardo Jimeno



## Agradecimientos

Las siguientes páginas son el resultado de varios años de trabajo, estudio e investigación, algo que, desde luego, no ha sido, en absoluto, en solitario. Muy al contrario, han sido años de estar acompañado por muchas personas que lo han hecho posible: desde aquellas que me han guiado y orientado en este largo camino que es la tesis; pasando por aquellas con las que he trabajado codo con codo en el laboratorio; hasta aquellas que han sido soporte en mi día a día.

En primera instancia, quiero agradecer su esfuerzo y dedicación a mis directores de tesis, Eva y Julián, quienes han conformado uno de los mejores grupos de investigación de Aragón, donde por un azar del mundo aterricé. Ellos son los que han sabido transmitir su pasión por la ciencia tanto a mí como al resto de mis compañeros del grupo.

A ellos y a ellas también quiero expresar mi gratitud, sobre todo, por el buen ambiente que se respira en los laboratorios, tanto en el CIBA como en Carboquímica. También por su compañerismo y cooperación, que han servido para sacar todos estos experimentos adelante.

Veo necesario mencionar a mis compañeros de la fábrica por su buena disposición, su comprensión y empatía, las cuales han hecho posible verse realizada la pasión de mi vida, esto es, cultivar hongos, ya sea en una placa de Petri, en el interior de un fermentador para hacer cerveza o dentro de un ratón.

No puedo olvidarme de mi familia. A mi padre y a mi madre por todo el soporte que me han brindado todos estos años. A mi padre, que ahora no está entre nosotros, pero sí está presente pues a él le debo toda mi capacidad para arreglar máquinas y cachivaches. Solo lamentar no haber podido absorber más conocimientos de los que ya no están. A mi madre por su coraje y valentía que me ha transmitido durante toda mi vida, así como por el cariño y amor que siempre me ha regalado. También mencionar a mi hermano y a mis “sobris”, que quieren ser futuros científicos como su tío. No saben dónde se están metiendo.

En último lugar, agradecer a mi novia Azahara, compañera de aventuras e hipotecas, haber estado a mi lado durante todo este largo viaje que ha sido la tesis. Sin su fuerza y apoyo no habría sido posible para mí llegar hasta este momento en el que estoy escribiendo estas últimas líneas que concluyen este trayecto. Ha sido un punto de apoyo clave, tanto moral como intelectualmente. Filósofa y profesora hasta la médula, ha sabido transmitir, tanto a mí como a sus alumnos de instituto, toda la pasión por la filosofía, la ética y el conocimiento que ella desprende. De igual manera, le agradezco saber soportar las chapadas sobre temas bio que reparto. *Amor omnia vincit.*



# Contenido

<b>1. Introducción .....</b>	<b>9</b>
1.1. Enfermedades fúngicas invasoras .....	9
1.1.1. Definición y agentes etiológicos.....	9
1.1.2. Morbilidad y mortalidad .....	10
1.1.3. Individuos en riesgo .....	11
1.1.4. Mecanismo de entrada e interacciones con el hospedador .....	11
1.1.5. Diagnóstico.....	13
1.1.6. Tratamiento.....	15
1.1.7. Limitaciones.....	18
1.2. <i>Aspergillus spp.</i> y aspergilosis .....	21
1.2.1. <i>Aspergillus spp.</i> .....	21
1.2.1.1. Taxonomía y distribución .....	22
1.2.1.2. Función en el ecosistema .....	23
1.2.1.3. Reproducción .....	25
1.2.1.4. Pared celular de <i>Aspergillus</i> .....	28
1.2.1.5. Metabolismo secundario.....	36
1.2.1.6. Aplicaciones.....	38
1.2.2. Aspergilosis.....	39
1.2.3. Patobiología de la aspergilosis y respuesta inmunológica .....	40
1.2.4. Modelos murinos de aspergilosis.....	43
1.3. <i>Cryptococcus spp.</i> y criptococosis .....	46
1.3.1. <i>Cryptococcus spp.</i> .....	46
1.3.1.1. Taxonomía y distribución .....	46
1.3.1.2. Papel en el ecosistema .....	47
1.3.1.3. Reproducción .....	48
1.3.1.4. Pared celular de <i>Cryptococcus</i> .....	51
1.3.1.5. Cápsula de <i>Cryptococcus</i> .....	57
1.3.2. Criptococosis .....	61
1.3.3. Patobiología de la criptococosis y respuesta inmunológica.....	63
1.3.4. Modelos murinos de criptococosis .....	66
2. Antecedentes y objetivos .....	69
3. Materiales y métodos .....	71
3.1. Producción y caracterización de Nbs de alpaca frente a <i>Gel4</i> .....	71
3.1.1. Producción de <i>Gel4</i> glicosilada y deglicosilada en <i>Picchia pastoris</i> .....	71

3.1.2. Inmunización de una alpaca, aislado de PBLs y amplificación de las secuencias V <sub>HH</sub> . ....	73
3.1.3. Phage display ....	74
3.1.4. Producción de Nbs en <i>E. coli</i> WK6.....	76
3.1.5. Caracterización de la unión de los Nbs a <i>Gel4</i> mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	77
3.1.6. Caracterización de la actividad transglicosilasa <i>in vitro</i> de <i>Gel4</i> y la capacidad inhibitoria de los Nbs. ....	78
3.2. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Aspergillus</i> y <i>Cryptococcus</i> por acción de los Nbs anti <i>Gel4</i> .....	79
3.2.1. Cultivo de <i>Aspergillus</i> y producción de conidias. ....	80
3.2.2. Cultivo de <i>Cryptococcus</i> .....	81
3.2.3. Cepas y aislados clínicos de <i>Aspergillus</i> y <i>Cryptococcus</i> . ....	82
3.2.4. Ensayo de sensibilidad a fármacos basado en la reducción de XTT.....	83
3.2.5. Determinación de sinergias del Nb3 con otros antifúngicos de uso común en clínica. ....	86
3.3. Estudio de la dinámica del Nb3 en la pared fúngica y la cápsula de <i>Cryptococcus</i> . ....	89
3.4. Estudio de la composición de azúcares simples de la pared de <i>Cryptococcus</i> ..	96
3.5. Modelo de aspergilosis y criptococosis en nemátodos.....	99
3.5.1. Manejo y cultivo básico de <i>C. elegans</i> . ....	102
3.5.2. Sincronización. ....	103
3.5.3. Modelo de infección por <i>Aspergillus</i> en <i>C. elegans</i> . ....	105
3.5.4. Modelo de infección por <i>Cryptococcus</i> en <i>C. elegans</i> .....	106
3.5.5. Ensayos de muerte o eficacia antifúngica en <i>C. elegans</i> .....	107
3.6. Modelos murinos de aspergilosis y criptococosis .....	108
3.6.1. Modelo murino de aspergilosis.....	108
3.6.1.1. Ensayo de eficacia del Nb3 como tratamiento de la aspergilosis invasiva en ratones BALB/c.....	110
3.6.1.2. Ensayo de eficacia del Nb3 administrado profilácticamente en ratones BALB/c con aspergilosis invasiva. ....	111
3.6.1.3. Carga fúngica en homogenizados de pulmón. ....	111
3.6.1.4. Determinación de niveles de gliotoxina y bismetilgliotoxina en biopsias de pulmón. ....	112
3.6.1.5. Estudio comparativo de la eficacia del Nb3 respecto a AMB y VCZ en modelo murino de aspergilosis. ....	113
3.6.1.6. Tinciones de hematoxilina eosina en cortes histológicos. ....	114
3.7.1. Modelo murino de criptococosis. ....	114

3.7.1.1.	Ensayo de eficacia del Nb3 como tratamiento de la CI en ratones BALB/c..	115
3.7.1.2.	Ensayo de eficacia del Nb3 administrado profilácticamente en ratones BALB/c con CI.	116
3.7.1.3.	Tratamiento tardío con Nb3 en ratones con CI.....	117
3.7.1.4.	Carga fúngica en homogenizados de cerebro y pulmón.....	117
3.7.1.5.	Dinámica del Nb3 a través de la barrera hematoencefálica.....	117
3.7.1.6.	Tinciones de HE en cortes histológicos.....	118
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>119</b>
4.1.	Producción y caracterización de Nbs frente a <i>Gel4</i> . .....	119
4.1.1.	Generación de Nbs frente a <i>Gel4</i> .....	119
4.1.2.	Caracterización de la unión de los Nbs a <i>Gel4</i> mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	121
4.1.3.	Determinación de las propiedades inhibitorias de los Nbs frente a <i>Gel4</i> .....	124
4.2.	Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>Aspergillus spp.</i> y <i>Cryptococcus spp. in vitro</i> . .....	125
4.2.1.	Sensibilidad de <i>A. fumigatus</i> , <i>C. neoformans</i> y <i>C. deneoformans</i> a Nb2, Nb3, Nb4 y NbSseK1. .....	126
4.2.2.	Inhibición del crecimiento de otras especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Cryptococcus</i> por parte del Nb3. .....	128
4.2.3.	Estudio comparativo de la eficacia de fármacos usados en clínica con el Nb 3. ..	131
4.2.4.	Sinergismo del Nb3 con otros fármacos de uso común en clínica.....	134
4.3.	Dinámica del Nb3 a través de la cápsula de <i>Cryptococcus</i> .....	136
4.4.	Estudio de la composición de la pared de <i>Cryptococcus</i> .....	139
4.5.	Modelos de aspergilosis y criptococosis en nemátodos. .....	142
4.6.	Modelos murinos de aspergilosis y criptococosis. .....	147
4.6.1.	Modelo murino de aspergilosis.....	148
4.6.1.1.	Eficacia del Nb3 como tratamiento profiláctico contra la AI. .....	148
4.6.1.2.	Eficacia del Nb3 como tratamiento de la AI.....	149
4.6.1.3.	Determinación de los niveles de GT y bmGT en biopsias de pulmón mediante cromatografía líquida. .....	151
4.6.1.4.	Estudio comparativo de la eficacia del Nb 3 como tratamiento de la AI frete a otros fármacos de uso común.....	152
4.6.1.5.	Tinciones de HE de pulmones de ratones afectados por aspergilosis. .....	153
4.6.2.	Modelo murino de criptococosis. .....	157
4.6.2.1.	Eficacia del Nb3 usado como profiláctico en la CI.....	157
4.6.2.2.	Eficacia del Nb3 como tratamiento de la CI.....	159
4.6.2.3.	Eficacia del Nb3 administrado tardíamente en ratones con criptococosis...	161

4.6.2.4. Distribución del Nb3 en pulmones y cerebros de ratones infectados con <i>C. deneoformans</i> .....	162
4.6.2.5. Tinciones de HE en pulmones y cerebros de ratones afectados por criptococosis.....	163
<b>5. Discusión .....</b>	<b>168</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>187</b>
<b>7. Abreviaturas.....</b>	<b>188</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>190</b>
8.1. Sensibilidad de <i>C. deneoformans</i> 1229817 a VCZ .....	190
8.2. Diferencias en la sensibilidad al Nb3 y a la CSF entre cepas con cápsula y acapsulares .....	191
8.3. Tinciones de plata-metenamina en cortes de pulmones infectados con <i>C. deneoformans</i> .....	192
<b>9. Bibliografía .....</b>	<b>193</b>

# 1. Introducción

## 1.1. Enfermedades fúngicas invasoras

### 1.1.1. Definición y agentes etiológicos

Las enfermedades fúngicas invasoras (EFIs) son aquellas causadas por mohos y levaduras oportunistas de múltiples géneros en las que logran diseminarse a otros órganos del hospedador más allá de los afectados inicialmente<sup>1</sup>. Entre esos hongos se encuentran *Mucorales spp.*, *Blastomyces spp.*, *Pneumocystis spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* o *Aspergillus spp.*; siendo las provocadas por las especies de estos tres últimos géneros las que mayor incidencia y/o mortalidad presentan<sup>2-4</sup>. De hecho, la Organización Mundial de la Salud ha clasificado recientemente a *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Candida Auris* en el grupo de prioridad crítica de la lista de patógenos fúngicos con el objetivo de inducir más atención en la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos y métodos diagnósticos ante el incremento del número de casos que está sucediendo en las últimas décadas debido, entre otras razones, al incremento en el uso de tratamientos inmunosupresores en diversas patologías<sup>5</sup>. *C. neoformans*, *A. fumigatus* y *C. albicans* son los principales causantes de las criptococosis, aspergilosis y candidiasis invasivas, respectivamente<sup>2,4,6-8</sup>.

En el caso de la **aspergilosis invasiva (AI)**, que es la enfermedad causada por las especies del género *Aspergillus*, *A. fumigatus* es identificado como el causante mayoritario de dicha enfermedad, llegando a representar hasta el 92% de los aislados, mientras que otras especies como *A. terreus*, *A. niger* o *A. flavus* son aisladas de manera minoritaria en el resto de los casos<sup>9</sup>.

La **criptococosis invasiva (CI)**, que es el término general con el que se designan a las diferentes enfermedades criptococicas invasivas (principalmente neumonía y meningitis), también es causada en su mayoría por una especie, *C. neoformans* (antiguamente serotipo A), aunque su prevalencia varía mucho en función de la población y la región geográfica<sup>10-12</sup>. No obstante, *C. deneoformans* (antiguo serotipo D) sigue teniendo relevancia clínica ya que es el responsable de un número representativo de los casos en países de Europa<sup>13,14</sup>. También cabe destacar a *C. gatti* (antiguo serotipo B), cuya prevalencia es mucho mayor en países cálidos con climas tropicales<sup>15</sup>.

Por último, mencionar que las infecciones fúngicas más comunes son aquellas causadas por especies del género *Candida*<sup>6</sup>. Aunque en la mayoría de los casos cursan como enfermedades de piel y mucosas sin especial gravedad en pacientes inmunocompetentes, una parte

representativa de los casos son candidiasis invasoras. De hecho, el cuarto patógeno más frecuente en aislados de sangre en Estados Unidos es *Candida*<sup>6,16</sup>. Entre las especies del género *Candida*, *C. albicans* es la especie más frecuente con hasta el 62% de los casos. Otras especies no-albicans como *C. auris*, *C. krusei* o *C. glabrata* también son importantes debido al incremento de casos acaecido en los últimos años<sup>6</sup>.

### 1.1.2. Morbilidad y mortalidad

Se estima que las enfermedades fúngicas afectan a más de 1000 millones de personas en el mundo y que provocan la muerte a 1.5-2 millones de personas al año<sup>2,8,16</sup>. Aunque la mayor parte de los casos corresponden a infecciones de piel, pelo, uñas y mucosas, y no son de especial gravedad, la práctica totalidad de las muertes asociadas a enfermedades fúngicas corresponden a EFIs provocadas por *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* o *Aspergillus spp.*<sup>8,16,17</sup>.

En el caso de *Aspergillus*, se estima que entre 15 y 30 millones de personas padecen alguna enfermedad relacionada con este hongo, aunque en la mayoría de los casos se trata de aspergilosis alérgica, sinusitis o enfermedad pulmonar crónica<sup>6</sup>. Sin embargo, en su variante invasiva se calcula que se dan más de 300000 casos nuevos todos los años, con una mortalidad que ronda entre el 50% y el 90% de los casos detectados en función de la patología primaria del paciente<sup>6,18</sup>.

*Cryptococcus spp.*, causante de la CI, genera en torno a un millón de casos al año<sup>19</sup>. De ellos, en torno al 50% son asociados a VIH, mientras que la otra mitad se deben a otros factores como la infección durante el trasplante de órganos<sup>6,19</sup>. Además, se estima que alrededor del 25% de las muertes asociadas a VIH son causadas por *Cryptococcus spp*<sup>20,21</sup>. Hay que destacar que la CI puede acabar desarrollándose como meningitis, donde la mortalidad se dispara hasta más del 60% de los casos y es del 100% si los pacientes no reciben tratamiento<sup>20,22,23</sup>.

*Candida spp.*, a diferencia de *Aspergillus spp.* y *Cryptococcus spp.*, forma parte de la flora de piel, mucosas y tractos digestivos y genitourinarios donde coexiste con el resto de la microbiota<sup>24,25</sup>. En individuos sanos, la relación de *Candida* con el hospedador es simple comensalismo, aunque la rotura de las barreras físicas, desregulaciones en la composición de la flora o la alteración del sistema inmunológico puede llevar a que se comporte como patógeno oportunista y acabe generando infección<sup>24</sup>. No obstante, en la mayoría de los casos, las infecciones que cursa son de carácter leve ya que el hospedador puede acabar eliminando la infección. Entre las formas más leves de infección, se encuentran las candidiasis orofaríngeas y del tracto genitourinario, con hasta 150 millones de casos al año entre todas<sup>16,24</sup>. Por el contrario, la candidiasis invasiva cursa

con un carácter mucho más grave y suele acabar generando sepsis, acumulando tasas de mortalidad de hasta el 70% y causando casi un millón de casos al año<sup>16,26,27</sup>.

### 1.1.3. Individuos en riesgo

En general, las enfermedades fúngicas pueden afectar a casi cualquier persona del mundo, aunque, suelen ser de carácter leve o incluso asintomáticas. No obstante, los individuos con riesgo de contraer algunaEFI son pacientes que padecen algún tipo de inmunosupresión<sup>7,17</sup>. Entre los factores de riesgo asociados a las EFIs se encuentran los tratamientos inmunosupresores para enfermedades autoinmunes o para evitar rechazo de órganos trasplantados, las terapias de inducción para el tratamiento de leucemias, las propias leucemias, cirugías mayores, trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, linfopenias y neutropenias, así como otras inmunodeficiencias innatas o adquiridas, como puede ser la generada por infección por VIH<sup>6-8,26-35</sup>. Por tanto, siempre suele haber una enfermedad subyacente que, intrínsecamente o derivado de su tratamiento, compromete el sistema inmunológico del hospedador. Las mermas en las poblaciones de ciertos tipos de células del sistema inmunológico, como macrófagos, neutrófilos o linfocitos; o una mal función de éstas, es lo que en definitiva decanta la balanza en favor del patógeno.

No obstante, cabe destacar que en los últimos años se vienen reportando casos de enfermedades fúngicas invasoras en pacientes, a priori, no inmunocomprometidos<sup>27,36-45</sup>. Sin embargo, la proporción y la gravedad de dichos casos en pacientes inmunocompetentes es, en general, menor que en pacientes inmunocomprometidos.

### 1.1.4. Mecanismo de entrada e interacciones con el hospedador

La principal forma de entrada al organismo del hospedador en el caso de *Cryptococcus spp.* y *Aspergillus spp.* es a través de la respiración<sup>10,34,35,46</sup>. La colonización comienza de modo natural cuando el hospedador inhala las conidias (*Aspergillus*) o las basidiosporas (*Cryptococcus*) y éstas se acaban depositando sobre el tracto respiratorio de éste<sup>34,46</sup>. Los eventos de respirar esporas son más comunes de lo que cabría de esperar, ya que ambos hongos, aunque en especial *Aspergillus*, son ubicuos<sup>47</sup>. Tanto en interiores como en exteriores, la concentración de esporas de *Aspergillus* en el aire ronda las 100 esporas por metro cúbico, con lo que un humano medio inhala al día en torno a 100 esporas<sup>47,48</sup>. No obstante, otras vías de entrada como la parenteral, gastrointestinal o incluso a través de traumatismos también han sido documentadas<sup>34-36,47</sup>.

Aunque en un primer momento se enfrentan al sistema mucociliar del hospedador, pueden acabar atravesándolo y, una vez han alcanzado los alvéolos, comienza la interacción con el sistema inmunológico del hospedador<sup>46</sup>. Los macrófagos alveolares presentes en la zona de infección fagocitan las esporas de ambos organismos o las células ya generadas en el caso de *Cryptococcus spp.* acabando con la presencia de éstos en un hospedador inmunocompetente<sup>34,35,46</sup>. Aunque ambos hongos tienen armas para combatir contra el sistema inmunológico, como la secreción de gliotoxina (GT), que es una toxina con efectos inmunomoduladores, en el caso de *Aspergillus*; o la cápsula que envuelve a *Cryptococcus* y que le protege de la fagocitosis; por norma general, el sistema inmunológico del hospedador acaba eliminándolos<sup>34,46</sup>. Sin embargo, incluso en pacientes sanos e inmunocompetentes, es relativamente frecuente que dichos hongos pueden acabar desarrollándose y manteniendo una enfermedad latente en forma de granuloma pulmonar durante años, esperando el momento en el que se debiliten las defensas del sistema inmunológico del hospedador para diseminarse por otros órganos y tejidos y provocar unaEFI<sup>34,46</sup>. Por el contrario, si el sistema inmunológico del hospedador ya está debilitado, mermado o es disfuncional, la invasión del resto del pulmón y el salto a la sangre es inminente, diseminándose desde ahí al resto de órganos a los que pueden acabar afectando y reduciendo las posibilidades de supervivencia enormemente<sup>6-8,10,32,34,35,46,49</sup>.

La infección por *Candida spp.* merece ser discutida aparte ya que, a diferencia de las infecciones causadas por *Aspergillus spp.* y *Cryptococcus spp.*, *Candida spp.* es una levadura comensal que es integrante de la microbiota normal de piel, el tracto intestinal o el tracto genitourinario<sup>50</sup>. De hecho, se estima que *Candida spp.* puede ser aislado en la microbiota de hasta el 75% de las personas<sup>50,51</sup>. Sin embargo, cambios en la composición de la microbiota que lleven a *Candida spp.* a ser predominante, la rotura de las barreras físicas que contienen a estos microorganismos o alteraciones en el sistema inmunológico del hospedador conducen al cambio de comensal a oportunista<sup>51</sup>. Por tanto, es en los tejidos en los que está presente como comensal, donde más frecuente es que se dé una infección, siendo la candidiasis orofaríngea y vulvovaginal sus manifestaciones clínicas más frecuentes<sup>26,50,51</sup>.

Normalmente, *Candida spp.* coexiste en la flora en forma de levadura unicelular, lo que le ayuda a diseminarse por el resto de la mucosa que coloniza<sup>50,52</sup>. Ciertos cambios ambientales como el pH alcalino, la temperatura, la hipoxia o la presencia de cantidades altas de N-acetil glucosamina pueden inducir el cambio morfológico de levadura a hifa, con la consiguiente expresión de factores de virulencia como adhesinas, enzimas que degradan los tejidos o proteínas antioxidantes de carácter defensivo, asociados a la morfología de hifa<sup>52</sup>. Aunque se desconocen todos los factores que inducen el cambio morfológico en *Candida spp.*, son las hifas las que

pueden infectar la mucosa y llegar a partes más internas de ésta<sup>52</sup>. No obstante, aunque se asocie tradicionalmente la morfología con la patogenicidad, cuando se disemina la enfermedad es común encontrar células de todas las morfologías<sup>52</sup>. Según avanza la enfermedad y si no puede ser parada por el sistema inmunológico del hospedador, las hifas acaban alcanzando el torrente sanguíneo<sup>27</sup>. Sin embargo, las células que habitualmente circulan por el torrente sanguíneo y que lo utilizan como medio de transporte para alcanzar otros órganos y diseminarse son de aspecto levaduriformes<sup>50,52</sup>. Una vez que se produce candidemia en el paciente, el riesgo para la vida de éste aumenta muchísimo y la candidiasis invasiva es inminente<sup>27</sup>. Las infecciones que se localizan en tejidos, por norma general, no suelen ser de especial gravedad y pueden ocurrir en pacientes no inmunocomprometidos<sup>26,27,50</sup>. No obstante, si esa infección se descontrola y acaba desarrollándose como invasiva, las probabilidades de supervivencia descienden drásticamente<sup>27,50</sup>.

### 1.1.5. Diagnóstico

Uno de los factores más importantes, y que afecta en gran medida al resultado final de las EFIs en cada paciente afectado, es la obtención de un diagnóstico precoz<sup>53-56</sup>. Debido a la complejidad en el diagnóstico de las EFIs, en especial la AI, así como a los preocupantes datos de mortalidad de estas enfermedades, durante décadas la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC) en conjunto con el Grupo de Estudio de Micosis (MSG) han ido generando y actualizando una serie de definiciones y criterios con el objetivo de mejorar y unificar el diagnóstico de las EFIs<sup>54,56</sup>. De acuerdo a la clasificación de la EORTC/MSG, las EFIs se clasifican en posible, probable y probada en función de una serie de evidencias y criterios clínicos, micológicos y del hospedador<sup>54,56</sup>.

Cuando la EORTC/MSG habla de los **factores del hospedador**, se refiere a características de cada paciente que le hacen estar claramente predispuesto a padecer una EFI<sup>54</sup>. En general, un estado deteriorado o abolido del sistema inmunológico del hospedador, ya sea de una manera innata o inducida, determina los factores del hospedador. Por ejemplo, bajos recuentos de neutrófilos (neutropenia) o de linfocitos T (linfocitopenia) prolongados en el tiempo y producidos por una afección natural o por el tratamiento con diversos fármacos son factores de probabilidad determinados por el hospedador.

Respecto a los **criterios clínicos**, éstos varían en mayor medida debido a los diferentes hongos que causan las EFIs y, por supuesto, de los órganos afectados<sup>54,56</sup>. Por ejemplo, en el caso de una aspergilosis pulmonar invasiva, que es la representación más común de la aspergilosis

invasiva, las manifestaciones clínicas son la observación por tomografía computarizada (CT) de estructuras circulares con o sin halo, en forma de cuña o cavidades en el interior del pulmón<sup>54,56</sup>. Sin embargo, como se ha mencionado antes, los criterios clínicos varían en función del patógeno. Por lo tanto, en el caso de la CI, donde las partes comúnmente más afectadas son pulmones y el sistema nervioso, las manifestaciones clínicas esperadas son la inflamación de las meninges y la presencia de nódulos en los pulmones, observados mediante pruebas radiológicas.

Por último, el tercer criterio necesario para el diagnóstico de unaEFI es el **micológico**. Aquí están comprendidas las pruebas microbiológicas y bioquímicas que se pueden hacer de manera rutinaria en un laboratorio y, nuevamente, pueden variar en función de la especie. En el caso de la AI, los criterios micológicos comprenderían, por un lado, los microbiológicos, que consisten en la recuperación de células fúngicas en cultivos de muestras de esputo, lavado broncoalveolar (BAL), cepillado bronquial o aspirado o, por otro lado, de criterios bioquímicos como la presencia de galactomanano en suero, plasma, BAL o líquido cefalorraquídeo, o mediante técnicas PCR sobre muestras de suero, plasma o BAL<sup>54,56</sup>. Por otra parte, el aislado de células de *Cryptococcus* en muestras estériles o no estériles es suficiente como evidencia microbiológica para la CI.

Una vez definidos los criterios necesarios para el diagnóstico de las EFIs, se puede comprender las categorías en las que se divide el diagnóstico de las EFIs: posible, probable y probada. Para que se considere que un paciente tiene unaEFI posible, en este al menos se necesita cumplir, independientemente del patógeno, un criterio clínico y otro relativo al hospedador sin haberse encontrado evidencia microbiológica<sup>54</sup>. Es decir, para que un paciente tuviese unaEFI posible, este ha de encontrarse en riesgo de padecerla debido a otra patología secundaria por la cual estuviese inmunocomprometido, así como la presencia de evidencia radiológica compatible, como una masa en el pulmón, sin haberse detectado evidencia micológica alguna en el paciente.

En el siguiente escalafón de certeza de acuerdo a la clasificación EORTC/MSG, se encontraría laEFI probable, en la cual se cumple al menos un criterio clínico, uno micológico y, por supuesto, uno relativo al paciente<sup>54</sup>. Por ejemplo, unaEFI sería clasificada como probable si un paciente tuviese una neutropenia prolongada, presentase una lesión compatible en pulmón observada mediante técnicas de imagen y, además, se le hubiese aislado un hongo en un lavado broncoalveolar.

Para demostrar que un paciente tiene unaEFI probada, sin embargo, no es necesario que ese paciente esté inmunocomprometido, ya que el único criterio que sirve para probar unaEFI es demostrar daño histopatológico en el tejido afectado debido al crecimiento del hongo en dicho tejido<sup>54,56,57</sup>. Aparentemente, es un problema de fácil solución puesto que con una biopsia del

tejido afectado sobraría para demostrar que es un hongo el que causa ese daño y recuperar dicho hongo vivo. Sin embargo, la gravedad de las patologías primarias que acompañan a estos pacientes imposibilita poder tomar muestras biológicas más allá de sangre y lavados en la mayoría de los casos, lo que complica muchísimo el diagnóstico certero de las EFIs<sup>58-61</sup>. De hecho, en la mayoría de los estudios clínicos de enfermedades fúngicas de difícil diagnóstico, como la AI, la enfermedad probada solo se obtiene, generalmente, tras la autopsia del paciente, lo que reduce muchísimo la ratio de enfermedades probadas en dichos estudios clínicos<sup>58,60,61</sup>.

### 1.1.6. Tratamiento

El tratamiento de las EFIs a día de hoy es bastante complicado debido a la disponibilidad de un escaso abanico de fármacos antifúngicos, a la elevada toxicidad de éstos, a las múltiples interacciones y limitaciones que presentan y al incremento de la proporción de especies resistentes que viene sucediendo en los últimos años<sup>57,62,63</sup>. Los grupos de antifúngicos disponibles actualmente son los polienos, las equinocandinas, los análogos de pirimidinas y los azoles<sup>64</sup>.

Originalmente, el primer grupo de fármacos antifúngicos que se aprobaron fueron los **polienos**, cuyo único integrante usado en clínica es la anfotericina B (AMB)<sup>57,65,66</sup>. Desde su aprobación por la FDA en 1959, ha sido el *gold standard* en el tratamiento general de las EFIs<sup>66,67</sup>. Su mecanismo de acción consiste en la formación de complejos en la membrana fúngica junto con ergosterol presente en la membrana para formar poros en ésta<sup>66-68</sup>. Aunque es relativamente efectiva contra la mayoría de hongos, también es capaz, aunque en menor medida debido a una menor afinidad, de unirse al colesterol de las células de mamíferos y formar complejos semejantes abriendo poros en la membrana<sup>68</sup>. Es esta capacidad de formar complejos con el colesterol de mamíferos la causa principal de su elevada toxicidad, siendo dicha toxicidad la principal reticencia al uso de la AMB en clínica. No obstante, es cierto que en los últimos años se han desarrollado otras formulaciones como la AMB liposomal, en dispersión coloidal o acomplejada con lípidos donde se ha reducido su toxicidad en comparación con la AMB tradicional (desoxicolato)<sup>69</sup>. Además, aunque se usen dosis por debajo del límite tóxico por día, no se suele utilizar la AMB más de una o dos semanas seguidas en un paciente debido a la aparición de nefrotoxicidad que puede llevar a un fallo renal<sup>69-71</sup>.

El siguiente grupo de fármacos en estar disponible fueron los **análogos de pirimidinas**, cuyo único integrante aprobado en clínica es la 5-flucitosina y cuyo mecanismo de acción consiste en interrumpir la síntesis de ácidos nucleicos. Más concretamente, su efecto se da tras ser

metabolizado en el interior de la célula fúngica en su metabolito farmacológicamente activo, el 5-fluorouracilo, el cual es capaz de competir con el uracilo en la síntesis de ácido ribonucleico (RNA) impidiendo la adición de más nucleótidos a la cadena de RNA tras su incorporación a ésta<sup>72</sup>. Desafortunadamente, debido a su elevada toxicidad y la escasa sensibilidad de muchos hongos a este fármaco, no es usada con mucha frecuencia. De hecho, prácticamente desde que fue aprobado por la FDA en 1969, se ha usado en combinación con la AMB ya que ambos potencian su efecto entre sí, compensando, en cierta medida, la elevada toxicidad de ambos en tratamientos contra infecciones producidas por *Candida spp.* y *Cryptococcus spp*<sup>73,74</sup>. Aunque se ha descrito toxicidad renal y hepática por el uso de 5-flucitosina en humanos, el principal y más frecuente es la mielotoxicidad. De hecho, las concentraciones de 5-flucitosina en sangre en pacientes tratados con este fármaco han de ser monitorizadas para no alcanzar concentraciones muy elevadas y poder evitar esta mielotoxicidad asociada al uso de este fármaco<sup>75</sup>.

Prácticamente a la vez que la 5-flucitosina, en 1969, fueron aprobados para uso clínico los primeros dos fármacos del grupo de los **azoles**: el clotrimazol y el miconazol<sup>76</sup>. Estos dos azoles pertenecientes a la primera generación de azoles fueron empleados principalmente en preparaciones para uso tópico en infecciones cutáneas y de mucosas, como la tiña y/o cualquier candidiasis, e incluso el miconazol administrado de manera intravenosa (IV), aunque de esta última forma presenta una elevada toxicidad ocular y cardiaca<sup>76,77</sup>. Aunque los azoles son a día de hoy la mejor arma disponible para el tratamiento contra infecciones fúngicas provocadas por múltiples especies, incluidas *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*, esto no fue hasta la llegada de la segunda generación de azoles, cuyo primer integrante en ser aprobado fue el ketoconazol en 1981<sup>76,78</sup>. La llegada de estos antifúngicos de segunda generación, cuyos principales integrantes son el ketoconazol, el fluconazol (FCZ) y el itraconazol, supuso una mejora considerable respecto a los antifúngicos de primera generación, puesto que, aunque su toxicidad y solubilidad seguían siendo un problema, se mejoró notablemente su espectro de acción, su especificidad y su forma de administración, que además de tópica e IV, incluyó la oral, convirtiéndolos en los tratamientos de primera elección para múltiples enfermedades fúngicas, incluidas EFIs como la AI o la CI, siendo el FCZ en esta última enfermedad el tratamiento de mantenimiento empleado hoy actualmente<sup>76</sup>. Sin embargo, debido a su mecanismo de acción, siguen presentando hepatotoxicidad y cardiotoxicidad<sup>76,78</sup>. No obstante, el discreto efecto inhibitorio que tenían estos fármacos para infecciones sistémicas provocadas por mohos ya que, de hecho, el FCZ no es efectivo en el tratamiento de la AI, llevó en 2002 a la aprobación para uso clínico del voriconazol (VCZ), el primero de los azoles de tercera generación entre los que se encuentran el posaconazol y el isavuconazol. Los integrantes de este grupo supusieron definitivamente una

mejora sustancial respecto a sus predecesores. Por ejemplo, el VCZ es 30 veces más activo contra mohos que las generaciones previas, mientras que, el isavuconazol va sintetizado como profármaco sulfatado que, al contacto con el suero del paciente, se convierte en el fármaco activo, atajando los problemas de efectividad y toxicidad de sus predecesores<sup>76,79,80</sup>.

El mecanismo de acción de los azoles es semejante para todos los integrantes del grupo y consiste en la inhibición de una enzima esencial para la supervivencia del hongo, una lanosterol-14- $\alpha$ -demetilasa (CYP51) que participa en la síntesis de ergosterol, componente principal de las membranas celulares de los hongos y análogo del colesterol en mamíferos<sup>76</sup>. La inhibición de la síntesis de ergosterol conlleva la acumulación de precursores afuncionales en las membranas en lugar de ergosterol, provocando alteraciones en ésta, inhibiendo el crecimiento del hongo e, incluso a concentraciones altas, provocando la muerte celular<sup>76,78,80</sup>. Aunque parezca una diana farmacológica interesante, lo cierto es que la elevada toxicidad de los azoles reside en que, desafortunadamente, también son capaces de inhibir ciertas enzimas humanas, como algunas que participan en la síntesis de colesterol y, además, CYP3A4, que es un citocromo P450 implicado en el metabolismo hepático de hasta el 60% de los fármacos usados en clínica<sup>76-81</sup>. El simple hecho de inhibir CYP3A4 hace que los azoles interaccionen negativamente con más de la mitad de las drogas existentes para uso clínico, impidiendo o lastrando su uso en función del resto de patologías que padezca el paciente<sup>76</sup>. Todas estas interacciones con enzimas humanas sirven para explicar las toxicidades múltiples asociadas al uso de azoles en el tratamiento de infecciones fúngicas. Aun así, la llegada de los azoles supuso una verdadera revolución en los fármacos antifúngicos y representan, a día de hoy, el principal tratamiento de elección para la mayoría de las enfermedades fúngicas, casi independientemente del hongo que las produzca<sup>76,78-81</sup>.

El último grupo de fármacos en estar disponible para uso médico fueron las **equinocandinas**, cuyos tres únicos integrantes son la caspofungina (CSF), la micafungina y la anidulafungina y fueron aprobados en 2001, 2005 y 2006 respectivamente<sup>82-85</sup>. Estos nuevos antifúngicos fueron diseñados para actuar contra la pared fúngica, una estructura que no es común en células animales y que, por tanto, debería reducir enormemente la cantidad de efectos secundarios adversos que poseían el resto de antifúngicos disponibles<sup>82,85</sup>. De hecho, la diana farmacológica de las equinocandinas es la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa, que es una enzima de membrana que sintetiza  $\beta$ -1,3-D-glucano, uno de los componentes principales de la pared fúngica y cuya función inhiben estos fármacos<sup>85</sup>. Sin embargo, pese a su elevada especificidad y a su mayor seguridad para el paciente, las equinocandinas no son los fármacos ideales para el tratamiento contra muchas especies fúngicas ya que no son fungicidas, sino fungistáticas y, además, son menos

efectivas contra el crecimiento de mohos que sus antecesores. Las equinocandinas se usan actualmente en clínica para el tratamiento de infecciones causadas por levaduras ya que son, en general, muy sensibles a dichos fármacos<sup>82,83</sup>. Por el contrario, aunque muchos mohos son sensibles a las equinocandinas, éstas no suelen ser usadas contra mohos debido a que la efectividad de los azoles o la anfotericina es muy superior, por lo que, si el paciente puede aguantar el tratamiento con éstos últimos, suele preferirse el uso de azoles en lugar de las equinocandinas. Sin embargo, la aparición de resistencias a azoles que viene sucediendo en los últimos años ha llevado a que las equinocandinas se conviertan en una opción real cuando azoles y anfotericina no pueden usarse en un paciente afectado por unaEFI causada por mohos<sup>85</sup>.

Patología	Microorganismo	Primera opción	Alternativos
Aspergilosis invasiva	<i>Aspergillus spp</i>	- Voriconazol (preferida) - Anfotericina B ( <i>gold standard</i> )	- Posaconazol - Itraconazol - Caspofungina
Cryptococosis invasiva	<i>Cryptococcus spp</i>	- Anfotericina B con o sin flucitosina (inicial) - Fluconazol (mantenimiento)	- Voriconazol - Itraconazol
Candidiasis invasiva	<i>Candida spp</i>	- Fluconazol (preferida) - Caspofungina (preferida) - Anfotericina B (casos graves)	- Micafungina - Anidulafungina - Otros azoles

Tabla 1: resumen de los tratamientos disponibles para la AI, la CI y la candidiasis invasiva.

### 1.1.7. Limitaciones

Como ya se ha mencionado previamente, las principales limitaciones para la obtención de buenos resultados en el tratamiento de las EFIs son: disponer de un diagnóstico precoz, una escasa variedad de opciones terapéuticas y la creciente aparición de cepas resistentes a antifúngicos<sup>8,17,45,46,76,86,87</sup>. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de derivar recursos para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos, así como de nuevas pruebas diagnósticas más sensibles y específicas que las disponibles actualmente.

Aunque se ha mejorado bastante en las técnicas diagnósticas de las EFIs y su clasificación en posible, probable y probada ha ayudado a reducir la mortalidad de las EFIs a través del tratamiento “profiláctico”, aunque sí bajo sospecha; lo cierto es que, aun así, los datos siguen siendo muy malos<sup>1,9,45,54,56,88,89</sup>. En lo que respecta a las técnicas diagnósticas radiológicas, aunque su fiabilidad ha ido en aumento en los últimos años, lo cierto es que lo que se ve en una CT o en una placa de rayos X no deja de ser una masa de características compatibles con otro tipo de patologías no fúngicas<sup>45</sup>. Además, suponiendo que la masa que produce esa lesión sea un hongo, el hecho de que dicha masa sea visible mediante técnicas radiológicas ya implica que

el paciente tiene una cantidad elevada de células de hongo vivo creciendo en su interior, aparte de las posibles diseminaciones a otros órganos que aún no hayan podido ser detectadas.

No obstante, es cierto que las técnicas bioquímicas como la detección de  $\beta$ -1,3-D-glucano (Fungitell®), galactomanano (Platelia®) o de DNA fúngico en suero, plasma, esputos, BAL o líquido cefalorraquídeo han añadido precocidad al diagnóstico de las EFIs. Sin embargo, todas ellas poseen sus limitaciones<sup>90,91</sup>. Por ejemplo, respecto a la detección de  $\beta$ -1,3-D-glucano, su presencia en fluidos biológicos no implica necesariamente que un hongo esté infectando al hospedador ya que el  $\beta$ -1,3-D-glucano está presente no solo en mohos y levaduras sino también en otros reinos como las plantas y, aunque ese  $\beta$ -1,3-D-glucano fuera de origen fúngico, es muy complicado distinguir si proviene de una colonización o de una infección<sup>90,92,93</sup>. Algo semejante ocurre con la detección de galactomanano. Si bien es cierto que el galactomanano es más específico de mohos, de nuevo es difícil conocer si ese galactomanano viene de un hongo que está colonizando o infectando al hospedador. Por último, aunque originalmente las técnicas de detección de hongos mediante PCR no estaban incluidas en los criterios de la EORTC/MSG, éstas han sido introducidas en la última revisión puesto que la especificidad que ofrecen es máxima, en comparación con la detección de polisacáridos fúngicos<sup>1,54,56,57</sup>.

Aparte de las limitaciones inherentes a las técnicas diagnósticas, se añaden también a la dificultad del manejo de las EFIs las limitaciones relacionadas con los antifúngicos. Como se ha mencionado en la sección anterior, solo hay 4 grupos de fármacos antifúngicos de los cuales solamente los azoles y la AMB tienen un efecto notable sobre la supervivencia del hongo. El hecho de que los hongos sean organismos eucariotas complica mucho la obtención de dianas farmacológicas únicas que no tengan homólogos en células animales<sup>62–64,66</sup>. Por desgracia, los antifúngicos realmente efectivos contra las EFIs tienen una elevada toxicidad asociada debido a que también ejercen su efecto sobre proteínas del hospedador, por lo que su uso tiene que ser monitorizado y controlado de forma rutinaria. Aunque las equinocandinas sí que son realmente seguras y de amplio espectro, su efecto sobre muchos hongos sigue siendo bastante discreto, por lo que no son usados como primera elección en el tratamiento de EFIs, pero sí que sirven para otras muchas micosis que implican un menor riesgo para el paciente como las infecciones tópicas y de mucosas<sup>66</sup>. Se necesitarían al menos tres grupos de fármacos nuevos con diferentes dianas farmacológicas que fueran realmente efectivas y que no tuvieran excesiva toxicidad para mejorar la supervivencia en pacientes afectados por EFIs<sup>62,63</sup>.

Añadido a la escasez de opciones terapéuticas, en las últimas décadas vienen incrementándose la aparición de nuevas cepas de hongos resistentes a azoles y equinocandinas<sup>92,94–101</sup>. Sin

embargo, en el caso de la AMB, que ha sido el *gold standard* en el tratamiento de las EFIs desde su aprobación en 1959, la aparición de resistencias es extremadamente rara debido a que su diana farmacológica es un esterol y no una proteína. El ergosterol, que es un componente fundamental de las membranas plasmáticas fúngicas, no puede cambiarse con facilidad por otra molécula parecida sin que se vean afectados negativamente múltiples procesos celulares fúngicos, como sí puede mutar una proteína perdiendo afinidad por su fármaco como es el caso de los azoles y CYP51A. Aunque se produjesen en un hongo los profundos cambios necesarios para que sintetizase y utilizase otro esterol diferente en sustitución del ergosterol en sus membranas lipídicas y, aun así, siguiese siendo igual de viable que sus semejantes, la AMB, probablemente, siguiese teniendo actividad contra ese hongo puesto que es muy promiscua en la unión a esteroles, como demuestra al ser capaz de unirse al colesterol en células animales y formar poros en sus membranas<sup>68,69,95,96</sup>. Por tanto, es bastante rara la aparición de resistencias a la AMB pese a llevar en uso más de 60 años. Sin embargo, como se ha mencionado en la sección anterior, la AMB también es muy tóxica para el paciente, lo que limita enormemente su uso en pacientes graves y críticos ya que dicho tratamiento antifúngico puede acabar induciendo la muerte del paciente y, por tanto, convierte a la AMB en un antifúngico poco útil, remarcando la necesidad de búsqueda de nuevos fármacos antifúngicos.

Sin embargo, respecto a la 5-flucitosina, un fármaco de escasa utilidad hoy en día debido a su escaso efecto sobre la mayoría de las especies fúngicas, es común la aparición de resistencias a dicho fármaco relacionadas con mutaciones en el sistema de transporte que incorpora este análogo de nucleótido al interior de la célula fúngica<sup>73-75</sup>. Aun así, debido a la escasez de dianas farmacológicas y a los pobres resultados de supervivencia en pacientes con EFIs, se sigue utilizando en combinación con AMB en el tratamiento de la CI en pacientes con VIH durante un máximo de 14 días tras el diagnóstico de la enfermedad. De hecho, se usan ambos en combinación hasta, literalmente, que el paciente aguante y empiece a mostrar signos de toxicidad asociada a estos dos fármacos y se tenga que cambiar a terapia de mantenimiento basada en FCZ<sup>8,10,35,74</sup>.

Pese a que la introducción de los azoles como fármacos antifúngicos supuso una revolución en el tratamiento de las EFIs, su uso indiscriminado, aunque justificable, trajo consigo la aparición de resistencias a ellos en múltiples especies fúngicas<sup>76,98,101</sup>. No obstante, el uso de otros azoles de estructura parecida a los de uso clínico como fitosanitarios también ha inducido la aparición de resistencias cruzadas, agravando el problema actual<sup>95</sup>. En el caso de los azoles, los dos mecanismos de resistencia principales conocidos son las mutaciones en CYP51A y, en menor medida, las asociadas al aumento de la expresión de las proteínas asociadas a los mecanismos

de eflujo celulares<sup>95</sup>. En el caso de *Aspergillus spp.*, la resistencia a azoles tanto en aislados clínicos como ambientales es considerable relacionándose además con peores pronósticos en pacientes afectados por cepas resistentes a los cuales hay que tratar con AMB, aún más tóxica que los azoles, o con las equinocandinas, de escaso efecto en mohos<sup>95,102,103</sup>. Sin embargo, aunque en *Candida spp.* y en *Cryptococcus spp.* son menos frecuentes las cepas resistentes a azoles (alrededor del 10% del total de los aislados clínicos), siguen siendo porcentajes elevados que continúan aumentando con el paso del tiempo y no son despreciables en clínica<sup>95,96</sup>. Pese a todo esto, los tratamientos de primera opción en la mayoría de las EFIs, a excepción de la candidiasis invasiva, son fármacos del grupo de los azoles.

Por último, las equinocandinas también supusieron una revolución en el tratamiento de las micosis, aunque de menor grado que la que produjeron los azoles. En materia de seguridad para el paciente, son las menos tóxicas de todas ya que su diana es específica de hongos y no de células animales. Sin embargo, su insuficiente efecto en mohos las ha relegado al no menos importante papel de tratamiento de las candidiasis en general<sup>50</sup>. Aunque se desarrollaron contra *Aspergillus spp.* pronto se descubrieron dos mecanismos de resistencia en *A. fumigatus* contra las equinocandinas que han demostrado ser idénticos a los que suceden en *Candida spp.* Dichos mecanismos son: la sobreexpresión del gen *fks1*, que es la β-1,3-D-glucano sintasa responsable de la síntesis de β-1,3-D-glucano, y la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la mitocondria que alteran la composición de los lípidos adyacentes a la β-1,3-D-glucano sintasa en la membrana celular reduciendo el efecto de las equinocandinas sobre ella<sup>95</sup>.

## 1.2. *Aspergillus spp.* y aspergilosis

### 1.2.1. *Aspergillus spp.*

*Aspergillus* es un género enormemente diverso de hongos (mohos) filamentosos, saprofitos y ubicuos compuesto por más de 340 especies pertenecientes al *phylum* de los ascomicetos<sup>104</sup>. En la naturaleza, los hongos del género *Aspergillus* son los principales agentes de degradación de múltiples sustancias orgánicas, siendo el eslabón que cierra el ciclo de muchos elementos asociados a la vida, degradando restos vegetales y animales a sustancias más simples que pueden volver a ser utilizadas por otros organismos<sup>104,105</sup>. Además, *Aspergillus* también puede causar enfermedades en plantas y es capaz de producir toxinas que quedan presentes en

alimentos como las aflatoxinas producidas por *A. flavus* en maíz u otros cultivos de relevancia en agricultura y alimentación humana. Aunque también sean conocidos patógenos oportunistas en animales y humanos, no todas sus funciones son perniciosas ya que también son utilizados en multitud de procesos tecnológicos, alimentarios o incluso en la producción de fármacos.

#### 1.2.1.1. Taxonomía y distribución

El nombre *Aspergillus*, que fue dado en 1729 por el botánico y sacerdote italiano Antonio Micheli, hace referencia a la similitud del conidióforo, que es la estructura donde se desarrollan y contienen las conidias (esporas asexuales) de *Aspergillus spp.*, al *aspergillum*, que es un objeto de la liturgia cristiana con el que se dispersa agua bendita en el ambiente<sup>105</sup>. El género *Aspergillus* está dividido taxonómicamente en 4 subgéneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* y *Nidulantes*) y 19 secciones de las que se destacan las secciones *Fumigati*, *Flavi*, *Terrei*, *Nigri*, y *Nidulantes*; cuyos organismos de referencia son, respectivamente, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans*<sup>104,106</sup>. Originalmente, las especies del género *Aspergillus* se clasificaban en función del aspecto visual del conidióforo, haciendo esta clasificación algo imprecisa. Las técnicas de secuenciación de las regiones ITS o del DNA ribosómico han dado clasificaciones más potentes en los últimos años que han llevado a reordenamientos de las clasificaciones antiguas y que, probablemente, seguirán propiciando más cambios en dichas clasificaciones en un futuro<sup>107</sup>.

La sección ***Fumigati***, cuyo principal integrante es *A. fumigatus*, está compuesta por otras especies semejantes como *A. fischeri*, así como una serie de especies más raras denominadas crípticas como son *A. novofumigatus*, *A. lentulus* o *A. udagawae*<sup>104,106,107</sup>. La sección *Fumigati* es, de lejos, la sección más relevante en clínica debido a que acompleja las especies más patógenas y/o problemáticas. Aunque *A. fischeri* es una especie raramente aislada en clínica en pacientes con AI probada, el resto de integrantes de la sección *Fumigati* son causantes de en torno al 80-90% de los casos. De todas esas AI causadas por especies de la sección *Fumigati*, *A. fumigatus* representa hasta el 95% de todos los aislados, mientras que las especies crípticas representan el otro 5% restante<sup>107,108</sup>. Aunque las especies crípticas son, a priori, menos infecciosas debido a, entre otras cosas, una menor velocidad de crecimiento o a una menor termotolerancia que *A. fumigatus* (puede crecer a más de 65°C), son de especial relevancia en clínica ya que es mucho más frecuente que sean resistentes a azoles que *A. fumigatus*<sup>107,109</sup>. De hecho, que *A. fumigatus sensu stricto* sea resistente a azoles es algo relativamente poco frecuente, con en torno a un 5% de los aislados clínicos, mientras que, en el caso de los aislados clínicos de especies crípticas, la

resistencia a azoles puede alcanzar cifras de hasta el 30% de los casos tomando de ahí su relevancia en clínica<sup>107,109</sup>.

La sección ***Flavi***, cuyos principales integrantes son *A. flavus* y *A. parasiticus*, está compuesta por otra serie de especies de especial relevancia en biotecnología, alimentación y salud<sup>110,111</sup>. La mayoría de las especies de esta sección que son patógenos de plantas son capaces de producir micotoxinas de especial relevancia en seguridad alimentaria como son las aflatoxinas y las ocratoxinas. Además, *A. flavus* es el segundo patógeno más frecuente aislado en AI con hasta casi el 10% de los casos. Aunque la mayoría de las especies de esta sección son productoras de micotoxinas, existen dos especies “domesticadas” por el ser humano, que son *A. oryzae* y *A. sojae*, incapaces de producir micotoxinas y perfectas para uso alimentario en humanos<sup>110,111</sup>.

El tercer gran grupo es la sección ***Terrei***, cuyo organismo modelo es *A. terreus*, un moho ubicuo presente en el suelo y que habita desde los desiertos a las praderas<sup>112</sup>. Al igual que los componentes de las otras dos secciones, también es capaz de infectar plantas y cultivos con la consiguiente producción de un amplio abanico de micotoxinas perniciosas para el ser humano y, además, las especies de la sección *Terrei* (*A. terreus* en la mayoría de los casos) también son capaces de infectar pacientes inmunocomprometidos. Aunque *A. terreus* solo representa el 4% de las AI, antes de la llegada de los antifúngicos del grupo de los azoles tenían especial relevancia clínica debido a una sensibilidad disminuida intrínseca a la AMB. Aunque sí que son sensibles a este fármaco, se necesitan concentraciones superiores para inducir su muerte, acercando de esta manera todavía más la dosis terapéutica a la tóxica para el hospedador<sup>112,113</sup>.

Especies como *A. niger* (sección *Nigri*) o *A. nidulans* (sección *Nidulantes*) también son capaces de provocar AI, aunque con frecuencias muy inferiores (<1%) a los integrantes de las secciones anteriores.

#### 1.2.1.2. Función en el ecosistema

Las especies del género *Aspergillus* son en su totalidad saprófitas por lo que, como su nombre indica, se alimentan de restos biológicos que ellas mismas degradan, puesto que tienen toda la maquinaria enzimática para hacerlo<sup>114</sup>. Son ubicuas, distribuidas por toda la Tierra y presentes en forma de micelio en suelos terrosos o arenosos; o sobre restos orgánicos como plantas y animales muertos, los cuales degradan en sustancias más simples que sirven como alimento a ellas mismas o a otros organismos; o en forma de conidias, que son esporas de pequeño tamaño que son dispersadas por el aire ayudando a conseguir la distribución mundial que tienen estos microorganismos<sup>114</sup>. Al igual que otros organismos saprófitos, son capaces de secretar una

batería de enzimas repleta de glucanasas, amilasas, proteasas, lipasas o celulasas, además de otras enzimas necesarias para la descomposición de organismos vivos, como animales y plantas, o incluso para su infección. De hecho, las enzimas que poseen otros organismos patógenos de plantas más severos que *Aspergillus spp.* como *Magnaporthe oryzae*, *Claviceps purpurea* o *Uncinula necátor* también están contenidas en el genoma de *Aspergillus* y son expresadas. Un buen ejemplo de la actividad de *Aspergillus* en los ecosistemas, más concretamente de *A. fumigatus*, son las pilas de compost, donde degrada esa materia orgánica gracias a toda la batería de enzimas que secreta al exterior. Durante este proceso, la actividad de *A. fumigatus* desprende mucho calor, llegando a alcanzar temperaturas en el núcleo de las pilas de compost de hasta 70°C, lo cual explica su impresionante termotolerancia que, en sentido opuesto, también puede crecer en el interior de una nevera a 4°C sobre la superficie de una naranja y descomponerla. De hecho, una forma infalible de identificar a un *A. fumigatus sensu stricto* en un laboratorio frente al resto de géneros y especies fúngicas es cultivarlo en una estufa a 50-55°C, donde, si hay crecimiento, es *A. fumigatus*. De igual manera a lo que ocurre en el suelo de un bosque, cuando *A. fumigatus* termina de degradar los materiales biológicos en sustancias más simples, estos pasan a formar parte del suelo/compost, y servirán como nutrientes a otros organismos, como pueden ser otros hongos, plantas o bacterias<sup>114</sup>. Además de la termotolerancia, que también es elevada en el resto de *Aspergillus spp.*, aunque no tan excepcional como en *A. fumigatus*, también son capaces de crecer en ambientes muy hostiles en materia de pH o de ausencia de nutrientes. Es esta habilidad de crecer en condiciones que no serían óptimas para la mayoría de microorganismos la que los convierte en perfectos patógenos oportunistas<sup>115</sup>.

Al igual que otros mohos, *Aspergillus spp.* forma un micelio al crecer, que es un conjunto más o menos caótico de hifas o células filamentosas unidas una detrás de otra dando lugar a grandes estructuras lineales más o menos ramificadas. Además, y por lo general en los extremos, se forman unas estructuras llamadas conidióforos en forma de plumero o de *aspergillum*, como ya se ha mencionado en la sección anterior, que contienen las conidias, que son las esporas asexuales de pequeño tamaño que pueden ser dispersadas flotando en el aire tras ser suspendidas en él. De hecho, son estas esporas las que se acabarán depositando sobre nueva materia descomponible en lugares distantes a donde se originaron contribuyendo en gran medida a la ubicuidad de estos organismos. Además, son estas mismas conidias, cuya concentración en aire ronda las 100 esporas por metro cúbico, las que pueden acabar colonizando el tracto respiratorio humano<sup>47,48,116</sup>.

#### 1.2.1.3. Reproducción

Originalmente y durante muchos años se creyó que los mohos no eran capaces de realizar reproducción sexual y se les clasificaba como hongos asexuales<sup>117</sup>. Sin embargo, con la aparición de los primeros genomas de *Aspergillus* pronto se identificaron múltiples genes aparentemente funcionales (ausencia de codones de stop prematuros o mutaciones que conlleven cambio de marco de lectura) relacionados con la reproducción sexual que acabaron conduciendo al descubrimiento de ciclos de reproducción sexual en múltiples especies de ascomicetos. Por último, también se ha descrito un tercer tipo de reproducción denominada parasexual en la que se produce una fusión entre hifas de dos cepas de la misma especie<sup>118,119</sup>.

La **reproducción asexual**, que es de lejos la más frecuente entre ascomicetos, consiste en la diseminación de las conidias por el aire hacia otros lugares o ubicaciones distintas a las de su origen<sup>116</sup>. Las conidias, que son las esporas asexuales que producen estos hongos, están contenidas en los conidióforos, que son unas estructuras derivadas de los extremos de las hifas que conforman el micelio capaces de elevarse más de 0.1 milímetros sobre la superficie en la que crece el micelio y hacen que las conidias sean accesibles a las corrientes de aire que podrán desplazarlas hacia nuevas ubicaciones y, además, para facilitar su difusión por el aire, las conidias son de pequeño tamaño (2-3  $\mu\text{m}$ )<sup>116</sup>. Las conidias son esporas adaptadas para sobrevivir en condiciones muy desfavorables para la vida, como el estrés térmico y oxidativo, la deshidratación, la presión osmótica, variaciones en pH o la luz ultravioleta. De hecho, está descrito que pueden germinar hasta un año después siendo conservadas a temperatura ambiente<sup>116</sup>. No obstante, en nuestro laboratorio, conidias de *Aspergillus spp.* guardadas en tubos con agua destilada durante más de 20 años a temperatura ambiente son capaces de germinar al sembrarlas en medio con agar.

Las conidias en fase durmiente, descritas arriba, son capaces de germinar cuando entran en contacto con una fuente de carbono descomponible. Es entonces cuando comienzan a sintetizar glucosa y aminoácidos que necesitarán para la transformación de la conidia para dar lugar a una hifa. La pared de las conidias durmientes es diferente de la de las hifas. Aunque las conidias tienen sobre su membrana una pared de composición similar a la de las hifas, con  $\beta$ -1,3-D-glucano ramificado,  $\alpha$ -glucanos, quitina, quitosano y galactomanano, entre otros, es mucho más densa y estrecha que la de las hifas. Además, sobre ella se sitúa una capa de pigmentos similares a la melanina que ayudan a comprimir la pared “estándar” situada bajo ella y ayudan a proteger las esporas de diferentes factores como la radiación UV<sup>116,120</sup>. Por último, existe una capa externa formada principalmente por dos proteínas (RodA y CcpA) que, entre otras cosas, entierran los polisacáridos que componen la parte más interna de la pared y los esconden del sistema

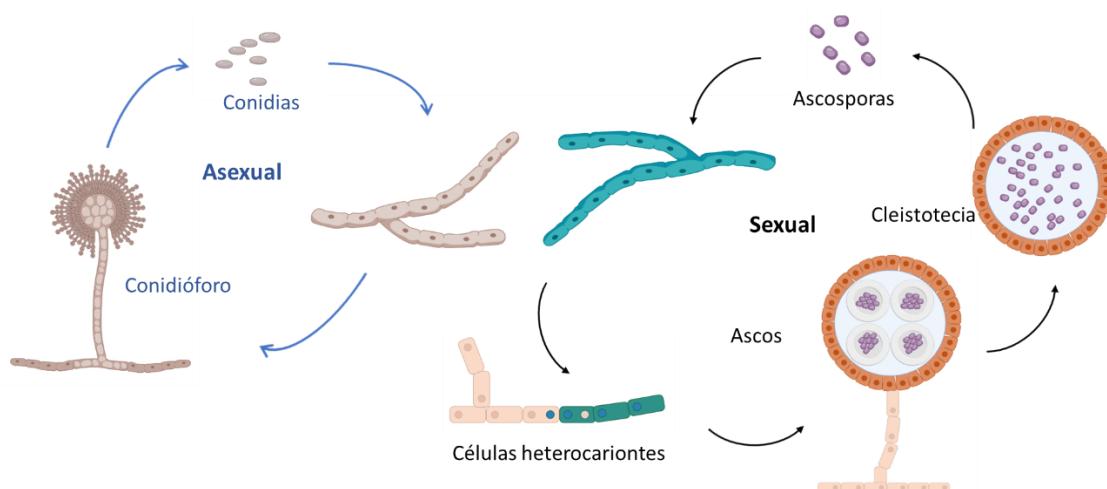
inmunológico del hospedador. Dado que el  $\beta$ -1,3-D-glucano y la quitina pueden ser detectados por las familias de receptores de tipo Dectin-1 y Dectin-2 presentes en células del sistema inmunológico, la función de esta última capa es aumentar la posibilidad de que el sistema inmunológico del hospedador no reconozca las conidias y éstas puedan germinar. De hecho, la patogenicidad de las cepas mutantes en cualquiera de estas dos proteínas se reduce enormemente ya que su inmunogenicidad aumenta considerablemente y son fácilmente reconocibles por sistemas inmunológicos debilitados<sup>116</sup>.

Cuando la espora comienza a germinar y entra en la fase isotrópica, comienza a expresar una serie de enzimas relacionadas con la producción de aminoácidos y proteínas, con la gluconeogénesis o con la síntesis y remodelación de la pared<sup>120</sup>. Dado que la germinación de la conidia va acompañada de un aumento de la permeabilidad de la pared, es evidente que se produce una remodelación de ésta para asemejarse más a la pared de una célula en crecimiento vegetativo (hifa). Entre los genes que aumentan su expresión al comenzar la germinación se encuentran  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetas, quitina sintetas y genes de la familia GEL (*glucan elongation protein*) como *Gel1* y *Gel4*<sup>116,120</sup>. Las  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetas y las quitina sintetas son enzimas transmembrana que producen polisacáridos lineales no ramificados que vierten al espacio periplásmico donde serán incorporados a la pared fúngica, mientras que las enzimas de la familia GEL son  $\beta$ -1,3-D-glucanosiltransferasas cuya función consiste en escindir un fragmento de  $\beta$ -1,3-D-glucano lineal de tamaño variable en función de cada glucanosiltransferasa y añadirlo mediante el nuevo extremo reductor generado a otro  $\beta$ -1,3-D-glucano creando un nuevo punto de ramificación o elongando uno ya existente<sup>116,120,121</sup>. Debido a la importancia de estos genes GEL en este trabajo, se analizarán más detalladamente en la siguiente sección.

Tras la fase isotrópica, comienza la fase polarizada, donde la célula deja de ser esférica y empieza a crecer de forma tubular, asemejándose ya a una hifa. Durante esta fase, se produce mucha síntesis de DNA asociada a mitosis, generándose nuevos núcleos que se distribuyen por la zona con forma tubular, así como la activación de múltiples procesos presentes ya en hifas normales, como la síntesis de ergosterol, de lípidos, de citoesqueleto o de metabolitos secundarios, entre otros<sup>116</sup>. Los diferentes núcleos serán separados mediante septos para generar células completas, aunque éstas permanezcan unidas polarmente a través de sus paredes durante el crecimiento en forma de hifas<sup>116</sup>.

Como se menciona en la introducción de esta sección, *Aspergillus* es un género capaz de llevar a cabo **reproducción sexual**. De hecho, *A. nidulans*, que fue la primera especie de *Aspergillus* donde se descubrió la reproducción sexual, posee un gen de la familia MAT1-1 y, en otro locus,

un gen de la familia MAT1-2<sup>118,119</sup>. Los genes de la familia MAT (*mating type*) codifican factores de transcripción capaces de regular procesos involucrados en la identidad celular, como aquellos implicados en la producción de feromonas y sus receptores. MAT1-1 y MAT1-2 codifican respectivamente un factor de transcripción del tipo MAT $\alpha$ -HMG y otro del tipo MATA-HMG que son complementarios entre sí, es decir, que controlan la expresión de diferentes genes, aunque relacionados entre sí y, sobre todo, que gobernarán cada una de las dos identidades sexuales necesarias para la reproducción sexual<sup>117,118</sup>. Una célula sexual que exhibe uno de los dos tipos será capaz de producir una feromona, mientras que otra célula sexual del otro tipo expresará el receptor necesario para detectarla. Como se menciona arriba, *A. nidulans* contiene una copia de cada uno de los dos genes en su genoma, por lo que no necesita de otra cepa de la misma especie para reproducirse sexualmente ya que puede generar las dos identidades sexuales. Estas especies se denominan homotálicas.



**Figura 1:** Representación esquemática del ciclo reproductivo sexual y asexual de *A. fumigatus*. Las conidias, o esporas asexuales, germinan y forman hifas haploides, a partir de las cuales se acabarán desarrollando conidióforos, unas estructuras especializadas donde se generan y almacenan las conidias hasta su dispersión. Si células de un par sexual que conforman una hifa se acaban encontrando con células de otra cepa del par sexual contrario, pueden fusionarse para dar lugar a células heterocariontes. Tras varios pasos de meiosis, se generarán las ascosporas fruto de la reproducción sexual, las cuales maduran y son almacenadas en una estructura denominada cleistotecia hasta que son vertidas al exterior, donde podrán germinar y dar lugar a hifas haploides.

Sin embargo, cuando se secuenció el primer genoma de *A. fumigatus* (*A. fumigatus* Af293) se encontraron múltiples genes relacionados con la reproducción sexual, pese a que se creía que no podía llevar a cabo reproducción sexual<sup>119</sup>. Entre esos genes, se encontró una copia de gen MAT1-2 (MAT $\alpha$ ), pero no de su contraparte, lo cual sugería que, si había reproducción sexual en *A. fumigatus*, sería de tipo heterotálica, es decir, que se necesitan dos cepas diferentes de la

misma especie en cuyos genomas una de ellas porte MAT1-1, mientras que, la otra contenga MAT1-2<sup>122-124</sup>. Durante mucho tiempo se intentó replicar la reproducción sexual en *A. fumigatus* en laboratorio sin éxito clonando las condiciones que otros *Aspergillus spp.* necesitaban, es decir, cultivos viejos de unas 4 semanas y con el medio agotado. No obstante, *A. fumigatus* necesita condiciones extremas de calor durante más de seis meses para poder generar las cleistotecias, que son las estructuras esféricas donde se produce la meiosis entre las dos identidades sexuales. En el interior de esas estructuras, se acabarán formando las ascosporas fruto de la recombinación genética propia de la reproducción sexual<sup>122,123</sup>. Aunque aparentemente sean condiciones que no se encuentran en la naturaleza, lo cierto es que sí. En el interior de las pilas de compost se genera el calor suficiente durante meses que posibilita llevar a cabo la reproducción sexual. La reproducción sexual es un medio importante en la transferencia de resistencias a antifúngicos entre diferentes poblaciones, de ahí la importancia de reducir al mínimo el uso de azoles en agroalimentaria ya que es la principal causa del aumento de resistencias en cepas involucradas en casos clínicos. Finalmente, se logró la reproducción sexual *in vitro* con la cepa de referencia general *A. fumigatus* Af293 (MATa) junto con otra cepa muy utilizada en este campo, la B5233 (MATa), que también es una de las que se usarán a lo largo de este trabajo.

#### 1.2.1.4. Pared celular de *Aspergillus*

La pared celular en *Aspergillus spp.*, al igual que en otros hongos y bacterias, es quizá la estructura más importante de la célula ya que es la que posibilita la supervivencia de *Aspergillus* en casi cualquier medio o condición, desde en el suelo de un bosque hasta en el interior de un macrófago<sup>125</sup>. Más concretamente, la pared celular es fundamental en el crecimiento fúngico; da soporte, resistencia mecánica y osmótica; permite la adherencia a otras superficies; actúa como filtro molecular; es el principal mecanismo de defensa del hongo y representa casi la mitad del peso seco de este. La pared celular, compuesta principalmente de polisacáridos, proteínas, lípidos y melaninas, es una estructura dinámica y versátil, capaz de adaptarse a múltiples condiciones y procesos y diferente en función del tipo celular (hifa o conidio). Entre los polisacáridos más abundantes, se encuentran el  $\beta$ -1,3-D-glucano, el  $\alpha$ -1,3-D-glucano, el galactomanano (GMN), el galactosaminogalactano y la quitina y el quitosano<sup>125-127</sup>. En *Aspergillus spp.*, y más en concretamente en *A. fumigatus*, la pared celular está dividida en dos estructuras diferenciadas, la pared celular interna y la pared celular externa, junto con la posibilidad de una matriz extracelular de composición parecida a la parte externa de la pared<sup>125</sup>.

La parte más interna de la pared, está compuesta fundamentalmente de fibras de quitina y quitosano,  $\beta$ -1,3-D-glucano y GMN<sup>125,127,128</sup>. Esta estructura es densa, rígida y aporta resistencia a estrés físico y mecánico. Dentro de la parte interna de la pared, la zona más profunda, es decir, la situada sobre la membrana plasmática, está ocupada principalmente por polímeros de quitina y quitosano, que son capaces de apilarse entre sí formando una matriz especialmente fuerte. Sobre ellos, se encuentra una matriz de  $\beta$ -1,3-D-glucano, que es el componente principal de la pared en *A. fumigatus* y en la inmensa mayoría de los hongos, junto con GMN y algo de galactosaminogalactano. El  $\beta$ -1,3-D-glucano se encuentra ramificado y los extremos de sus ramas se unen covalentemente a otros polisacáridos como la quitina, el quitosano o el GMN, actuando como una especie de cemento que retiene al resto de componentes de la pared celular<sup>125,127</sup>.

Por otro lado, la parte externa de la pared está compuesta principalmente por  $\alpha$ -1,3-D-glucano, GMN y galactosaminogalactano y es de aspecto más laxo, difuso y amorfo que la parte interna de la pared<sup>127</sup>. El  $\alpha$ -1,3-D-glucano entierra otros componentes de la pared celular más inmunogénicos, como el  $\beta$ -1,3-D-glucano y el GMN, mientras que el galactosaminogalactano puede tener una función similar a la del quitosano, añadiendo algo de estabilidad a la parte externa. Es el único de los polisacáridos que componen la pared que no se une covalentemente al  $\beta$ -1,3-D-glucano. Además, *Aspergillus spp.*, es capaz de generar una matriz extracelular compuesta de galactosaminogalactano, GMN y  $\alpha$ -1,3-D-glucano. Aunque los tres son componentes de la membrana externa, la presencia de galactosaminogalactano es esencial para que se pueda generar la matriz extracelular. Dicha matriz extracelular es fundamental para la formación de biofilms<sup>125-127</sup>.

La **quitina**, que es un homopolisacárido lineal compuesto por enlaces 1 a 4 de N-acetilglucosamina, representa entre el 1 y el 15% del peso seco de la pared en *Aspergillus spp.* y, como se ha mencionado arriba, se sitúa en la parte más interna de la pared y contribuye enormemente en la morfología de la célula<sup>125</sup>. Dichos homopolímeros, son capaces de generar más puentes de hidrógenos con otros polímeros de quitina que sus versiones no aminoacetiladas como la celulosa ( $\beta$ -1,4-D-glucano), generando un mayor grado de empaquetamiento y, por tanto, de resistencia mecánica. La quitina es sintetizada en *A. fumigatus* por ocho enzimas diferentes (ChsA-G) pertenecientes a dos clases distintas en función de si necesitan tripsina para activarse *in vitro* o no<sup>125,129-131</sup>. Dichas enzimas son proteínas transmembrana que se nutren de UDP N-acetilglucosamina citosólico para sintetizar un polisacárido lineal que se inyecta en el espacio periplásmico. Aparentemente, la función de estas ocho quitina-sintetasas es redundante, ya que delecciones individuales de los genes que codifican estas enzimas no producen cambios

significativos en *Aspergillus*, con excepción de *ChsG*, cuya ausencia aumenta mucho la sensibilidad de dichos hongos a equinocandinas ya que, aparentemente, *ChsG* puede estar involucrada en un mecanismo compensatorio ante la falta de  $\beta$ -1,3-D-glucano inducida por estos fármacos<sup>129-131</sup>. No obstante, mutantes cuádruples de éstas ocho enzimas (agrupadas en las dos clases a las que pertenecen) sí que han mostrado defectos en el crecimiento, en la formación de las conidias y en la morfología de la pared<sup>130</sup>.

Junto con la quitina, se suele describir otro polisacárido directamente relacionado en forma, composición y función, que es el **quitosano**. Este heteropolisacárido, también lineal como la quitina, está compuesto de N-acetilglucosamina y glucosamina, ambas distribuidas aleatoriamente por toda la cadena. Su síntesis es a partir de quitina, la cual es deacetilada por unas enzimas denominadas quitín deacetilasas (ocho en el genoma de *Aspergillus*). Al igual que con las quitín sintasas, las quitín deacetilasas son enzimas redundantes, puesto que la delección individual de cada una de ellas no produce cambios perceptibles en el crecimiento y la viabilidad de *A. fumigatus*, con la excepción de *Cda2*, cuya ausencia impide la generación de conidias<sup>132</sup>. La diferenciación entre quitina y quitosano es algo difusa, puesto que la única diferencia reside en el grado de acetilación de cada uno de ellos. Por ejemplo, se considera quitina si el grado de acetilación de las glucosaminas es superior al 50%, mientras que si dicho grado es menor del 50% se considera quitosano. La eliminación de grupos acetilo en quitina suele disminuir su rigidez ya que se eliminan interacciones con otras fibras de quitina al reducir el número de puentes de hidrógeno posibles. Dicha deacetilación de la quitina cambia las propiedades químicas del polímero quitina/quitosano aumentando su solubilidad y su flexibilidad y, además, confiriendo carga positiva al polímero al hidratarse<sup>132</sup>.

El  **$\beta$ -1,3-D-glucano**, que en origen es un homopolisacárido lineal, está compuesto de residuos de glucosa unidos con enlaces  $\beta$ -1,3<sup>127</sup>. *A. fumigatus* solo tiene una única  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa, *fks1*, cuya función va regulada por una GTPasa de la familia Rho. Esta  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa es una proteína transmembrana que utiliza UDP glucosa citosólica para generar largos polímeros de  $\beta$ -1,3-D-glucano de hasta 200 residuos de longitud, aunque en condiciones biológicas pueden llegar a tener hasta 1500 residuos debido a la extensa modificación que se lleva a cabo después de su síntesis<sup>126,127</sup>. El  $\beta$ -1,3-D-glucano que sintetiza *Fks1* es lineal pero el que se encuentra embebido en la pared fúngica se encuentra ramificado (el enlace de las ramificaciones es  $\beta$ -1,4 o  $\beta$ -1,6). Además, es habitual encontrar longitudes mucho mayores en las cadenas de  $\beta$ -1,3-D-glucano ya incluidas en la pared fúngica<sup>126,127</sup>. Por tanto, las funciones de ramificación y elongación del  $\beta$ -1,3-D-glucano han de ser asumidas por otras enzimas que, debido a su importancia en este trabajo, se describen más adelante.

Quizá el polímero más importante de la pared de *Aspergillus*, y de muchos otros hongos, sea el  $\beta$ -1,3-D-glucano<sup>125-128</sup>. Pese a que su mutante es viable, su crecimiento *in vitro* y su virulencia *in vivo* se ven enormemente afectadas. La pared del mutante de *fks1* no contiene nada de  $\beta$ -1,3-D-glucano, lo que confirma que su síntesis solo está gobernada por una única enzima<sup>126,133</sup>. Además, la estructura de la pared de dicho mutante es muy aberrante, puesto que está compuesta únicamente de quitina expuesta al exterior junto “grumos” de galactosaminogalactano. La ausencia de *fks1* se correlaciona con la presencia de grandes cantidades de GMN, galactosaminogalactano y  $\alpha$ -1,3-D-glucano dispersos por el medio de cultivo y la inhibición de *Fks1* con equinocandinas, como puede ser la CSF, genera un fenotipo similar en células tratadas<sup>133</sup>. Aunque el mutante sea viable, *A. fumigatus* se vuelve enormemente susceptible a múltiples tipos de estrés a los que antes era especialmente resistente, como el químico, el osmótico o el térmico ya que lo que separa la membrana fúngica del exterior es más una malla con regiones vacías que una estructura densa y bien definida como es una pared funcional<sup>133</sup>. La mayoría de los componentes de la pared celular fúngica van unidos covalentemente al  $\beta$ -1,3-D-glucano, por lo que la ausencia de este explica que no puedan ser retenidos en la pared y sean vertidos al medio de cultivo, haciendo que las células mutantes para *fks1* sean poco más que protoplastos<sup>125-127</sup>.

Aparte de la subunidad biosintética de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa (*Fks1*), esta enzima está compuesta por una segunda subunidad, de carácter regulatorio, denominada *Rho1*<sup>125-127</sup>. *Rho1* es una GTPasa de membrana cuyo mecanismo regulatorio está basado en la detección de estímulos de estrés asociados a la pared fúngica. Además, la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa suele localizarse en los bordes y puntas de las hifas más que en las zonas de menor crecimiento ya que ahí es donde se necesita la síntesis de nueva pared. Para que se lleve a cabo esa actividad biosintética, es necesaria la presencia de una tercera proteína, *Rom2*, cuya unión a *Rho1* la activa y, en última instancia, *Rho1* activa *Fks1*. De hecho, los mutantes de *rom2* tienen un fenotipo similar a los de *fks1*, con un crecimiento muy reducido y una elevada susceptibilidad a múltiples agentes que causen estrés<sup>126</sup>.

La biosíntesis del  $\beta$ -1,3-D-glucano lineal comienza en la membrana plasmática, donde *Fks1* está localizada y vierte al espacio periplásmico polímeros lineales de  $\beta$ -1,3-D-glucano de longitud variable<sup>126,133</sup>. En la membrana celular, se encuentran ancladas mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) varias familias de proteínas que son capaces de modificar el  $\beta$ -1,3-D-glucano recién sintetizado y que poseen funciones de endoglucanasas, transglicosilasas y ramificantes<sup>134-142</sup>. Entre esas proteínas, se encuentran siete endoglucanasas (*Eng1-7*) y 9 transglicosilasas pertenecientes a dos familias distintas, *Bgt1-2* y *Gel1-7*, y todas ellas son proteínas ancladas a la

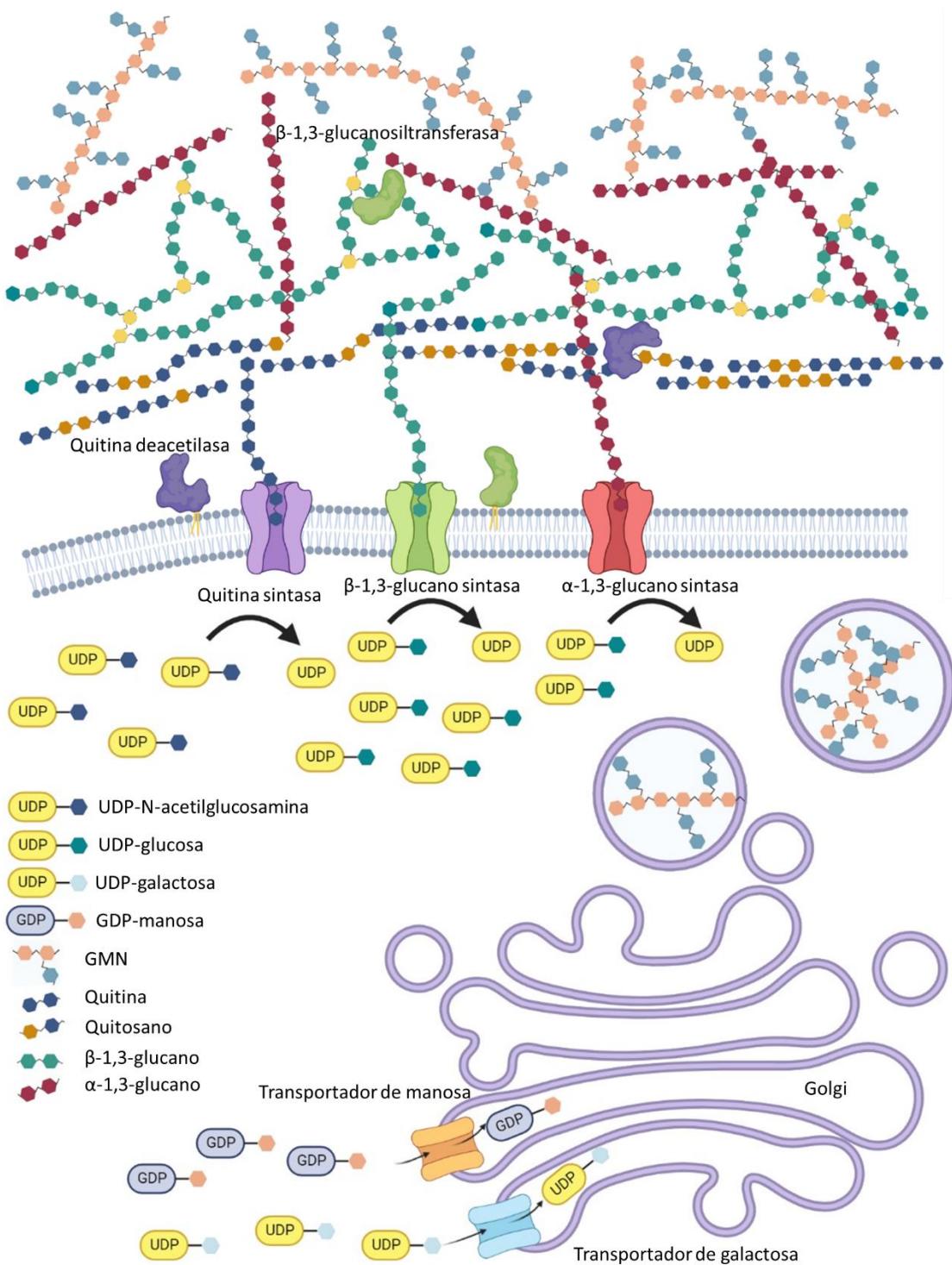
membrana mediante GPI. Respecto a las endoglucanasas, son enzimas cuya misión es escindir cadenas de  $\beta$ -1,3-D-glucano<sup>134</sup>. Aunque mutantes simples de *eng1* y *eng2* no se veían afectados respecto al crecimiento o a la virulencia, lo que vuelve a sugerir funciones redundantes, mutantes múltiples de ellas en *A. fumigatus* mostraron algunos defectos en la morfología de las conidias. Concretamente, el mutante de las 5 primeras endoglucanasas impedía la separación de las conidias recién formadas, quedando estas como collares de cuentas unidas una detrás de otra, aunque su viabilidad no se redujo<sup>134</sup>. Por otra parte, *Bgt1* y *Bgt2*, que son dos transglicosilasas con actividad endoglucanasa, también están caracterizadas. *Bgt1* es capaz de cortar una cadena de  $\beta$ -1,3-D-glucano y enlazarla al carbono 6 de un extremo no reductor de otra molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano. Es decir, acaba generando una cadena lineal de  $\beta$ -1,3-D-glucano con un enlace  $\beta$ -1,6 interno y un C3 libre en la molécula con el C6 enlazado por lo que, por tanto, no tiene actividad ramificante, simplemente introduce enlaces  $\beta$ -1,6 aleatorios<sup>135</sup>. Sin embargo, la actividad de *Bgt2* es ligeramente diferente ya que, aunque también tiene actividad endoglucanasa, luego transfiere el fragmento de  $\beta$ -1,3-D-glucano recién escindido a un punto interno de otra cadena de  $\beta$ -1,3-D-glucano con un enlace  $\beta$ -1,4 y, por tanto, mostrando también actividad ramificante. No obstante, mutantes dobles de ambos genes no influyeron en el crecimiento y desarrollo de *A. fumigatus in vitro*, sugiriendo que estas enzimas podrían ser menos importantes en la síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano<sup>135</sup>.

Un tercer grupo de enzimas participan en el metabolismo del  $\beta$ -1,3-D-glucano. Estas enzimas pertenecen a la familia GEL y, al igual que las anteriores, son transglicosilasas<sup>136-139,141,142</sup>. De las siete que contiene el genoma de *A. fumigatus*, se han caracterizado *Gel1*, *Gel2*, *Gel4* y *Gel7*. Los genes *gel1*, *gel2* y *gel4* se expresan constitutivamente, mientras que *gel7* lo hace durante la conidiación<sup>143,144</sup>. *Gel1* y *Gel2* son enzimas con actividad endoglucanasa, es decir, escinden fragmentos de  $\beta$ -1,3-D-glucano, así como de transglicosilasa, ya que son capaces de unir el extremo reductor del oligosacárido recién escindido al extremo no reductor de otra molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano ya existente, es decir, elongando la segunda molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano<sup>139,143</sup>. El mutante de *gel1* es viable y no genera un fenotipo distinto del original, aunque exhibe reducción en la cantidad de  $\beta$ -1,3-D-glucano total que forma la pared<sup>143</sup>. Sin embargo, el mutante de *gel2* y el mutante doble de *gel1* y *gel2* ven su crecimiento enormemente disminuido; así como su virulencia, lo que sugiere que estas transglicosilasas son importantes en la síntesis y remodelación de la pared<sup>139,141,143</sup>. Por otra parte, el mutante de *gel7* apenas generó diferencia fenotípica, aunque los mutantes dobles de *gel7* con *gel1* y *gel2* mostraron serios defectos en el crecimiento al someterse a estrés térmico, así como en la conidiación y en la cantidad de  $\beta$ -1,3-

D-glucano presente en la pared<sup>144</sup>. En conjunto, se puede apreciar que la función de *Gel7* puede ser absorbida mayormente por *Gel1* y *Gel2*.

Por último, la última transglicosilasa caracterizada es *Gel4*. *Gel4* es una enzima especial, muy probablemente una de las más importantes descubiertas hasta la fecha en la síntesis de la pared de *A. fumigatus*. *Gel4* posee actividad endoglucanasa, ya que es capaz de escindir fragmentos de más de 5 residuos de  $\beta$ -1,3-D-glucano; transglicosilasa, ya que es capaz de enlazar dichos fragmentos de  $\beta$ -1,3-D-glucano a un extremo no reductor de otra molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano consiguiendo elongar dicha molécula y ramificante, ya que, a diferencia del resto de enzimas de su grupo, también posee la capacidad de unir los fragmentos escindidos de  $\beta$ -1,3-D-glucano al C6 de un residuo interno de otra molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano, es decir, creando una ramificación mediante un enlace interno  $\beta$ -1,6<sup>138,142</sup>. Además, la delección de *Gel4* es letal en *A. fumigatus*, ya que no se ha conseguido nunca obtener un mutante viable para este gen, lo que hace resaltar la importancia de esta enzima en la síntesis y remodelación de la pared, así como en la viabilidad del hongo<sup>138</sup>. Por estas razones, ***Gel4* es la diana que hemos escogido en este trabajo en el que desarrollaremos un nanobody inhibitorio para ser usado como fármaco en el tratamiento de la AI**. Además, resulta casi paradójico que, abolir la síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano lineal produzca efectos graves en la viabilidad de *A. fumigatus*, pero no sea letal; mientras que, abolir la remodelación del  $\beta$ -1,3-D-glucano lineal para dar lugar a la molécula grande y con muchas ramificaciones que es, al final, la que se encuentra embebida en la pared, sí que sea letal. De hecho, hasta la actualidad, la delección de *Gel4* es la única alteración letal que se ha encontrado en relación a la biosíntesis de la pared de *A. fumigatus*. No obstante, aunque *Bgt2*, que se ha mencionado antes, también tenga actividad ramificante, la ausencia de esta enzima no modifica la viabilidad de *A. fumigatus*<sup>135,136</sup>.

Por otra parte, resulta complejo imaginar que la completa remodelación del  $\beta$ -1,3-D-glucano se de en la totalidad en el espacio periplásmico, sobre la membrana plasmática. Aunque *Gel4* lleva anclaje GPI a la membrana y la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa es una proteína de membrana, el transporte de una molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano ramificado de más de 1500 residuos a través de la maraña de polisacáridos que es una pared ya formada, sería enormemente complicado. De hecho, se ha detectado *Gel4* en exosomas secretados por *A. fumigatus*, lo que apoyaría la hipótesis de que la modificación del  $\beta$ -1,3-D-glucano puede darse *in situ*, sobre la misma pared, y posiblemente también de otros polisacáridos de la pared<sup>145</sup>.



**Figura 2:** Esquema de la síntesis y la composición de la pared celular de *A. fumigatus*. La síntesis de quitina es llevada a cabo por varias quitina sintasas a partir de UDP-N-acetilglucosamina citosólica. Posteriormente, residuos de N-acetilglucosamina de la quitina pueden ser deacetilados por quitina deacetilasas para producir quitosano. Por otra parte, los  $\alpha$  y  $\beta$ -1,3-glucanos son sintetizados a partir de GDP-glucosa citosólica por sus respectivas sintetasas. Además, el  $\beta$ -1,3-glucano lineal puede ser modificado por enzimas de la familia GEL. Por último, se sospecha que la síntesis del GMN se da en el interior del Golgi como glicosilación de proteínas, desde donde será transportado al exterior de la célula contenido en el interior de vesículas.

Otro polisacárido común en la pared de *Aspergillus* es el  **$\alpha$ -1,3-D-glucano**, cuya ubicación se encuentra en la parte externa de la pared, ayudando a ocultar el  $\beta$ -1,3-D-glucano al exterior y mejorando la adhesión de las hifas a diferentes superficies, así como participando en la formación de biofilms<sup>126,128</sup>. El  $\alpha$ -1,3-D-glucano es sintetizado por tres enzimas de membrana conocidas como *Ags1-3*. Sin embargo, aunque sus mutantes, incluido el triple, son viables, éste último presenta virulencia reducida en un modelo murino de aspergilosis que, probablemente, esté relacionado con una mayor inmunogenicidad del hongo al tener expuesto el  $\beta$ -1,3-D-glucano al exterior, el cual sería fácilmente reconocido por el receptor de reconocimiento de patrones Dectina-1 presente, por ejemplo, en macrófagos<sup>126,146,147</sup>. Por tanto, el  $\alpha$ -1,3-D-glucano es un factor de virulencia, ya que su ausencia reduce las posibilidades de supervivencia del hongo en el hospedador. Además, el triple mutante también presenta defectos en la conidiación.

Continuando con la parte externa de la pared de *Aspergillus*, otro heteropolisacárido importante es el **galactosaminogalactano**, que es sintetizado a partir de UDP galactosa y UDP galactosamina con enlaces  $\alpha$ -1,4 por la enzima *Gtb3*. Aunque no está confirmado del todo, el mutante de *gtb3* no produce galactosaminogalactano, aunque su pared celular no se ve afectada en absoluto por la ausencia de este<sup>148</sup>. Sin embargo, el galactosaminogalactano es esencial para la formación de biofilms, ya que su carga positiva le permite adherirse a otras superficies y, además, su distribución variable de galactosa y galactosamina le permiten tener propiedades físicas diferentes en función de las necesidades que tenga la célula<sup>126,148</sup>.

El último heteropolisacárido relevante de la pared celular de *Aspergillus* es el **GMN**, que está compuesto de un esqueleto de manosa enlazada  $\alpha$ -1,2 o  $\alpha$ -1,6 con ramificaciones  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 compuestas de cuatro o cinco residuos de galactofuranosa enlazada  $\beta$ -1,5. El GMN tiene propiedades hidrofóbicas y es esencial para la estructura de la pared fúngica, a la cual va enlazado covalentemente con el  $\beta$ -1,3-D-glucano, así como para procesos de adherencia a superficies y virulencia<sup>126,127</sup>. Respecto al esqueleto de manano lineal, se desconocen las manosiltransferasas que participan en su síntesis en *A. fumigatus*, aunque sí que se conoce un transportador de GDP manosa (*GmtA*) que se localiza en la membrana del Golgi cuyo mutante es incapaz de transportar GDP manosa a su interior y carece completamente de galactomanano en la pared fúngica. De igual manera, se desconocen las transglicosilasas que participan, aunque sí se ha identificado otro transportador en el Golgi que introduce UDP galactofuranosa y cuyo mutante generaba cadenas cortas de manano sin ramificaciones de galactofuranano<sup>149</sup>.

#### 1.2.1.5. Metabolismo secundario

Casi igual de importante que su pared, el metabolismo secundario de *Aspergillus* juega un papel clave en la adaptación a los múltiples ambientes en los que puede encontrarse. De hecho, se entiende como metabolismo secundario a todas aquellas vías metabólicas que generan pequeñas moléculas que no son necesarias para la estricta supervivencia del organismo, pero que juegan un papel clave en las interacciones con el medio ambiente o con otros organismos. Entre las diferentes secciones y especies de *Aspergillus*, el grueso del genoma que no pertenece al metabolismo secundario está altamente conservado (>80%)<sup>150</sup>. Sin embargo, las regiones próximas a los telómeros de los ocho cromosomas que posee *Aspergillus spp.*, la variabilidad genética es altísima, tanto, que el grado de homología cae hasta el 30% incluso entre individuos de la misma sección<sup>150-152</sup>. En esas regiones próximas a los telómeros, se encuentran almacenadas las rutas biosintéticas de los diferentes metabolitos secundarios (MS) contenidas en sus pertinentes clústeres genéticos<sup>150,152</sup>. Como se ha mencionado antes, el grado de homología en estas regiones próximas a los telómeros es baja, lo cual es debido a que no todas las especies contienen los mismos clústeres de síntesis de MS, por lo que cada especie genera un perfil de metabolitos distintos<sup>153</sup>. A groso modo, se puede apreciar una serie de MS que son comunes entre especies de la misma sección y que no están representados en otras secciones. Incluso dentro de una misma especie, puede darse el caso de que una cepa sea defectuosa en un clúster mientras que otra no. Si bien es cierto que algunos MS como las ocratoxinas son compartidos entre diferentes secciones, como es en este caso la sección *Nigri* y la sección *Flavi*, lo más común es que durante los diferentes eventos de especiación, los diferentes clústeres homólogos se hayan ido diferenciando para acabar produciendo un MS diferente o incluso se hayan ido perdiendo<sup>150-153</sup>. Por ejemplo, el clúster de la (GT), típico de la sección *Fumigati* y que no está presente en otras secciones, sí que tiene homólogos relativamente parecidos que tras la especiación han ido divergiendo para acabar codificando una ruta biosintética que genera un MS diferente, como es el caso de la acetilaranotina en la sección *Terrei* o la aspiroclorina en la sección *Flavi*<sup>153</sup>.

La estructura de los clústeres de síntesis de MS es más o menos común, donde hay una enzima núcleo o principal, que suele ser una péptido sintasa no ribosomal (NRPS), una poliquétido sintasa (PKS) o una enzima mixta NRPS/PKS que sintetizan el esqueleto del MS; una serie de enzimas accesorias que modifican la molécula esqueleto hasta generar el MS final; uno o varios factores de transcripción que controlan la expresión de los diferentes genes del clúster o el transporte del MS hacia el exterior<sup>150,153</sup>. Aunque su número varía entre cepas y especies, existiendo cepas con un perfil muy escaso en materia de producción de MS perniciosos, como

*A. oryzae* y *A. sojae*, por norma general cada genoma de *Aspergillus* contiene varias decenas de estos clústeres basados en NRPSs y PKSs.

El perfil de MS que genera una especie de *Aspergillus* le permite adaptarse a múltiples entornos. Entre las actividades biológicas que presentan los MS de *Aspergillus* se suelen encontrar antibacterianas, antivirales, inmunomoduladoras, oncogénicas e incluso antifúngicas. Por ejemplo, en un entorno biológico en el que tiene que competir con otros hongos y bacterias, *Aspergillus spp.*, que tiene uno de los metabolismos secundarios más potentes conocidos en el reino de los hongos, es capaz de decantar la balanza a su favor limitando mucho o incluso aboliendo el crecimiento del resto de especies que tratan de coexistir en ese mismo ambiente. De hecho, cuando *Aspergillus* contamina una placa de cultivo donde se está cultivando otro microorganismo diferente, es capaz de desarrollarse y, al final, acaba creciendo por toda la placa destruyendo completamente al microorganismo original en la mayoría de los casos.

Muchos péptidos no ribosomales o poliquétidos como la GT de *A. fumigatus*, el terrieno o la acetilaranotina de *A. terreus* o, por supuesto, la penicilina de *A. nidulans*, entre otros muchos ejemplos, tienen propiedades antibacterianas<sup>153–156</sup>. Un ejemplo curioso de toxina fúngica antifúngica, valga la redundancia, es la lovastatina de *A. terreus*. La lovastatina, un inhibidor de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa humana que es ampliamente utilizado como fármaco en el tratamiento de la hipercolesterolemia y otros trastornos lipídicos relacionados con un exceso de colesterol, es sintetizada y secretada por *A. terreus* como antifúngico ya que también es capaz de inhibir a su homólogo fúngico que participa en la síntesis de ergosterol<sup>157</sup>. De hecho, los azoles usados en clínica siguen una estrategia similar y también están dirigidos contra la ruta biosintética del ergosterol, aunque contra otra enzima.

Respecto al perfil de MS de *A. fumigatus*, que es uno de los principales organismos sobre los que se desarrolla este trabajo, quizá la micotoxina más importante y, probablemente, la más estudiada, incluido este grupo de investigación, sea la GT. La GT es un péptido no ribosomal fruto de la unión de L-serina y L-fenilalanina para dar un ciclopéptido L-Ser-L-Phe que, posteriormente, será modificado por una serie de enzimas que acabarán introduciendo dos átomos de azufre sobre el nuevo anillo de piperazina formado por los dos enlaces péptidos anteriores. La alta reactividad de estos dos átomos de azufre, que pueden estar en forma reducida o ditiol, u oxidados formando un puente disulfuro intra anular, es elevada. La alternancia entre la forma ditiol y la forma disulfuro genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y, además, es capaz de reaccionar con casi cualquier molécula biológica, como otras proteínas, mediante puentes disulfuro, es decir, modificándolas covalentemente.

Se sabe que la GT exhibe actividad contra casi todos los reinos de la vida e incluso contra varios virus. En el caso de las bacterias, presenta actividad antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Microsporum gypseum*, *Staphylococcus aureus*, y *Bacillus subtilis*<sup>153,158,159</sup>. En lo referente a hongos, también se ha reportado inhibición del crecimiento de *C. albicans*<sup>159</sup>, así como en protozoos, donde también tiene actividad contra *Plasmodium falciparum*<sup>160</sup>, causante de la malaria. Sorprendentemente, también tiene actividad antiviral respecto a un buen número de virus, como los virus Nipah y Hendra, los virus del herpes y la polio, así como Influenza A, entre otros<sup>161-164</sup>.

Además de las actividades expuestas anteriormente, la GT también tiene un papel especial en la infección causada por *A. fumigatus* en animales ya que le ayuda a esquivar el sistema inmunológico del hospedador. De hecho, la GT es un conocido factor de virulencia en modelos de ratón, donde su ausencia reduce la mortalidad asociada a la AI en dichos modelos<sup>165,166</sup>. La GT, que se secreta desde los primeros instantes de la infección (al germinar la conidia), es capaz de inhibir la fagocitosis en macrófagos, induce apoptosis en macrófagos y monocitos, bloquea la producción de citoquinas inhibiendo el factor de transcripción NF-κB, impide la desgranulación de mastocitos e inhibe el sistema mucociliar, así como la angiogénesis<sup>153,156,167-169</sup>. Junto a la GT, *A. fumigatus* secreta otras toxinas con propiedades inmunosupresoras o inmunomoduladoras, como el ácido helvólico, que inhibe la producción de ROS en fagocitos, o la fumagilina, que inhibe la angiogénesis e induce daño tisular<sup>150,156,167,168,170,171</sup>. En conjunto, estas y otras sustancias aún por descubrir, ayudan a que las hifas de *Aspergillus* puedan proliferar en los tejidos que infectan esquivando el sistema inmunológico del hospedador.

#### 1.2.1.6. Aplicaciones

Pese a que las especies del género *Aspergillus* son peligrosos patógenos oportunistas, también se ha de reconocer su importancia en multitud de procesos biotecnológicos, alimentarios e industriales<sup>104</sup>. Por ejemplo, *A. sojae* y *A. oryzae*, que son las especies domesticadas de la sección *Flavi*, son usados en la fermentación de alimentos y en la producción de bebidas alcohólicas. *A. sojae* es el organismo empleado para fermentar extracto de soja y elaborar la salsa de soja, típica en la cocina oriental; mientras que *A. oryzae* se emplea para degradar el almidón contenido en los granos de arroz a azúcares más simples y generar un mosto dulce que luego será capaz de fermentar una levadura del género *Saccharomyces* y producir alcohol, dando lugar a la bebida japonesa conocida como *Sake*. Además, *A. niger* o *A. carbonarius* (ambos de la sección *Nigri*) se utilizan para producir sustancias orgánicas como los ácidos glucurónico, láctico, oxálico o cítrico

mediante la fermentación de melazas u otros restos procedentes de industrias agroalimentarias. De hecho, el 99% de la producción mundial de ácido cítrico es mediante fermentación por *A. niger*, sustituyendo a la extracción directa del jugo de limón<sup>172,173</sup>.

Las especies del género *Aspergillus* que, como se ha mencionado antes, poseen un metabolismo secundario muy potente, también son empleadas en la obtención de múltiples fármacos y sustancias bioactivas. Entre los fármacos aprobados para uso médico más conocidos se encuentran la lovastatina, que es un potente inhibidor de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa humana, tercera enzima en la vía del mevalonato (síntesis de colesterol, otros esteroles e isoprenoides); la ciclosporina A, que es un ciclopéptido que tras unirse a la ciclofilina en células T inhibe a la calcineurina, que es la responsable de activar el factor de transcripción NF-AT que a su vez induce la expresión de IL-2, inhibiendo de este modo la activación de linfocitos T; o el antibiótico universalmente conocido penicilina de *A. nidulans*<sup>104</sup>.

Además de estas sustancias, las especies de *Aspergillus* también son capaces de producir una inmensa batería de sustancias con actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales o antitumorales como la GT, la asperfuranona, la terreína, la aranotina, la fumagilina, la fumitremorgina C o la pinabulina entre otras muchas; así como psicoactivas, como las fumigaclavinas, que son considerados alcaloides del ergot similares al ácido lisérgico<sup>104,172,173</sup>.

Por último, hay que destacar que de cultivos de múltiples especies del género *Aspergillus* se obtienen enzimas y proteínas de valor tecnológico e industrial como amilasas, catalasas, celulasas, glucanasas, glucosidasas, lipasas o xilananas, entre otras<sup>104</sup>.

### 1.2.2. Aspergilosis

El término aspergilosis recoge a todas aquellas enfermedades causadas por especies del género *Aspergillus* en pacientes tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos<sup>174</sup>. De hecho, las aspergilosis se clasifican en función del estado del sistema inmunológico del paciente y de la respuesta que este da al patógeno en aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilosis pulmonar crónica (APC) y aspergilosis invasiva (AI)<sup>175-178</sup>.

La **ABPA**, que es la manifestación clínica de la aspergilosis más frecuente en pacientes con asma o fibrosis quística, consiste en una reacción de hipersensibilidad contra *Aspergillus* caracterizada por la generación de IgE<sup>175</sup>. La frecuencia de la ABPA es de en torno al 3% de los pacientes con asma y de hasta el 10% de los pacientes con fibrosis quística y, en la mayoría de los casos, la especie causante es *A. fumigatus*<sup>174</sup>.

*Aspergillus spp.* puede producir infecciones pulmonares no invasivas en las que desarrollan bolas fúngicas en el lugar de la infección (aspergiloma) en las que el sistema inmunológico del paciente es incapaz de eliminar al patógeno y conducen a procesos inflamatorios muy prolongados en el tiempo que son clasificadas como APC<sup>174,179</sup>. La APC suele ir ligada a otras patologías en las que se generan cavidades en el pulmón como la tuberculosis pulmonar, la enfermedad oclusiva crónica, los enfisemas o la sarcoidosis y, además, el estado del sistema inmunológico del hospedador no necesariamente tiene que estar comprometido para que se desarrollen. *Aspergillus spp.* es capaz de aprovechar las cavidades generadas por esas otras patologías y crecer en su interior generando, aunque no necesariamente, un aspergiloma que puede estar adosado, o no, a las paredes de la cavidad pulmonar. En un primer momento, se produce la colonización por parte de *Aspergillus* de esas cavidades preexistentes de patologías previas. De hecho, alrededor del 20% de los pacientes que se recuperan de tuberculosis pulmonar, acaban desarrollando APC en menos de 3 años<sup>174,179</sup>. A diferencia de la AI, en la APC no se produce invasión del sistema circulatorio con la consiguiente diseminación al resto del organismo, sino que infección suele estar localizada en las cavidades del pulmón generadas por otras patologías.

En último lugar, la enfermedad más grave provocada por estos mohos es la AI, siendo una de las causas de muerte más comunes en pacientes severamente inmunocomprometidos y de la cual *A. fumigatus*, o más en concreto, las especies pertenecientes a la sección *Fumigati* son los causantes de la mayoría de los casos<sup>174</sup>. Ya en la década de los 90 se comprobó que la incidencia de la AI se había incrementado 4 veces respecto a estudios epidemiológicos de dos décadas atrás. No obstante, las mejoras en el diagnóstico y la introducción de los azoles en el tratamiento supuso una mejora sustancial en la incidencia y mortalidad asociada a la AI a mediados de la primera década del siglo XXI, aunque, desde entonces, pocos avances y mejoras se han hecho. Su versión pulmonar es, de lejos, la forma más frecuente de AI dado que la entrada de *Aspergillus* al organismo del hospedador es en la mayoría de los casos por inhalación de sus esporas<sup>46,174</sup>. Debido a su especial importancia y gravedad, la AI será desarrollada más en profundidad en las siguientes secciones de la introducción de esta tesis.

### 1.2.3. Patobiología de la aspergilosis y respuesta inmunológica

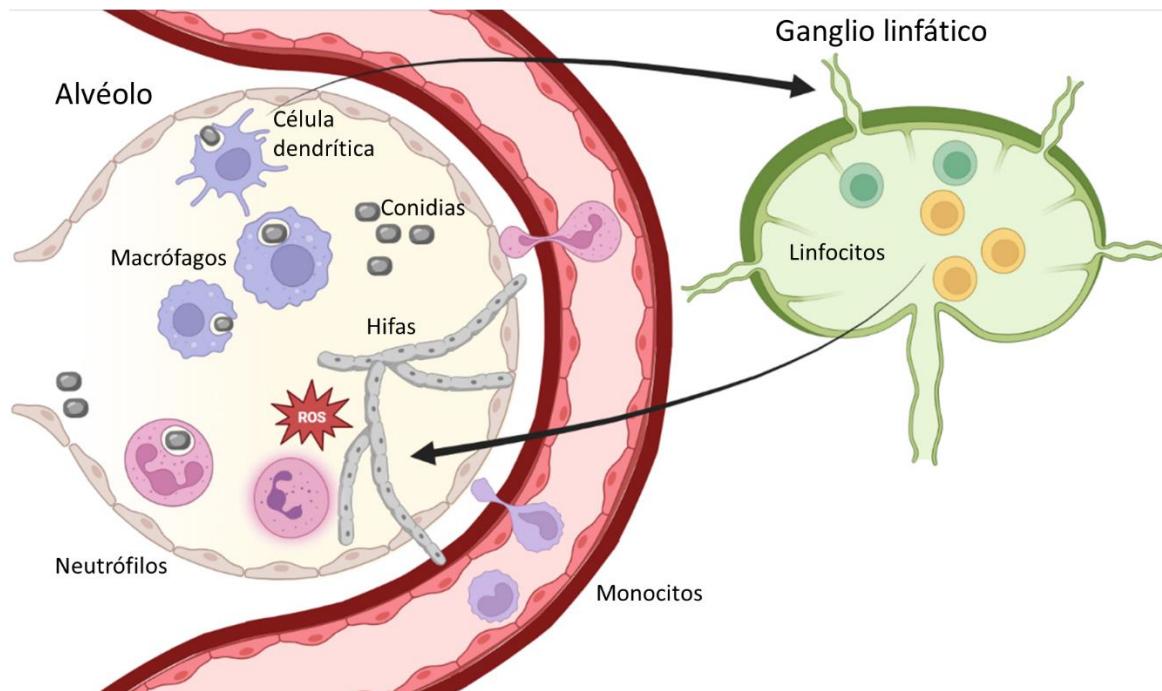
Por norma general, las conidias de *Aspergillus* suspendidas en el aire y presentes de manera ubicua son inhaladas por el hospedador y se depositan tanto en las vías respiratorias superiores como en las inferiores. La primera interacción de estas conidias es, por tanto, con el sistema mucociliar del hospedador, que es el encargado de producir moco gracias a las células

calciformes presentes en el sistema respiratorio y de barrer dicho moco al cual se quedarán pegadas las esporas de *Aspergillus* u otros posibles microorganismos inhalados. Desde el momento que dichas conidias se depositan sobre una fuente de carbono descomponible, como es el moco y el epitelio respiratorio, dejan de estar durmientes y en 2h comienzan a germinar<sup>116</sup>. La parte más externa de la pared de una conidía de *Aspergillus* está compuesta fundamentalmente por dos proteínas, RodA y CcpA, cuyas funciones principales son incrementar la resistencia a diversos tipos de estrés y, además, esconder otros componentes de la pared de la conidía que pueden ser detectados por el sistema inmunológico del hospedador<sup>116,175</sup>. Estas proteínas no solo protegen a las conidias durmientes de diversas condiciones adversas, sino también durante las primeras fases de la germinación hasta que la conidía comienza a hincharse y el  $\beta$ -1,3-D-glucano queda expuesto al exterior.

La mayoría de las conidias germinan sobre el epitelio respiratorio, mientras que un 30% son fagocitadas por las células del propio epitelio, donde son degradadas en fagolisosomas ácidos de manera activa por las células del epitelio pulmonar<sup>116,180</sup>. Sin embargo, en torno al 3% de las conidias fagocitadas son capaces de evadir esta degradación y germinar en el interior de la célula epitelial, atravesándola en última instancia según avanza la fase polarizada de la germinación de la espora, es decir, cuando comienza a tomar forma de hifa. Estas conidias que consiguen desarrollarse son capaces de alcanzar la membrana basal situada bajo las células del epitelio respiratorio. Sin embargo, la mayoría de las conidias germinan en la luz de las cavidades respiratorias, es decir, sobre el epitelio respiratorio y, además, son capaces de atravesar este sin necesidad de ser fagocitadas<sup>181</sup>. Estas conidias atraviesan las células del epitelio pulmonar induciendo la formación de un túnel de actina en estas últimas a través del cual se interna la hifa para alcanzar la membrana basal sin destruir la célula epitelial<sup>180,181</sup>.

Aparte de las células epiteliales, también son capaces de fagocitar las conidias en germinación los macrófagos residentes en el tejido respiratorio. Dichos macrófagos residentes en el tejido son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el  $\beta$ -1,3-D-glucano en las conidias en germinación o el GMN a través de los receptores lectina tipo C (CTL) dectina-1 y dectina-2 respectivamente expresados en la membrana celular del macrófago residente<sup>46,180,182</sup>. La internalización de las conidias en germinación o incluso de hifas por parte de los macrófagos residentes en el tejido respiratorio está mediada por estos receptores. Además, otros receptores de tipo Toll (TLR), como TLR-1, TLR-3, TLR-4 o TLR-6, presentes en la superficie del macrófago, o de tipo Nod (NLR), expresados intracelularmente, también participan en la detección de *Aspergillus*<sup>46,180,181</sup>. Una vez que las conidias en germinación o pequeñas hifas presentes en la superficie del tejido respiratorio son internalizadas en el interior

del macrófago mediante endosomas, se produce la acidificación de estos según van madurando. Además, se activa la generación de ROS mediante NADH oxidasas que ayudan a la eliminación del patógeno en el interior de los fagolisosomas. Generalmente, esta es la forma principal que tiene un hospedador inmunocompetente de eliminar las esporas de *Aspergillus* que se inhalan continuamente. Sin embargo, ciertas situaciones, como el tratamiento con corticoides, en los que la generación de ROS en macrófagos está disminuida, se asocian con una reducción en la muerte del hongo en el interior de los fagolisosomas<sup>180</sup>.



**Figura 3:** Representación esquemática de la respuesta inmunitaria en el interior de un hospedador frente a una infección por *Aspergillus*.

Además de la fagocitosis y de la eliminación del patógeno, los macrófagos y las células epiteliales producen una batería de citoquinas y quimiocinas que mediarán en la inflamación y en el reclutamiento de otras células del sistema inmunológico tras la exposición a *Aspergillus*<sup>180,181</sup>. Las células epiteliales del tracto respiratorio, así como los macrófagos residentes, son capaces de producir IL-1, IL-6, IL-10, MIP1, IFN tipo I y tipo III, Cxcl-1, 2 y 10 en respuesta a la presencia de *Aspergillus*<sup>46,180,181,183</sup>. De hecho, la unión de  $\beta$ -1,3-D-glucano y GMN a los receptores delectina-1 y delectina-2 respectivamente al comenzar la germinación de las conidias acaba activando transductores de señal como Syk, MyD88 o CARD9 induciendo, entre otros, la liberación de varios ligandos de CXCR2, así como de IL-1, con el consiguiente reclutamiento de neutrófilos al lugar de la infección<sup>180,181,183</sup>. Otras células del sistema inmunológico innato, como los monocitos

que circulan en la sangre, también son reclutados al lugar de la infección, donde se transformarán en macrófagos o células dendríticas derivadas de monocitos.

Los neutrófilos desplazados a la zona de infección mediante quimiotaxis son capaces de fagocitar las conidias no germinadas y destruirlas mediante ROS de manera similar a los macrófagos residentes. Sin embargo, la destrucción de hifas que no pueden ser fagocitadas es dependiente de la liberación de ROS en el sitio de la infección a través del receptor Fcy previa opsonización de las hifas<sup>180,184</sup>. Además, también son capaces de secretar trampas extracelulares (NETs) junto con otras sustancias con actividad contra *Aspergillus* como péptidos antimicrobianos, proteasas o secuestrantes de hierro. Por tanto, los neutrófilos son las células más importantes del sistema inmunológico innato en la lucha contra una infección de *Aspergillus*. Sin embargo, también hay más células importantes, como las células dendríticas o las células dendríticas derivadas de monocitos, que son capaces de fagocitar las conidias de *Aspergillus* y transportar sus antígenos a los ganglios linfáticos colindantes iniciando de esta manera la respuesta adaptativa<sup>185</sup>. Aunque se sabe que el papel del sistema inmunológico adaptativo es redundante, en el caso de pacientes trasplantados de médula, que previamente han sido sometidos a la ablación de su sistema inmunológico, se ha encontrado que células T CD4+ y CD8+ son necesarias para desarrollar una respuesta protectora contra el patógeno<sup>180,186,187</sup>. De hecho, la transferencia de células T CD4+ (Th1) sensibilizadas frente a *Aspergillus* confiere protección frente a la AI<sup>188</sup>. Por tanto, dado que tanto las células dendríticas de los tejidos afectados, así como las derivadas de monocitos desplazados por quimiotaxis a dichos tejidos son capaces de trasportar antígenos de *Aspergillus* a los ganglios linfáticos colindantes, es altamente probable que se generen respuestas adaptativas en pacientes afectados por *Aspergillus*<sup>180</sup>. De hecho, en pacientes con ABPA, la disfunción de células Treg induce un cambio de respuesta inmunológica adaptativa hacia tipo Th2 al romperse la tolerancia hacia antígenos de *Aspergillus*. Las respuestas de tipo Th2 también están asociadas con peores resultados en pacientes con AI.

#### 1.2.4. Modelos murinos de aspergilosis

Los modelos de ratón para el estudio de enfermedades son usados ampliamente en el campo de la experimentación debido al fácil manejo de éstos, así como a la similitud en el comportamiento de las diferentes enfermedades ensayadas respecto a lo que sucede en seres humanos. No obstante, la similitud de la enfermedad entre el modelo de estudio y lo que sucede en el caso de los humanos no siempre es exacta. Entre los factores a tener en cuenta en un

modelo de aspergilosis se encuentran la forma de entrada de las conidias, los fármacos inmunosupresores, si es un modelo neutropénico o no, o incluso la cepa de ratón empleada.

En general, los ratones no inmunocomprometidos son muy resistentes al desarrollo de aspergilosis. Al igual que en la mayoría de los casos en humanos no inmunocomprometidos, los ratones pueden inhalar grandes cantidades de conidias de *Aspergillus* sin llegar a padecer ningún tipo de aspergilosis. No obstante, en el caso del ser humano, sí que existen casos en los que se dan aspergilosis, generalmente no invasivas, en individuos no inmunocomprometidos.

Preferentemente, la forma de inoculación de las conidias de *Aspergillus* en estos modelos suele ser la intranasal (IN) en un intento de emular la forma de entrada del patógeno en seres humanos. La forma más común de administración IN consiste en la inoculación de grandes cantidades de conidias suspendidas en un pequeño volumen (10-50  $\mu$ L) de PBS. Dicha suspensión se carga en una punta pequeña para micropipeta de 20  $\mu$ L y se deposita sobre los orificios nasales de un ratón previamente anestesiado en el cual se está oprimiendo la faringe con los dedos para posibilitar que la suspensión de conidias sea inhalada y alcance las vías respiratorias e impidiendo que éstas se devuelvan al sistema digestivo<sup>189-191</sup>. Aunque este método es sencillo de realizar en un animalario y no es muy pernicioso para el bienestar del animal, es poco preciso en términos de homogeneidad en el número de esporas que alcanzan el pulmón, órgano diana en la mayoría de los modelos. Otra forma de administración, la cual emula a la perfección la forma de entrada de *Aspergillus*, consiste en la inhalación de conidias suspendidas en el aire contenido en una cámara diseñada especialmente para ello. Aunque la similitud a las vías naturales de infección es muy superior y no es necesario ni anestesiar a los ratones ni introducirles líquido en las fosas nasales, sigue teniendo problemas de homogeneidad en el inóculo administrado a cada individuo<sup>192</sup>.

Junto a las formas de inoculación anteriores, existe la intratraqueal (IT), que consiste en la administración de una suspensión de conidias mucho más diluida que la necesitada para el formato IN en el interior de la tráquea mediante inyección directa. Aunque esta forma sea más invasiva que las anteriores, supone una mejora en términos de homogeneidad en el número de conidias que alcanzan el pulmón. Sin embargo, para poder llevar a cabo este tipo de administración, es necesaria la presencia de personal con preparación para ello debido a la dificultad del procedimiento. Por último, hay que destacar la administración IV, en la cual se introduce una suspensión de conidias a través de la vena de la cola del ratón. Esta forma de administración permite incluso la infección de animales no inmunocomprometidos, por lo que se usa preferentemente en estudios de respuestas inmunológicas.

Las dos cepas de ratón más utilizadas en modelos animales de aspergilosis son la C57BL/6 y la BALB/c. Aunque los modelos de aspergilosis en ratón no están restringidos únicamente a estas cepas, son las encontradas con mayor frecuencia en la literatura<sup>190,191,193</sup>. Respecto a la eliminación del patógeno, es bastante similar en ambas cepas de ratón, pero, existen pequeñas diferencias en el tipo de respuesta inmunológica adaptativa que se da en cada cepa. En comparación, los ratones C57BL/6 son capaces de eliminar el patógeno algo más rápido que los BALB/c. Los C57BL/6 presentan mayor cantidad de neutrófilos, linfocitos y macrófagos a día 7 de infección en el lugar afectado que los BALB/c, y se correlaciona con la menor carga fúngica de éstos a día 7 en comparación a los BALB/c, que necesitan más días para limpiar por completo la infección. Durante la infección por *Aspergillus*, ambas cepas producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , lo que conduce al establecimiento de una respuesta de tipo Th1<sup>190,191</sup>. Sin embargo, mientras que en la cepa C57BL/6 apenas se produce IL-4, en la cepa BALB/c se generan cantidades representativas a la semana de infección, lo cual indica la propensión de esta cepa a desarrollar respuestas de tipo Th2 y puede explicar la menor capacidad para limpiar la infección de esta cepa<sup>190,191</sup>.

Por último, salvo en el caso de la infección por vía IV, los ratones necesitan estar en un estado inmunocomprometido para poder ser infectados con *Aspergillus*. Dicho estado inmunocomprometido se induce, en la mayoría de los casos, de manera farmacológica, siendo la administración de corticoides o de ciclofosfamida las dos drogas preferidas<sup>194</sup>. Generalmente, los modelos de aspergilosis se diferencian entre neutropénicos y no neutropénicos en función del fármaco inmunosupresor administrado, ciclofosfamida o corticoides, respectivamente. La administración de hidrocortisona a los ratones se traduce en la inhibición de la producción de IL-12, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  por parte de células dendríticas y linfocitos T<sub>H</sub>1 mientras que aumenta la síntesis de IL-4, IL-10 e IL-13 en linfocitos T<sub>H</sub>2, induciendo el desplazamiento de la respuesta inmunológica de tipo Th1 a Th2 y reduciendo la capacidad del sistema inmunológico para eliminar el patógeno. Además, la hidrocortisona reduce la expresión de IL-2 y su receptor en células T, inhibiendo de esta manera su activación enfocada hacia una respuesta de tipo Th1. Por otra parte, el tratamiento con altas dosis de ciclofosfamida (>150 mg/Kg) erradica por completo a las células madre hematopoyéticas, reduciendo de esta manera la cantidad de linfocitos y leucocitos en sangre y ejerciendo de esta forma su actividad inmunomoduladora. Dado que las células más importantes en la lucha contra *Aspergillus* son los neutrófilos, los modelos neutropénicos de aspergilosis (los tratados con ciclofosfamida) suelen presentar, por definición, mayor mortalidad que los no neutropénicos<sup>190,191,195,196</sup>.

## 1.3. *Cryptococcus spp.* y criptococosis

### 1.3.1. *Cryptococcus spp.*

Las levaduras del género *Cryptococcus* son hongos basidiomicetos saprófitos distribuidos universalmente<sup>10,197,198</sup>. Al igual que otros hongos saprófitos, es capaz de vivir sobre restos de materia orgánica en descomposición, pero, a diferencia de otras muchas especies, posee una estructura externa superpuesta a la pared fúngica, denominada cápsula, que le confiere especial resistencia a múltiples ambientes, yendo estos desde la materia vegetal en descomposición del suelo hasta el interior de un fagolisosoma<sup>10,197,198</sup>. Aparte de su función saprófita, varias especies del género *Cryptococcus* son conocidas por causar enfermedades en el ser humano, cuyas versiones agravadas se dan en pacientes con VIH<sup>197,199</sup>. Además, están muy interrelacionados con las plantas, ya que su ciclo sexual se logró demostrar en un modelo combinado con plantas y se sospecha que pueden establecer relaciones patogénicas con éstas, como es el caso de la “roya” de las hojas de café<sup>200</sup>.

#### 1.3.1.1. Taxonomía y distribución

Originalmente clasificado como *Saccharomyces neoformans*, *Cryptococcus* fue identificado por primera vez en 1894 por Otto Busse y Abraham Buschke en una paciente con un granuloma crónico en la tibia<sup>197</sup>. Actualmente, el género *Cryptococcus* está compuesto por apenas una decena de especies donde la característica común es la presencia de cápsula ya que muchas especies que antiguamente se clasificaron dentro de este género han sido desplazadas a otros géneros. Durante décadas, el género *Cryptococcus* se clasificó en 4 serotipos (A, B, C y D) mediante aglutinación con un kit serológico (Crypto Check – Iatron Laboratories). Originalmente, *C. neoformans* era el único causante de la criptococosis y sus diferentes variantes, *var. grubii*, *var. neoformans* y *var. gatti*, se correspondían con los serotipos A, D y B y C respectivamente. Posteriormente, se descubrieron fenotipos híbridos que correspondían a especies híbridas como es el caso del serotipo AD y del BC, así como variantes nuevas del serotipo B. Al igual que en la mayoría de los diferentes géneros de hongos, el género *Cryptococcus* ha ido sufriendo una tremenda remodelación a lo largo de los años, sobre todo con la incorporación de las técnicas de clasificación moleculares. Es por esto que actualmente es tendencia ir eliminando la antigua denominación de serotipos ya que han pasado a considerarse especies diferentes. El antiguo serotipo A se corresponde con *C. neoformans* sensu stricto mientras que el serotipo D

actualmente es *C. deneoformans* y, además, ambos forman junto con sus híbridos el complejo de especies *C. neoformans*<sup>197,201</sup>. Por otra parte, los antiguos serotipos B y C, junto con sus híbridos y sub-serotipos en el caso del B, están incluidos en el complejo de especies *C. gatti*<sup>197,201</sup>. A día de hoy, el antiguo serotipo B se corresponde con *C. gatti* sensu stricto y *C. deuterogatti*, mientras que el serotipo C se corresponde con *C. bacillisporus*, *C. tetragatti* y una tercera especie aún sin nombre a día de hoy<sup>197,198,201,202</sup>. Además, existen otras pocas especies de *Cryptococcus* que no están clasificadas por sus serotipos y que no provocan infecciones en el ser humano como *C. depauperatus*, *C. luteus* y *C. amylorentus* siendo las dos primeras levaduras micoparásitas (infectan a otros hongos) y la última entomopatógena (insectos)<sup>197,203</sup>.

Respecto a su distribución, las especies del complejo *C. neoformans* (*C. neoformans* y *C. deneoformans*) se encuentran presentes en todas las regiones geográficas del mundo, viviendo en multitud de climas diferentes. Sin embargo, las especies del complejo *C. gatti* están mucho más asociadas a climas tropicales y subtropicales, donde no hace excesivo frío. Por tanto, la presencia de las especies del complejo *C. gatti* es mayoritaria en climas tropicales, mientras que *C. neoformans* (serotipo A) es el más común en el resto del mundo, a excepción de Europa, donde las cepas más comunes pertenecen a *C. deneoformans* (serotipo D)<sup>13,201,202</sup>.

#### 1.3.1.2. Papel en el ecosistema

Las especies del género *Cryptococcus* suelen encontrarse en los suelos que contienen materia orgánica vegetal en descomposición. Como muchos otros hongos, *Cryptococcus spp.* son saprófitos y secretan un amplio repertorio de enzimas cuya misión es degradar la materia orgánica adyacente. Además del suelo con materia orgánica en descomposición, otros reservorios naturales de *Cryptococcus* son la superficie de árboles y los excrementos de múltiples especies animales. Sobre todo, es frecuente encontrar *Cryptococcus* sobre pinos y eucaliptos, así como en excrementos de gatos, palomas u ovejas entre otras muchas especies. La relación de *Cryptococcus* con todas esas especies a día de hoy es bastante desconocida, aunque se sospecha que las aves migratorias han sido el vehículo que ha contribuido a su distribución por todo el mundo<sup>197</sup>.

Además de sus características saprófitas, las especies de los complejos *C. neoformans* y *C. gatti* son capaces de infectar plantas, así como individuos humanos predominantemente inmunocomprometidos propiciando las variantes invasivas de la criptococosis, mientras que también son capaces de infectar individuos aparentemente inmunocompetentes, aunque de forma no invasiva (granulomas en diferentes órganos o infecciones cutáneas y de mucosas). Por

último, hay que destacar a las especies *C. depauperatus* y *C. luteus*, capaces de parasitar hifas de ascomicetos fusionando su pared con la pared del hongo hospedador y separando ambas células por un pequeño septo, generando de esta manera una especie de ramificación de la hifa original, conformando esta nueva ramificación las células del *Cryptococcus* parásito<sup>203</sup>.

#### 1.3.1.3. Reproducción

Las levaduras del género *Cryptococcus*, al igual que otros hongos y levaduras, se reproducen fundamentalmente de forma asexual. No obstante, también pueden llevar a cabo la reproducción sexual de igual forma que *Aspergillus spp.* o *Saccharomyces spp.* mediante el encuentro de una célula haploide MATa con otra MAT $\alpha$  (heterotálica)<sup>204,205</sup>. Por último, las cepas *C. neoformans* MATa pueden llevar a cabo un segundo tipo de reproducción sexual en la que no necesitan la presencia de otra pareja sexual opuesta denominada reproducción unisexual. A diferencia de *Aspergillus spp.*, ambas formas de reproducción sexual de *Cryptococcus spp.* se dan con mucha frecuencia en la naturaleza e incluso en el interior del hospedador y están estrechamente relacionadas con la generación de células resistentes a antibióticos o a las defensas del hospedador<sup>204,206</sup>.

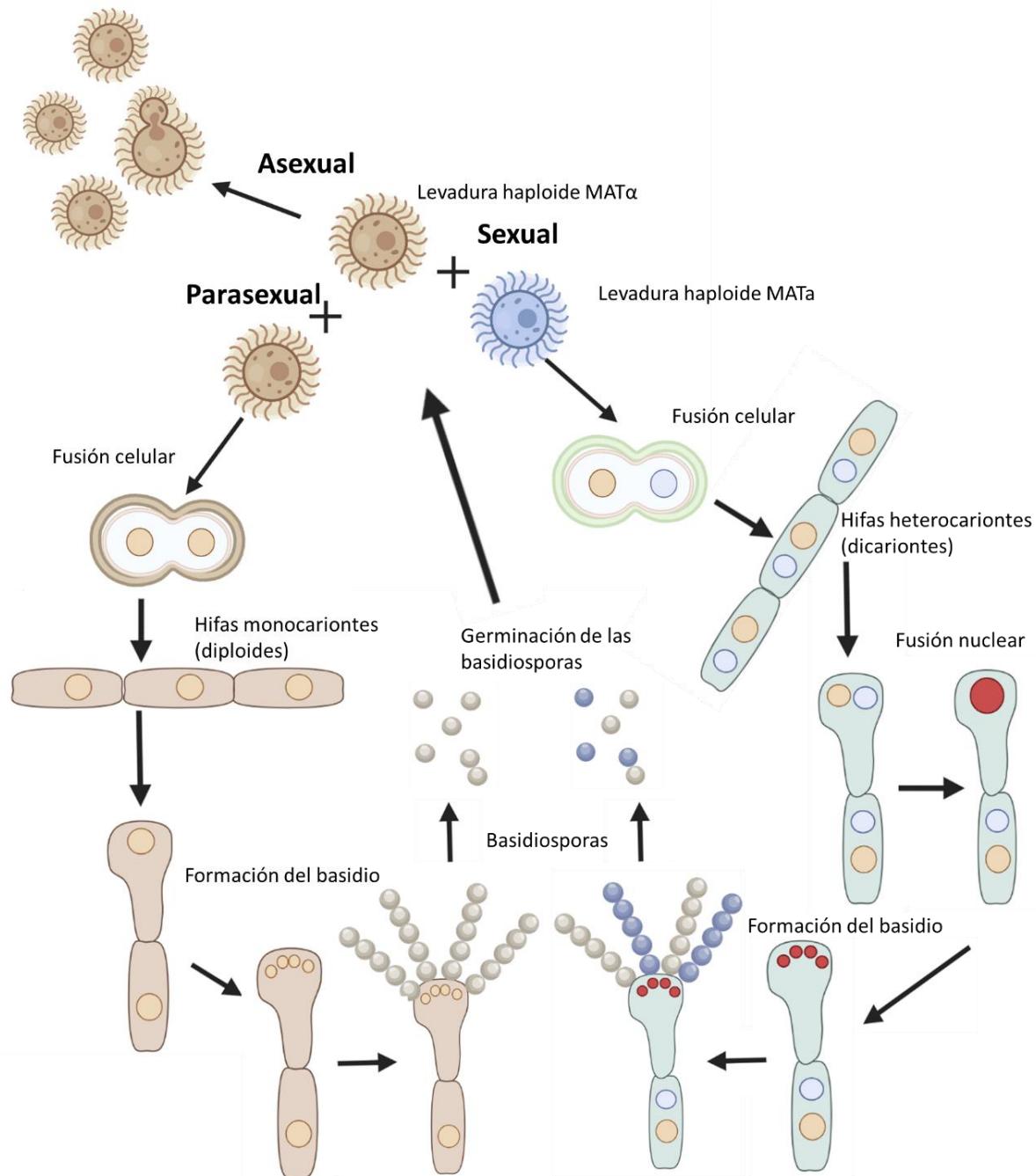
Las células haploides de *Cryptococcus* durante su ciclo de vida normal, son capaces de reproducirse asexualmente por gemación de igual manera que otras levaduras del tipo *Saccharomyces*, es decir, generando una pequeña célula hija sobre la superficie de la célula parental, con la que comparte pared celular hasta que logra separarse de ella. Esta nueva célula, también será haploide, al igual que su progenitora. Las células haploides levaduriformes son la morfología más común que muestran las células de *Cryptococcus* en la naturaleza.

Sin embargo, si una de estas células haploides levaduriformes encuentra a otra célula de *Cryptococcus*, cuyo locus MAT es el opuesto, llevarán a cabo la reproducción sexual. En ciertas condiciones de estrés, como calor o falta de nutrientes, estas células de tipo sexual opuesto se fusionarán para dar un zigoto dicariótico, donde los dos núcleos de ambos progenitores coexisten sin fusionarse. Dicho zigoto dicariótico tomará forma de hifa, conservando ambos núcleos por separado, y generará nuevas células dicarióticas en forma de hifas. En un momento dado, se producirá la fusión de ambos núcleos (cariogamia) y la consiguiente meiosis dando lugar a los basidios, estructuras que contendrán cuatro núcleos haploides con información genética mezclada de ambos progenitores. Desde estos basidios comienzan a generarse cuatro hileras de esporas (basidiosporas) por gemación desde el basidio provenientes una de cada uno de los cuatro núcleos allí contenidos. Una vez maduras, estas hileras de basidiosporas pueden

ser suspendidas en corrientes de aire y ser transportadas a otros lugares, contribuyendo a la distribución global de *Cryptococcus*.

Por otra parte, las especies del género *Cryptococcus* son capaces de desarrollar con mucha más frecuencia un segundo tipo de reproducción sexual, denominada reproducción unisexual. Mientras que en otros hongos, como los del género *Aspergillus*, la frecuencia de cepas de una especie para cada uno de los dos loci MAT ronda el 50%, en el caso de *Cryptococcus* spp la frecuencia del locus MAT $\alpha$  es superior al 95% para los 4 serotipos principales de *Cryptococcus*<sup>197,204-207</sup>. De hecho, el genoma de *Cryptococcus* posee un receptor de feromonas (*Cpr2*) fuera del locus MAT y que presenta actividad constitutiva, es decir, que activa (por defecto) las cascadas de respuesta a feromonas sin que haya habido presencia de éstas en el entorno<sup>208</sup>. Cuando dos de estas células MAT $\alpha$  “autoactivadas” se encuentran, son capaces de fusionarse y crecer en forma de hifa de manera similar a lo que ocurre durante la reproducción sexual. De hecho, al igual que en la reproducción sexual, durante la cariogamia que se lleva a cabo para dar lugar al basidio, también se producen elevadas tasas de meiosis, por lo que la reproducción unisexual puede clasificarse como una auténtica reproducción sexual.

La reproducción sexual en *Cryptococcus* spp., ya sea sexual *sensu stricto* o unisexual, es bastante más frecuente en la naturaleza que el caso de otros hongos patógenos oportunistas como *Aspergillus* spp<sup>205-207</sup>. De hecho, se conocen muchos factores inductores de la reproducción sexual en *Cryptococcus*, como son ciertas auxinas vegetales (hormonas de crecimiento como el ácido indolacético), los excrementos de aves o, sobre todo, la interacción con un hospedador. Es en este último caso, donde la reproducción sexual puede inducir a la aparición de células hipervirulentas o hiperresistentes a los fármacos utilizados para tratar la criptococosis debido a la alta tasa de diversidad genética que se genera, incluso aunque todas las células implicadas en la reproducción sexual proviniesen de un mismo clon<sup>204-207</sup>.



**Figura 4:** representación esquemática de la reproducción sexual, asexual y para sexual en el género *Cryptococcus*. Las células levaduriformes haploides de *Cryptococcus* pueden reproducirse asexualmente mediante gemación. Si dos células de diferente par sexual se encuentran, pueden fusionarse dando lugar a hifas que contienen ambos núcleos separados de los progenitores (dicariontes) y, posteriormente, formarán la estructura (basidio) a partir de la cual se generarán las basidiosporas previa fusión de ambos núcleos y meiosis. Por otra parte, dos levaduras haploides del par MAT $\alpha$  pueden fusionarse (núcleos incluidos) para dar lugar a hifas diploides de las que se generarán basidios y en las que se dará meiosis previa a la formación de las basidiosporas. Al germinar, las basidiosporas dan lugar a levaduras haploides.

#### 1.3.1.4. Pared celular de *Cryptococcus*

Al igual que para otros organismos, la pared celular de *Cryptococcus* es una estructura clave que ofrece al hongo resistencia a diferentes factores ambientales, a estrés osmótico o mecánico o incluso a la deshidratación<sup>209</sup>. Además, aporta forma y rigidez a la célula y actúa de cimiento sobre el que se construye la cápsula de *Cryptococcus*, que es una estructura superpuesta a la pared celular, también compuesta de polisacáridos, que confiere especial resistencia a múltiples tipos de estrés, como el oxidativo, que puede padecer en el interior de un fagolisosoma<sup>210,211</sup>. De hecho, las condiciones que se dan en los pulmones del huésped inducen un rápido agrandamiento de la cápsula que, a su vez, un mayor tamaño de la cápsula está relacionado con una mayor resistencia al estrés oxidativo al que va a ser sometido por los macrófagos y neutrófilos a los que se encontrará en el pulmón, siendo esta una manera de protegerse del sistema inmunológico del huésped<sup>210,211</sup>.

La pared celular de *Cryptococcus* es una estructura dinámica, que cambia y puede ser modificada en función de las necesidades de la célula y está fundamentalmente compuesta de quitina, quitosano,  $\beta$ -1,3-D-glucano,  $\beta$ -1,6-D-glucano,  $\alpha$ -1,3-D-glucano, y manoproteínas<sup>209,212-215</sup>. Junto a estos componentes, cabe destacar la presencia de melanina, así como de proteínas secretadas implicadas en la síntesis y el remodelado de la pared secretadas en exosomas<sup>213,214,216</sup>. La parte más interna de la pared, está compuesta por  $\beta$ -glucanos y fibras de quitina y quitosano, mientras que la parte más externa está formada por  $\beta$ -glucanos y  $\alpha$ -1,3-D-glucano<sup>209,215</sup>.

La **quitina**, que es un homopolímero no ramificado de N-acetilglucosamina (NacGLN) con enlaces  $\beta$ -1,4, es uno de los componentes más importantes de la pared fúngica. Forma estructuras en forma de fibras que aportan rigidez a la pared celular, su presencia es necesaria para una correcta incorporación de melanina a la pared celular y, además, se une covalentemente a otros polisacáridos de la pared y de la cápsula, como el  $\beta$ -1,3-D-glucano, el  $\alpha$ -1,3-D-glucano o glucuronoxilomanano (GXM), que es el componente mayoritario de la cápsula de *C. neoformans*<sup>209,212,215,217</sup>. El genoma de *C. neoformans*, contiene 8 quitina sintasas diferentes, lo cual sugiere funciones redundantes de ellas. Las quitina sintasas son grandes proteínas de membrana que se nutren de UDP-NacGLN citosólico para sintetizar largos polímeros de quitina que son extrusionados al exterior de la membrana plasmática<sup>212,218</sup>. En un estudio en el que se mutaron individualmente cada una de esas quitina sintasas, los mutantes individuales de cada una ellas continuaron siendo viables, aunque todos mostraron alteraciones en la morfología celular o en el tamaño y arquitectura de la cápsula<sup>218</sup>. Sin embargo, el mutante de la quitina sintasa 3 (*chs3*), que poseía un aspecto más enfermizo que el resto, presentaba morfologías celulares visiblemente más alteradas, presentando tamaños celulares agrandados

entre 2 y 3 veces, defectos en la gemación, imposibilidad de separación de una célula hija de su progenitora, sensibilidad aumentada a la temperatura, una importante disminución en la cantidad de quitina en la pared y, lo que es más llamativo, no presentaba apenas cápsula y albergaba todo el GXM capsular almacenado en el interior celular<sup>218,219</sup>. Todo esto parece indicar, por un lado, que chs3 tiene un papel más importante que el resto de quitina sintasas y, por otro lado, que la quitina juega un papel importante en el transporte del GXM sintetizado en el interior celular y almacenado en vesículas hacia la cápsula y a través de la pared<sup>218,219</sup>. Por último, el tratamiento con inhibidores de quitina sintasas genera una cápsula de tamaño disminuido y vagamente unida a la pared celular, poniendo de manifiesto la importancia de la quitina en la integridad de la pared y la cápsula<sup>215</sup>.

El **quitosano** es un heteropolisacárido de NacGLN y glucosamina (GLN) distribuidos aleatoriamente y unidos mediante enlace  $\beta$ -1,4 sintetizado por deacetilación de residuos de NacGLN sobre fibras de quitina ya existentes. A diferencia de otros hongos, donde la cantidad de quitosano respecto a la quitina suele ser baja, en el caso de *Cryptococcus*, el quitosano suele ser entre 2 y 10 veces más abundante que la quitina, entendiendo que la diferencia entre quitina y quitosano solo reside en el diferente grado de acetilación de cada uno<sup>209,215</sup>. A diferencia de la quitina, el quitosano es más soluble y flexible, por lo que su presencia contrarresta la rigidez aportada por el primero<sup>215</sup>. La deficiencia en una de las tres deacetilasas (cda1-3) propicia la acumulación de quitina en la pared celular, así como un engrosamiento del tamaño de la cápsula y problemas de integridad celular<sup>215</sup>.

El  **$\alpha$ -1,3-D-glucano**, del que se sospecha que, a diferencia de otros géneros fúngicos, es uno de los componentes mayoritarios y más importantes de la pared celular de *Cryptococcus*, es un polisacárido lineal sintetizado a partir de residuos de UDP glucosa<sup>209,212,215</sup>. El  $\alpha$ -1,3-D-glucano es un polisacárido bastante más soluble que la quitina y los  $\beta$ -D-glucanos y se sitúa preferentemente en la parte externa de la pared celular<sup>212</sup>. Sus funciones principales son, por un lado, ocultar otros polisacáridos que componen la pared celular de *Cryptococcus*, como son quitinas y  $\beta$ -glucanos, que son mucho más inmunogénicos que el  $\alpha$ -1,3-D-glucano y, por otra parte, participar de alguna manera en el anclaje de la cápsula a la pared y, por tanto, al resto de la célula<sup>220,221</sup>. Una única enzima ubicada en la membrana plasmática (*Ags1*) es capaz de sintetizar todo el  $\alpha$ -1,3-D-glucano celular y su mutante, aunque viable, presenta sensibilidad a temperatura, crecimiento lento y virulencia reducida en un modelo murino de criptococosis<sup>220</sup>. Además, aunque se desconoce exactamente si el  $\alpha$ -1,3-D-glucano está enlazado directamente a los componentes de la capsula, el mutante de *ags1* de *C. deneoformans*, con quien se llevó a cabo el estudio, es incapaz de formar la cápsula en el exterior celular pese a que sí puede

sintetizar los componentes que conforman la cápsula, por lo que se sospecha que, directa o indirectamente, participa en el anclaje de la cápsula a la célula<sup>220,221</sup>.

Por último, hay que destacar que, pese a la relativa importancia del  $\alpha$ -1,3-D-glucano en la biología de *Cryptococcus*, muy pocos estudios han sido llevados a cabo en este campo y, donde se afirma que es un componente mayoritario, es en dos artículos de las décadas de los sesenta<sup>222</sup> y noventa en los que se usaron, por un lado, dos especies raras de *Cryptococcus* no *neoformans/gatti* como son *C. albidus* y *C. terreus* mientras que en el otro artículo se utilizó el mutante acapsular *cap67* de una cepa del serotipo D (*C. deneoformans*). Respecto a *C. albidus* y *C. terreus*, hoy en día se clasifican como *Naganishia albida* y *Solicoccozyma terreus*, respectivamente, por lo que los resultados sobre el  $\alpha$ -1,3-D-glucano no deberían ser trasladados a *Cryptococcus*. Por otra parte, en el artículo de los noventa<sup>223</sup> se usa una cepa acapsular en la que probablemente estén activados mecanismos compensatorios en respuesta a la ausencia de cápsula y las proporciones del resto de componentes de la pared celular estén alterados respecto a la cepa WT. Además, en este último artículo, se cultiva la cepa acapsular en un medio rico durante 3 y 9 días. Cuando *Cryptococcus* se cultiva en un medio rico, el tamaño de su cápsula es muy discreto, mientras que, si el medio es pobre en nutrientes o está muy consumido, *Cryptococcus* sintetiza enormes cantidades de GXM que pasan a engrosar la cápsula<sup>211</sup>, lo que hace sospechar que también pueda sintetizar más cantidad de  $\alpha$ -1,3-D-glucano y quitina donde enlazar los componentes de la cápsula. Al cultivar esa cepa acapsular en medio rico en nutrientes durante 3 días, donde probablemente tampoco se induzca en exceso la síntesis de cápsula, la cantidad de  $\alpha$ -1,3-D-glucano que obtienen respecto al resto de componentes de la pared es inferior al 20%, mientras que la cantidad de  $\beta$ -glucanos es superior al 50%. No obstante, cuando las células llevan nueve días en cultivo, donde muy probablemente hayan agotado los recursos y se hayan activado los mecanismos, aunque defectuosos, de síntesis de cápsula, la proporción de  $\alpha$ -1,3-D-glucano sí que se dispara hasta casi el 50% y, como aspecto curioso, la cantidad de  $\beta$ -glucanos se mantiene invariable. Con estos datos, no se puede afirmar que el  $\alpha$ -1,3-D-glucano sea el componente mayoritario de la pared celular de un *Cryptococcus wild type*. Además, en un estudio más reciente<sup>220</sup> en el que se vuelve a utilizar una cepa acapsular *cap59*, la proporción de  $\beta$ -1,3-D-glucano respecto al  $\alpha$ -1,3-D-glucano es de 5 a 1 cultivándose dos días en un medio con un 2% de glucosa. Por tanto, se requiere mucho más trabajo en este campo para llegar a dilucidar el papel del  $\alpha$ -1,3-D-glucano en la pared celular de *Cryptococcus*.

Otro de los componentes importantes es el  **$\beta$ -1,3-D-glucano**, que es un polisacárido sintetizado linealmente a partir de UDP glucosa mediante enlaces  $\beta$ -1,3<sup>209,212</sup>. No obstante, al igual que en otros géneros fúngicos, posee ramificaciones con enlaces  $\beta$ -1,6 y se encuentra enlazado a otros

componentes de la pared celular como son la quitina y el  $\beta$ -1,6-D-glucano, así como a otras proteínas presentes en la pared relacionadas con la síntesis y remodelación de ésta<sup>209,212-215,224,225</sup>. Sin embargo y, a diferencia de la mayoría de géneros fúngicos, se ha propuesto que *Cryptococcus* contiene menos  $\beta$ -1,3-D-glucano<sup>215,226</sup> aunque, como se menciona arriba, existen estudios contradictorios. De hecho, aunque la FDA (*Food and Drug Administration*) avisa de que *Cryptococcus* no produce  $\beta$ -1,3-D-glucano, por lo que no recomienda su uso como marcador de diagnóstico de la criptococosis, lo cierto es que existen varios trabajos y artículos en los que sí se detecta  $\beta$ -1,3-D-glucano en fluido cerebroespinal de pacientes con criptococosis, lo cual puede sugerir que su síntesis no es anecdótica<sup>227</sup>.

Siguiendo con la síntesis, está determinada por una única proteína, *Fks1*, que es una enzima transmembrana que se nutre de UDP glucosa citosólica para generar dicho polisacárido en su forma lineal e injectarlo al espacio periplásmico. A diferencia de otras enzimas relacionadas con la síntesis y remodelación de la pared fúngica, la delección de *fks1* es letal, lo que indica que este gen es esencial para *Cryptococcus*<sup>228</sup>. Como ya se ha mencionado antes, encontrar una enzima cuya función es esencial para la supervivencia de un patógeno es una muy buena noticia, dado que se convierte en una diana farmacológica fantástica. De hecho, la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa de *Cryptococcus* es muy sensible a las equinocandinas como la CSF *in vitro*<sup>229</sup>. Sin embargo, al tratar cultivos de *Cryptococcus* con CSF, se necesitan concentraciones mucho mayores, en comparación con otros géneros como *Candida* o *Aspergillus*, para llegar a inhibir sensiblemente el crecimiento de *Cryptococcus*, por lo que rápidamente se descartó su uso en clínica ya que *Cryptococcus* era, de alguna manera, resistente a las equinocandinas<sup>230</sup>. Es decir, pese a que la delección de *fks1* en *Cryptococcus* revela que este gen es esencial para su biología y a que las equinocandinas inhiben la actividad  $\beta$ -glucano sintasa *in vitro* de la *Fks1* de *Cryptococcus*, se necesitan concentraciones muy altas de CSF en cultivos de este hongo para llegar a inhibir su crecimiento<sup>229</sup>, algo que condujo a varios grupos de investigación a descubrir varios mecanismos de resistencia equinocandinas en *Cryptococcus*<sup>231-233</sup>.

Aunque se desconoce en detalle la forma por la cual *Cryptococcus* es resistente a las equinocandinas, se sabe que mecanismos compensatorios de síntesis y remodelación de la pared en respuesta a estrés pueden estar implicados<sup>231,234</sup>. Por ejemplo, *Puf4*, que es un regulador post transcripcional de varios mRNAs relacionados con la síntesis de la pared, entre ellos el de *fks1*, regula negativamente la expresión de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa. Su mutante, en el que la expresión de *fks1*, *ags1*, o varias quitina sintasas y deacetilasas está aumentada, muestra una marcada resistencia a las equinocandinas, haciendo indicar que ciertos mecanismos compensatorios pueden sustituir la ausencia de síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano al ser

inhibida por las equinocandinas<sup>231</sup>. Por otra parte, también se ha descrito una fosfolipasa de membrana (*Cdc50*) que participa en la regulación del calcio intracelular y cuya ausencia aumenta muchísimo la sensibilidad de *Cryptococcus* a la CSF<sup>232,233</sup>. Además, siguiendo la lógica, también se ha descrito que mutantes con defectos en la síntesis de ergosterol, en los que la estabilidad de la membrana plasmática también está comprometida, son mucho más sensibles a las equinocandinas<sup>235</sup>.

Se sabe que la inhibición de la síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano induce la síntesis de quitina o de  $\beta$ -1,6-D-glucano como mecanismo compensatorio. Aunque *in vitro* el hongo pueda seguir creciendo, padece elevada sensibilidad a diferentes tipos de estrés, como la temperatura o el osmótico. Además, la ausencia de  $\beta$ -1,3-D-glucano aumenta la exposición de otros componentes como la quitina, lo que propicia que en modelos *in vivo* este fenotipo de la pared tenga virulencia disminuida ya que es rápidamente eliminado por el sistema inmunológico del hospedador<sup>231</sup>. Recientemente, se ha logrado generar un mutante condicional de *fks1* en *Cryptococcus* en el que se ha demostrado que este hongo es viable expresando muy pocas unidades de *Fks1*<sup>234</sup>. Sin embargo, una ligera reducción de la expresión de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa en modelo de criptococosis *in vivo* induce una notoria reducción de la virulencia de esa cepa mutante, mostrando la importancia del  $\beta$ -1,3-D-glucano para *Cryptococcus*.

Además de las equinocandinas, también se ha demostrado que scFvs diseñados contra la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintasa de *Cryptococcus* tienen efecto antifúngico tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>236</sup>. De hecho, incluso añadir anticuerpos anti  $\beta$ -1,3-D-glucano sobre *Cryptococcus* tiene efectos antifúngicos *in vitro*, reduce la capacidad del hongo de adherirse a superficies e inhibe la formación de capsula, estructura importante para resistir al sistema inmunológico del huésped<sup>237,238</sup>.

Pese a que la síntesis del  $\beta$ -1,3-D-glucano lineal está bastante bien estudiada debido, en parte, a la curiosidad generada por la resistencia mostrada a las equinocandinas, las enzimas que participan en la modificación no están estudiadas. De hecho, una búsqueda simple en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) revela que *Cryptococcus* solo tiene un único gen que codifica una glucanosil transferasa (*CnGel* a partir de ahora), cuyo homólogo es *Gel4* en *A. fumigatus*, la proteína diana para la que se ha generado un nanobody (Nb) inhibitorio en este estudio. Pese a que aún no ha sido caracterizada, sí que ha sido encontrada en el proteoma de la pared de *Cryptococcus*, así como en vesículas secretadas por este hongo, poniendo de manifiesto su importancia en la síntesis y remodelación de la pared<sup>213,214,239</sup>. Además, el doctor Óscar Zaragoza del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, con quien hemos colaborado a lo largo de este

trabajo, logró generar un mutante viable de esta enzima en serotipo A, pero, sorprendentemente, fue imposible generar un mutante para un *Cryptococcus* serotipo D, poniendo de manifiesto, por un lado, que *CnGel* es esencial para el serotipo D y, por otro, que hay diferencias en la síntesis y remodelación de la pared en los diferentes serotipos de *Cryptococcus*.

Por último, el **β-1,6-D-glucano** es el último de los componentes principales de origen glucídico de la pared de *Cryptococcus*. Al igual que en otros hongos, es un polisacárido altamente ramificado cuya síntesis no está del todo dilucidada hoy en día y, de igual manera, se presupone que se enlaza de manera covalente al β-1,3-D-glucano, a la quitina o a proteínas con anclaje GPI, como son la mayoría de las que participan en la síntesis y remodelación de la pared fúngica<sup>212</sup>. Se sospecha que su síntesis se produce en el interior celular y se conocen hasta 7 proteínas que, de alguna manera, participan en la síntesis de β-1,6-D-glucano (*Kre5* y *6*, *Kre61-64* y *Skn1*) y, aunque todos los mutantes son viables, el mutante de *kre5* y el mutante doble de *kre6* y *skn1* presentan problemas de integridad de la pared celular, son avirulentos y tienen la cápsula aumentada<sup>212,240</sup>.

Además, hay que destacar la presencia de **melanina** embebida en la pared celular de *Cryptococcus*. La melanina, que es un compuesto polimérico complejo, amorfó y de alto peso molecular originado por la unión de monómeros indólicos o fenólicos, está ampliamente distribuida en múltiples reinos de la vida, como son los hongos, bacterias, plantas o animales<sup>241,242</sup>. Su función principal es la de aportar resistencia a varios tipos de estrés, como el mecánico y el oxidativo o el generado por la radiación ionizante o la ultravioleta<sup>241,242</sup>. En el reino de los hongos existen tres formas de síntesis de melanina, aunque dos de ellas son las mayoritarias. La primera utiliza sustratos endógenos como el acetil CoA o el malonil CoA para generar 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno mediante una poliquérido sintasa (PKS), que posteriormente será modificado hasta generar 1,8-dihidroxinaftaleno<sup>241,243,244</sup>. Esta vía, conocida como vía del dihidroxinaftaleno es la típica por la cual se genera la pigmentación de las conidias de *Aspergillus*<sup>243</sup>. No obstante, *Cryptococcus* solo puede generar melanina nutriéndose de fuentes exógenas de compuestos fenólicos como la L-DOPA. La primera reacción es una oxidación de estos compuestos llevada a cabo por enzimas con actividad lacasa para generar dopaquinona, que es una molécula altamente reactiva capaz de reaccionar con sí misma para generar cicloDOPA, que tras otra oxidación y una tautomerización se acaban generando los dihidroxindoles que polimerizarán para generar melanina<sup>244</sup>. El genoma de *Cryptococcus* contiene dos genes, *lac1* y *lac2*, que codifican dos enzimas con actividad lacasa y que se expresan en situaciones de privación de nutrientes, aunque únicamente la delección de *lac1* genera

importantes cambios en la morfología de la pared de *Cryptococcus*, así como en su virulencia, ya que reduce la resistencia al estrés oxidativo que puede sufrir al enfrentarse a los ROS generados por células del sistema inmunológico del hospedador; mientras que la delección de *lac2* solo produce un retraso en la generación de melanina<sup>243,245,246</sup>. Al igual que en otros hongos, se sospecha que la síntesis de melanina se produce en el interior de vesículas que son secretadas al exterior. De hecho, se detecta actividad lacasa en esos exosomas embebidos en la pared, donde la síntesis podría llevarse a cabo *in situ*<sup>244</sup>. Además, la capa de melanina está formada por partículas agrupadas en la parte más interna de la pared celular, posiblemente unidas a quitina o quitosano y de tamaño semejante al de dichas vesículas.

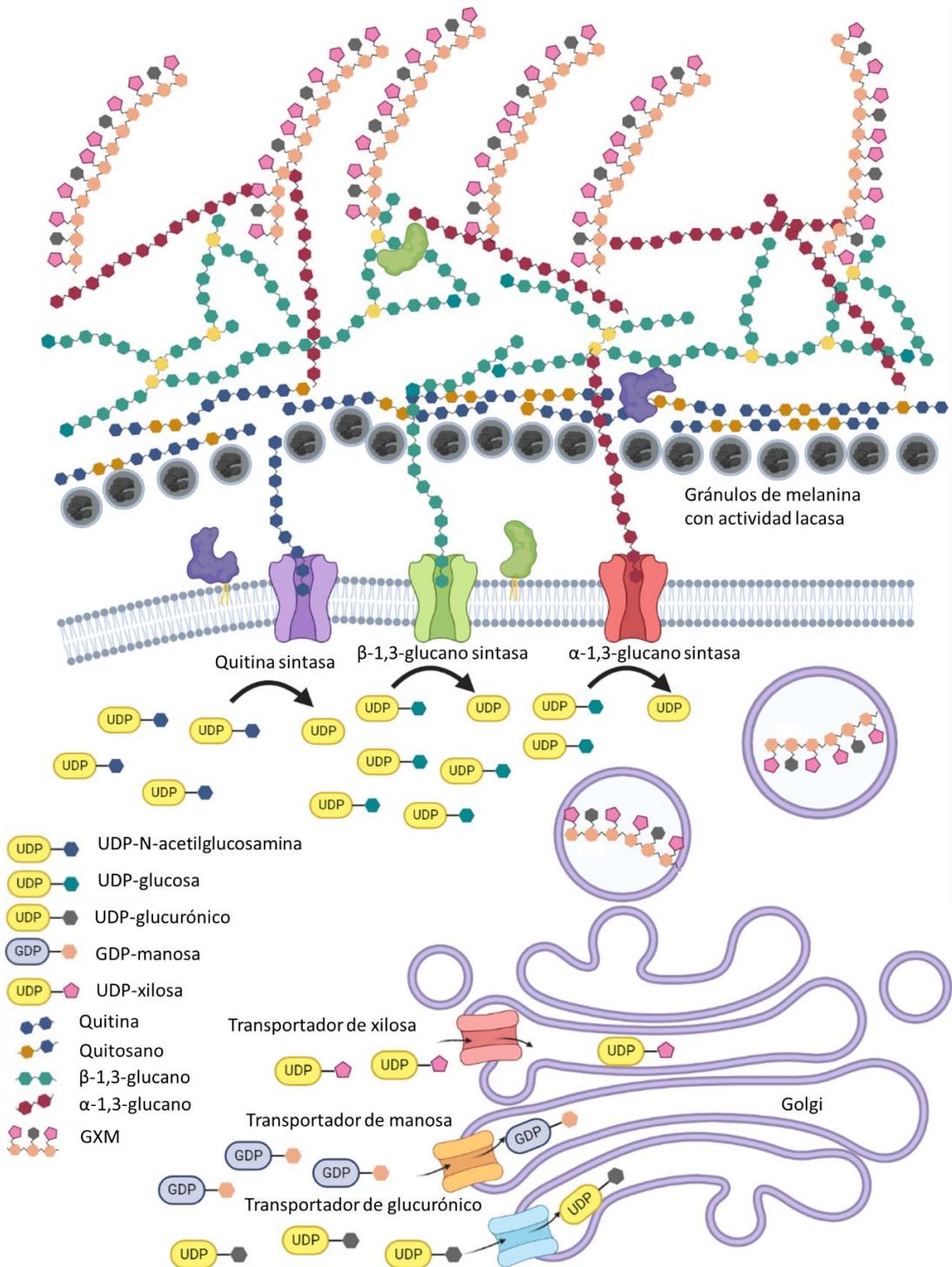
#### 1.3.1.5. Cápsula de *Cryptococcus*

La cápsula de *Cryptococcus* es una estructura compleja, superpuesta a la pared celular, compuesta principalmente de dos polisacáridos, glucuronoxilomanano (GXM) y galactoxilomanano (GalXM), altamente hidratada y que confiere especial resistencia al estrés oxidativo o a la deshidratación, además de ejercer actividad inmunomoduladora e inmunosupresora a través de sus dos polisacáridos principales<sup>211,247</sup>. Los polisacáridos que componen la cápsula, también pueden ser secretados al exterior sin pasar a formar parte de la cápsula, donde ejercen efectos inmunomoduladores para el hospedador.

El principal componente de la cápsula (>90%) es el GXM, que es un polisacárido compuesto a su vez por un esqueleto lineal de 1,3- $\alpha$ -manano con ramificaciones de ácido glucurónico con enlace  $\beta$ -1,2 y xilosa con enlaces  $\beta$ -1,2 o  $\beta$ -1,4 en función del serotipo<sup>211</sup>. Más detalladamente, se pueden identificar hasta seis motivos diferentes en las moléculas de GXM que se repiten a lo largo de estas largas moléculas y no todos los motivos están presentes en todos los serotipos<sup>211,247</sup>. Lo común a los seis motivos son 3 residuos de 1,3- $\alpha$ -manano cuya primera ramificación es un residuo de ácido glucurónico unido mediante enlace  $\beta$ -1,2, mientras que las diferencias entre los seis motivos radican en la presencia o ausencia de sustituciones de xilosa con enlace  $\beta$ -1,4 del primer residuo de manosa,  $\beta$ -1,2 del segundo residuo del esqueleto de manano o de las ramificaciones con enlaces  $\beta$ -1,2 y/o  $\beta$ -1,4 del tercer residuo de manosa<sup>211,247,248</sup>. Además, los residuos de manosa pueden ir acetilados en la posición seis. Es común que cada cepa de *Cryptococcus* use diferentes motivos de los arriba presentados en el polisacárido que compone su cápsula o que use un único motivo. Además, entre cepas que usen los mismos motivos para la síntesis de su cápsula, las ratios con las que se presentan esos motivos pueden ser diferentes, lo cual induce ligeras diferencias en las cápsulas de las diferentes cepas de una misma especie<sup>247</sup>.

Por otra parte, el GalXM, que es el otro polisacárido que compone la cápsula de *Cryptococcus*, está presente en menores cantidades (<10%) que el GXM y, además, es una molécula más pequeña y de estructura algo más compleja que el GXM<sup>212</sup>. Además, hay que indicar que, recientemente, se ha identificado que el GalXM en realidad es glucuronoxilomananogalactano (GXMGal) aunque en la literatura se le sigue mencionando como GalXM. El GXMGal está compuesto por un esqueleto lineal de galactosa con enlaces  $\alpha$ -1,6. Dicho esqueleto lineal está ramificado de manera alterna, donde un residuo del esqueleto está ramificado con una galactosa unida con enlace  $\beta$ -1,2 al galactano mientras que el residuo siguiente está ramificado con una galactosa con enlace  $\beta$ -1,3 a la cual hay unidos mediante enlace  $\alpha$ -1,4 un disacárido de manosa con enlace  $\alpha$ -1,3<sup>212</sup>. Además, esta última ramificación puede ir sustituida, o no, con dos residuos de xilosa con enlaces  $\beta$ -1,2 y  $\beta$ -1,3 a las manosas de la ramificación. Por último, la galactosa que conforma el punto de ramificación más complejo contiene un residuo de ácido glucurónico con enlace  $\beta$ -1,3 y fue esta sustitución la que propició el cambio de nombre de este polisacárido<sup>212</sup>. Al igual que el GXM, el GXMGal varía en función del serotipo y se sospecha que pueden existir más motivos<sup>211,212,247</sup>.

A diferencia de las síntesis de la mayoría de polisacáridos de la pared, a día de hoy se desconocen muchas de las enzimas que participan en la síntesis de la cápsula ya que los métodos de homología de secuencia que se suelen emplear para identificar genes y asociarlos con funciones análogas no sirven en el caso de la cápsula de *Cryptococcus* ya que es una estructura única en eucariotas, por lo que los genes que rijan esas funciones únicas, como la síntesis de la cápsula, muy probablemente también sean únicos<sup>212</sup>.



**Figura 5:** representación esquemática de la síntesis de la pared y de la cápsula de *Cryptococcus*. La síntesis de quitina es llevada a cabo por varias quitina sintasas a partir de UDP-N-acetilglucosamina citosólica. Posteriormente, residuos de N-acetilglucosamina de la quitina pueden ser deacetilados por quitina deacetilasas para producir quitosano. Por otra parte, los  $\alpha$  y  $\beta$ -1,3-glucanos son sintetizados a partir de GDP-glucosa citosólica por sus respectivas sintetasas. Además, el  $\beta$ -1,3-glucano lineal puede ser modificado por enzimas de la familia GEL. Además, se han identificado transportadores de xilosa, manosa y glucurónico expresados en el retículo endoplásmico y en el Golgi, así como varias xilosil, manosil y glucuronosiltransferasas encargadas de la síntesis del GXM<sup>249-251</sup>.

Además, hoy en día se desconocen muchos aspectos de la síntesis de los componentes de la cápsula, aunque se sospecha que dicha síntesis se da en el interior celular, en vesículas que probablemente procedan del Golgi y que posteriormente se secreten al exterior de la célula vía exocitosis<sup>212,252,253</sup>. De hecho, se ha detectado GXM mediante anticuerpos antiGXM en el interior de vesículas intracelulares de entre 20 y 200 nm, lo cual sugiere que su síntesis, al menos de sus precursores, se da en el interior celular<sup>253</sup>. Tras la síntesis intracelular, se supone que estas vesículas que contienen GXM, y presumiblemente las enzimas que participan en la síntesis y ensamblaje de la capsula, así como otras que participen en la síntesis y remodelación de la pared, son secretadas al exterior celular en forma de exosomas<sup>253</sup>. Aunque se desconoce cómo son capaces de atravesar la pared, probablemente las endoglucanasas, elongasas y transglicosilasas contenidas en esos u otros exosomas, o embebidas a lo largo de la pared<sup>214,239,254</sup>, faciliten la traslocación de los componentes de la cápsula hacia el exterior de la pared celular de *Cryptococcus*. De hecho, se ha logrado identificar mediante microscopía electrónica una capa de aspecto granular incluida justo sobre la pared celular y, a su vez, justo bajo la cápsula, lo que conduce a la hipótesis de que la elongación o el ensamblaje de la cápsula se da en dicha capa de aspecto granuloso, siendo esos gránulos, los exosomas que contienen lo necesario para la síntesis de la cápsula<sup>253,255</sup>. Además, dado que la cápsula de *Cryptococcus* es una estructura dinámica y que puede cambiar de tamaño rápidamente en función de múltiples factores<sup>210,211,247,252</sup>, también se observa un cambio de tamaño en esa capa de acumulación de partículas<sup>253,255</sup>. Más concretamente, cultivar *Cryptococcus in vitro* en un medio sin carencias nutricionales normalmente genera capsulas de pequeño tamaño, mientras que *Cryptococcus* es capaz de multiplicar varias veces el tamaño de su cápsula tras unas horas en el interior de un organismo hospedador, por lo que el tamaño de la capa granular también es mayor en condiciones donde se ve favorecida la síntesis de capsula<sup>253,255</sup>. Sin embargo, en otros experimentos en los que se marcó covalentemente la cápsula, se observó que los componentes más antiguos de la cápsula permanecían próximos a la pared, mientras que la elongación de la cápsula se daba en el extremo de la cápsula<sup>211,256</sup>.

La dinámica y la función de la cápsula van estrechamente relacionadas. Como se ha indicado arriba, existen ciertos factores, como la carencia de hierro o de nutrientes, la exposición a factores del huésped, o la presencia de un 5% de CO<sub>2</sub> que inducen el aumento de tamaño de la cápsula en *Cryptococcus*<sup>211,257</sup>. De hecho, *Cryptococcus* es capaz de agrandar su cápsula rápidamente tras entrar en contacto con las células pulmonares del organismo hospedador como se ha visto en modelos animales<sup>258,259</sup>. Además, la porosidad de la cápsula, controlada probablemente por la variación en la cantidad de *cross-linking* entre las diferentes moléculas de

GXM que componen la cápsula, disminuye (es menos permeable) tras haber sido inducida en condiciones *in vivo* respecto a condiciones *in vitro*, reduciendo la capacidad de diversas macromoléculas de atravesar la cápsula en función de su tamaño<sup>211,247,258</sup>. Por otra parte, el incremento de tamaño de la cápsula que se induce *in vivo* confiere a *Cryptococcus* resistencia al estrés oxidativo inducido por los ROS generados en el interior de un fagolisosoma de una célula fagocítica, como puede ser un macrófago, siendo la cápsula una estructura fundamental para la supervivencia intracelular de este organismo y, como era de esperar, las cepas acapsuladas son más sensibles al estrés oxidativo<sup>210</sup>. Junto a esto, se ha descrito que la cápsula es necesaria para posibilitar la replicación intracelular de *Cryptococcus* en el interior de un macrófago, mientras que las cepas acapsuladas no pueden replicarse, mostrándose como un factor clave en este proceso<sup>211</sup>.

### 1.3.2. Criptococosis

La criptococosis es el término general con el que se conocen al conjunto de enfermedades causadas por las especies del género *Cryptococcus*<sup>10</sup>. Las criptococosis, son EFIs que se dan preferentemente en pacientes inmunodeficientes y que cursan principalmente en forma de neumonía, criptococemia y meningitis, aunque otros tipos de desarrollo, como una infección cutánea, también pueden darse<sup>10,34,36</sup>. Las criptococosis habitualmente se dan en pacientes inmunocomprometidos, fundamentalmente en pacientes con bajos recuentos de células T CD4+, como los afectados por VIH, aunque cada vez se reportan más casos de criptococosis invasivas en pacientes no inmunocomprometidos<sup>8,34,37,39</sup>.

La principal vía de entrada de *Cryptococcus* al organismo hospedador es a través de la respiración. Las células de *Cryptococcus* son inhaladas y alcanzan las vías respiratorias inferiores donde causarán infección en individuos inmunocomprometidos o en individuos no inmunocomprometidos serán eliminadas por el sistema inmunológico. No obstante, se ha descrito que *Cryptococcus* puede generar una infección latente y asintomática en individuos no inmunocomprometidos, la cual puede descontrolarse si el estado del sistema inmunológico del hospedador cambia<sup>260</sup>. Puesto que, salvo en casos donde se ha transmitido la criptococosis mediante el trasplante de órganos, la forma de entrada principal es a través de la respiración, la **criptococosis pulmonar** debería ser la manifestación clínica más frecuente de todas. Sin embargo, el diagnóstico de esta manifestación es complicado debido a que las señales radiológicas que genera son muy inespecíficas y pueden ser “compartidas” por otras enfermedades. Además, el aislado de *Cryptococcus* en muestras pulmonares puede indicar una

simple colonización y la detección de antígeno criptocócico puede ser poco fructífero al hacerlo en muestras diferentes al fluido cerebroespinal<sup>260</sup>. Si la infección pulmonar se descontrola y el hongo se disemina, pasan a darse otras manifestaciones clínicas como la meningitis criptocócica y la criptococemia. No obstante, hay que indicar que la incidencia de la criptococosis pulmonar puede ser mucho mayor en pacientes no inmunocomprometidos, ya que en un estudio retrospectivo se observó que más del 50% de los casos de criptococosis no tenían ningún factor de riesgo ni afectación inmunológica aparente alguna<sup>261</sup>. Por otra parte, se ha identificado un polimorfismo del receptor de Dectina-2 asociado con una mayor probabilidad de padecer criptococosis pulmonar invasiva en pacientes no-VIH<sup>262</sup>. Si el sistema inmunológico del huésped no es capaz de acabar con la infección pulmonar de manera efectiva, *Cryptococcus* puede diseminarse prácticamente a cualquier órgano y tejido del cuerpo, aunque dos de los lugares más frecuentes son el Sistema Nervioso Central (SNC) y la sangre.

A diferencia de la criptococosis pulmonar, la meningitis criptocócica es más frecuente en pacientes inmunocomprometidos. De hecho, esta meningitis es el mayor causante de muertes asociadas a VIH con tasas de entre el 15 y el 25% de los casos<sup>198,263,264</sup>. Una vez *Cryptococcus* ha sorteado al sistema inmunológico del pulmón, puede alcanzar el cerebro del hospedador atravesando la barrera hematoencefálica<sup>198</sup>. En concreto, se han identificado hasta tres mecanismos por los cuales este hongo puede atravesar la barrera hematoencefálica, siendo estos la transcitosis, la parasitosis y la estrategia del caballo de Troya. *Cryptococcus* es capaz de secretar una metaloproteasa, una ureasa y una fosfolipasa, que son considerados factores de virulencia, al igual que la cápsula y la síntesis de melanina; y estas tres enzimas son necesarias para atravesar las uniones estrechas intercelulares de las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica<sup>198,264</sup>. Además, se ha descrito que este hongo es capaz de internalizarse en el citosol de esas células endoteliales y atravesar la barrera hematoencefálica a través de ellas. Por último, *Cryptococcus* es capaz de vulnerar la barrera hematoencefálica parasitando el interior de macrófagos y aprovechando que estos pueden cruzarla para alcanzar el cerebro creciendo en su interior<sup>198,264</sup>.

Hay que indicar que, asociada a la meningitis criptocócica, suele aparecer la criptococemia, que no deja de ser *Cryptococcus* creciendo en la sangre del paciente y, por tanto, una sepsis<sup>265,266</sup>. Como cabe esperar, la criptococemia manifestada junto con meningitis es un signo de peor pronóstico para el paciente afectado que, además, suele relacionarse con una peor respuesta al tratamiento.

### 1.3.3. Patobiología de la criptococosis y respuesta inmunológica

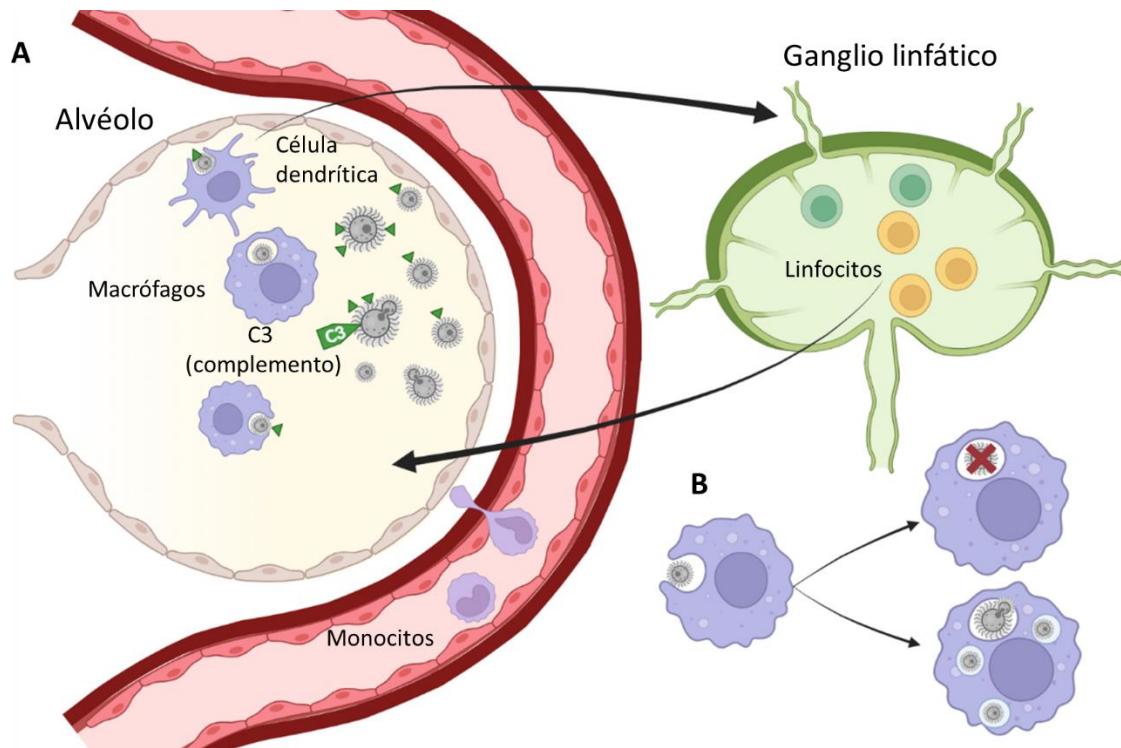
Como se ha ido indicando a lo largo de este trabajo, la principal forma de entrada de *Cryptococcus* en el organismo del hospedador es mediante la inhalación de esporas o células desecadas de pequeño tamaño (1-5  $\mu\text{m}$ )<sup>260</sup> que acaban alcanzando las vías respiratorias inferiores. Los macrófagos alveolares, así como las células dendríticas allí presentes son capaces de, en condiciones normales, fagocitar a las células del hongo y eliminarlas rápidamente. No obstante, aun en el caso de pacientes inmunocompetentes, *Cryptococcus* puede sobrevivir en los alvéolos pulmonares, aunque contenido en el interior de un granuloma por el sistema inmunológico del huésped, donde puede permanecer latente durante años<sup>267</sup>.

Las células de *Cryptococcus* que alcanzan los alvéolos desde el exterior contienen muy poca cápsula. No obstante, una vez entran en contacto con el ambiente existente en los alvéolos, marcado por la restricción de nutrientes como el hierro o la concentración de CO<sub>2</sub>, las células de *Cryptococcus* se activan y comienzan a agrandar rápidamente su cápsula en respuesta a esos estímulos<sup>211,267-270</sup>. Las células fagocíticas presentes en el tejido son capaces de detectar, a través de TLRs, NLRs y receptores de lectina tipo C, PAMPs de *Cryptococcus* como pueden ser múltiples componentes de su pared y cápsula. Aunque macrófagos y células dendríticas son capaces de detectar componentes de la cápsula de *Cryptococcus*, lo cierto es que ésta oculta otros componentes mucho más inmunogénicos del hongo, como pueden ser los  $\beta$ -glucanos de su pared. De hecho, las cepas acapsulares de *Cryptococcus*, que no tienen cápsula que esconda el  $\beta$ -glucano, son fagocitadas más rápidamente por macrófagos que las que tienen cápsula<sup>271</sup>.

La fagocitosis de las células de *Cryptococcus* es mediada principalmente por el sistema del complemento. De hecho, animales deficientes en el sistema del complemento son más propensos a padecer sepsis de origen criptocólico<sup>272</sup>. C3 es capaz de activarse por la vía alternativa y adherirse a la cápsula de *Cryptococcus*, por lo que los macrófagos y células dendríticas reconocen proteínas del complemento mediante los pertinentes receptores<sup>269</sup>. Sin embargo, el rápido crecimiento de la cápsula puede enterrar el C3 que está opsonizando la cápsula, afectando negativamente a la fagocitosis por parte de macrófagos y células dendríticas<sup>273</sup>. Además, anticuerpos ya presentes en el suero de exposiciones previas a *Cryptococcus* ayudan a los macrófagos a fagocitar las células del patógeno.

El polisacárido de la cápsula, además de sus propiedades antifagocíticas, también juega un papel en tratar de tornar la respuesta inmunológica hacia tipo T<sub>H</sub>2, lo que reduce la capacidad del huésped para eliminar al patógeno. Además, esta respuesta de tipo T<sub>H</sub>2 favorece la supervivencia de *Cryptococcus* en el interior de los macrófagos<sup>268,271</sup>. Por norma general, una

respuesta de tipo T<sub>H</sub>1, con los macrófagos activados por la vía clásica, es la necesaria para una completa eliminación del patógeno, aunque una respuesta excesiva también puede ser perniciosa<sup>268,269</sup>.



**Figura 6:** (A) Representación esquemática de la respuesta inmunitaria frente a una infección por *Cryptococcus*. (B) Tras ser fagocitado por los macrófagos, *Cryptococcus* puede ser eliminado en el interior de los fagolisosomas o puede acabar desarrollándose en el interior de éstos parasitando al macrófago.

Por lo tanto, una vez que la célula de *Cryptococcus* ha sido fagocitada, el endosoma que contiene a la levadura se fusiona con lisosomas donde se introducirán ROS para propiciar la muerte de ésta<sup>268</sup>. No obstante, como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la cápsula y la capa de melanina de su pared son capaces de proteger a *Cryptococcus* del estrés oxidativo que se genera en el interior de los fagolisosomas. Además, si *Cryptococcus* es capaz de modular la respuesta inmunitaria hacia una de tipo 2, puede garantizar su supervivencia e incluso replicación en el interior del macrófago<sup>267</sup>. De hecho, parasitar el interior de macrófagos es una de las vías utilizadas por *Cryptococcus* para atravesar la barrera hematoencefálica y, por tanto, diseminarse al resto del organismo.

Por último, hay que destacar que algunas células de *Cryptococcus* pueden padecer una serie de cambios morfológicos en los que aumentan considerablemente su tamaño (hasta 100  $\mu\text{m}$ ) para dar lugar a un tipo celular conocido como células titán. Estas células se caracterizan por tener

una cápsula sobredimensionada, así como un citosol mucho más grande y una pared engrosada y con una mayor proporción de quitina<sup>274,275</sup>. Se sospecha que su enorme tamaño, así como la capacidad inmunomoduladora de la quitina, son características clave que impiden que estas células sean fagocitadas, junto con la elevada resistencia a diversos tipos de estrés que muestran estas células titán.

Junto con los macrófagos residentes en los alvéolos, las células dendríticas también juegan otro papel clave en la respuesta inmunológica contra *Cryptococcus* ya que son el nexo con la respuesta inmunológica adaptativa<sup>268</sup>. Al igual que los macrófagos, son capaces de fagocitar y destruir las células de *Cryptococcus* usando los mismos mecanismos, pero, como células presentadoras de antígenos que son, migran hasta los ganglios linfáticos cercanos donde exponen esos antígenos criptocócicos a los linfocitos T que se encuentran ahí<sup>268</sup>. La maduración de las células dendríticas en presencia de IFN-γ induce que estas produzcan IL-12 y, por tanto, que acaben produciendo más IFN-γ que acaba conduciendo hacia una respuesta de tipo T<sub>H</sub>1 necesaria para acabar con el patógeno<sup>270</sup>. Además, la depleción de células dendríticas y macrófagos residentes en los alvéolos en modelos murinos posibilita una rápida invasión del patógeno que conduce a una muerte prematura, remarcándose el papel fundamental que tienen estas células en la defensa frente a *Cryptococcus*.

Otras células del sistema inmunológico innato como los neutrófilos, que son capaces de matar células de *Cryptococcus* mediante procesos oxidativos y no oxidativos; células NK, que matan mediante perforina; o células NKT, que son necesarias para conducir la respuesta hacia tipo T<sub>H</sub>1, participan en la respuesta frente a este patógeno<sup>268,270</sup>.

Ya con la inmunidad adaptativa, las células T CD4 son indispensables en la respuesta inmunológica al patógeno. Como ya se ha mencionado antes, pacientes con VIH u otros tipos de linfopenias donde el recuento de células T CD4 es menor de 100 células/μL, así como recibiendo tratamientos antirrechazo en trasplantes de órganos o con tratamientos con corticoides prolongados, son susceptibles de padecer infecciones por *Cryptococcus*<sup>276</sup>. Tras producirse la presentación antigénica en los ganglios linfáticos adyacentes a la zona de infección por parte de las células dendríticas que portan antígenos criptocócicos, es fundamental que el IFN-γ sea la citoquina predominante en el medio, ya que acaba induciendo la maduración de las células T CD4 hacia tipo T<sub>H</sub>1, que es el que se relaciona con una respuesta protectora hacia el patógeno<sup>277</sup>. En humanos, los linfocitos T CD4 activados son necesarios para activar linfocitos T CD8 frente a *Cryptococcus* y, además, ambos tipos celulares son necesarios para ejercer una respuesta protectora contra *Cryptococcus*<sup>276</sup>. Por otra parte, hay que indicar que, en estudios con ratones,

se observó que la activación de las células T CD8 y la producción de IFN-γ no dependía de la presencia de células T CD4<sup>276,278</sup>.

Una vez son activados, los linfocitos T CD4 y CD8 migran desde los ganglios linfáticos hacia las zonas afectadas por la infección donde ejercen su actividad frente al patógeno. Allí, los linfocitos T CD4 influyen en la respuesta inmunológica en función del perfil de citoquinas que generan. Además, los linfocitos T CD4 median en la formación de granulomas, que son estructuras formadas por acumulaciones de macrófagos y otros tipos de células que contienen al patógeno focalizado en el interior del granuloma.

Sin embargo, si la infección pulmonar por *Cryptococcus* no puede ser contenida en el pulmón y se convierte en invasiva, técnicamente, el hongo puede acabar infectando casi cualquier parte del cuerpo. Como se indicó en la sección anterior, *Cryptococcus* puede atravesar la barrera hematoencefálica de varias formas, ya sea en el interior de un macrófago o degradando las uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Una vez ubicadas en el cerebro, las células de *Cryptococcus* pueden formar agrupaciones o criptococomas, así como crecer de manera dispersa a lo largo de él generando daño neuronal<sup>279</sup>. La presencia de *Cryptococcus* en el cerebro se relaciona con un aumento en la mortalidad en pacientes de VIH o inmunodeprimidos.

#### 1.3.4. Modelos murinos de criptococosis

Al igual que en otros modelos animales de infección, la forma de entrada de *Cryptococcus* al organismo, la cepa de ratón empleada y, en menor medida en este caso, el estado del sistema inmunológico del ratón, son los factores más importantes a la hora de diseñar un modelo de criptococosis. En una comparativa rápida con los modelos murinos de aspergilosis, los modelos murinos de criptococosis se caracterizan por una mayor diversidad en las cepas de ratón utilizadas y en los métodos de infección empleados, así como la posibilidad de infectar al ratón sin necesidad de inmunosupresión, ya que los ratones no son tan resistentes a *Cryptococcus* como si lo son a *Aspergillus*. Por último, la virulencia de cada cepa concreta de *Cryptococcus* empleada sobre una cepa concreta de ratón puede variar y, por tanto, influir decisivamente en la evolución de la enfermedad.

Respecto a la forma de entrada de *Cryptococcus* en el organismo de ensayo, quizá la más común entre los modelos de ratón sea la IV, aunque la zona donde se inyecta el hongo puede variar entre la vena de la cola, las plantas de los pies o incluso en el seno retro orbital<sup>280-282</sup>. La

administración IV tiene la ventaja de ser la forma más rápida de diseminar el hongo por el organismo del hospedador, así como necesitar inocular menos CFUs del patógeno para lograr una dosis letal. De hecho, se puede detectar *Cryptococcus* en el cerebro tras las primeras 72h de infección tras una inoculación por vía IV<sup>280,283,284</sup>. Sin embargo, la progresión de la enfermedad es mucho más acelerada que mediante otros métodos, así como la diseminación a otros órganos, por lo que la muerte del ratón puede ser demasiado rápida en comparación con el transcurso de la enfermedad en humanos. Además, la administración IV es un procedimiento invasivo.

Un procedimiento mucho menos invasivo es la inoculación por vía IN. Por norma general, la administración por vía IN induce una infección en las vías respiratorias y los pulmones, simulando el transcurso normal de la enfermedad<sup>280,285</sup>. Como cabe esperar, la letalidad de *Cryptococcus* se manifiesta de forma más tardía y requiriendo mayores cantidades de CFUs de patógeno en el inóculo en comparación con la administración por vía IV<sup>280,285</sup>. *Cryptococcus* genera, en primera instancia, una infección en los pulmones durante las dos primeras semanas tras la inoculación y, a partir de entonces, se disemina por el resto del organismo y alcanza el sistema nervioso central generando una meningitis<sup>281</sup>. Entre lo positivo de la inoculación IN se encuentra su similitud con una infección real o la invasividad mínima que presenta el procedimiento para el ratón. Sin embargo, entre lo negativo se encuentra la escasa correlación entre la cantidad de inóculo que se usa originalmente y la que realmente acaba llegando a los pulmones del ratón, ya que parte acabará en el tracto digestivo, pudiendo haber grandes diferencias entre ratones del mismo experimento.

Por otra parte, otro procedimiento de inoculación que se emplea en algunos estudios es la administración IT. A diferencia de la IN, la administración IT es capaz de depositar una cantidad exacta de inóculo en las vías respiratorias y simular un transcurso natural de la enfermedad. No obstante, para administrar inóculo IT es necesario acceder a la tráquea mediante cirugía, lo que convierte a este tipo de administración en altamente invasiva<sup>280</sup>.

Como se ha mencionado arriba, a diferencia de los modelos de ratón de aspergilosis, *Cryptococcus* es capaz de infectar ratones inmunocompetentes<sup>281,283</sup>. Sin embargo, como cabría esperar, la administración de fármacos inmunosupresores como son los corticoides aumenta la letalidad respecto a ratones inmunocompetentes inoculados con la misma cantidad de CFUs de *Cryptococcus*. El tratamiento con corticoides reduce la cantidad de linfocitos circulantes y PBMCs que participan en la defensa del organismo frente al patógeno<sup>283</sup>.

BALB/c, A/J, C57BL/6J, DBA/2, SCID o Swiss son algunas de las cepas de ratones más empleadas en modelos de criptococosis. Las cepas empleadas en los modelos, tanto de ratón como de *Cryptococcus*, influyen enormemente en la invasividad y la mortalidad del modelo. De hecho, una misma cepa de *Cryptococcus* produce diferente mortalidad y/o invasividad en diferentes cepas de ratón, mientras que también existe una elevada variabilidad en la invasividad y la mortalidad de diferentes cepas de *Cryptococcus* sobre una misma cepa de ratón<sup>282,283,286,287</sup>. En términos generales, los ratones BALB/c y los DBA/2 sufren más invasividad que los A/J en infecciones por *Cryptococcus*<sup>282</sup>. Respecto a las cepas de *Cryptococcus*, parece que la virulencia va más asociada a la cepa concreta que al propio serotipo<sup>282,286,287</sup>. De hecho, en un estudio comparativo entre modelos de criptococosis con diferentes cepas de ratón y diferentes cepas y especies de *Cryptococcus*, la cepa más virulenta fue un serotipo D, habiendo cepas de serotipo A en el estudio<sup>282</sup>. Es un resultado interesante ya que, en comparación con el ser humano, *C. neoformans* (serotipo A) es el que más prevalencia tiene entre las criptococosis, mientras que el serotipo D está relegado a Europa y el Mediterráneo y, en la literatura, se afirma que es más propenso a generar infecciones cutáneas que invasivas.

Por último, se ha de indicar que existe una clara relación, que está recogida ampliamente en la literatura, entre la cantidad de inóculo y la mortalidad de la enfermedad<sup>281,283</sup>.

## 2. Antecedentes y objetivos

Como se ha detallado durante la introducción, las EFIs son un problema de salud pública de elevada importancia debido, fundamentalmente, a la dificultad del diagnóstico, al estado generalmente inmunocomprometido del paciente y, sobre todo, a la escasa disponibilidad de diferentes opciones terapéuticas efectivas que puedan adaptarse a las condiciones del paciente o a la aparición creciente de resistencias a estos<sup>2,8,27,29,30,60,91,92</sup>. Todo ello, en conjunto, es expuesto por la OMS como una de las mayores amenazas a la salud pública mundial en el siglo XXI, y es algo en lo que se debe centrar el esfuerzo científico para lograr equilibrar la balanza, ya que muy pocas enfermedades no fúngicas tienen datos de mortalidad tan desastrosos como los de las EFIs<sup>5</sup>.

Hablando de los fármacos antifúngicos, que además es lo que concierne a este estudio, las dos únicas opciones terapéuticas realmente efectivas en la mayoría de los casos, son los azoles y la AMB. Sin embargo, tanto la AMB como los azoles son bastante tóxicos para cualquier paciente, por lo que no se pueden usar indiscriminadamente<sup>69,77</sup>. Aunque se ha reducido la toxicidad en los últimos años, ya sea cambiando las formulaciones o diseñando nuevos fármacos menos tóxicos, no ha sido suficiente y, en función de la afección primaria del paciente que, además, también ha contraído una EFI, puede que ni sea posible administrarle alguno de estos fármacos<sup>4,22,63</sup>. Con palabras más simples, no se puede administrar un fármaco nefrotóxico a un paciente con disfunción renal, por ejemplo.

Para solventar el problema de la toxicidad, se desarrollaron racionalmente las equinocandinas, dirigidas contra una diana no presente en mamíferos, como es la 1,3-β-glucano sintasa fúngica<sup>82,84,85,230</sup>, enzima que todas las especies tienen y es más o menos importante, pero que no está presente en los pacientes que se quiere tratar. De esta manera, se logró reducir enormemente la toxicidad asociada al tratamiento, generando una serie de fármacos que se le pueden administrar a cualquier paciente sin apenas riesgo. Sin embargo, no es oro todo lo que reluce. Su efectividad varía mucho en función de la especie fúngica contra la que se dirige, siendo bastante efectivas en *Candida spp*, algo menos en *Aspergillus spp* y muy poco efectivas en *Cryptococcus spp*<sup>83,230,288</sup>.

Por otra parte, es importante, en el desarrollo de nuevos fármacos, que éstos sean lo más efectivo y lo menos tóxico posible, por lo que es fundamental el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Es decir, genes o proteínas fúngicas cuya función es esencial en la biología

de éstos. En línea con estas premisas, se descubrió que una  $\beta$ -glucanosiltransferasa de *A. fumigatus* (Gel4) era esencial para el funcionamiento del hongo, convirtiéndose en una posible diana contra la que dirigir un fármaco<sup>138</sup>. Este descubrimiento motivó el desarrollo en este trabajo de un fármaco antifúngico basado en un Nb con características inhibitorias contra esta enzima, apoyándose en estudios previos en los que se desarrolló un scFv contra la 1,3- $\beta$ -glucano sintasa de *C. neoformans*<sup>236</sup>.

De hecho, desarrollar anticuerpos con propiedades inhibitorias frente a una enzima puede ser un buen método sustituto a la búsqueda de inhibidores químicos para una enzima mediante el cribado de bibliotecas que contienen miles de compuestos.

Por tanto, la hipótesis de este estudio es comprobar si un Nb puede presentar actividad antifúngica, algo que sería muy útil en el desarrollo general de nuevos fármacos contra diversas enfermedades. De esta manera, el objetivo principal de este trabajo es **el desarrollo de un Nb con capacidad inhibitoria sobre las  $\beta$ -glucanosiltransferasas fúngicas** y el análisis de su eficacia y su mecanismo de acción frente a *Aspergillus* y *Cryptococcus* *in vivo* e *in vitro*.

Para ello, será necesario lograr una serie de objetivos intermedios o secundarios, entre los que se encuentran:

- Generar al menos un Nb capaz de unirse a la diana seleccionada.
- Determinar la actividad del Nb *in vitro* frente a cultivos de los hongos a estudiar: *Aspergillus* y *Cryptococcus*.
- Determinar la actividad del Nb *in vivo* en dos modelos animales diferentes (ratón y nemátodo).
- Ensayar combinaciones con otros fármacos de uso común en clínica para comprobar su posible efecto sinérgico.
- Analizar el mecanismo de acción del Nb.

### 3. Materiales y métodos

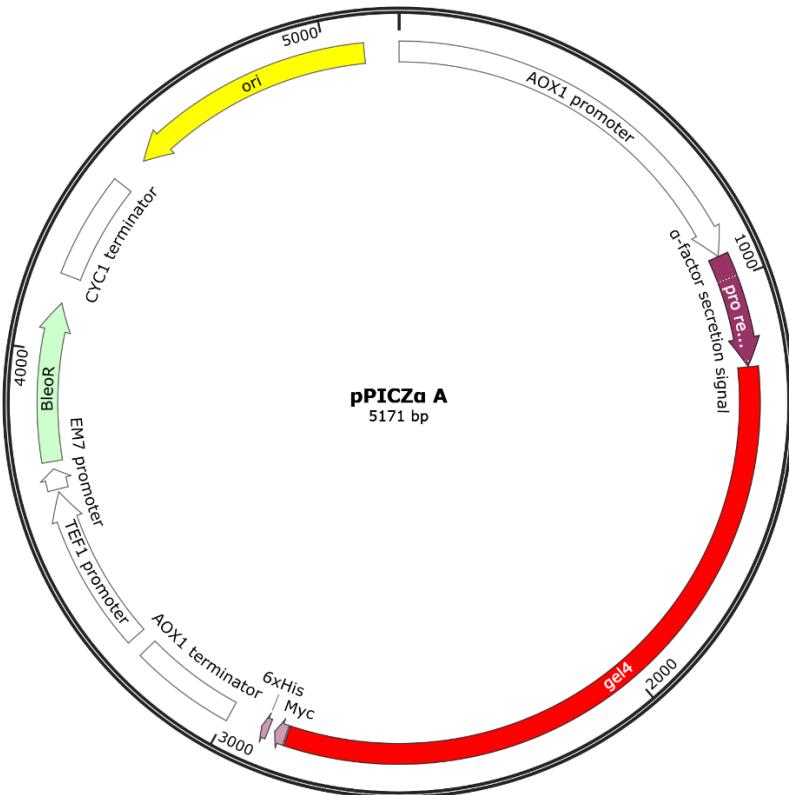
#### 3.1. Producción y caracterización de Nbs de alpaca frente a *Gel4*

En el año 2010 se describió una enzima de *A. fumigatus* con actividad beta glucanosiltransferasa implicada en la síntesis y remodelación de la pared de este hongo<sup>138</sup>. Un poco más detalladamente, *Gel4* es una enzima de la familia GH72 con varias actividades descritas. *Gel4* es capaz de cortar un fragmento de  $\beta$ -1,3-D-glucano de al menos 10 residuos de glucosa y transferir este fragmento recién escindido a otra molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano. Esta enzima es capaz de unir ese fragmento de  $\beta$ -1,3-D-glucano mediante su extremo reductor, por un lado, al C3 libre de un extremo no reductor de otra molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano con la consiguiente elongación de ésta o, por otra parte, al C6 de un residuo intracatenario de una molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano generando una ramificación con enlace  $\beta$ -1,6. Mientras que la actividad elongasa (la que genera enlaces  $\beta$ -1,3) es compartida por otras enzimas de la familia *Gel*, la actividad ramificante (la que genera enlaces  $\beta$ -1,6) es única para *Gel4* en el genoma de *Aspergillus*.

En el estudio mencionado arriba, se encontró que la delección de ese gen nunca generaba mutantes viables, lo cual conducía a pensar que esa función era esencial para *Aspergillus*, convirtiéndose así en la primera enzima descubierta, relacionada con la síntesis y remodelación de la pared de *Aspergillus*, que es completamente esencial para *Aspergillus*. Junto a esto, el hecho de que, además, sea una enzima implicada en un proceso que no existe en mamíferos, motivó al Doctor Ramón Hurtado a lanzarse en la búsqueda de inhibidores químicos de esta enzima análogos de su sustrato<sup>289</sup>. De hecho, todo lo relativo a la producción y caracterización de Nbs frente a *Gel4* de este trabajo se realizó en el laboratorio del Doctor Ramón Hurtado en el instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) de la Universidad de Zaragoza.

##### 3.1.1. Producción de *Gel4* glicosilada y deglicosilada en *Pichia pastoris*

Partiendo del genoma de *A. fumigatus* Af293, se seleccionó la secuencia aminoacídica de *Gel4* (AFUA\_2G05340) sin el péptido señal y se encargó a GenScript su inserción en el vector de clonaje pPICZ $\alpha$ A, así como la optimización de codones para su propicia expresión en *P. pastoris*.



**Figura 7:** esquema del plásmido pPICZ $\alpha$ -A en el que se insertó la secuencia de gel4 para su expresión en *Picchia*.

El plásmido pPICZ $\alpha$ -Gel4 fue replicado en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  de donde se aisló y, posteriormente, se linealizó cortándolo con la enzima de restricción *SacI*, paso necesario para poder posibilitar la inserción del plásmido en el genoma de *Picchia*. El plásmido pPICZ $\alpha$ A contiene antes del lugar de inserción de Gel4 el promotor de la alcohol oxidasa 1, que es inducible por metanol y permite la integración en el genoma de *Picchia* mediante recombinación, logrando una expresión estable. Además, tras el inserto de Gel4 se encuentran una cola de histidinas y c-Myc, que servirán para poder recuperar la proteína en columnas de afinidad.

Por tanto, una vez fue linealizado el plásmido, se procedió a transformar la cepa X33 de *P. pastoris* mediante electroporación. La selección de las células transformadas se realizó cultivándolas 24h a 30°C en placas de agar de YPDS (1% m/v de extracto de levadura, 2% m/v de peptona, 2% m/v de dextrosa, 1 M de sorbitol) suplementado con 100  $\mu$ g/mL de zeocina (InvivoGen), siendo este último el antibiótico de selección de la transformación.

Las levaduras que logran crecer en zeocina, muy probablemente también expresen *Gel4*, por lo que se procede a cultivar estas células de *Picchia* transformadas con *Gel4* en medio líquido BMGY (1% (m/v) de extracto de levadura, 2% m/v de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6.0, 1.34% m/v de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 1% v/v de glicerol y 0.04% m/v de biotina) durante 24 horas a 30°C para conseguir una buena cantidad de células. Pasadas 24h, se centrifuga el cultivo a 4000 g durante 10 minutos y se resuspenden las células de nuevo en medio líquido BMGY (1% (m/v) de extracto de levadura, 2% m/v de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6.0, 1.34% m/v de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 1% v/v de glicerol y 0.04% m/v de biotina) pero esta vez suplementado con un 1% en volumen de metanol para activar la expresión y secreción de *Gel4*. Se mantienen los cultivos a 18°C durante 72h en presencia de metanol y se recogieron los sobrenadantes que contienen *Gel4* glicosilada producida por *Picchia*.

Una vez producida la proteína, se procedió a concentrarla usando un filtro centrífugo Pellicon XL (10000 MWCO, PES; Millipore) y se dializó frente a una solución de Tris 25mM, pH 7.5, 300mM de NaCl y 10mM de imidazol. A continuación, se equilibró una columna de histidinas HisTrap HP (GE Healthcare) con 10 veces su volumen del mismo báfer Tris que se usó en la diálisis. Tras ello, se cargó el concentrado de proteínas del sobrenadante en la columna y se eluyó en gradiente de imidazol (10-500mM) usando el mismo buffer. El eluido se cargó en una columna HiPrep 26/10 Desalting column (GE Healthcare) con el objetivo de atrapar el imidazol utilizando de eluyente el mismo buffer Tris, pero esta vez sin imidazol. Por último, el eluido de la columna anterior que contiene la *Gel4* ya sin imidazol se sometió a una cromatografía de filtración en gel pasándola a través de una columna Superdex 75 XK26/60 (Cytiva) con un báfer Tris 25mM, pH 7.5, 50mM de NaCl.

Respecto a la *Gel4* deglicosilada, se obtuvo mediante tratamiento enzimático del eluido de la columna de desalado con EndoH a 18°C durante la noche que, posteriormente, será eliminada circulando la disolución a través de una columna MBPTrap HP (GE Healthcare) previamente equilibrada con Tris 25mM, pH 8.0, 150mM de NaCl y 1mM de EDTA.

### 3.1.2. Inmunización de una alpaca, aislado de PBLs y amplificación de las secuencias $V_{HH}$ .

La *Gel4* deglicosilada que se obtuvo de los cultivos anteriores de *P. pastoris* transformada fue utilizada por el Profesor Serge Muyldermans, de la *Vrije Universiteit* de Bruselas, para inmunizar una alpaca (*Vicugna pacos*). Para ello, se inyectaron 100 µg de *Gel4* deglicosilada por inyección

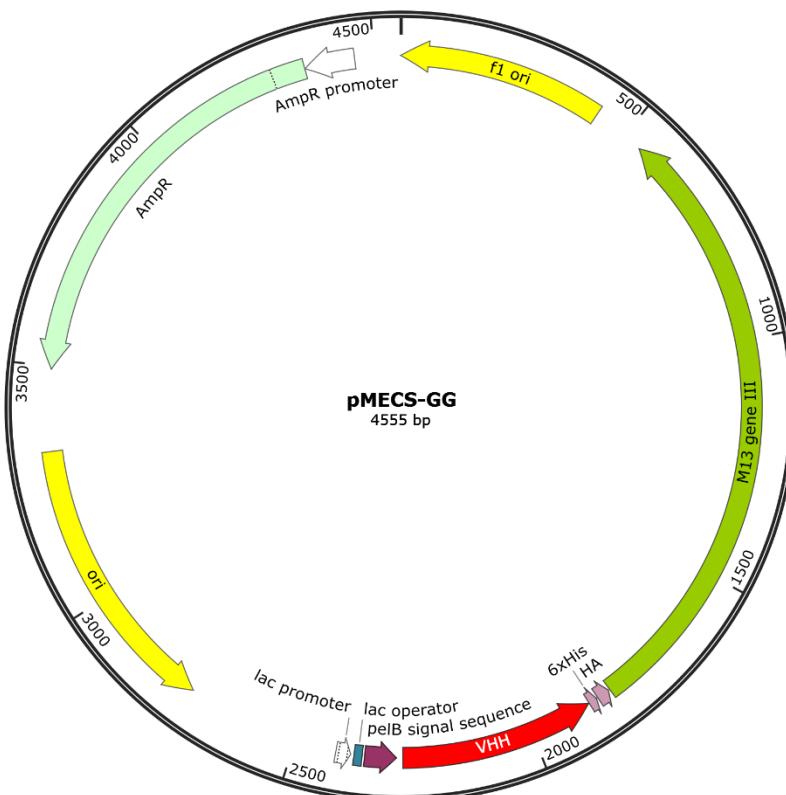
subcutánea junto con cantidades semejantes de adyuvante Gerbu, que estimula una respuesta humoral en caballos y camélidos, una vez por semana durante seis semanas. Tres días después de la última inyección, se extrajo sangre de la vena yugular en condiciones anticoagulantes y se aislaron los linfocitos de sangre periférica (PBLs). Entre esos linfocitos, hay linfocitos B maduros que reaccionan contra el antígeno que se ha estado inoculando, por lo que se extrajo el RNA total de esas células para ser transcrita a DNA y generar los cDNAs pertinentes como está descrito en la literatura<sup>290</sup>. Por último, mediante una PCR anidada<sup>291</sup>, se amplificaron las secuencias V<sub>H</sub>H contenidas entre todos los cDNAs generados antes. Hay que indicar que las secuencias V<sub>H</sub>H se corresponden con las regiones variables, es decir, de unión a antígeno, de anticuerpos de camélidos. Los anticuerpos de camélidos, a diferencia de los de otras muchas especies, como puede ser el ser humano, solo constan de dos cadenas pesadas, por lo que su región variable contiene toda la capacidad de unirse a antígeno. Estas proteínas capaces de unirse a antígeno son originadas sin amplificar la región constante de esa cadena pesada, por lo que su tamaño es muy pequeño, en comparación con el anticuerpo completo, sea de la especie que sea.

### 3.1.3. Phage display

A los cDNAs de las secuencias V<sub>H</sub>H se les añadió en la PCR anidada dos secuencias de corte de la enzima de restricción *SapI* en los flancos para poder ser ligados posteriormente en fagémidos pMECS-GG, por lo que, previamente, tanto amplicones como plásmidos fueron tratados con *SapI* y, posteriormente, fueron ligados para generar una librería de fagémidos. Los fagémidos son básicamente plásmidos bacterianos a los que se les ha añadido el origen de replicación de un fago bacteriano, por lo que pueden producir DNA de una sola cadena. Además, la región V<sub>H</sub>H se inserta en el fago adyacente a la secuencia de una proteína de la envuelta del virus, en forma de proteína de fusión, por lo que cuando se ensambla el fago, esa proteína de fusión expondrá los Nbs (regiones V<sub>H</sub>H) hacia el exterior formando parte de la envuelta del fago. Opcionalmente, los fagémidos pueden contener alguna proteína necesaria para la generación del fago, aunque, normalmente, suelen ir todos contenidos en un segundo fago auxiliar<sup>292</sup>.

El plásmido pMECS-GG (Golden Gate) contiene dos sitios de corte de la enzima de restricción *SapI* entre los cuales se encuentran los genes *cddB*, cuya expresión es letal para bacterias, así como un gen de resistencia a cloranfenicol. Por lo tanto, si se ha introducido correctamente el inserto en el plásmido, las *E. coli* TG1 que se transformen con el fagémido bien construido no serán resistentes a cloranfenicol ni poseerán un gen letal<sup>291</sup>. Por lo tanto, cuando estas bacterias

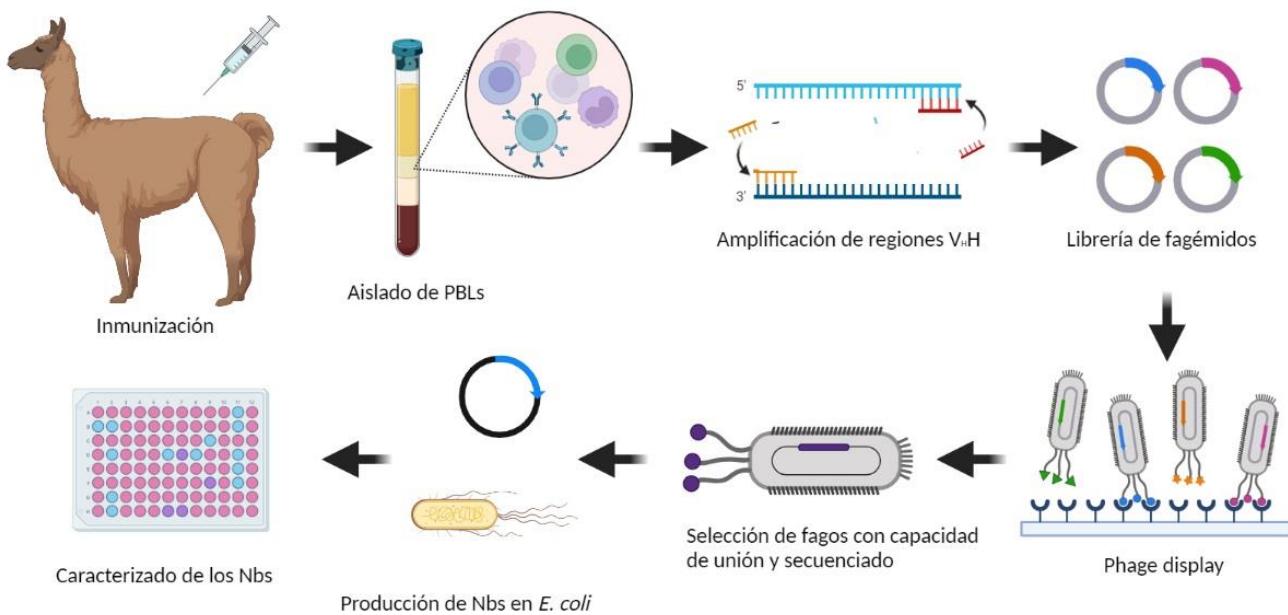
se trasformen con este fagémido, más otro accesorio que contenga el resto de genes necesarios para generar fago, éstos expresaran una secuencia  $V_{HH}$  junto a una proteína de su envuelta en forma de proteína de fusión. No obstante, hay que indicar que entre el tag de hemaglutinina y la proteína del fago existe un codón de *stop* ámbar, lo que quiere decir es que para ciertas cepas de *E. coli* ese codón siempre significa final de la traducción, mientras que en otras cepas a veces no significa *stop*, sino que sigue traduciendo y genera esa proteína de fusión con el Nb.



**Figura 8:** esquema del fagémido pMECS-GG en el que se insertaron las secuencias  $V_{HH}$ .

La librería de fagémidos construida, que posee múltiples secuencias de  $V_{HH}$  diferentes, fue utilizada para transformar *E. coli* TG1, generando una librería de bacterias que, además, fueron transformadas con el plásmido accesorio M13K07 que contiene el resto de genes necesarios para formar y ensamblar el fago. Los fagos que expresen estas bacterias son prácticamente semejantes a excepción de la secuencia  $V_{HH}$  que expresan fusionada con la proteína III del fago M13. Por tanto, el sobrenadante de estos cultivos contiene una librería de fagos con afinidad con diferentes epítopos, algunos de los cuales son de la proteína *Gel4* que se inoculó a la alpaca, por lo que se sometieron a 3 ciclos de “panning” con el objetivo de enriquecer y aislar las secuencias  $V_{HH}$  que son capaces de reconocerla. Estos ciclos se basan en añadir ese sobrenadante frente a antígeno inmovilizado que, en este caso, es *Gel4*. De esta manera, los

fagos con afinidad quedan unidos a *Gel4*, mientras que los que no tienen afinidad son lavados y eliminados. Tras soltar los fagos que sí tienen afinidad, se procedió a reinfectar células de *E. coli* TG1 con el objetivo de incrementar el número de viriones con afinidad frente a *Gel4* y añadirlos sobre *Gel4* inmovilizada, comenzando un nuevo ciclo de “panning”. Por último, y tras tres ciclos, se procedió a secuenciar las secuencias  $V_{H}H$  que, enriquecidas por este método de *Phage display*, son capaces de unirse a *Gel4*.



**Figura 9:** representación esquemática del proceso de generación de Nbs.

### 3.1.4. Producción de Nbs en *E. coli* WK6

Tras la secuenciación de los Nbs con afinidad por *Gel4*, se procedió a transformar células de *E. coli* WK6, que es una cepa supresora y, por tanto, siempre detecta como fin de la traducción el codón de stop ámbar entre la señal de hemaglutinina y el gen III del fago M13, por lo que en esta cepa solo expresa el Nb con la señal de hemaglutinina y la cola de histidinas.

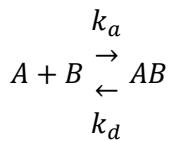
Primero, se cultivó esta cepa de *E. coli* en medio TB (2.3 g/L de  $KH_2PO_4$ , 16.4 g/L de  $K_2HPO_4$ , 12 g/L de peptona, 24 g/L de extracto de levadura, 0.4% de glicerol, 5.5mM de glucosa y 2mM de  $MgCl_2$ ) a 37°C y en agitación (180 rpm) para conseguir suficiente masa de bacterias y utilizarse como inóculo en un cultivo más grande. Una vez se obtuvo este inóculo, se añadió sobre un volumen mayor de medio TB suplementado con 1M de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) ya que el plásmido contiene un promotor inducible por lactosa (*pLac*) controlando la expresión de la región  $V_{H}H$ . Este cultivo de medio TB (“Terrific Broth”) suplementado con IPTG

se cultivó durante la noche a 28°C y en agitación (180 rpm). Al día siguiente, se centrifugó el cultivo a 10000 rpm durante 20 min a 4°C.

Los Nbs que se producen de esta manera están contenidos en el espacio periplásmico ya que pMECS-BB contiene la señal *peI/B* de localización periplásmica en bacterias. Para su extracción, el pellet ha de ser tratado con tampón TE (Tris-EDTA) (0.2M Tris pH 8.0, 0.5mM de EDTA y 0.5M de sacarosa) a razón por 12 mL de búfer TE por cada litro de cultivo de *E. coli* peletizado durante 6 horas a 4°C, tras lo cual se añade el doble de volumen, respecto al empleado antes, de tampón TE diluido ¼ con agua y se incuba en las mismas condiciones que antes durante toda la noche. Tras esto, se cargó el extracto celular en el que está contenido el Nb expresado en *E. coli* WK6 en una columna de afinidad a histidinas. Dado que nuestros Nbs contienen una cola de histidinas, se quedan adheridos a la columna de afinidad con níquel en su matriz. Previamente, la columna de afinidad HisTrap HP (GE Healthcare) fue equilibrada con tampón Tris pH 7.5 a 5mM, 300mM de NaCl y 10mM de imidazol y, tras la carga del extracto celular, se eluyó en gradiente de imidazol (10-500mM) para arrastrar primero todas las proteínas sin afinidad por la matriz y, en última instancia, el Nb según aumenta la concentración de imidazol. Tras este paso, se procedió a eliminar el exceso de imidazol mediante una columna de desalado HiPrep 26/10 Desalting column (GE Healthcare) en la que se cargaron las fracciones que contienen los Nbs y se circuló búfer Tris pH 7.5 25mM con 300mM de NaCl. Por último, el eluido de la columna de desalado se concentró con filtros de centrífuga de 10000 MWCO (Millipore) y repurificado en una columna Superdex 75 XK26/60 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrada con buffer Tris pH 7.5 25mM con 150 mM de NaCl.

### 3.1.5. Caracterización de la unión de los Nbs a *Gel4* mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica mediante la cual se pueden determinar los parámetros termodinámicos de una unión entre dos sustancias en disolución<sup>293</sup>. Es decir, se pueden determinar tanto los cambios de entalpía ( $\Delta H$ ), la constante de equilibrio de asociación ( $K_A$ ) y la estequiométrica de la unión. Más detalladamente, la unión de una sustancia A, a otra sustancia B produce o extrae una cantidad de calor que es similar al cambio de entalpía de la unión de las dos sustancias. Tras la determinación de la constante de asociación, se puede determinar la energía libre de la unión ( $\Delta G$ ) y, junto con la entalpía, calcular el cambio de entropía ( $\Delta S$ )<sup>294</sup>. Las siguientes ecuaciones matemáticas describen lo detallado en este párrafo.



$$k_{obs} = k_a \cdot [A] \cdot [B] + k_d \cdot [AB]$$

$$K_A = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{1}{K_D}$$

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_A = \Delta H + T \Delta S$$

Habitualmente, los dispositivos calorimétricos están compuestos de dos celdas, una de referencia y otra para la muestra, separadas por una termopila que es capaz de medir de manera precisa las diferencias de temperatura entre las dos celdas. Mientras que la celda de referencia suele estar llena con agua o con el mismo solvente que la celda de muestra (en estos experimentos Tris HCl 25mM y pH 7.5), en la celda de muestra se encuentran una de las dos proteínas y, conectada a ella, una jeringa que contiene la segunda sustancia a ensayar. Ambas celdas contienen elementos capaces de calentar dichas celdas conectados a la termopila. Al añadir una cantidad concreta de sustancia B en la celda que contiene la A, dependiendo de si la unión es endotérmica o exotérmica, los elementos calefactores tendrán que añadir más o menos energía para que tenga la misma temperatura que la celda de referencia, siendo esta energía el incremento de entalpía de la unión.

Para determinar los parámetros energéticos derivados de la unión de los Nbs a *Gel4* glicosilada y deglicosilada, se utilizó un dispositivo Auto-iTC200 (Microcal, Cytiva) en el cual se enfrentaron los Nbs obtenidos de aplaca (5  $\mu$ M) frente a concentraciones variables de *Gel4* y *Gel4* deglicosilada, estando estas últimas cargadas en la jeringa a concentraciones de 35 $\mu$ M. El análisis de datos se llevó a cabo usando Origin 7 (Microcal) y los modelos se ajustaron a un único sitio de unión.

### 3.1.6. Caracterización de la actividad transglicosilasa *in vitro* de *Gel4* y la capacidad inhibitoria de los Nbs.

La actividad transglicosilasa en enzimas fúngicas fue descrita y caracterizada previamente en *Saccharomyces cerevisiae*, concretamente en la familia de proteínas *Gas*, las cuales son homólogas con las Gel de *Aspergillus* y la de *Cryptococcus*<sup>295</sup>. Con un ensayo diseñado similar al de *S. cerevisiae*, ya descrito, se procedió a la caracterización de la actividad transglicosilasa de *Gel4* de *A. fumigatus*. Para ello, se utilizó laminarina ( $\beta$ -1,3-D-glucano lineal) como molécula

donante de fragmentos de  $\beta$ -1,3-D-glucano y laminarinhexaosa marcada con sulfurodamina (L6-SR) donde la laminarinhexaosa es un pequeño fragmento de  $\beta$ -1,3-D-glucano de 6 residuos de glucosa. Dado que, biológicamente, una molécula de  $\beta$ -1,3-D-glucano podría ser tanto donante como receptor en una reacción catalizada por una  $\beta$ -1,3-D-glucanosiltransferasa, se usa como molécula receptora un oligosacárido pequeño ya que éste no puede ser utilizado por la enzima como donante, solo como receptora.

Para determinar la actividad transglicosilasa de *Gel4*, se añadieron en pocillos de placas de 96 2.5 mg/mL de laminarina como donante, 30  $\mu$ M de L6-SR como receptor y *Gel4* glicosilada y deglicosilada a una concentración final de 0.58  $\mu$ M que se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Tras esto, se paró la reacción añadiendo ácido fórmico al 40% y se transfirieron 5  $\mu$ L de cada pocillo a papel cromatográfico donde los glucanos más complejos, fruto de la transferencia de fragmentos de  $\beta$ -1,3-D-glucano al L6-SR quedarán atrapados, mientras que los oligosacáridos L6-SR que no hayan reaccionado pudieron ser lavados con agua-etanol al 66% con un 5% de ácido fórmico. Tras esto, se procedió a la lectura de la fluorescencia en un lector de fluorescencia FluoStar Omega Reader (BMH Labtech).

De manera similar a este ensayo se llevaron a cabo los estudios de inhibición de la actividad enzimática de *Gel4* en presencia de los Nbs. Para ello, se añadieron concentraciones variables de los Nbs en el rango de 125-373nM y se comprobó la fluorescencia obtenida tras 30 minutos de reacción a 37°C. Como control se usó un Nb frente a *Ssek-1* de *Salmonella enterica* que, presumiblemente, no interacciona con *Gel4* a concentraciones similares usadas en este ensayo para los Nbs desarrollados contra *Gel4*.

### 3.2. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Aspergillus* y *Cryptococcus* por acción de los Nbs anti *Gel4*

Tras comprobar la capacidad de algunos Nbs generados contra *Gel4* de inhibir la actividad de ésta, se procedió a comprobar si esta capacidad inhibitoria también se trasladaba hacia una reducción de la viabilidad del hongo en ensayos de crecimiento *in vitro*. En forma resumida, se evaluó el crecimiento de múltiples cepas y aislados de *Aspergillus* y *Cryptococcus* en presencia de Nb2, Nb3, Nb4 y NbSseK1 mediante un ensayo colorimétrico de reducción de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida).

### 3.2.1. Cultivo de *Aspergillus* y producción de conidias.

Una forma simple y efectiva de almacenar cepas o aislados de *Aspergillus* en un laboratorio es depositando sus conidias en un tubo cerrado con agua y almacenado a temperatura ambiente. Las conidias, como se ha mencionado durante la introducción, son estructuras naturales que genera el hongo, capaces de resistir en condiciones adversas durante mucho tiempo y poder germinar cuando esas condiciones adversas han desaparecido y las nuevas son aptas para el desarrollo del hongo. Sin embargo, aunque dichas conidias puede permanecer viables en un tubo con agua a temperatura ambiente durante décadas, van perdiendo viabilidad con el paso del tiempo, por lo que muchas veces es conveniente pasarlas varias veces antes de utilizarlas en un experimento con el fin de que recuperen cierto vigor en el crecimiento que no muestran durante la primera siembra.

La forma de crecimiento más común en *Aspergillus* es en forma de hifas. Las hifas son agrupaciones de células unidas linealmente por sus extremos y que están (las células) separadas físicamente unas de otras mediante un septo. Como es evidente, dichas células individuales que componen las hifas son muy difíciles o imposibles de contar, por lo que en muchos experimentos con *Aspergillus* se suele partir de conidias en vez de hifas, ya que éstas son unidades o células independientes capaces de generar una colonia viable y son fácilmente contables, como si se tratase de una levadura.

Por tanto, antes de usar cualquier cepa o aislado de *Aspergillus* almacenado, sus conidias se sembraron en placas de agar Sabouraud suplementado con cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) e incubadas a 37°C durante uno o dos días hasta que se generaron nuevas conidias viables que pudieron ser utilizadas en el resto de ensayos de este trabajo. Habitualmente, una cepa de *Aspergillus* que crece con brío o vigor es capaz de generar en 24h a 37°C, al menos, una capa de hifas blancas que cubren toda o casi toda la placa. Además, puede haber generado también, en esas 24h o en las 24 siguientes, una capa de conidias coloreadas. Por el contrario, si esa cepa no es capaz de generar esa capa de conidias en 24-48h es necesario resembrarla otra vez. Para ello, cuando genere conidias, éstas se han de recoger mediante roce suave con un hisopo untado en Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), resembrado por contacto en otra placa de agar Sabouraud e incubado en las mismas condiciones que antes. Alternativamente, con una lanza esterilizada por calor se puede cortar un pequeño trocito de agar con hifas y/o conidias y depositarse sobre una nueva placa de Sabouraud-cloranfenicol para su resiembra.

Una vez se obtuvieron conidias de cultivos vigorosos, éstas se separaron de sus hifas mediante un roce suave con un hisopo mojado en Tween-20 y se depositaron en un tubo de ensayo de fondo semiesférico de vidrio con 5 mL de PBS en su interior mediante el raspado del hisopo que contiene las conidias contra la superficie del tubo de ensayo. Tras esto, es necesario vortear la suspensión de esporas con el fin de homogenizarla lo máximo posible antes de medir su turbidez en un densitómetro. Si su turbidez es inferior a 1McF, es necesario volver a pasar el hisopo por la superficie de la placa con suavidad con el objetivo de lograr arrastrar conidias procurando no coger también hifas y depositarlas sobre el tubo de ensayo. Si la turbidez de la suspensión es mayor a 1McF, es necesario añadir agua hasta que la turbidez se ajuste a 1McF.

Todos los ensayos relativos a *Aspergillus* llevados a cabo durante este trabajo se han hecho partiendo de suspensiones de conidias 1McF. Una unidad McF en el caso de *A. fumigatus* se corresponde aproximadamente con  $2.5 \cdot 10^6$  CFU/mL en recuentos en placa de diluciones seriadas. Si bien es cierto que en otras especies de *Aspergillus* el tamaño de la conidia es diferente, por lo que la relación entre CFU/mL y turbidez también es diferente, para simplificar el procedimiento, se ha usado el mismo valor de turbidez en los pocos ensayos en los que se han usado cepas o aislados de *Aspergillus* no-fumigatus.

### 3.2.2. Cultivo de *Cryptococcus*

Al igual que para *Aspergillus*, el medio de cultivo sólido elegido para el cultivo de *Cryptococcus* es el Sabouraud-cloranfenicol, que es un medio complejo muy utilizado en el cultivo de hongos, ya que, además de ser selectivo para hongos, también es capaz de hacer crecer a un amplio abanico de géneros fúngicos, estando *Cryptococcus* entre ellos.

Nuevamente, el almacenamiento de *Cryptococcus* también es bastante versátil. Aunque la mejor manera de almacenar cualquier microorganismo durante períodos prolongados de tiempo sea por congelación a -80°C en glicerol, lo cierto es que, las levaduras también pueden almacenarse a temperatura ambiente suspendidas en agua. De hecho, aunque sea un caso extremo de la resistencia al paso del tiempo en condiciones agresivas, se han logrado recuperar levaduras viables de los géneros *Saccharomyces* o *Brettanomyces* almacenadas en botellas de cerveza sin abrir obtenidas en naufragios acaecidos hace más de 200 años. No obstante, de manera similar a otras especies, van perdiendo viabilidad con el tiempo por lo que pueden ser necesarios varios pasos hasta que *Cryptococcus* crezca con vigor.

Por tanto, todas las cepas y aislados de *Cryptococcus* usados en este trabajo fueron sembradas desde archivo en placas de Petri con agar Sabouraud más cloranfenicol e incubadas en estufas a 30°C durante 48h. Aunque *Cryptococcus* es capaz de crecer satisfactoriamente a 37°C, temperatura corporal humana, en condiciones de laboratorio crece más rápidamente a 30°C, al igual que otras levaduras, por lo que en materia de producción de células de *Cryptococcus* suele emplearse una temperatura de crecimiento de 30°C. Además, en comparación con otras levaduras, *Cryptococcus* no suele replicarse rápidamente en condiciones de laboratorio, por lo que suelen ser necesarias 48h o más de cultivo para alcanzar una masa de células suficiente para lo ensayos posteriores a realizar.

Tras las 48h de cultivo a 30°C, con un hisopo o un asa estéril se raspa la superficie del cultivo de *Cryptococcus*, arrastrando células de este a un tubo de ensayo de fondo redondo de vidrio que contiene 5 mL de PBS. Tras esto, se mide la turbidez de la suspensión previamente agitada con un vórtex con el fin de homogenizarla. Al igual que en *Aspergillus*, la suspensión de células de *Cryptococcus* se ajustó a 1McF, que en este caso 1McF de *C. deneoformans* 1229817 se corresponde con, aproximadamente,  $1 \cdot 10^7$  CFU/mL tras comparar con recuentos en placa de diluciones seriadas. Por norma general, en el resto de experimentos en los que se usó una suspensión de *Cryptococcus*, éstas tenían una turbidez de 1McF o se partió de una suspensión 1McF para obtener suspensiones con diferente CFU/mL.

### 3.2.3. Cepas y aislados clínicos de *Aspergillus* y *Cryptococcus*.

A lo largo de este trabajo, las cepas y/o aislados clínicos más utilizados, sobre los que se ha construido este estudio, fueron la B5233 de *A. fumigatus* y la 1229817 de *C. deneoformans*. La cepa *A. fumigatus* B5233 fue proporcionada por la Dra. Janice Kwon-Chung. Aunque originalmente fue un aislado clínico, ha sido empleada en varios experimentos en los que se propuso la GT como factor de virulencia de *A. fumigatus* o en estudios de reproducción sexual. Respecto a *C. deneoformans* 1229817, es un aislado clínico de un paciente del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y fue proporcionado por el Dr. Antonio Rezusta. Junto a éstas, se han utilizado otras cepas y aislados de *Aspergillus spp.* y *Cryptococcus spp.* en diferentes experimentos y están reflejadas en la Tabla 2.

Organismo	Origen	Sección (Asp) / Serotipo (Cryp)	Fuente
<i>A. fumigatus</i> B5233	Cepa	Fumigati	Dra. J. Kwon-Chung
<i>A. fumigatus</i> 1631562	Aislado clínico	Fumigati	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. fumigatus</i> 1677095	Aislado clínico	Fumigati	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. fumigatus</i> 1627666	Aislado clínico	Fumigati	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. fumigatus</i> 838	Aislado clínico	Fumigati	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. fumigatus</i> 286	Aislado clínico	Fumigati	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. fumigatus</i> 678715	Aislado clínico	Fumigati	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. terreus</i> 585392	Aislado clínico	Terrei	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. flavus</i> 1207239	Aislado clínico	Flavi	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. niger</i> 877861	Aislado clínico	Nigri	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. ustus</i> B5	Aislado clínico	Usti	Dr. Antonio Rezusta
<i>A. nidulans</i> 822007	Aislado clínico	Nidulantes	Dr. Antonio Rezusta
<i>C. deneoformans</i> 1229817	Aislado clínico	Serotipo D	Dr. Antonio Rezusta
<i>C. deneoformans</i> B3501	Cepa	Serotipo D	Dr. Óscar Zaragoza
<i>C. deneoformans</i> B3501 <i>cap67-</i>	Cepa	Serotipo D	Dr. Óscar Zaragoza
<i>C. deneoformans</i> JEC-21	Cepa	Serotipo D	Dr. Óscar Zaragoza
<i>C. deneoformans</i> 24067	Cepa	Serotipo D	Dr. Óscar Zaragoza
<i>C. neoformans</i> H99	Cepa	Serotipo A	Dr. Óscar Zaragoza
<i>C. neoformans</i> H99 <i>cap60-</i>	Cepa	Serotipo A	Dr. Óscar Zaragoza
<i>C. neoformans</i> H99 <i>CnGel-</i>	Cepa	Serotipo A	Dr. Óscar Zaragoza

**Tabla 2:** Cepas aislados clínicos de *Aspergillus* y *Cryptococcus* utilizados en este trabajo sobre los cuales, al menos, se ha ensayado la eficacia del Nb3 en la inhibición del crecimiento de sus cultivos.

### 3.2.4. Ensayo de sensibilidad a fármacos basado en la reducción de XTT

Tradicionalmente, los ensayos de toxicidad frente a sustancias se han realizado comprobando visualmente si hay o no hay crecimiento de un microorganismo cuando está en contacto con diferentes concentraciones del fármaco ensayado<sup>296</sup>. Ya sea creciendo el hongo en medio líquido o en agar, la concentración mínima inhibitoria (MIC) es, por definición, la concentración menor del fármaco que ha inhibido por completo el crecimiento del hongo frente al que se prueba<sup>297</sup>. Generalmente, los fármacos antifúngicos con propiedades fungicidas o los fungistáticos más potentes pueden ser ensayados satisfactoriamente mediante estos métodos y, además, son las formas preferidas para hacerlo. De hecho, son uno de los métodos recomendados tanto por la EUCAST (“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”) como por el CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*).

En un intento por automatizar los ensayos y no tener que depender del ojo de un observador humano, es muy común realizar test de susceptibilidad a antifúngicos en medio líquido para levaduras y determinar el crecimiento en función de la densidad óptica, es decir, de la turbidez. Este método presenta una serie de ventajas respecto a la comprobación visual ya que permite

determinar rangos de efecto intermedio del fármaco y no únicamente el punto a partir del cual ya no hay crecimiento. Por ejemplo, se pueden determinar concentraciones como la MIC<sub>50</sub> o la MIC<sub>90</sub> en las que la medida de turbidez se corresponde con un 50% o un 90% de inhibición de su crecimiento, respectivamente. Sin embargo, presenta otras limitaciones como el hecho de que no es un método apto para su uso con mohos como *Aspergillus*, ya que estos microorganismos crecen en forma de hifa y no ocupan homogéneamente todo el espacio del pocillo; o que una célula muerta también genera turbidez, por lo que se puede infravalorar el efecto de los fármacos menos potentes o de acción no inmediata.

Frente a esto, en los últimos años se han ido haciendo populares los ensayos colorimétricos para medir la susceptibilidad de un microorganismo a un fármaco. Estos ensayos colorimétricos se basan en la habilidad de las células vivas con mitocondrias activas para reducir sales de tetrazolio y generar un compuesto coloreado en mayor concentración según haya más células vivas en el pocillo. Más concretamente, si la célula está viva y tiene mitocondrias activas, también tiene oxidorreductasas mitocondriales activas que son capaces de generar NADPH+H que, a su vez, será capaz de reducir la sal de tetrazolio haciéndole cambiar de color, lo que acaba proporcionando una medida de la actividad y/o capacidad metabólica general de la célula. Originalmente, estos ensayos usaban sales de tetrazolio más o menos solubles que al reducirse generaban cristales insolubles que era necesario disolver con ácido para poder medir la cantidad que se había generado y, además, eran tóxicos para las células ensayadas. Actualmente, existen otras versiones de estas sales cuyos metabolitos reducidos no son insolubles, lo cual simplifica mucho los ensayos de susceptibilidad a fármacos y, además, su sal reducida no es letal para las células.

El XTT es una sal de tetrazolio de color amarillento pálido y soluble en agua cuyo uso en ensayos de susceptibilidad a fármacos en mohos como *Aspergillus* o *Penicillium* es muy común<sup>288,298-301</sup>. Cuando el XTT es reducido por acción de las oxidorreductasas mitocondriales, éste se torna de un color naranja intenso que puede ser medido espectrofotométricamente. Habitualmente, estos ensayos se hacen en placas de 96 pocillos donde las absorbancias individuales de cada pocillo se obtienen de la resta entre la absorbancia del pocillo a 450nm y la absorbancia a 650nm. Con estos datos, el porcentaje de crecimiento de cada condición se calcula con la fórmula:

$$\% \text{crecimiento} = \frac{ABS_{\text{pocillo}} - ABS_{\text{control sin hongo}}}{ABS_{\text{control sin droga}} - ABS_{\text{control sin hongo}}} * 100$$

Por tanto, a lo largo de este trabajo se ha usado este método colorimétrico basado en la reducción de XTT para determinar la susceptibilidad de múltiples cepas y aislados de *Aspergillus* y *Cryptococcus* tanto a los Nbs generados contra *Gel4* como a otros fármacos de uso común en el tratamiento de IFIs como son la AMB, el VCZ, el FCZ o la CSF.

Independientemente del fármaco empleado, los ensayos de sensibilidad basados en reducción de XTT que se llevaron a cabo siguieron un procedimiento semejante. En primer lugar, es necesario llenar con 200  $\mu$ L de agua estéril los pocillos que conforman el perímetro de la placa de 96 pocillos, es decir, los pocillos A1-A12, B12-G12, H12-H1 y G1-B1. La razón por la que se hace esto es para reducir el “efecto borde” que se da en este tipo de ensayos en placa de 96 pocillos donde la evaporación siempre es más intensa que en los pocillos interiores, lo que puede acabar ocasionando medidas incorrectas de actividad metabólica debido al aumento de la intensidad del color en ese pocillo debido a la pérdida de agua y no a la generación de más XTT reducido.

Una vez está protegida la placa del efecto borde, en los pocillos de la columna libre situada más a la izquierda (columna 2) se añaden 100  $\mu$ L de la disolución en PBS que contenga el fármaco a 4x la concentración más alta que se vaya a testar en el ensayo de sensibilidad. Sobre ellos, se añaden otros 100  $\mu$ L de medio RPMI 1640 4x con 25mM de HEPES y 2% de glucosa sin bicarbonato donde este medio se preparó a partir de RPMI 1640 en polvo (Thermofisher-Scientific, Waltham, Massachusetts) disuelto en 250 mL en lugar de en 1L. Por tanto, en los pocillos de esa columna habrá 200  $\mu$ L con fármaco y medio a 2x la concentración final. Por otra parte, en el resto de pocillos libres de la placa se añaden 50  $\mu$ L de medio RPMI 1640 4x y PBS para acabar dando 100  $\mu$ L de RPMI 1640 2x. Tras esto, se procede a mezclar con una micropipeta los pocillos de la columna 2 que contienen el fármaco tomando y soltando 100  $\mu$ L 3 veces. A continuación, se toman 100  $\mu$ L de cada uno de estos pocillos y se vierten y homogenizan con la micropipeta sobre los pocillos de la columna siguiente (la tercera). Se repite este proceso de tomar 100  $\mu$ L de los pocillos de la izquierda y verterlos sobre sus contiguos a la derecha, junto con su homogenizado hasta llegar a la columna 10, donde en vez de añadirlos sobre los pocillos de esa columna, son descartados ya que esa columna contendrá el control de crecimiento del hongo sin fármaco, que se corresponde, por definición, con el 100%. Tras esto, se añadirán 100  $\mu$ L de una suspensión 1McF de *Cryptococcus spp.* o *Aspergillus spp.* sobre todos los pocillos a excepción de los de la columna 11, donde se añadirán 50  $\mu$ L de fármaco 4x (al igual que en la primera columna) y 50  $\mu$ L de PBS para dejar una concentración de RPMI 1640 1x, al igual que en el resto de pocillos de la placa. El volumen total y final de todos los pocillos será de 200  $\mu$ L.

Una vez se ha preparado la placa de sensibilidad al fármaco que sea, se procede a incubarla a 30°C (*Cryptococcus*) o 37°C (*Aspergillus*), en función de la especie, durante 48h. Tras completarse la incubación, se añaden 50 µL de una solución de XTT (AppliChem, Darmstadt, Germany) a 1 mg/mL suplementado con 125 µM de menadiona (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y se incuba nuevamente durante 1-2h a 30°C o 37°C o, al menos, hasta que los pocillos control sin droga alcancen 1 unidad de absorbancia. En este caso, aunque no sea necesario estrictamente añadirla, la menadiona simplemente acelera la reacción de reducción de XTT disminuyendo el tiempo que se necesitaría para alcanzar esa unidad de absorbancia en el control respecto de no añadirlo<sup>302</sup>. Por último, se procede a la lectura de las absorbancias de los pocillos de la placa en un lector de placas SynergyHT (Agilent Technologies, Santa Clara, California) a 450 nm y 650 nm.

Respecto a los fármacos, las concentraciones ensayadas para los Nbs Nb2, Nb3, Nb4 y NbSseK1 se situaron entre los 2 mg/mL y los 0.001 mg/mL; para los azoles como el VCZ o el FCZ fueron entre 64 y 0.25 µg/mL, para la AMB entre los 8 y 0.125 µg/mL, mientras que para la CSF entre 1 mg/mL y 0.004 mg/mL.

### 3.2.5. Determinación de sinergias del Nb3 con otros antifúngicos de uso común en clínica.

El método FICI (“*Fractional Inhibitory Concentration Index*”) es uno de los análisis de cuantificación de interacciones entre fármacos más usado en la actualidad<sup>303,304</sup>. Está basado en el formato tablero de ajedrez en el que se enfrentan un rango de concentraciones variables de ambos fármacos sobre cultivos del organismo que sea en placas de 96 pocillos. Cada pocillo de esa placa, contendrá una combinación única de ambos fármacos que generará un efecto concreto sobre el crecimiento del organismo, el cual se compara con el efecto que genera cada uno de los fármacos por individual, y se expresa matemáticamente con la siguiente ecuación:

$$FIC = \frac{MIC_{Ab}}{MIC_A} + \frac{MIC_{Ba}}{MIC_B}$$

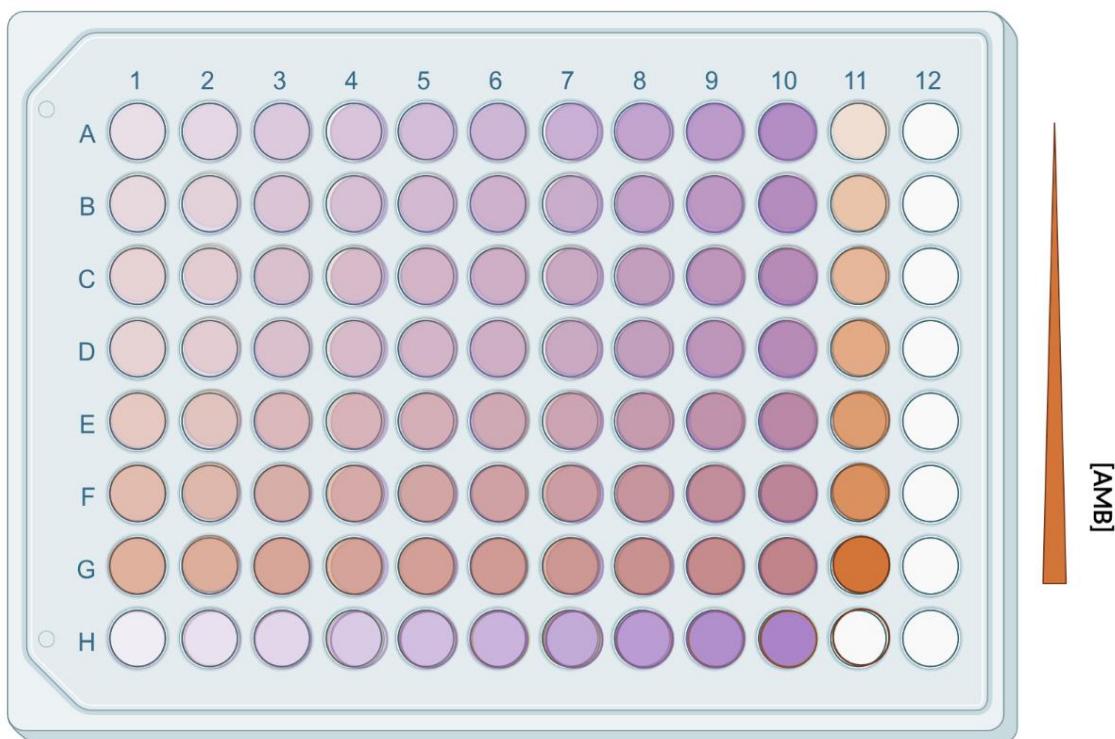
En la fórmula de arriba,  $MIC_{Ab}$  se corresponde con el pocillo donde se ha alcanzado la concentración inhibitoria mínima con la cantidad de antifúngico A más pequeña en combinación con el antifúngico B;  $MIC_A$  se corresponde con la concentración inhibitoria mínima del antifúngico A en solitario;  $MIC_{Ba}$  es la concentración de antifúngico B más pequeña con el que se ha alcanzado la MIC en combinación con el antifúngico A; y  $MIC_B$  es la concentración inhibitoria mínima del antifúngico B en solitario<sup>304</sup>. Hay que indicar que, para  $MIC_{Ab}$  y  $MIC_{Ba}$ , se suelen usar las concentraciones mínimas en combinación, aunque también se pueden usar las

máximas, así como las concentraciones de cualquier otro pocillo, pero, no obstante, solo las dos primeras son las más habituales.

Al igual que en los ensayos de susceptibilidad a un único antifúngico, surge la problemática de definir la MIC. En el caso de fungicidas muy potentes, como la AMB, la MIC puede determinarse visualmente. Sin embargo, cuando se testan otro tipo de compuestos menos potentes como las equinocandinas o los azoles, es habitual que se usen técnicas turbidimétricas o colorimétricas basadas en la densidad óptica de los pocillos o en la cantidad de XTT que se reduce en ellos. En estos casos, lo más habitual es usar la MIC<sub>90</sub> o la MIC<sub>50</sub> que, por definición, se corresponden con las concentraciones a las cuales se alcanza el 90% y el 50% de inhibición del crecimiento, respectivamente. Por tanto, dado que la mayoría de los compuestos antifúngicos que se utilizaron en este trabajo se encontraban en esta situación, se decidió usar la MIC<sub>50</sub> para todos los experimentos de sinergia. A modo de ejemplo, el protocolo que se siguió para el estudio de sinergia entre el Nb3 y la AMB y que se expone en el párrafo siguiente es similar al que se usó en el resto de las combinaciones ensayadas, que fueron Nb3-AMB, Nb3-VCZ y Nb3-Nb4 para *A. fumigatus* B5233 y Nb3-AMB, Nb3-FCZ y Nb3-Nb4 para *C. deneoformans* 1229817 y *C. neoformans* H99.

1. Se parte de una disolución de Nb3 en PBS a una concentración de 4096 µg/mL.
2. Dicha solución de Nb3 se diluye ½ añadiendo RPMI 1640 4x. (Nb3 2048 µg/mL y RPMI 2x)
3. Se añaden en la columna nº10 200 µL de la dilución de Nb3 en RPMI 2x.
4. Se llenan las columnas 1 a 9 y 11 con 100 µL de RPMI 2x diluido ½ en PBS (100 µL de RPMI 1640 2x)
5. Con una pipeta multicanal se toman 100 µL de los pocillos de la columna nº10 y se vierten (pipeteando 3 veces) sobre los pertinentes pocillos de la columna nº9.
6. Se toman nuevamente 100 µL de los 8 pocillos de la columna nº9 y se vierten sobre los respectivos de la columna nº8 de acuerdo al paso 5.
7. Repetir hasta alcanzar la columna nº1
8. Descartar los últimos 100 µL de los pocillos de la columna 1.
9. Se toma una disolución de AMB en DMSO (dimetil sulfóxido) con concentración de 1 mg/ml y se diluye en PBS hasta alcanzar una concentración de 64 µg/mL. Posteriormente, se diluye ½ en RPMI 4x (AMB 32 µg/mL y RPMI 2x)

10. Con una pipeta multicanal, se añaden 100  $\mu$ L de la disolución de AMB en RPMI 1640 2x sobre los pocillos 1 a 11 de la fila A y se homogeniza con la pipeta multicanal.
11. Se toman 100  $\mu$ L de los pocillos 1 a 11 de la fila A con la pipeta multicanal y se vierten de acuerdo al paso anterior sobre los respectivos pocillos de la fila B, homogenizando por pipeteado tras verterlo.
12. Repetir el paso anterior hasta alcanzar la fila G.
13. Descartar los últimos 100  $\mu$ L de los pocillos de la fila G.
14. Añadir 100  $\mu$ L de RPMI 4x diluido  $\frac{1}{2}$  en PBS sobre los pocillos 1 a 10 de la fila H y resuspender 3 veces con la pipeta multicanal.
15. Descartar 100  $\mu$ L de cada pocillo 1 a 10 de la fila H. En estos dos pasos se logra igualar la concentración del Nb3 a la del resto del tablero.
16. Añadir 100  $\mu$ L de RPMI 2x diluido  $\frac{1}{2}$  en PBS sobre los pocillos A-G de la columna nº11 y resuspender 3 veces con la pipeta multicanal.
17. Descartar 100  $\mu$ L de cada pocillo A-G de la columna nº11.
18. Añadir 100  $\mu$ L de RPMI 2x en los pocillos H11 y H12 para el control positivo y el control negativo.
19. Preparar el inóculo a 4x la CFU final deseada en el pocillo en PBS.
20. Añadir inmediatamente 100  $\mu$ L del inóculo, preparado como se describe en secciones anteriores, con la pipeta multicanal sobre todos los pocillos de la placa a excepción del control negativo.
21. Añadir 100  $\mu$ L de agua y/o PBS sobre el control negativo.
22. Cultivar en estufa a la temperatura correspondiente y con la agitación necesaria o no de acuerdo al microorganismo ensayado durante 48h.
23. Añadir 50  $\mu$ L de XTT 1 mg/mL suplementado con 125  $\mu$ M de menadiona e incubar a 30°C o 37°C en función del microorganismo durante 1 hora.
24. Leer la placa en un lector de placas espectrofotométrico a 450 y 650 nm.



**Figura 10:** Representación de un experimento de sinergia prototípico entre Nb3 (morado) y AMB (naranja) en una placa de 96 pocillos. En la fila H se encuentra el tratamiento con Nb3 en solitario, mientras que, el tratamiento con AMB en monoterapia se encuentra en la columna 11.

Tras obtener las lecturas de absorbancia de cada pocillo, se procedió a calcular los porcentajes de inhibición del crecimiento de cada pocillo individual, que servirán para determinar las FIC (concentración inhibitoria fraccional) individuales y, en última instancia, identificar MIC mínimas para cada combinación. Matemáticamente, si la FIC de un pocillo es  $< 0.5$ , se considera sinergia, mientras que, si la FIC está entre  $0.5$  y  $2$  (a veces hasta  $4$ ) se considera efecto aditivo. Por último, las FIC con valores por encima de  $4$  indican antagonismo entre los dos fármacos ensayados<sup>303</sup>.

### 3.3. Estudio de la dinámica del Nb3 en la pared fúngica y la cápsula de *Cryptococcus*.

Aunque hay estudios previos en los que se demostró que un scFv puede tener efecto antifúngico sobre una proteína situada en la membrana<sup>236</sup>, bajo la pared fúngica, lo que sugiere que estas proteínas son capaces de atravesar esta barrera física, en este trabajo fue necesario comprobar si el Nb3 es capaz de atravesar, al menos, la cápsula en *Cryptococcus*. A modo resumido, los

experimentos consistieron en marcar ciertas partes de las células fúngicas, como la pared en ambos hongos o también la cápsula en el caso de *Cryptococcus* y añadir Nb3 marcado con una molécula fluorescente (Sulfocianina-5 – Cy5) y comprobar su localización mediante microscopía confocal.

La microscopía confocal es una técnica de imagen mediante la cual se pueden obtener imágenes donde todos los puntos que conforman esa imagen en 2 dimensiones están en el mismo plano<sup>305</sup>. A diferencia de la microscopía convencional, donde la luz que atraviesa la muestra y llega al objetivo proviene de múltiples planos e induce un aspecto borroso a la imagen, la microscopía confocal se basa en hacer pasar tanto la luz que va a la muestra como la que sale de ella por dos pequeños colimadores o “pinholes” cuya misión es eliminar toda la luz que no se encuentra en el mismo plano que el que se está observando y su grado de “apertura” determinará el grosor del “punto” que se está observando<sup>305</sup>. De hecho, el microscopio escanea cada punto concreto de la superficie del plano para conformar la imagen final y, aunque los planos están, obviamente, en 2D, la microscopía confocal permite generar objetos bastante precisos en 3D al poder sumar, “apilar” o hacer un “stack” de varios planos contiguos<sup>306</sup>.

Aunque la microscopía confocal también puede hacerse con la luz del láser que es reflejada en un punto de la superficie de la muestra, en el campo de las ciencias biológicas es muy habitual usar la luz emitida por fluorescencia en un punto de la muestra por excitación de un fluoróforo allí contenido con una luz generada por un láser concreto. Más detalladamente, tras excitar un punto de la muestra con el láser adecuado, la luz emitida por fluorescencia pasa a través del “pinhole” antes de llegar al fotomultiplicador. Cuando el microscopio ha escaneado ese punto, el espejo encargado de reflejar la luz laser cambia de orientación para poder apuntar al siguiente punto de la muestra e ir conformando la imagen total del plano que se escanea.

Respecto a la emisión, existen una gran cantidad de opciones en los láseres a emplear, como son los generados por gases como el helio o el argón, los láseres en estado sólido o los generados con diodos. Entre esos láseres son habituales los que generan radiaciones de longitudes de onda de 405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm, 561 nm 594 nm o 633 nm. En este estudio se usaron fundamentalmente los láseres de 405 nm para el calcofluor, el de 488 nm para el mAb18b7-FITC y el de 633nm para excitar el Nb3-Cy5.

Las 3 sondas fluorescentes que se usaron son calcofluor, mAb18b7-FITC y el propio Nb3-Cy5. El calcofluor white es una molécula fluorescente capaz de unirse a polisacáridos con enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 como la quitina o beta glucanos de origen vegetal, bacteriano y fúngico<sup>307,308</sup>. El calcofluor se excita principalmente con luz UV, aunque también puede excitarse con luz violeta y tiene su

máximo de absorción a 347 nm, por lo que en el campo de la microscopía confocal suele excitarse usando el láser de 405 nm. Respecto a la emisión de fluorescencia, ésta se da en el azul con un máximo de emisión de alrededor de unos 450 nm pudiendo tomarse el rango de luz emitida desde 406 nm hasta más de 500 nm.

Por otra parte, mAb18b7 es un anticuerpo monoclonal de ratón de tipo IgG1 que es capaz de unirse al GXM de la cápsula de los 4 principales serotipos de *Cryptococcus* y que fue candidato para convertirse en fármaco en el tratamiento de la criptococosis ya que era capaz de inducir ciertas propiedades beneficiosas como opsonizar células de *Cryptococcus* potenciando su fagocitosis por parte de macrófagos, inducir la activación del sistema del complemento o retirar polisacárido de *Cryptococcus* de la circulación, que es conocido por tener efectos perniciosos sobre la respuesta inmunológica del hospedador hacia *Cryptococcus*<sup>309-311</sup>. Además, también se investigó su uso como antifúngico en combinación con isótopos radiactivos enlazados a él, por lo que este anticuerpo era capaz de transportar específicamente esa radiación a células de *Cryptococcus*, radiación que, además, era letal para el hongo<sup>312</sup>. En este estudio, se usó mAb18b7 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para determinar la ubicación de la cápsula. El FITC es un fluorocromo de la familia de los xantenos que absorbe luz en el espectro del azul-cyan (450-500 nm) con un máximo de absorción en 492 nm por lo que suelen utilizarse los láseres de argón 458 y/o 488 para excitarlo. En el caso de su espectro de emisión, éste va desde 490nm hasta los 600nm, con un máximo en torno a 525 nm, que se corresponde con el verde.

En último lugar, se usó Nb3 marcado con el fluorocromo sulfocianina-5 (Cy5) con el objetivo de, por un lado, comprobar si el Nb3 era capaz de atravesar la cápsula de *Cryptococcus* y, por otro lado, ver si éste se depositaba sobre alguna estructura celular. Más concretamente, si la fluorescencia que aporta el Nb3-Cy5 se sitúa concéntricamente a la fluorescencia que aporta el mAb18b7-FITC significaría que el Nb3-Cy5 ha conseguido atravesar la cápsula de *Cryptococcus* y alcanzar, o al menos estar más cerca, a su diana (*CnGel*), que presumiblemente se encuentra en la membrana y la pared fúngica. Además, puesto que *CnGel* no debería encontrarse en la cápsula, al menos a priori, si se observase fluorescencia asociada al Nb3-Cy5 “atrapada” junto a la del mAb18B7-FITC implicaría que la cápsula juega un papel muy importante en la protección del hongo frente a la difusión del Nb3 a través de ella. Respecto al fluorocromo elegido para marcar el Nb3, Cy5, fue necesario producir Nb3 donde su glutamina 13 fue sustituida por una cisteína necesaria para poder enlazar la sulfocianina-5 maleimida. El fluorocromo Cy5 absorbe entre los 550 nm y los 700 nm (verde-naranja-rojo), siendo su máximo en 640nm, lo cual hace

que, preferiblemente, se use el láser de 633 para excitarlo. En el caso de la emisión, su espectro va desde los 650 nm hasta los 800 nm, que se corresponde con el rojo, rojo lejano e infrarrojo.

En el caso de los experimentos de dinámica del Nb3 a través de la pared y de la cápsula de *Cryptococcus*, el protocolo que se empleó para los montajes difiere del de *Aspergillus* por varias razones. Por un lado, la forma de crecimiento de cada uno es diferente, ya que *Cryptococcus* es una levadura y se reproduce por gemación, separando en última instancia la célula original de la célula hija, mientras que *Aspergillus* crece en forma de hifa sin separar las células parentales de las hijas. A menos que se estudien esporas de *Aspergillus* germinando, su manejo va a ser diferente. Por otra parte, *Aspergillus* no tiene cápsula, por lo que no tiene sentido usar un anticuerpo contra ella y lo único que se comprobó es la localización del Nb3-Cy5 en sus preparaciones. Por tanto, las preparaciones de *Cryptococcus* y de *Aspergillus* se realizaron de la siguiente manera:

#### *Cryptococcus*

1. Sembrar la cepa o aislado concreto de *Cryptococcus* en placa de agar Sabouraud con cloranfenicol y cultivar a 30°C durante 7días.
2. Pasar un asa estéril sobre dicho cultivo y resuspender las células arrastradas en 1 mL de PBS.
3. Centrifugar 5 minutos a 1800 g a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 1 mL de PBS.
5. Colocar un cubreobjetos redondo en el interior de un pocillo de una placa de 12 pocillos.
6. Añadir 2 mL de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) en el pocillo que contiene el cubreobjetos e incubar durante 30 min con la tapa de la placa cerrada a temperatura ambiente. Asegurarse de que los cubres están sumergidos en la solución de poli-L-lisina. La poli-L-lisina ayuda a que las células se mantengan adheridas al cubreobjetos.
7. Retirar la poli-L-lisina aspirando con una micropipeta.
8. Lavar el cubreobjetos 3 veces con PBS para retirar el exceso de poli-L-lisina.
9. Depositar 80 µL de suspensión de *Cryptococcus* como si fuese una gota sobre el centro del cubreobjetos. Hacerlo con cuidado para que no se extienda la gota por todo el pocillo y permanezca en todo momento sobre la superficie superior del cubreobjetos. Añadir

una gota de mayor volumen puede hacer que esta exceda la superficie del cubre y se vierta por fuera de éste.

10. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente para que las células de *Cryptococcus* queden adheridas al cubreobjetos.
11. Retirar la suspensión de *Cryptococcus* de la superficie del cubre aspirando con una micropipeta de 200  $\mu$ L.
12. Lavar el cubreobjetos 3 veces con 2 mL de PBS para eliminar las células que no se hayan adherido a la superficie del cubreobjetos. Es importante verter el PBS con cuidado, procurando no arrancar las células adheridas al cubreobjetos.
13. Añadir una gota de unos 80  $\mu$ L de mAb18b7-FITC y/o Nb3-Cy5 500  $\mu$ g/mL en PBS sobre el cubreobjetos e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Es importante que, al igual que al colocar la suspensión de células, esta no exceda los límites del cubreobjetos y se acabe vertiendo por el interior del pocillo de la placa.
14. Retirar la gota con una micropipeta de 200  $\mu$ L.
15. Lavar añadiendo 2 mL de PBS en cada lavado y retirándolo del pocillo aspirando suavemente con una micropipeta de 1 mL.
16. Repetir el paso anterior 5 veces para eliminar el Nb3-Cy5 no unido.
17. Añadir una gota de unos 80  $\mu$ L de calcofluor (Sigma) diluido  $\frac{1}{2}$  en PBS.
18. Lavar añadiendo 2 mL de PBS en cada lavado y retirándolo del pocillo aspirando suavemente con una micropipeta de 1 mL.
19. Repetir el paso anterior 5 veces para eliminar el calcofluor.
20. Verter una gota de unos 10  $\mu$ L de fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) en un portaobjetos y colocar el cubreobjetos boca abajo, es decir, la superficie sobre la que se han pegado las células de *Cryptococcus* y sobre la cual se han hecho las tinciones ha de estar en contacto con el fluoromount, quedando las células contenidas entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

#### *Aspergillus fumigatus*

1. Sembrar conidias de *A. fumigatus* de una solución 1McF, como se describió en apartados previos, en un frasco de cuello inclinado con 10 mL de medio RPMI 1640 con HEPES 25mM y 2% de glucosa e incubar a 37°C el tiempo que requiera el análisis, ya sean unas pocas horas si se requieren conidias germinando o en crecimiento polarizado o hasta 48h si se requieren hifas.
2. Transferir el contenido completo del frasco de cuello inclinado a un tubo Falcon de 15 mL.
3. Centrifugar a 1800 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Resuspender el pellet en 1 mL de PBS y transferir con una micropipeta a un tubo Eppendorf.
5. Centrifugar a 1800 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Resuspender el pellet en 200 µL de Nb3-Cy5 500 µg/mL y calcofluor diluido ½ en PBS e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
7. Añadir 1 mL de PBS y centrifugar a 1800 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Descartar el sobrenadante.
9. Repetir los pasos 7 y 8 cuatro veces más (5 lavados en total).
10. Resuspender el pellet de *Aspergillus* marcado con Nb3-Cy5 en 100 µL de PBS.
11. Transferir 50 µL de la suspensión de *Aspergillus* a un tubo Eppendorf de 0.5 mL
12. Añadir 10 µL de fluoromount y resuspender.
13. Tomar 20 µL de la suspensión de *Aspergillus* con fluoromount y colocar sobre un portaobjetos.
14. Colocar un cubreobjetos sobre la gota y aplicar una leve presión para evitar que se formen burbujas de aire.

#### *Aspergillus fumigatus* (método alternativo)

1. En el caso de que en el cultivo de *Aspergillus* esté muy crecido y se observen estructuras visibles formadas por hifas, no es conveniente centrifugar, ya que éstas tienden a

compactarse. Para ello, con ayuda de una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$ , se “pesca” una de estas estructuras y se transfiere a un tubo Eppendorf con 1 mL de PBS.

2. Agitar con un vórtex durante 10 segundos.
3. Volver a pescar las hifas visibles con ayuda de una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y transferirlas a un tubo Eppendorf con 1 mL de PBS para terminar de eliminar el medio de cultivo.
4. Pescar las hifas visibles con ayuda de una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y transferir a un tubo Eppendorf con 200  $\mu\text{L}$  de Nb3-Cy5 500  $\mu\text{g/mL}$  y calcofluor diluido  $\frac{1}{2}$  en PBS e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Pescar las hifas marcadas con ayuda de una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y transferirlas a un tubo Eppendorf con 1 mL de PBS.
6. Agitar con un vórtex durante 10 segundos.
7. Repetir los pasos cinco y seis 4 veces más (5 lavados en total).
8. Verter una gota de unos 10  $\mu\text{L}$  de fluoromount en la superficie de un portaobjetos.
9. Pescar las hifas de *Aspergillus* marcadas y colocarlas sobre el fluoromount.
10. Colocar un cubreobjetos sobre la gota y aplicar una leve presión para evitar que se formen burbujas de aire.

Una vez se prepararon las muestras, se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM880. Para el caso de *Cryptococcus*, se configuraron tres canales, siendo el primero el del calcofluor, el segundo el del FITC y el último el del Cy5. En el caso del calcofluor, se excitó con el láser de 405 nm usando solamente un 0.5% de su intensidad total, mientras que se recogió toda la luz emitida entre los 410 nm y los 470 nm estableciendo la ganancia del detector en 500. Respecto al canal 2, empleado para detectar el mAb18b7-FITC, se usó el láser de 488 nm para excitar la muestra utilizando un 50% de su intensidad, mientras que se recogió toda la fluorescencia emitida entre 500 nm y 560 nm con una ganancia de 800 en el detector. Por último, en el canal del Nb3-Cy5 se utilizó el láser de 633 nm al 100% para la excitación, recogiéndose toda la fluorescencia emitida entre 650 y 720 nm con una ganancia del detector de 700. El calcofluor, por norma general, es una tinción bastante brillante, por lo que no hace falta usar mucha intensidad del láser. Por otra parte, el FITC y el Cy5 suelen ser menos brillantes, por lo que es

necesario mayor intensidad del láser y mayor ganancia, comparado con el calcofluor, para poder observarlos.

Por otra parte, en el caso de las preparaciones de *A. fumigatus* solo fue necesario usar dos canales, el del calcofluor y el del Nb3-Cy5, con la misma configuración que la empleada en *Cryptococcus*, ya que este organismo no tiene cápsula a la que adherirse el mAb18b7-FITC.

### 3.4. Estudio de la composición de azúcares simples de la pared de *Cryptococcus*.

Dado que las  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasas como *Gel4* o *CnGel* participan activamente en la síntesis y remodelación del  $\beta$ -1,3-glucano, una hipótesis evidente sería que la inhibición de éstas podría inducir cambios en la composición de la pared fúngica. Por norma general, y a diferencia del estudio de otros componentes de una célula, el estudio de los componentes de la pared fúngica es un proceso escasamente explorado y desarrollado, con escasos protocolos y metodologías publicadas disponibles<sup>313-316</sup>.

A modo resumido, las metodologías disponibles se clasifican en función de si primero se separan los diferentes componentes de la pared fúngica, como la quitina, el GMN o los  $\beta$ -glucanos antes de digerirlos a azúcares simples, o si por el contrario se digieren todos los componentes juntos y luego se separan los productos de la digestión<sup>313-316</sup>. Por otra parte, en lo relativo a la digestión también se observan dos variantes, la enzimática y la ácida. Mientras que la ácida se basa en la hidrólisis con ácidos inorgánicos como el sulfúrico o el clorhídrico a altas temperaturas con el objetivo de generar los diferentes monosacáridos libres, la enzimática se basa en el uso de quitinasas y glucosidasas para digerir quitina y  $\beta$ -glucanos y, necesariamente, tienen que estar separados dichos componentes ya que los mananos se han de hidrolizar con ácido.

Los protocolos en los que primero se separan los componentes de la pared fúngica se basan en la diferente solubilidad de éstos en soluciones alcalinas y ácidas. Primero, es necesario romper mecánicamente las células fúngicas, ya sea con un *bead-beater* o con dispositivos de microfluídica capaces de ejercer altas presiones que rompan la pared celular. Una vez se han separado físicamente todos los componentes, se procede a separarlos por centrifugación en función de si son insolubles en agua, en álcali o en sales ácidas para, posteriormente, hidrolizar las diferentes fracciones obtenidas con ácido o enzimáticamente<sup>313-316</sup>. Por otra parte, los protocolos donde primero se digiere se caracterizan por ser bastante más simples. En ellos, se puede inducir, o no, una ruptura más suave de las células, ya sea por agitación con *glass beads*

en un vórtex o incluso por tratamiento con desestabilizadores de membranas fúngicas como el dodecilsulfóxido (SDS) o el Tween-20, con el objetivo de obtener paredes celulares lo más intactas posibles y, sobre todo, precipitables por centrifugación. De esta manera, una vez se han obtenido los fragmentos de pared fúngica, se sedimentan por centrifugación y se digieren con ácido sulfúrico más o menos concentrado y en temperaturas de entre 70-100°C. Como cabe esperar, a mayor temperatura y mayor concentración de ácido, menor es el tiempo que se requiere en la digestión, aunque usar concentraciones de ácido altas o tiempos de contacto largos entre el ácido y los polisacáridos de la pared fúngica pueden inducir la aparición de oxidaciones indeseadas en los azúcares que componen la muestra.

Lo que sí es similar en todas las metodologías que aparecen en la literatura científica, es la forma de separación y detección de los monosacáridos totales, la cual se hace mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés: *High Performance Liquid Chromatography*). Aunque en el caso de hidrólisis ácidas es necesario eliminar o neutralizar el excedente de ácido que contiene la solución de monosacáridos con soluciones alcalinas, las fracciones resultantes de los otros métodos se pueden pasar directamente por un HPLC. Las técnicas de HPLC se basan en hacer circular una solución compleja, en este caso de los diferentes monosacáridos que hemos extraído, junto con una fase móvil de composición constante o variable, a través de un cartucho o columna con una matriz concreta donde los diferentes componentes de la muestra compleja interactúan de manera diferente con la matriz, quedando retenidos más o menos tiempo en el interior de esa columna y, en última instancia, separándose. Aunque existen múltiples tipos de columnas para las diferentes sustancias que se pueden separar mediante HPLC, las que se usan para separar azúcares simples suelen ser de intercambio catiónico con una matriz basada en una resina de estireno y divinilbenceno.

En este trabajo, se utilizó la columna SHODEX SH1011 (Showa Denko, Tokio, Japón) de intercambio catiónico y específica para separar monosacáridos en un HPLC Jasco (Japan Spectroscopic Company, Tokio, Japón). Como detector, se usó un módulo Jasco RI2031 Plus (Japan Spectroscopic Company, Tokio, Japón) de índice de refracción, usado habitualmente en la detección de azúcares en disolución. Como fase móvil, se usó  $H_2SO_4$  5mM bombeado con un caudal de 0.8 mL/min. Dicha fase móvil, se usó también para equilibrar la columna SH1011 previo a cualquier análisis, circulando el mismo caudal durante 90 minutos, con una temperatura constante en la columna de 50°C.

En lo referente a la extracción, pese a que se probaron los diferentes protocolos en los que se fraccionaba la extracción o los que se basaban en hidrólisis enzimática, por reducción de tiempos

y mayor calidad de la muestra antes de introducirla en el HPLC, se decidió usar la hidrólisis ácida. Principalmente, los otros protocolos diluían mucho la muestra, por lo que, si se están manejando pequeñas cantidades de células, la concentración final de monosacáridos en la muestra también queda muy diluida y, por tanto, la señal que se genera en el detector de índice de refracción es muy débil. El protocolo de hidrólisis ácida, donde la concentración final de monosacáridos en la muestra es alta sin necesidad de introducir pasos para aumentar la concentración, queda de la siguiente manera:

#### Protocolo hidrólisis ácida

1. Sembrar *Cryptococcus* en una placa de agar Sabouraud con cloranfenicol y cultivar a 30°C durante 7 días. El uso de células de cultivo “viejo” posibilita que dichas células ya hayan agotado el medio y no se encuentren en fase de crecimiento exponencial. Como se ha mencionado en secciones anteriores, cuando *Cryptococcus* crece en un medio rico prácticamente no se induce la síntesis de cápsula, por lo que agotar el medio es una manera de que induzca la síntesis de cápsula sin llegar a ser sobredimensionada.
2. Arrastrar con ayuda de un asa estéril las células de *Cryptococcus* y preparar 10 mL de una suspensión 1McF, como se ha explicado en secciones anteriores.
3. Añadir 1 mL de RPMI 4x, 1 mL de PBS y, o 1 mL de Nb3 a 512 µg/mL o 1 mL de PBS en función de si se trata de tubos con tratamiento o control, respectivamente, en tubos Falcon de 15 mL.
4. Añadir 1 mL de inóculo a cada uno de los tubos para conseguir un volumen final de 4 mL con RPMI 1640 y Nb3 a una concentración final 1x.
5. Vortear los tubos para disolver algo de aire en el medio (oxigenar).
6. Incubar los tubos Falcon a 30°C durante 3, 6, 24 o 48h en agitación y con los tapones semiabiertos.
7. Centrifugar los sobrenadantes a 1800 g durante 10 minutos, descartarlos y congelar los pellets hasta su uso.
8. Resuspender los pellets en 10 mL de agua y centrifugar 10 min a 1800 g descartando el sobrenadante al finalizar.
9. Repetir el paso 8 dos veces más.

10. Resuspender en 0.5 mL de agua, transferir todo el contenido a un tubo Eppendorf nuevo y añadir *glass beads*.
11. Vortear durante 30s y trasvasar la suspensión de células fracturadas a un segundo tubo Eppendorf nuevo pesado previamente.
12. Lavar el tubo que contiene las *glass beads* con 0.5 mL de agua y trasvasar el agua de lavado al tubo que había sido pesado previamente y que contiene la suspensión de fragmentos de células.
13. Repetir el paso 12 una vez más.
14. Centrifugar 10 min a 14000 *g* los tubos Eppendorf que contienen la suspensión de fragmentos de pared y descartar el sobrenadante.
15. Secar el pellet en corriente de nitrógeno y pesar el tubo Eppendorf.
16. Resuspender en 200  $\mu$ L de agua y transferir 50  $\mu$ L a un Eppendorf nuevo.
17. Añadir 12  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  y 38  $\mu$ L de agua y calentar durante 1 hora a 95°C.
18. Dejar que se enfríe y añadir 400  $\mu$ L de una disolución de  $Ba(OH)_2$  saturada. Se formará un precipitado blanco de  $BaSO_4$  muy insoluble en agua, consiguiendo eliminar el exceso de ácido y de iones de la disolución.
19. Centrifugar 1 min a 14000 *g* y descartar el precipitado blanco.
20. El sobrenadante obtenido contiene una disolución concentrada de monosacáridos provenientes de la pared que se podrá introducir en el HPLC para lograr la separación individual de éstos.

### 3.5. Modelo de aspergilosis y criptococosis en nemátodos

*Caenorhabditis elegans* es un nemálogo de pequeño tamaño distribuido prácticamente por todo el mundo y que se ha usado durante más de 50 años como modelo animal en el estudio de toda índole como enfermedades, toxicidades asociadas a fármacos, de desarrollo, etc<sup>317</sup>. Las larvas de *C. elegans* tienen alrededor de 0.25 mm de tamaño, mientras que los individuos adultos pueden llegar a alcanzar hasta 1 mm de longitud<sup>318</sup>. Su pequeño tamaño, junto con su fácil manejo y la rapidez con la que se producen diferentes generaciones lo ha convertido en uno de los principales organismos modelo para diversos estudios. Además, su manejo no

requiere de equipos o materiales complejos, puesto que con un incubador y una lupa o un estereomicroscopio se puede hacer toda la cría y el manejo básico de estos animales<sup>318,319</sup>.

El medio de cultivo sólido más utilizado para la cría y propagación de *C. elegans* es el NGM (medio de crecimiento de nemátodos, del inglés: *Nematode Growth Medium*). El medio NGM básicamente se compone de peptona y sales de sodio, potasio, calcio y magnesio y es necesario suplementarlo con colesterol, ya que *C. elegans* es auxótrofo para este nutriente por lo que lo necesita para su crecimiento normal<sup>320</sup>. Junto al colesterol, la fuente de nutrientes que se emplea en la cría de *C. elegans* son bacterias. En laboratorio, se cultiva *E. coli* en medio líquido y posteriormente se añade sobre las placas de agar NGM que contienen los nemátodos formando una capa sobre la superficie. Cuando *C. elegans* agota los nutrientes, es capaz de sobrevivir hasta seis meses a 15°C utilizando solo su metabolismo lipídico para subsistir, por lo que esta es una buena manera de almacenar un stock de gusanos para experimentos sucesivos.

El ciclo sexual de *C. elegans*, que va desde que eclosiona el huevo que contiene el gusano hasta que se convierte en adulto, dura entre 3 y 5 días cuando es cultivado a 25°C, mientras que si se cultiva a 15°C su velocidad de crecimiento se reduce a la mitad. Los huevos son puestos por los individuos hermafroditas, es decir, los que contienen células sexuales masculinas y femeninas, que representan entre el 99% y el 99.8% de todos los individuos de un cultivo; mientras que entre el 0.2% y el 1% de los individuos son machos. Cuando los individuos hermafroditas se autofecundan, son capaces de generar hasta 300 huevos fértiles durante toda su edad fértil y, sin embargo, si se aparean con un macho, pueden generar hasta 1000 huevos fértiles<sup>318</sup>. Una vez eclosionan los huevos, las larvas generadas pasan por cuatro estados larvarios (L1-L4) hasta que se diferencian sexualmente en el último estado larvario y son sexualmente activos en la fase adulta.

Por otra parte, es cierto que, en modelos de enfermedades, la patobiología y el desarrollo de éstas o de los agentes que las causan pueden ser muy diferentes en comparación con el ser humano. Por ejemplo, en el caso del modelo de aspergilosis en *C. elegans*, la infección es principalmente gastrointestinal, ya que la forma de entrada del hongo al nemátodo es por vía oral<sup>321</sup>; mientras que en humanos se dé infección intestinal es bastante raro. Sin embargo, aunque los modelos de animales superiores, como los mamíferos, pueden ser mucho más fieles a lo que ocurre en el ser humano, los modelos de nemátodos aportan la posibilidad de poder experimentar ciertas variables, como la toxicidad asociada un fármaco o su efectividad, con un número alto de animales antes de trasladar los ensayos a modelos de animales superiores. De esta manera se pueden descartar fármacos si tienen mucha toxicidad o poca efectividad antes

de comprometer la vida y aplicar sufrimiento inútil a animales superiores en otros modelos de enfermedad.

En los últimos años han empezado a aparecer trabajos en los que se prueban toxicidades y eficacias de fármacos en modelos de enfermedades fúngicas en *C. elegans*, como es el caso de las generadas por *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*<sup>321-324</sup>. Aunque presentan ciertas diferencias entre ellos, fundamentalmente se caracterizan por facilitar la ingesta de células de levadura o esporas al cultivar conjuntamente el hongo y el nemátodo. En el caso de *Candida* y *Cryptococcus*, se suele sembrar un césped con células de estas levaduras en una placa de agar y se deja que los nemátodos se desplacen un tiempo corto sobre la superficie de la placa, ingiriendo levaduras mientras tanto, de forma similar a como se hace en modelos de infección causados por bacterias. Por tanto, la cantidad de hongo inoculado dependerá del tiempo de contacto de los nemátodos con las levaduras de la superficie de la placa de agar<sup>324</sup>. Sin embargo, en el caso del modelo de *Aspergillosis*, las conidias se depositan en un punto concreto de la placa de Petri, hacia los bordes, dejando el resto de la superficie sin nada de hongo y se cocultivan unas 12h. En esas 12h, al menos el 80% de los nemátodos habrán pasado por ese punto de la placa, ingiriendo conidias de *Aspergillus*, aunque aún no mostrarán signos de infección<sup>321</sup>. Puesto que, cuando germinan las conidias de *Aspergillus* se generan células con morfología de hifas, dispersar las conidias por la placa de cultivo induciría la germinación de éstas, lo que supondría una rápida formación de micelio por toda la placa que atraparía a los nemátodos allí contenidos.

Habitualmente, muchos ensayos de toxicidad y eficacia de fármacos se han elaborado con *C. elegans* N2, que es una de las cepas más extensamente utilizadas en el mundo. Sin embargo, las cepas *wild-type* (WT) de *C. elegans* son, por lo general, muy resistentes a las infecciones fúngicas. Además, el mayor tamaño de una célula de levadura o de una conidia en comparación con una bacteria imposibilita que las larvas de *C. elegans* puedan ingerir las células del hongo y, por tanto, que estas larvas no se infecten, arruinando el experimento. Es por ello que los modelos de infecciones fúngicas se suelen diseñar con *C. elegans* AU37 (*glp-4; sek-1*), que es una cepa mutante que, por un lado, es incapaz de generar progenie a más de 25°C (*glp-4*); mientras que, por otro, posee una elevada sensibilidad a múltiples patógenos al carecer del gen *sek-1*, que es una MAP (proteína activada por mitógenos, del inglés: *Mitogen-Activated Protein*) quinasa implicada en la defensa frente a patógenos.

Junto a las ventajas que presentan los modelos de nemátodos se encuentra también la posibilidad de disponer de múltiples cepas y mutantes de *C. elegans* que se pueden obtener

fácilmente del *Caenorhabditis Genetics Centre* (CGC) en la Universidad de Minnesota. De hecho, tanto la cepa AU37 de *C. elegans* como *E. coli* OP50 que han sido usadas en este trabajo fueron adquiridas allí.

### 3.5.1. Manejo y cultivo básico de *C. elegans*.

Cuando se adquirieron las diferentes cepas de *C. elegans* en el CGC, los nemátodos se envían vivos creciendo en placas con agar NGM, ya que, como se ha mencionado antes, son capaces de sobrevivir en condiciones de privación de alimento durante varios meses, lo que los hace idóneos para transportarlos a largas distancias sin necesidad de condiciones especiales en su transporte. Nada más recibirlos, se procedió a trasvasarlos a placas de cultivo NGM (US Biological Life Sciences, Swampscott, Massachusetts) suplementado con 5 µg/mL de colesterol, 50 µg/mL de kanamicina y 100 µg/mL de estreptomicina. Para ello, se suspendieron los gusanos de la placa en buffer M9 (3 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/L de NaCl y MgSO<sub>4</sub> 1 mM) vertiendo 5 mL de éste directamente sobre la placa. Con ayuda de una micropipeta de 1 mL con una punta abocardada, para no dañar los gusanos al aspirarlos, se trasvasó el buffer M9 con los nemátodos en suspensión a un tubo Falcon de 15 mL.

Cuando se agota el alimento, como puede ocurrir durante el transporte de *C. elegans* hacia el laboratorio de destino, estos nemátodos son capaces de salirse de su ciclo vital normal desde los estados larvarios 1 y 2 hacia un estado denominado dauer en el cual sintetizan una hormona característica denominada dauerina cuya presencia induce a otros individuos la salida del ciclo vital normal. Los nemátodos en estado *dauer* son capaces de aguantar durante meses en condiciones adversas, como pueden ser temperaturas extremas o inanición, y cuando son transferidos a una placa nueva con alimento bacteriano, abandonan dicho estado para volver al ciclo vital normal, pasando al estado larvario L4. Dado que, probablemente, en esa placa donde se transportaron los nemátodos se habría producido dicha hormona, es conveniente lavar los nemátodos 2 o 3 veces para eliminar dicha hormona y posibilitar una correcta y rápida propagación de *C. elegans*. Para ello, se procedió a centrifugar el tubo Falcon a 400 g durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Subsecuentemente, se llenó el tubo Falcon con el pellet de nemátodos con 10 mL de M9 y se volvió a centrifugar, repitiéndose este proceso de lavado hasta 3 veces.

Una vez se hubo eliminado la presencia de dauerina, se resuspendieron los nemátodos en 5 mL de buffer M9 y se vertió 1 mL de la suspensión de *C. elegans* en 5 placas de Petri de 150 mm con agar NGM sobre las que se había añadido 5 mL de cultivo de *E. coli* OP50, que fueron sembradas

en medio LB (Luria Bertani) el día anterior y cultivadas en agitación a 37°C. Dado que 6 mL de líquido en la placa de Petri no se absorbe rápidamente, es conveniente dejar las placas abiertas en el interior de una campana microbiológica para que la corriente de aire las seque y, una vez secas, se incubaron durante, al menos, 7 días a 20°C. Aunque los nemátodos recién sembrados salgan del estado dauer y empiecen a poner huevos en 2 o 3 días, es conveniente que esa nueva generación llegue a la edad reproductiva (3-5 días más) para poder obtener un buen número de individuos que, por un lado, podrán dirigirse para seguir propagándose o, por otro lado, podrán ser utilizados para los ensayos de muerte o eficacia del Nb3 como terapia antifúngica.

### 3.5.2. Sincronización.

Debido a que en una placa de cultivo hay individuos en todos los estados de desarrollo, es necesario sincronizarlos, es decir, lograr que todos los individuos que tengamos estén en el mismo estado de desarrollo antes de poder usarlos en los modelos de enfermedad. La sincronización de *C. elegans* es un proceso químico mediante el cual se matan todos los individuos vivos a excepción de los embriones contenidos en los huevos<sup>325,326</sup>. Aunque se parte de placas con un gran número de individuos, el rendimiento en la obtención de nemátodos sincronizados puede ser muy variable<sup>325</sup>, por lo que es necesario partir de, al menos, tres placas de Petri grandes crecidas durante, al menos, una semana.

Por tanto, se procedió a extraer todos los individuos vivos, junto con los huevos que pudiera haber puestos en las tres placas de agar NGM grandes, lavándolas con 5 mL de buffer M9 que, posteriormente, se depositaron en 3 tubos Falcon. Además, se vertieron otros 5 mL de buffer M9 sobre las placas ya lavadas para despegar el mayor número de huevos pegados a la superficie de la placa y se trasvasaron a sus respectivos tubos Falcon de 15 mL, que contendrán, en total, unos 10 mL de suspensión de nemátodos. Dichas suspensiones, se centrifugaron 5 min a 400 g y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se procedió a resuspender el pellet de nemátodos en 2 mL de buffer M9 sobre el que se añadieron 2 mL de solución “blanqueante”, que está compuesta de NaOH 0.5 M y NaClO 2% y que tras mezclarse con el M9 su concentración será la mitad. Esta solución de sosa y lejía destruirá, más o menos rápido, la cutícula de las larvas y los gusanos adultos, dispersando todas las células del nemátodo por el medio. Los individuos en estado larvario se desintegran rápidamente, pero, sin embargo, los individuos adultos grávidos (los que contienen embriones en su interior) comenzarán a expulsar a través de la vagina, el ano u otros poros que se hayan podido abrir en su cutícula, todos los huevos que

contienen en su interior y son los que posteriormente eclosionarán a la vez generando individuos de la misma edad (sincronizados).

Desafortunadamente, la velocidad a la que se produce el proceso de degradación de la cutícula y expulsión de los huevos al exterior depende de múltiples factores difíciles de controlar en muchas ocasiones. Fundamentalmente, la masa de gusanos obtenida e, indirectamente, la cantidad de cutícula a degradar, junto con la concentración de sosa cáustica y lejía, el tiempo de contacto o la agitación afectan enormemente al rendimiento final de la sincronización, suponiendo, por supuesto, que la mayoría de ellos sean grávidos. Por tanto, una vez que se añadió la solución “blanqueante”, se agitó durante 10s en un vórtex y rápidamente se tomó una pequeña alícuota de 20  $\mu$ L que se depositó en un pocillo de una placa de 96 y se observó visualmente lo que sucedía en un estereomicroscopio. Si los nemátodos todavía se mueven, probablemente se necesiten más ciclos de agitación de 10 s en un vórtex hasta que se aprecie como los gusanos estallan, literalmente, expulsando los huevos y sus órganos internos al exterior. Cuando eso pasa, es el momento indicado para parar el tratamiento con lejía y sosa. Por el contrario, si tras tres agitados eso todavía no sucede, puede ser necesario añadir 1 mL extra de solución “blanqueante”.

Como se menciona antes, una vez se produjo la expulsión de los huevos, se procedió a parar la reacción, para lo cual se añadieron 10 mL de buffer M9 y se centrifugó 10 min a 650 g, con el objetivo de precipitar los huevos. Tras esto, se descartó el sobrenadante con ayuda de una pipeta hasta que quedaran en el tubo Falcon aproximadamente 2 mL y, tras lo cual, se volvieron a añadir 10 mL repitiendo el proceso de lavado 3 veces más. Si el proceso de blanqueado se corta demasiado pronto, es muy posible que queden muchos cadáveres sin destruir junto con los huevos obtenidos y, aunque el rendimiento será muy alto, esos cadáveres acompañarán a los huevos en los diferentes ensayos que se realizarán posteriormente. Aunque para ciertos ensayos no sea importante, en los ensayos de muerte dificultarán las consiguientes lecturas, por lo que es conveniente que no estén. Por el contrario, si se produce un blanqueado excesivo, aunque desaparecerán todos los cadáveres, también se reducirá mucho el número de individuos que se obtienen. Por tanto, es buena estrategia partir de un número alto de gusanos grávidos y pasarse un poco con el tiempo de contacto de la solución blanqueante para obtener, aunque sacrificando algo el rendimiento, un buen número de huevos viables sin ningún cadáver que los acompañe.

Una vez se han lavado los huevos extraídos en el Falcón, se elimina el M9 de lavado hasta dejar 2 mL en el fondo del tubo, donde se encuentran los huevos en forma de pellet. Con ayuda de

una micropipeta de 1 mL con la punta abocadada, se resuspendieron en ese mismo volumen y se transfirieron a una placa de agar NGM de 100 mm sin suplementar con un césped de bacterias, tras lo cual se procedió a incubarlas 24h a 25°C. No añadir alimento durante las primeras 24h ayuda a equilibrar todavía más el desarrollo de los nemátodos. Dado que de todos los huevos que se obtienen no todos tienen la misma edad, es factible que algunos se abran tras la sincronización y que otros que aún no habían sido depositados tarden un día extra en hacerlo. Por tanto, no alimentar a esos gusanos más avanzados durante un día ayuda a equilibrar su estado de desarrollo larvario con los embriones que aún no han eclosionado, empezando a alimentarlos cuando la mayoría han eclosionado. Por tanto, las bacterias se añadieron sobre las placas de agar NGM sincronizadas tras 24h de incubación a 25°C. Hay que indicar que, cuando se alimenta a los gusanos de placas sincronizadas, es necesario pasteurizar las *E. coli* OP50 en un termobloque o en un baño termostático a 74°C durante 20 min o matarlas con radiación UV para impedir que se puedan desarrollar en el medio de los ensayos de muerte ya que, aunque se use un organismo auxótrofo para uracilo, siempre puede desarrollarse en esos pocillos con medio líquido e impedir la correcta visualización de los nemátodos. Por tanto, una vez fueron añadidas las bacterias, se cultivó a 25°C durante tres o cuatro días, tiempo necesario para que las larvas alcancen el estado L4. Es conveniente revisar las placas esos días con un estereomicroscopio o con un microscopio de disección para comprobar visualmente cuando están en fase L4 la mayoría de los individuos.

### 3.5.3. Modelo de infección por *Aspergillus* en *C. elegans*.

Las propias placas que contienen los nemátodos sincronizados son el mejor lugar donde realizar la infección por *Aspergillus*. Para ello, se partió de una suspensión de conidias de *A. fumigatus* B5233 1McF, preparadas como se ha descrito previamente, se centrifugó 5 min a 800 g para sedimentar todas las conidias. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y con una micropipeta de 200 µL se tomaron 100 µL de conidias directamente del pellet y se depositaron en forma de 3 gotas gruesas y espesas, con un radio menor a 5 mm, en una zona cercana al borde de la placa y muy próximas entre sí. Esta placa inoculada, se incubó 12h a 25°C, tiempo en el cual la mayoría de los individuos de la placa pasarán en algún momento por encima de ella e ingerirán conidias de *Aspergillus*. La razón de usar larvas en estado L4 y no en estados de desarrollo previo es que, debido a su tamaño, las larvas más jóvenes no pueden ingerir las conidias o, en general, células eucariotas debido a que su tamaño es mayor que el de su orificio bucal<sup>321</sup>.

Tras la infección, se procedió a extraer los nemátodos infectados de la placa de infección procurando no arrastrar las conidias de *Aspergillus* contenidas en la gota. Para ello, fue necesario levantar ligeramente la placa de cultivo, colocando la parte donde estaban depositadas las gotas en la posición más alta, mientras que el borde opuesto ha de estar tocando con la superficie de trabajo y verter 3 mL de medio M9 por toda la superficie de la placa situada inmediatamente por debajo de las gotas de conidias. De esta manera, se recolectaron los nemátodos sin arrastrar esa enorme cantidad de conidias que perjudicarían los ensayos posteriores. Los 3 mL de buffer M9 que contiene los nemátodos infectados se vertieron en un tubo Falcon de 15 mL el cual se completó con buffer M9 hasta los 12 mL y se centrifugó 2 min a 400 g descartando el sobrenadante. De igual manera, los nemátodos infectados se lavaron 4 veces más con medio M9 para eliminar el máximo número de conidias que pudieran haberse quedado pegadas a la cutícula de *C. elegans* al haberse desplazado por encima de las gotas de conidias.

Una vez se terminó el lavado, se procedió a contar los nemátodos para determinar su concentración y, con más buffer M9, ajustarla a unos 200-300 individuos por mililitro con el objetivo de depositar unos 20-25 gusanos por pocillo en los ensayos de muerte, ya que un mayor número puede dificultar su recuento. Es necesario resuspender bien los nemátodos antes de contarlos con un estereomicroscopio o con un microscopio de disección y realizar varias mediciones.

### 3.5.4. Modelo de infección por *Cryptococcus* en *C. elegans*.

Al igual que en el caso anterior la propia placa de cultivo con los nemátodos sincronizados es el mejor lugar donde realizar la infección. Para ello, se vertió en la placa 1 mL de una suspensión 1 McF de *C. deneofomans* 1229817, preparada como se ha descrito previamente; se extendió por toda la superficie para formar un césped; y por último, se dejó la placa abierta en el interior de una campana de seguridad biológica para posibilitar su secado. Tras esto, se cultivó durante 12h a 25°C, tiempo suficiente para ingerir células de *Cryptococcus*.

Trascurrido este tiempo, se suspendieron los nemátodos infectados en 3 mL de buffer M9 que, con ayuda de una pipeta de 1 mL con una punta abocardada, se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL, tras lo cual, se añadió buffer M9 hasta los 12 mL y se centrifugó durante 2min a 400 g, descartando el sobrenadante. El proceso de lavado se repitió 5 veces para posibilitar la eliminación del mayor número de células de *Cryptococcus* que no se encontrase en el interior

de los nemátodos y, al igual que en el modelo de aspergilosis, la concentración de gusanos se ajustó a 200-300 individuos por mililitro.

### 3.5.5. Ensayos de muerte o eficacia antifúngica en *C. elegans*.

Independientemente del microorganismo con el que se infectó *C. elegans* AU37, los ensayos de eficacia del tratamiento con Nb3 y otros fármacos de uso común en el tratamiento de EFIs se llevaron a cabo de manera similar. En estos ensayos se mide, básicamente, el número de individuos vivos respecto a la cantidad inicial y se compara con individuos infectados sin tratamiento. Para ello, partiendo de los nemátodos infectados previamente, se procedió a cultivarlos en placas de 96 pocillos de fondo plano en contacto con el fármaco concreto a ensayar. Dado que se preparó la solución de gusanos infectados a una concentración de 200-300 gusanos/mL, 100  $\mu$ L contendrán, aproximadamente, 20 o 30 gusanos, que es la cantidad idónea para poder contar sin equivocación en el interior de un pocillo. Junto a los gusanos infectados, a cada pocillo se le añadieron 40  $\mu$ L de medio BHI (infusión de cerebro y corazón, del inglés: *Brain Heart Infusion*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), 10  $\mu$ L de buffer M9 y 50  $\mu$ L de disolución del fármaco a estudiar a 4x la concentración final de ensayo, quedando un volumen final de 200  $\mu$ L con el BHI al 20%.

Entre los fármacos ensayados, se titró el Nb3 en concentraciones de entre 0.02 mg/mL y 8 mg/mL para ambos modelos de enfermedad fúngica, mientras que para los fármacos clásicos usados en el tratamiento de EFIs se ensayaron concentraciones con efecto hacia ambos organismos, siendo 4  $\mu$ g/mL para el VCZ, 32  $\mu$ g/mL para la CSF, 32  $\mu$ g/mL para el FCZ y 0.5  $\mu$ g/mL para la AMB. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 25°C para evitar que las larvas y/o adultos jóvenes de *C. elegans* fueran fértiles y generaran descendencia, haciendo variar el número de gusanos en los pocillos y arruinando, en última instancia, el experimento completo. Con ayuda de un estereomicroscopio se contaron los gusanos vivos en cada uno de los pocillos cada 12h durante 48h o 72h. Se ensayaron, al menos, 3 pocillos por cada condición en tres experimentos diferentes, es decir, entre 60 y 90 nemátodos infectados por concentración de fármaco empleada y experimento (entre 180 y 270 en total). Como controles, y en número similar a lo mencionado anteriormente, se usaron nemátodos infectados sin tratar y, por otra parte, nemátodos sincronizados sin infectar, los cuales fueron apartados del resto de los gusanos sincronizados antes de ser infectados para estos experimentos. Junto a estos ensayos y de forma similar, se estudió la toxicidad de estos fármacos en *C. elegans*, usando similares números de

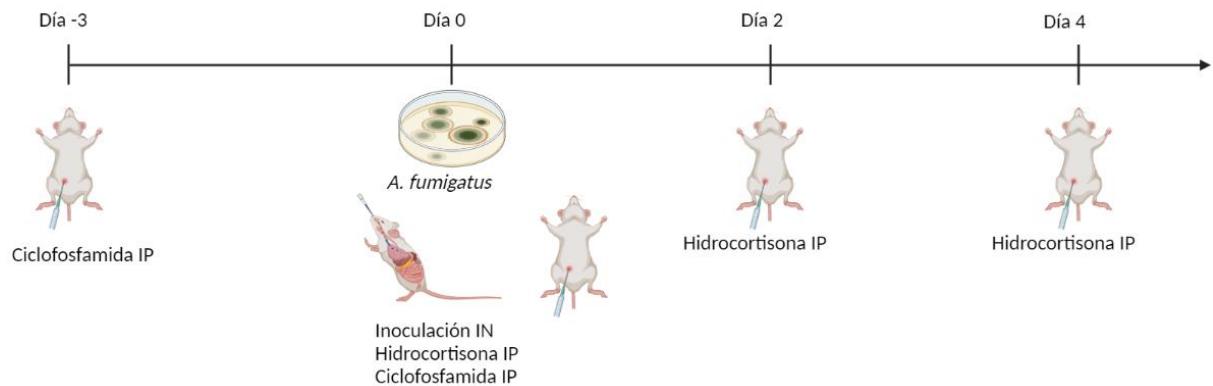
gusanos y concentraciones de fármaco, con la excepción de no haber sido infectados previamente.

### 3.6. Modelos murinos de aspergilosis y criptococosis

Tras demostrar, por un lado, la escasa toxicidad del Nb3 en *C. elegans*, así como su efectividad al retrasar la progresión de ambas enfermedades fúngicas, se decidió probar su eficacia en modelos de animales superiores. A diferencia de *C. elegans*, donde el primer modelo de aspergilosis data de hace menos de 10 años, los modelos murinos de infecciones fúngicas están bien establecidos en la literatura. No obstante, muchas veces puede ser necesaria una puesta a punto previa ya que, como se detalla en la introducción, la patogenicidad de diferentes cepas de una misma especie fúngica puede variar, por lo que puede ser necesaria diferente cantidad de inóculo o de fármaco inmunosupresor.

#### 3.6.1. Modelo murino de aspergilosis

De acuerdo a la literatura<sup>327,328</sup>, los ratones que se emplearon, entre las distintas opciones posibles, fueron hembras BALB/c (Janvier-Labs, Lyon, Francia) de unas 6-8 semanas y, al menos, 20 gramos de peso. Tras recibirlas en el animalario y tenerlos 3 o 4 días acostumbrándose al nuevo entorno, se procedió a administrarles el tratamiento inmunosupresor previo al procedimiento de infección. Dicho tratamiento, constaba de una inyección IP de ciclofosfamida a razón de 150 mg/Kg 3 días antes de la infección y otra el mismo día de la infección. Además, ese mismo día cero (el de la infección), también se les administró por vía intraperitoneal (IP) 200 mg/Kg de hidrocortisona, la cual se repitió los días 2 y 4 tras la infección con el fin de mantener el estado inmunocomprometido del ratón durante la infección. Aunque, por defecto, este fue el tratamiento inmunosupresor elegido para todos los experimentos llevados a cabo con este modelo de aspergilosis en este estudio, previamente se ensayó una pauta de inmunosupresión diferente, basada únicamente en la administración de hidrocortisona por vía IP los días -3, 0 y cada dos días durante dos semanas tras la infección.



**Figura 11:** pauta de inmunosupresión e infección administrada sobre el modelo de aspergilosis.

Respecto al inóculo, se partió de una solución 1 McF de conidias de *A. fumigatus* B5233 preparada como se ha descrito en secciones anteriores, con la salvedad de que es necesario retirar el Tween-20 que haya sido utilizado para suspender las conidias de *Aspergillus*, ya que es tóxico para los ratones. Por tanto, esa suspensión 1 McF se centrifugó a 800 g durante 5 min para sedimentar las esporas y poder descartar el sobrenadante, que contiene la mayoría del Tween-20, y se repitió este lavado dos veces más. Puesto que, aproximadamente, 1 mL de suspensión de conidias de *A. fumigatus* se corresponde a  $10^7$  CFU/mL, se procedió a resuspender las conidias con el PBS necesario para obtener  $5 \cdot 10^7$  CFU/mL ya que, a los ratones se les administrarán 20  $\mu$ L de esa suspensión concentrada que contiene  $10^6$  CFU de *Aspergillus*.

Antes de inocular las  $10^6$  conidias de *Aspergillus* en 20  $\mu$ L, fue necesario anestesiar a los ratones. Normalmente, para cualquier otro procedimiento se suele anestesiar a los ratones por completo con isoflurano (BBrown, Melsungen, Alemania) inhalado en una cámara de anestesia. Sin embargo, para la administración IN de sustancias, es necesario que los ratones no estén profundamente dormidos ya que, tanto la frecuencia respiratoria como el volumen de aire inhalado en cada respiración decaen enormemente. Más detalladamente, cuando se abre el flujo de isoflurano y oxígeno en una cámara de anestesia con ratones, estos tardan alrededor de un minuto en caer al suelo y dejar de tener reflejos en extremidades o cola, pero aún tienen frecuencias respiratorias altas, por lo que es necesario que el ratón no lleve mucho tiempo anestesiado para aprovecharlo. Una vez se anestesió el ratón, se extrajo con cuidado de la cámara de anestesia con la mano izquierda y se puso boca arriba presionando ligeramente con el dedo pulgar la mandíbula, forzando mantener la boca del ratón cerrada para evitar que este tenga el reflejo de tragar. Una vez se encontró el ratón dispuesto de dicha manera, con ayuda de una micropipeta se depositaron, aproximadamente, unos 10  $\mu$ L de inóculo sobre uno de los orificios nasales y se esperó hasta que esta gotita fue inhalada por el ratón. Tras esto, se

añadieron los otros 10  $\mu\text{L}$  restantes en la otra fosa nasal y, tras su inhalación, se depositó el ratón infectado en su jaula en posición lateral hasta que despertase de la anestesia.

### 3.6.1.1. Ensayo de eficacia del Nb3 como tratamiento de la aspergilosis invasiva en ratones BALB/c

Un total de 60 ratones BALB/c infectados con *A. fumigatus* B5233 y tratados con hidrocortisona y ciclofosfamida como se describe arriba fueron separados en dos grupos de 36 ratones en función de la forma de administración del tratamiento a la que fueron sometidos. Por un lado, los primeros 36 ratones fueron tratados intraperitonealmente durante todos los días durante una semana, siendo la primera dosis de tratamiento al día siguiente de la infección. De esos 36 ratones tratados intraperitonealmente, 18 ratones recibieron PBS, mientras que los otros 18 restantes recibieron Nb3 a razón de 80 mg/Kg. De esos 36 ratones, se monitorizó la supervivencia de 6 ratones tratados con PBS y otros 6 tratados con Nb3, mientras que los otros 24 restantes se sacrificaron 4 días después de la extracción y se biopsiaron sus pulmones para posteriores análisis.

Por otra parte, el segundo grupo de 24 ratones recibió tratamiento IN con una pauta de administración semejante al grupo IP, es decir, recibieron tratamiento una vez al día durante una semana con la salvedad de que la dosis empleada de Nb3 fue de 20 mg/Kg debido a que no es conveniente introducir mucho volumen de líquido en las vías respiratorias para no ahogarlos. De igual manera que en el caso anterior, 12 ratones recibieron 20  $\mu\text{L}$  de vehículo (PBS), mientras que los otros doce recibieron en similar volumen 20 mg/Kg de Nb3, siendo necesario anestesiarlos con isoflurano. Un total de 12 ratones (6 de cada tratamiento) fueron empleados en los ensayos de supervivencia que se prolongaron durante 15 días y los otros doce restantes fueron sacrificados el cuarto día tras la infección y sus pulmones fueron extraídos para análisis posteriores.

A lo largo de todos estos experimentos, los sacrificios se llevaron a cabo sustituyendo la atmósfera del interior de una jaula o de una cámara de sacrificio por  $\text{CO}_2$  durante unos minutos. Después de haberse cerciorado que los animales estaban muertos y no mostraban ningún reflejo en patas, cola o caja torácica, se extrajeron de la cámara y se depositaron sobre dos paños quirúrgicos superpuestos y se les aplicó por todo el cuerpo una solución de etanol al 70%. El embadurnado con etanol, aparte de desinfectar la superficie del ratón, permite extraer más eficazmente el pelo y la piel del ratón y, sobre todo, reduce muchísimo el número de pelos que pueden acabar contaminando las biopsias que realicemos.

Con ayuda de la mano izquierda, se levantó un pellejo de piel en el pecho a la altura del esternón del ratón y se realizó un corte con una tijera. A continuación, se estiró con firmeza la piel del ratón situando ambas manos a cada uno de los lados del corte realizados previamente. De esta manera, se logra despellejar el ratón, dejando más accesibles los órganos a extraer. De nuevo, con una tijera se hizo un corte en el esternón y, a continuación, un corte perpendicular a las costillas que delimitan la caja torácica, abriéndola y haciendo accesibles los pulmones del individuo. Tras esto, con unas pinzas se recogieron los pulmones habiéndolos separado previamente de la tráquea.

### 3.6.1.2. Ensayo de eficacia del Nb3 administrado profilácticamente en ratones BALB/c con aspergilosis invasiva.

Un total de 64 ratones BALB/c fueron tratados con ciclofosfamida e hidrocortisona e infectados con *A. fumigatus* B5233 de la forma explicada arriba. De esos ratones, se hicieron dos grupos, uno de 24 ratones que recibió el tratamiento por vía IN, mientras que los otros 40 recibieron tratamiento IP y, en ambos casos, se comenzó a administrar el tratamiento el mismo día que se llevó a cabo la infección. El grupo del tratamiento IN se dividió en 2 subgrupos de 12 ratones en función de si se les administraba vehículo o Nb3 20 mg/Kg. Sin embargo, el grupo de administración IP se dividió en tres subgrupos a razón de 16 ratones tratados con vehículo, 12 ratones tratados con Nb3 40 mg/Kg y 12 ratones tratados con Nb3 a 80 mg/Kg.

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, a todos los ratones se les comenzó a aplicar el tratamiento en el mismo momento que se les inoculó *A. fumigatus*, el cual se repitió una vez al día durante 7 días. En este experimento, se monitorizó la supervivencia de los 64 ratones durante 12 días.

### 3.6.1.3. Carga fúngica en homogenizados de pulmón.

Además de ensayar la supervivencia, también fue necesario comprobar si la respuesta debida al tratamiento se correlacionaba con la carga fúngica en pulmón, es decir, si venía acompañada por una menor carga fúngica. Habitualmente, estos ensayos se suelen hacer a partir de diluciones seriadas de homogenizados de la biopsia, las cuales se siembran en placas de Petri con un medio concreto y se cuentan las CFU que han crecido en las placas. Sin embargo, esta técnica no es muy útil en el caso de hongos filamentosos, ya que sus células (hifas) crecen unidas longitudinalmente unas a otras, por lo que es complicado poder separarlas en células individuales para poder contar las colonias posteriormente. En estos casos, es habitual apoyarse

en otro tipo de técnicas cuantitativas, como es el caso de la PCR en tiempo real, técnica con la que se pueden cuantificar el número de copias de un fragmento de DNA presente en una muestra. Más detalladamente, esta técnica permite detectar cual es el número de ciclos mínimo a partir del cual se produce fluorescencia detectable asociada a la amplificación de ese fragmento de DNA del patógeno concreto en una muestra que, en este caso, fueron biopsias de pulmón. Aunque existen múltiples posibilidades en lo que se refiere a dianas de la PCR, la más usada habitualmente es la secuencia de la subunidad ribosomal 18S o la de la 28S (rDNA 18S y rDNA28S). Al igual que en las PCR convencionales, se usa una pareja de cebadores que delimitan la secuencia a amplificar solo que, en este caso, uno de ellos porta una molécula fluorescente cuya fluorescencia es extinguida por una segunda molécula unida al cebador. Cuando este cebador es consumido por la polimerasa para generar una nueva copia de DNA, la molécula fluorescente y la *quencher* se separan, por lo que se emite fluorescencia que puede ser observada desde el termociclador.

Los pulmones obtenidos de los 12 ratones sacrificados al cuarto día del experimento de eficacia del Nb3 en tratamiento IN fueron homogeneizados en un disociador gentleMACS (Miltenyi biotec, Colonia, Alemania) usando el programa específico para pulmones que lleva de serie. Los pulmones completos biopsiados fueron introducidos en tubos M para gentleMACS junto con 1 mL de PBS para favorecer la homogenización del tejido. Tras esto, se procedió a extraer el DNA de la muestra de acuerdo al protocolo del kit VIASURE Real Time Detection Kit (Certest, Zaragoza, España) con cual se realizó la qPCR.

### 3.6.1.4. Determinación de niveles de gliotoxina y bismetilgliotoxina en biopsias de pulmón.

Uno de los marcadores emergentes más prometedores en la detección de la aspergilosis invasiva es la GT y, sobre todo, su derivado inactivado por tiometilación bismetilgliotoxina (bmGT)<sup>328,329</sup>. *A. fumigatus* es capaz de producir estos metabolitos secundarios pocas horas después de germinar en cultivos *in vitro*<sup>329</sup>, así que se decidió comprobar si también eran detectables en biopsias de pulmón de ratones con aspergilosis.

Partiendo de las biopsias de pulmón de los ratones infectados con *Aspergillus* durante 4 días y tratados a las 24 horas, se procedió a disgregarlos utilizando el homogeneizador gentleMACS habiendo depositado las biopsias junto con 1 mL de PBS en tubos M. Tras disgregarlas, se trasvasó el homogenizado a un frasco de vidrio de 10 mL al cual se le añadieron 6 mL de diclorometano (DCM) (Panreac, Barcelona, España) y se agitó durante 30s en un vórtex. La GT y

la bmGT son poco solubles en agua, pero muy solubles en disolventes orgánicos como el DCM que, a su vez, es muy poco soluble en agua, por lo que al exponer el extracto acuoso que contiene estos metabolitos secundarios en contacto con DCM, éstos acabarán disolviéndose en la parte orgánica, separándolos de la fase acuosa.

Tras el agitado, es conveniente esperar unos minutos para que se separen bien las dos fases (orgánica y acuosa). Entonces, con ayuda de una micropipeta de 1 mL, se tomó la fase orgánica y se trasvasó, con cuidado de no arrastrar la fase acuosa, a otro frasco de vidrio de 10 mL. Subsecuentemente, se procedió a evaporar el DCM en corriente de nitrógeno hasta que todo el DCM se hubo evaporado, dejando un residuo cristalino blanco o amarillento el cual se volvió a disolver en 1 mL de DCM. Con una micropipeta de 1 mL, se trasvasó ese mililitro de DCM a un vial de vidrio de HPLC de 2 mL, el cual se sometió a una nueva corriente de nitrógeno para poder evaporar el diclorometano. El residuo sólido cristalino que apareció se disolvió en 200  $\mu$ L de agua-metanol (Panreac, Barcelona, España) 55-45% y se filtró con un filtro de jeringa para HPLC, depositándose el filtrado en un capilar inserto en un nuevo vial de vidrio de HPLC.

El extracto disuelto en agua-metanol se inyectó en un HPLC Alliance e2695 (Waters, Milford, Massachussets) equipado con una columna de C18 XBridge® de 3.5  $\mu$ m y 4.6  $\times$  100 mm (Waters, Milford, Massachussets). Como fase móvil, se circuló una mezcla de agua-metanol compuesta por un 55% de agua los 10 primeros minutos, un 40% de agua entre el minuto 11 y el 20 y un 55% de agua entre los minutos 20 y 22. La detección de ambas sustancias se llevó a cabo con un módulo UV 2489 (Waters, Milford, Massachussets) equipado en el HPLC a 273 nm, longitud de onda a la cual GT y bmGT tienen su máximo de absorción.

### 3.6.1.5. Estudio comparativo de la eficacia del Nb3 respecto a AMB y VCZ en modelo murino de aspergilosis.

Como se mencionó en la introducción, los tratamientos más utilizados para combatir la aspergilosis invasiva son los azoles, entre los cuales se encuentra el VCZ, y la AMB, que a día de hoy sigue siendo el *gold standard*. Por tanto, se partió de 24 ratones infectados con *A. fumigatus* B5233 e inmunocomprometidos farmacológicamente como se ha detallado al comienzo de esta sección, los cuales se dividieron en tres grupos de seis ratones. El primer grupo recibió vehículo por vía IP. De igual manera, el siguiente grupo recibió Nb3 por vía IP (80 mg/Kg), mientras que los dos últimos grupos recibieron AMB y VCZ también por vía IP a razón de 2 mg/Kg y 20 mg/Kg respectivamente. Se les administró el tratamiento una vez al día 24 horas después de haberles inoculado el patógeno, durante siete días. Se monitorizó su supervivencia durante 12 días.

### 3.6.1.6. Tinciones de hematoxilina eosina en cortes histológicos.

Doce pulmones provenientes de ratones infectados con *A. fumigatus* y tratados intraperitonealmente con vehículo o con Nb3 80 mg/Kg (6 ratones por grupo) fueron introducidos en tubos Falcon de 15 mL con 5 mL de formaldehido al 4% y se incubaron 12h a 4°C. Trascurrido ese tiempo, se procedió a sustituir el formaldehido por etanol al 70%, solvente en el que se almacenaron las biopsias hasta que se realizasen las tinciones de hematoxilina-eosina (HE).

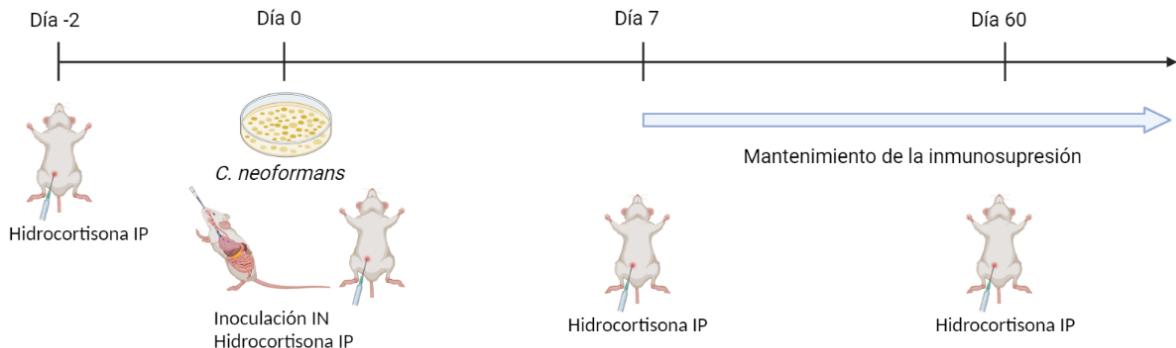
Antes de poder realizar cualquier técnica histoquímica, las diferentes biopsias han de ser incluidas en bloques de parafina, para lo cual es necesario sustituir el agua que compone la mayoría del tejido biopsiado por etanol. Tras deshidratar las muestras, estas se añaden sobre parafina fundida para que vaya penetrando por dentro de ellas y, en última instancia, se deposita la muestra en el interior de un molde con más parafina que se deja solidificar enfriándose. Una vez se han obtenido los bloques de parafina, estos pueden ser cortados en láminas muy finas con un microtomo. Dichos cortes, se expusieron a hematoxilina, que es un colorante básico que tiñe los núcleos de las células del corte de morado y, a continuación, a eosina. La eosina, por el contrario, es un colorante ácido que marca los citoplasmas celulares del corte histológico en rosa, lo cual permite diferenciar ciertas estructuras del corte histológico.

Una vez se obtuvieron los cortes, realizados por el servicio de anatomía patológica del CIBA, se procedió a observarlos en un microscopio invertido Widefield Olympus IX81 en campo claro.

### 3.7.1. Modelo murino de criptococosis.

Al igual que en *Aspergillus*, la cepa de ratón elegida fue la BALB/c ya que, en este caso, es una de las cepas que más invasividad sufre en infecciones de *Cryptococcus*<sup>282</sup>. Dado que en este modelo se quiso emular el comportamiento que tiene *Cryptococcus* en individuos humanos inmunocomprometidos, se decidió aplicar a todos los ratones un tratamiento con hidrocortisona con el fin de modificar el estado inmunológico del ratón, haciéndole más susceptible a *Cryptococcus*. Por tanto, se administró hidrocortisona intraperitonealmente a razón de 200 mg/Kg a hembras BALB/c de Janvier de unas 6-8 semanas y unos 20g de peso. La primera dosis de hidrocortisona se inyectó dos días antes de infectarlas, de igual manera que cualquier otra inyección IP, es decir, inmovilizando al ratón con la mano izquierda e introduciendo la aguja en uno de los dos laterales del vientre con un ángulo de unos 30° respecto a la superficie del vientre del ratón, asegurando que esta atraviesa el peritoneo al introducirse

en el ratón. Además de administrar la hidrocortisona dos días antes de la infección, también se aplicaron dosis el mismo día de la infección y, tras ésta, una vez a la semana durante los 65 días que duraron los experimentos con el objetivo de mantener un estado inmunodeprimido en el ratón.



**Figura 12:** pauta de inmunosupresión e infección del modelo de criptococosis.

Respecto al inóculo, se decidió emplear  $2.5 \cdot 10^7$  CFU de *C. deneoformans* 1229817 contenidos en 20  $\mu\text{L}$  de PBS. Para ello, se partió de una suspensión de *C. deneoformans* 1 McF preparada como se ha descrito en secciones anteriores. Al igual que en el otro modelo murino, es necesario retirar el Tween-20 que se ha usado para suspender las conidias antes de poder inyectar *Cryptococcus* a los ratones. Por tanto, se procedió a centrifugar las células de *Cryptococcus* a 800 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Dado que todavía podían quedar restos de Tween-20, se volvió a añadir PBS hasta completar el volumen del tubo y se centrifugó a 800 g durante 5 min, repitiéndose este lavado dos veces más. Tras descartar el último sobrenadante, se añadió PBS hasta conseguir una concentración de  $1.25 \cdot 10^9$  sabiendo que 1 mL 1 McF de la solución original contiene  $1 \cdot 10^7$  CFU de *C. deneoformans* 1229817. Subsecuentemente, con ayuda de una micropipeta se depositaron dos gotas, una por fosa, de 10  $\mu\text{L}$  de esa suspensión de *Cryptococcus* concentrada en los orificios nasales de un ratón previamente anestesiado. Dado que la forma de inocular el patógeno fue IN, fue necesario anestesiar a los ratones en una cámara de anestesia donde se introdujo isoflurano vaporizado con oxígeno sin demorarse mucho ya que, como se ha mencionado en la sección anterior, la frecuencia respiratoria de los ratones decrece según aumenta el tiempo que están en contacto con la anestesia.

**3.7.1.1. Ensayo de eficacia del Nb3 como tratamiento de la CI en ratones BALB/c**  
 Un total de 108 ratones hembras BALB/c infectados con *C. deneoformans* 1229817 de la forma mencionada anteriormente, fueron divididos en dos grupos de 48 y 60 ratones,

respectivamente. Trascurridas 24h desde la infección, el grupo de 60 ratones comenzó a recibir tratamiento IP, mientras que el grupo de 48 ratones lo hizo de forma IN. Independientemente de la vía de administración usada, cada uno de los ratones recibió tratamiento desde el día siguiente de la infección, 3 veces por semana durante 65 días o, en su caso, lo que durase el experimento.

El grupo de 60 ratones tratados intraperitonealmente volvió a ser dividido en 4 subgrupos a razón de la sustancia que recibieron, siendo estas: vehículo o PBS (18 ratones), Nb3 20 mg/Kg (18 ratones), Nb2 20 mg/Kg (12 ratones), y NbSseK1 20 mg/Kg (12 ratones). De cada uno de los 4 subgrupos, se tomaron seis ratones y se monitorizó su supervivencia durante 65 días administrándoles sus respectivos tratamientos con la frecuencia indicada arriba. Los otros 36 ratones fueron sacrificados tras 14 días de infección y sus cerebros y pulmones fueron extraídos para diferentes experimentos posteriores.

En el caso de los pulmones, estos se biopsiaron de igual manera que se explicó en el modelo de aspergilosis. Sin embargo, *C. neoformans* es capaz de infectar el SNC, ya que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica por varios mecanismos descritos en la introducción. Por tanto, se decidió biopsiar también su cerebro, para lo que fue necesario seccionar la columna vertebral con una tijera a la altura de la base del cráneo. Al realizar ese corte, se pueden introducir las puntas de la tijera para hacer un corte en el hueso occipital que se extiende hacia uno de los dos huesos parietales, alcanzando, en última instancia, el hueso parietal. Repitiendo el mismo corte en el otro lado, se puede separar esa parte del cráneo y extraer el encéfalo completo haciendo palanca suavemente con unas pinzas.

### 3.7.1.2. Ensayo de eficacia del Nb3 administrado profilácticamente en ratones BALB/c con CI.

Un total de 60 ratones infectados con *C. deneoformans* 1229817 de la manera explicada al comienzo de esta sección fueron tratados intraperitonealmente con vehículo (PBS) o Nb3 a razón de 20 mg/Kg y 5 mg/Kg el mismo día que se les practicó la infección, dividiéndose de esta manera en 3 grupos de 24, 24 y 12 ratones, respectivamente. A la mitad de los ratones de cada grupo, se les administró el tratamiento tres días a la semana durante todo el experimento y se monitorizó su supervivencia durante los 65 días que duró; mientras que la otra mitad recibió similar pauta de tratamiento durante 14 días, tiempo al que fueron sacrificados y sus pulmones y cerebros biopsiados.

### 3.7.1.3. Tratamiento tardío con Nb3 en ratones con CI.

Un total de 24 ratones infectados con *C. deneoformans* 1229817 de la manera indicada arriba fueron divididos en dos grupos, vehículo y Nb3, de 12 ratones cada uno. A los 14 días desde el momento de la infección, se comenzó a administrarles intraperitonealmente vehículo y Nb3 a razón de 20 mg/Kg y a la mitad de cada grupo se les monitorizó la supervivencia durante 65 días, mientras que, la otra mitad fue sacrificada 21 días después de la infección, biopsiando sus pulmones y cerebros tras ello.

### 3.7.1.4. Carga fúngica en homogenizados de cerebro y pulmón.

Puesto que *C. deneoformans* es un microorganismo unicelular cuyas células se separan unas de otras al duplicarse, una forma sencilla de determinar la carga fúngica en cada órgano afectado es mediante diluciones seriadas y siembra en placa. Como se ha podido advertir, la mayoría de experimentos con ratones comienzan con una serie de ratones tratados en paralelo a los que se les ensaya la supervivencia, pero cuyo experimento termina a los 14 o 21 días de infección. Esos ratones, a los que se les biopsia cerebro y pulmón, son sacrificados para determinar la carga fúngica y compararla con la efectividad del tratamiento en los experimentos de supervivencia. Es decir, si la acción del fármaco ensayado se correlaciona con una mayor probabilidad de supervivencia y, en última instancia, con una menor carga fúngica.

Por tanto, una vez fueron extraídos dichos órganos, se procedió a su homogeneizado en un disociador gentleMACS usando un programa específico para cada tejido disociado. Se utilizaron tubos M en cuyo interior se añadió 1 mL de PBS y el tejido en cuestión. Subsecuentemente, se trasvasó el homogenizado a un tubo Eppendorf a partir del cual se hicieron diluciones 1:10 hasta 7 órdenes de magnitud. Cincuenta microlitros de esas diluciones seriadas se sembraron en placas de agar Sabouraud y se cultivaron dos días a temperatura ambiente hasta que pudieran contarse las colonias.

### 3.7.1.5. Dinámica del Nb3 a través de la barrera hematoencefálica.

Puesto que *Cryptococcus* es un patógeno capaz de alcanzar el sistema nervioso central atravesando la barrera hematoencefálica, se propuso comprobar si, a su vez, el Nb3 también era capaz de atravesarla. Para ello, se infectaron 24 ratones con *C. neoformans* de la manera genérica explicada al comienzo de esta sección y se dividieron en 4 grupos de 6 ratones cada uno a los cuales se les administró 24 horas después de la infección vehículo (PBS), Nb3 20 mg/Kg,

Nb2 20 mg/Kg y NbSseK1 20 mg/Kg 3 veces por semana durante 14 días, momento en el cual fueron sacrificados y sus cerebros extraídos de la manera explicada arriba.

Dichos cerebros, fueron homogenizados en tubos M con un disociador gentleMACS a los cuales se les había añadido 1 mL de PBS con inhibidores de proteasas. Tras concluir el programa específico, los homogenizados fueron filtrados y, dado que los 3 Nbs contienen una cola de histidinas, se detectó su presencia mediante el kit His-Tag ELISA detection Kit (GenScript, Piscataway, Nueva Jersey) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

### 3.7.1.6. Tinciones de HE en cortes histológicos.

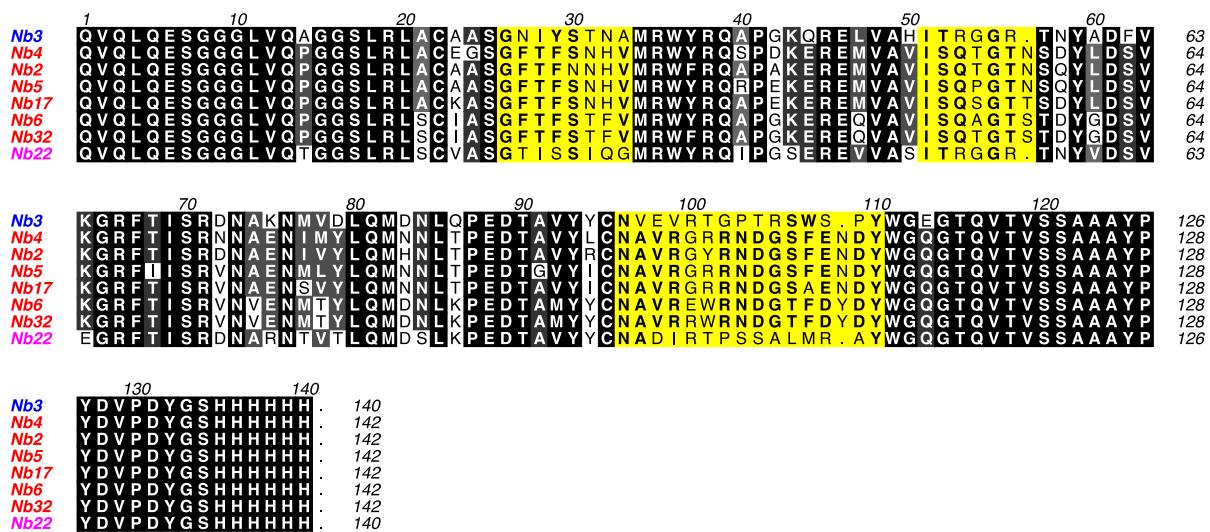
Doce pulmones y doce encéfalos provenientes de ratones infectados con *C. deneoformans* y tratados intraperitonealmente con vehículo o con Nb3 20 mg/Kg (6 ratones por grupo) fueron introducidos en tubos Falcon de 15 mL con 5 mL de formaldehido al 4% y se incubaron 12h a 4°C. Trascurrido ese tiempo, se procedió a sustituir el formaldehido por etanol al 70%, solvente en el que se almacenaron las biopsias hasta que se realizasen las tinciones de HE. Una vez se obtuvieron los cortes, realizados por el servicio de anatomía patológica del CIBA, se procedió a observarlos en un microscopio invertido Widefield Olympus IX81 en campo claro.

# 4. Resultados

## 4.1. Producción y caracterización de Nbs frente a *Gel4*.

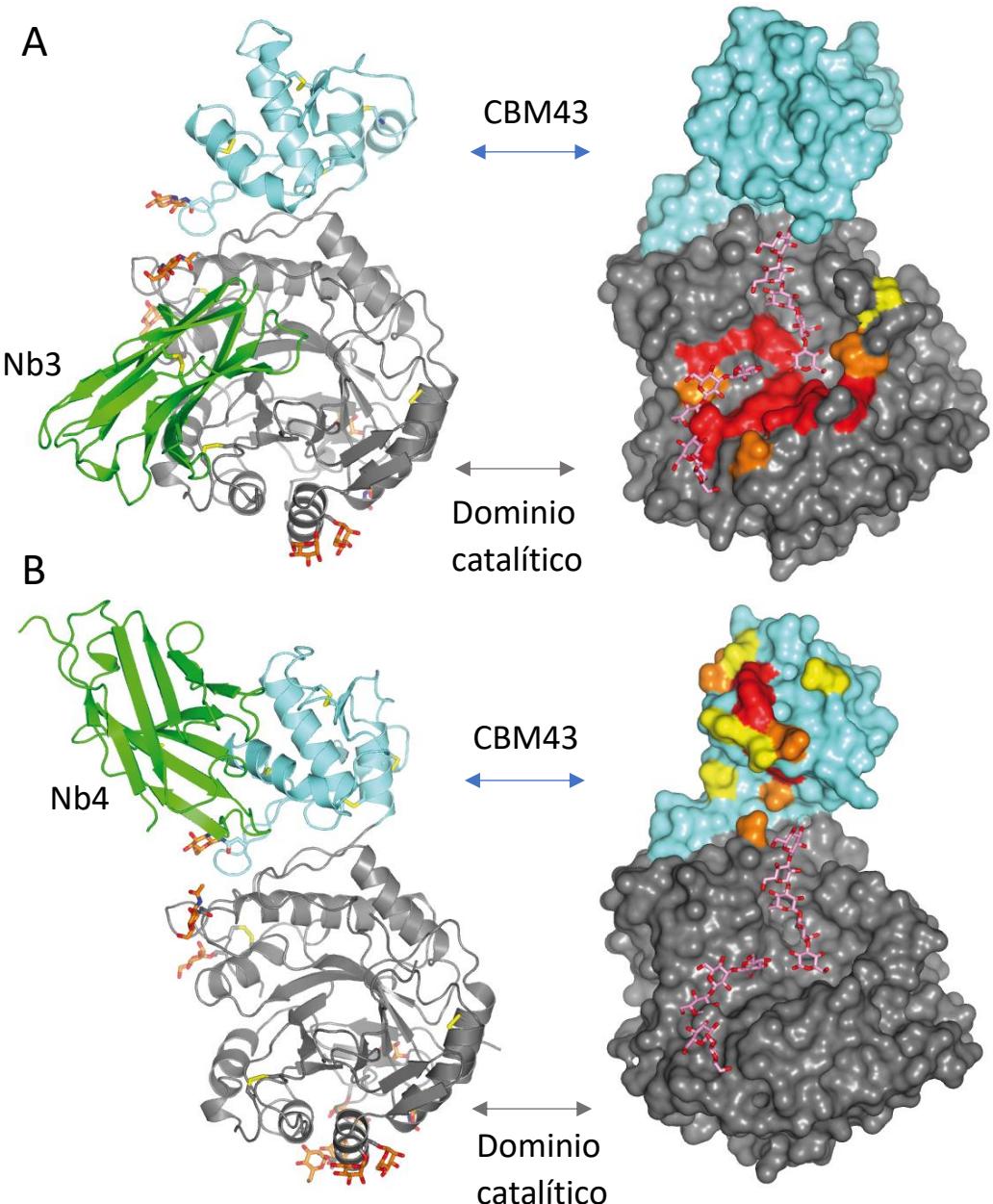
### 4.1.1. Generación de Nbs frente a *Gel4*.

Como se describió en materiales y métodos, se utilizó *Gel4* de *A. fumigatus* recombinante y sin glicosilaciones para inmunizar una alpaca. Tras varios ciclos de *phage display*, se acabaron seleccionando un total de 8 secuencias distintas que codificaban regiones V<sub>H</sub>H cuyos productos eran capaces de unirse a *Gel4*. Dichos Nbs se agruparon en 3 familias distintas en función de variaciones en su secuencia. La primera familia consta de los Nbs 2, 4, 5, 6, 17 y 32 (Nb2, Nb4, Nb5, Nb6, Nb17 y Nb32) mientras que la segunda y la tercera familia solo tienen un único componente cada una, los Nbs 3 (Nb3) y 22 (Nb22), respectivamente. Como se muestra en la Figura 13, la clasificación de las familias se ha realizado en función del grado de homología de sus secuencias CDR3 (regiones determinantes de complementariedad).



**Figura 13:** Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los 8 Nbs seleccionados. En rojo, azul y rosa agrupados los diferentes Nbs en función de si pertenecen al grupo 1, 2 o 3, respectivamente. Dentro de las secuencias individuales, fondo negro para los nucleótidos conservados en las 8 secuencias mientras que diferentes tonos de gris hasta el color blanco según aumentan los polimorfismos en esa posición. Por último, el fondo amarillo indica los 3 “loops” variables que se corresponden con CDR1 (posiciones 26-32), CDR2 (posiciones 51-57) y CDR3 (posiciones 96-110); siendo la homología de esta última la que ha suscitado la clasificación de los Nbs.

Los Nbs del grupo 2 (Nb2, Nb4, Nb5, Nb6, Nb17 y Nb32) poseen una secuencia bastante homóloga entre sí no solo para CDR3, sino también para CDR1, lo que podría indicar que estas regiones  $V_{H}H$  que dan lugar a los Nbs de este grupo tienen un progenitor o clon común, que por hipermutación somática dichas secuencias fueron variando al sustituirse o eliminarse nucleótidos<sup>330-332</sup>. Por el contrario, las regiones CDR3, al igual que las CDR1 y CDR2, son completamente diferentes para el Nb3 y el Nb22, indicando un origen clonal distinto entre sí.



**Figura 14:** Zonas de reconocimiento de *Gel4* por parte del Nb3 (A) y el Nb4 (B) determinadas por cristalografía de Rayos X. En verde se muestran tanto el Nb3 (A) como el Nb4, mientras que las regiones azul y gris se corresponden con los dominios CBM43 y catalítico, respectivamente.

El grupo de Ramón Hurtado, quien se encargó de esta primera sección del trabajo, también realizó estudio cristalográfico del Nb3 y el Nb4 unidos a la *Gel4* deglicosilada con la que se realizó la inmunización. Como se muestra en la Figura 14, el Nb4 es capaz de unirse al dominio CBM43 de *Gel4*, estructura que, probablemente, sea capaz de reconocer al  $\beta$ -1,3-glucano y sea importante, de alguna manera, para la actividad transglicosilasa de *Gel4*; mientras que el Nb3 es capaz de unirse directamente al centro activo del dominio catalítico de *Gel4*. Por extensión, los Nbs 2, 5, 6, y 32, probablemente, también se unan al dominio CBM43. Además, el hecho de que estos Nbs se unan a zonas que se sabe (Nb3) o que se intuye que participan en la actividad de *Gel4* conduce, irremediablemente, a la hipótesis de que estos Nbs pueden ser capaces de inhibir la actividad de *Gel4*.

#### 4.1.2. Caracterización de la unión de los Nbs a *Gel4* mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica

Con el objetivo de determinar las constantes de asociación y disociación, así como los parámetros energéticos de la unión de los diferentes Nbs a *Gel4* glicosilada y deglicosilada, se llevaron a cabo experimentos de titulación calorimétrica con los 8 Nbs y el Nb control NbSseK1, junto con las dos *Gel4*. El NbSseK1 no está diseñado para que reconozca a *Gel4*, por lo que su uso en este experimento es como control de no unión.

Los datos brutos obtenidos del calorímetro ITC200 se muestran en los gráficos superiores de la Figura 15, mientras que en los inferiores se muestran las diferencias de calor normalizadas con la cantidad de *Gel4* glicosilada o deglicosilada añadidos mediante inyección. Tras analizar los termogramas con el software asociado al equipo, se elaboró una tabla (Tabla 3) que contiene los diferentes parámetros asociados a la unión de cada Nb con *Gel4* glicosilada y deglicosilada junto con los parámetros termodinámicos de dichas uniones. Mientras que la amplia mayoría de las uniones de Nbs a las *Gel4* glicosilada y deglicosilada se produce con una ganancia en entalpía, la unión del Nb3 con la *Gel4* glicosilada y deglicosilada, así como el Nb6 con la *Gel4* glicosilada, se ven impulsadas por un incremento en la entropía, lo que podría indicar que la unión de estos Nbs desolvata moléculas de aguas presentes en la superficie de unión.

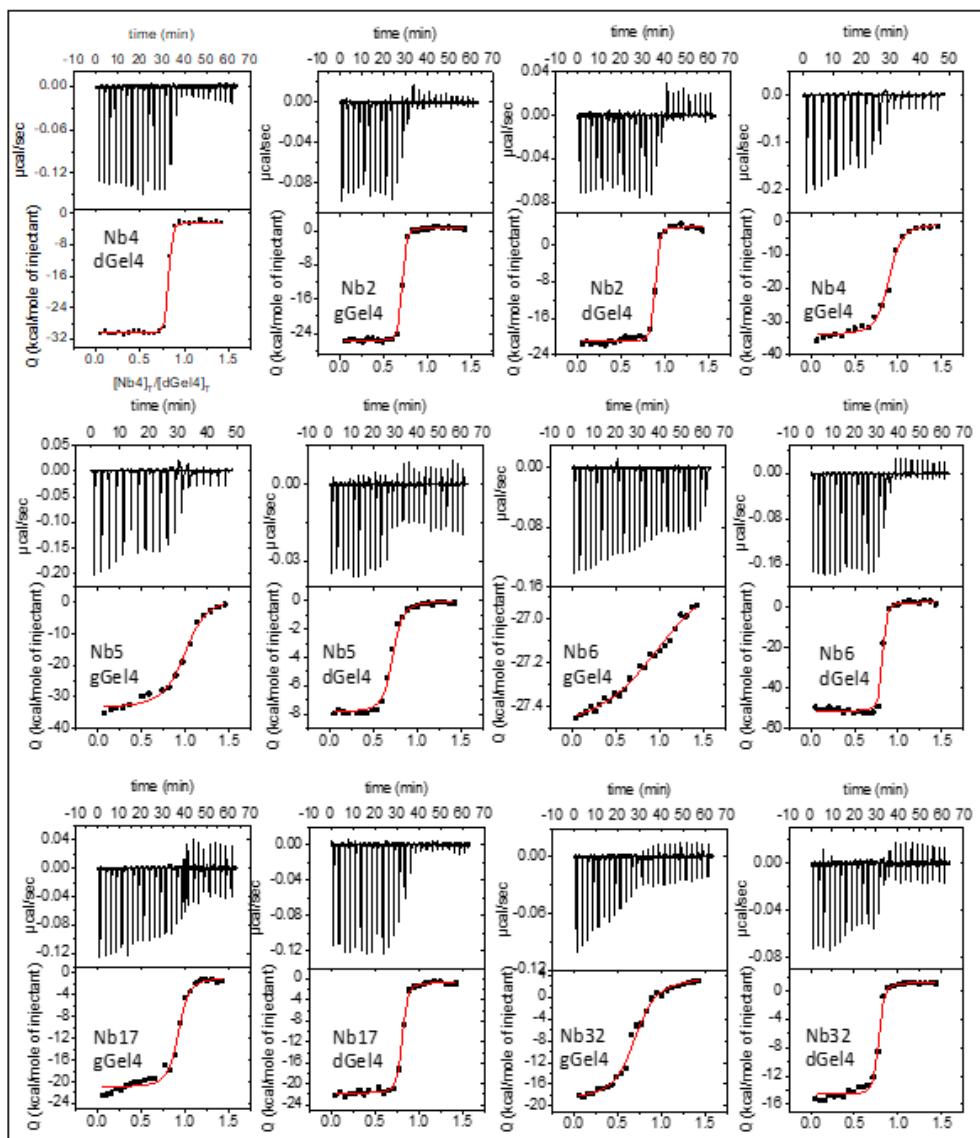
Como se recoge en la Tabla 3, la relación estequiométrica de todas las uniones es cercana a 1, indicando que la unión a su diana es 1 a 1, por lo que en el cálculo de las constantes de asociación y disociación se aplicó un modelo de unión 1 a 1. Respecto a las constantes de disociación, se puede apreciar que todas están en el rango nanomolar, siendo especialmente bajas las que son frente a la forma deglicosilada, ya que esta fue la forma empleada en la inmunización de la

alpaca. Haber usado una forma glicosilada y, probablemente, menos inmunogénica que la forma deglicosilada para inmunizar la aplaca hubiera conducido a un menor grado de inmunización. No obstante, en el caso de los Nbs 2, 3, 5 y 17 apenas vieron afectadas sus constantes de disociación al ser ensayadas contra la forma glicosilada, que, al final, es la forma que se presentará *in vivo*. Nótese que, si un parámetro termodinámico es negativo, indica que favorece la unión de las dos sustancias.

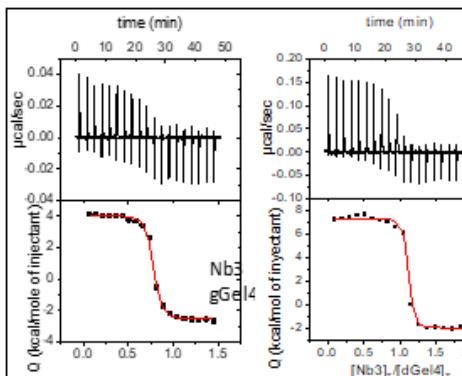
Nb	Gel4	$K_D$ (nM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	$n$
2	Glicosilada	$1.56 \pm 0.22$	-12.01	$-26.32 \pm 0.39$	14.31	0.69
2	Deglicosilada	$1.69 \pm 0.53$	-11.96	$-24.24 \pm 0.3$	12.28	0.86
3	Glicosilada	$8.69 \pm 1.5$	-10.94	$6.66 \pm 0.08$	-17.60	0.74
3	Deglicosilada	$3.24 \pm 0.78$	-11.53	$9.37 \pm 0.11$	-20.90	1.07
4	Glicosilada	$26.31 \pm 5.95$	-10.29	$-33.74 \pm 0.87$	23.45	0.86
4	Deglicosilada	$0.75 \pm 0.2$	-12.39	$-28.3 \pm 0.25$	15.91	0.78
5	Glicosilada	$73.82 \pm 16.9$	-9.68	$-36.02 \pm 1.6$	26.34	0.98
5	Deglicosilada	$19.74 \pm 5.18$	-10.46	$-7.93 \pm 0.9$	-2.53	0.70
6	Glicosilada	$575.02 \pm 173.7$	-8.47	$-0.76 \pm 0.11$	-7.71	1.10
6	Deglicosilada	$17.7 \pm 6.82$	-11.81	$-53.9 \pm 0.86$	42.09	0.79
17	Glicosilada	$17.7 \pm 4.92$	-10.53	$-20.32 \pm 0.6$	9.79	0.90
17	Deglicosilada	$3.79 \pm 0.63$	-11.65	$-20.76 \pm 0.84$	9.11	0.78
22	Glicosilada	$25.39 \pm 7.67$	-10.36	$-10.64 \pm 0.37$	0.29	0.79
22	Deglicosilada	$0.24 \pm 0.05$	-13.05	$-10.9 \pm 0.04$	-2.15	0.71
32	Glicosilada	$110.01 \pm 22.14$	-9.45	$-22.64 \pm 0.78$	13.19	0.69
32	Deglicosilada	$4.14 \pm 1.21$	-11.38	$-15.88 \pm 0.25$	4.5	0.75

**Tabla 3:** Cuadro resumen donde se exponen los principales parámetros de la unión de los diferentes Nbs a *Gel4* glicosilada y deglicosilada.  $K_D$  se corresponde con la constante de disociación,  $\Delta G$  es la energía libre de la unión,  $\Delta H$  es el incremento de entalpía,  $\Delta S$  es la variación de la entropía y  $n$  se corresponde con la ratio de unión entre las dos sustancias. Como se ha indicado en el texto principal, la unión del Nb3 a ambas formas de *Gel4* es potenciado por un aumento en la entropía, como así indica la mayor magnitud de energía por mol (kcal/mol) en el caso de  $T\Delta S$  respecto a  $\Delta H$ .

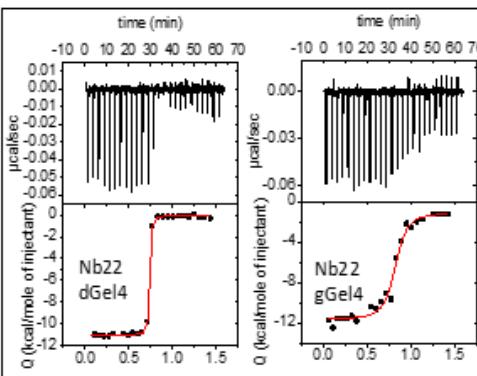
### Familia 1



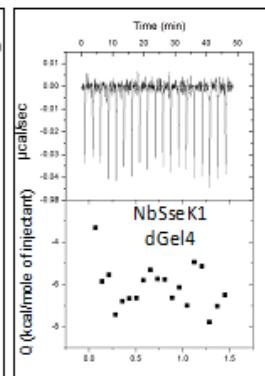
### Familia 2



### Familia 3



### NbSsek1



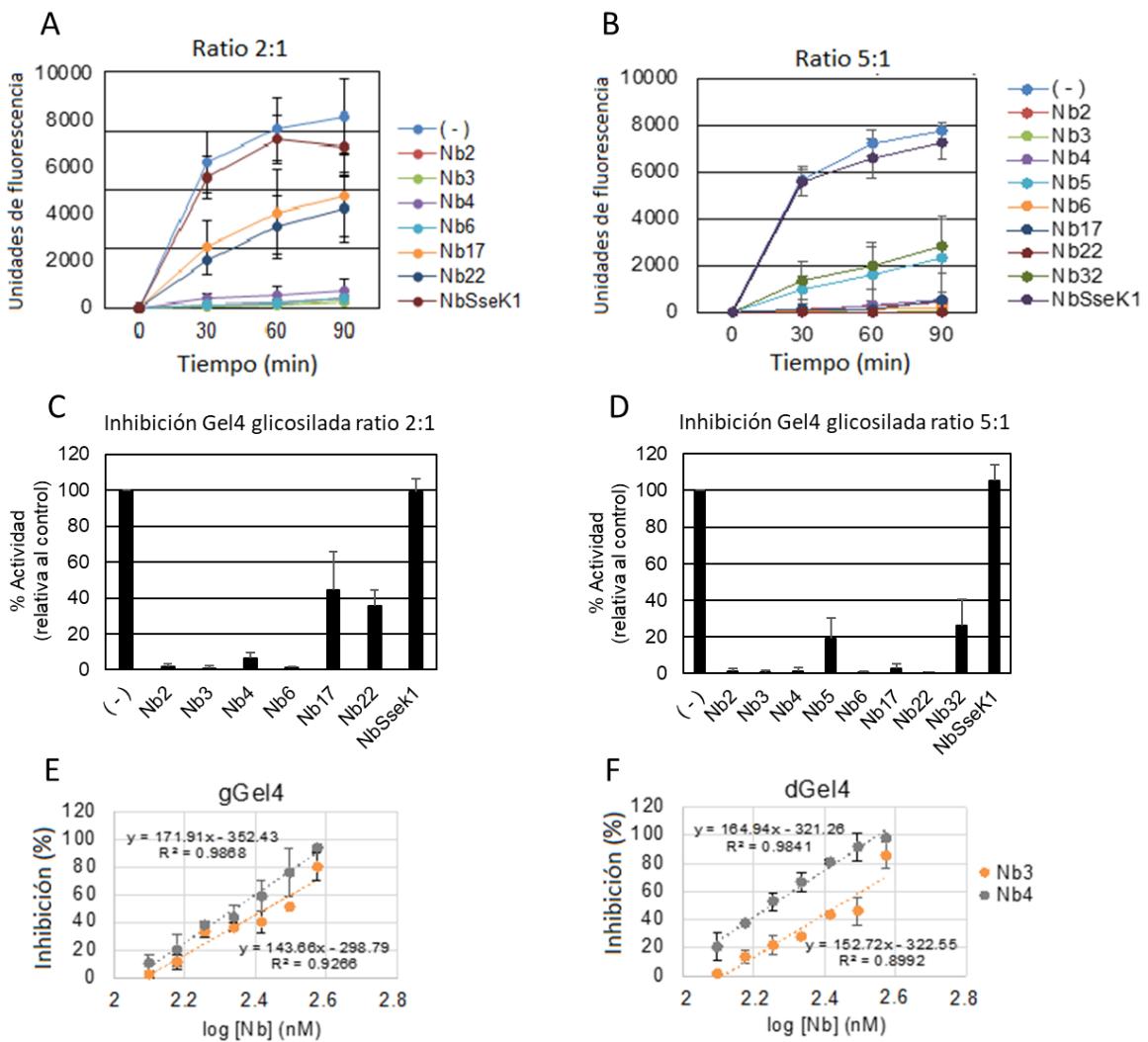
**Figura 15:** Calorimetrías de titulación isotérmicas para los 8 Nbs y NbSsek1. En la parte superior de cada gráfico doble se disponen los termogramas realizados tras sucesivas inyecciones de *Gel4* glicosilada y deglicosilada sobre los diferentes Nbs. En la parte inferior de cada panel doble se encuentran los gráficos del calor generado en cada unión frente a la relación entre las dos sustancias.

#### 4.1.3. Determinación de las propiedades inhibitorias de los Nbs frente a *Gel4*.

Tras caracterizar los parámetros termodinámicos de la unión de los distintos Nbs a *Gel4* glicosilada y deglicosilada, se procedió a llevar a cabo los estudios de inhibición enzimática de *Gel4* glicosilada y deglicosilada. Como se detalló en la introducción, *Gel4* es una  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasa que, además, posee actividad ramificante  $\beta$ -1,6. Usando laminarinhexosa marcado con sulfurodamina (L6-SR) como oligosacárido receptor y laminarina como donante<sup>333</sup>, se ensayó la inhibición de esta actividad transglicosilasa a lo largo del tiempo en *Gel4* glicosilada en presencia de los 8 Nbs en proporciones 2:1 y 5:1 como se detalla en la Figura 16 A y B. Los 8 Nbs mostraron capacidad de inhibición de *Gel4* glicosilada cuando se ensayaron en ratios de 5 a 1 respecto a *Gel4* (Figura 16 B y D). De hecho, a excepción del Nb5 y el Nb32, la mayoría inhibieron más de un 95% la actividad de *Gel4 in vitro* mientras que, como era de esperar, el Nb control NbSseK1 no afectó en absoluto a la actividad transglicosilasa.

De manera secuencial, los seis Nbs más potentes del experimento de inhibición 5:1 anterior (Nb2, Nb3, Nb4, Nb6, Nb17 y Nb22) fueron empleados en un nuevo ensayo de inhibición frente al tiempo similar al anterior, pero con una proporción menor entre los Nbs y *Gel4* glicosilada. Como se observa en la Figura 16 A y C, en el caso de los Nbs 2, 3, 4, 5 y 6, se puede apreciar que apenas generan fluorescencia a 90 minutos, lo que indica que siguen inhibiendo perfectamente la reacción de transglicosilación incluso en proporciones menores. Sin embargo, el Nb17 y el Nb22 mostraron menor poder de inhibición al reducirse la ratio frente a *Gel4*.

Puesto que los Nbs 2, 4 y 6 son de la misma familia y, presumiblemente, se unen a una región similar en *Gel4* teniendo, por tanto, un mecanismo semejante, se decidió continuar los experimentos de inhibición únicamente con el Nb4 como representante de la primera familia, junto con el Nb3. De esta manera, se llevaron a cabo nuevos ensayos de inhibición de la actividad enzimática de *Gel4* glicosilada y deglicosilada en concentraciones variables de Nb3 y Nb4 con el objetivo de determinar la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ). Para el caso del Nb3, la  $IC_{50}$  sobre la *Gel4* glicosilada fue de  $262 \pm 17$  nM, mientras que la de la deglicosilada fue de  $220 \pm 7.5$  nm, lo que indica que la presencia de glicosilaciones no afecta demasiado a la capacidad del Nb3. Sin embargo, las  $IC_{50}$  del Nb4 para la *Gel4* glicosilada y deglicosilada fueron, respectivamente,  $277 \pm 22$  nM y  $177 \pm 7$  nM, indicando que, en este caso, la glicosilación de *Gel4* puede ser un impedimento para la capacidad inhibitoria del Nb4.



**Figura 16:** Ensayos de inhibición enzimática. (A) Capacidad de inhibición de *Gel4* glicosilada por parte de los de los Nbs 2, 3, 4, 6, 17, 22 y Ssek1 con una ratio Nb/*Gel4* 2:1 durante 90 minutos. (B) Experimento similar al anterior, pero con una ratio Nb/*Gel4* de 5:1. (C y D) Actividad de *Gel4* en presencia de los Nbs a ratios 2:1 (C) y 5:1 (D) expresada como diferencia con la actividad de la enzima sin inhibir con los Nbs tras 90 minutos de reacción. (E) Inhibición de *Gel4* glicosilada (E) y deglicosilada (F) en presencia de concentraciones variables de Nb3 y Nb4 durante 90 minutos.

#### 4.2. Ensayos de inhibición del crecimiento de *Aspergillus spp.* y *Cryptococcus spp. in vitro*.

Los prometedores resultados de la inhibición de la actividad de *Gel4* *in vitro* condujeron a probar si estos Nbs eran capaces de alterar también el crecimiento de *Aspergillus* y *Cryptococcus* *in vitro*. A lo largo de esta sección se detallarán diferentes experimentos de sensibilidad a antifúngicos, entre ellos los Nbs 2, 3 y 4, junto con algunos otros fármacos usados habitualmente en el tratamiento de enfermedades fúngicas. Estos ensayos de sensibilidad a fármacos se basan

principalmente en cuantificar la capacidad del hongo, en contacto o no con dichas sustancias, para reducir sales de XTT añadidas al medio de cultivo. Habitualmente, si el fármaco añadido es capaz de inhibir el crecimiento del hongo o, más concretamente, si la capacidad reductora del hongo es menor en presencia de dichos fármacos, es decir, que éstos son capaces de disminuir la actividad metabólica total del hongo en ese pocillo, la cantidad de XTT reducido y, por tanto, el color generado en aquellos pocillos es menor que el color que se genera en los pocillos control. Si hay menos células en el pocillo con droga respecto al pocillo control, ya sea porque el fármaco mata células o ralentiza su crecimiento o porque las mata, o si el fármaco reduce la actividad de las mitocondrias de las células del hongo, aunque el número de células en esos pocillos sea similar al de los controles, se podrá apreciar una menor reducción de XTT y, por tanto, menor color naranja en los pocillos con fármaco que en el control de crecimiento.

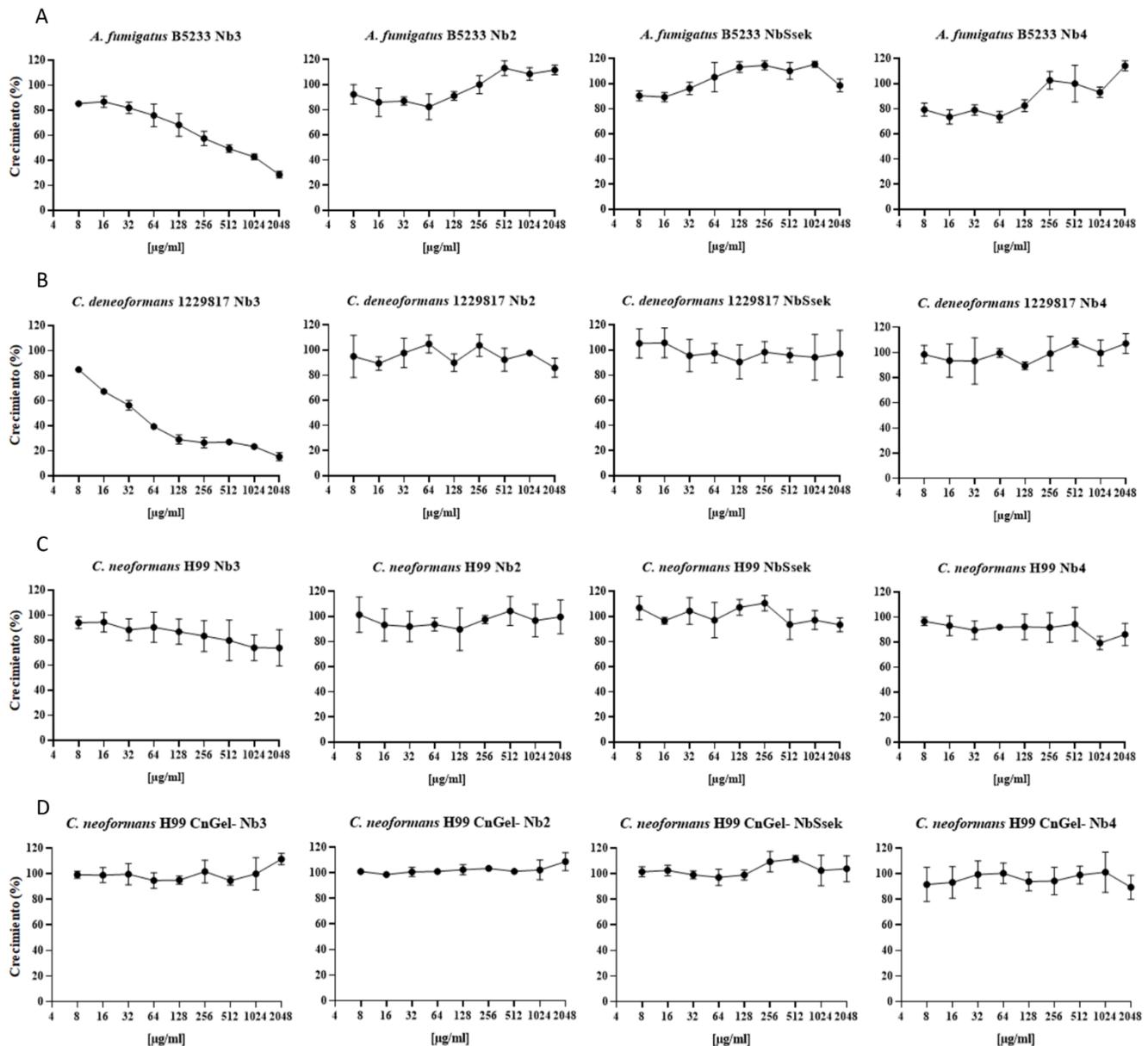
Aunque a lo largo de este trabajo se han introducido diferentes aislados clínicos de varias secciones de *Aspergillus*, como las secciones *Fumigati*, *Nigri*, *Flavi* o *Terrei*, o diferentes cepas del serotipo A y D de *Cryptococcus*, la mayor parte de los estudios se centraron en torno a una cepa de la sección *Fumigati* (*A. fumigatus* B5233) y a otra del complejo de especies *C. neoformans* (*C. deneoformans* 1229817), puesto que, habitualmente, son los agentes etiológicos más frecuentes en sus respectivas enfermedades. No obstante, si bien es cierto que *A. fumigatus* tiene una dominancia notoria sobre el resto de especies aisladas en clínica, en el caso de *Cryptococcus* no es tan acusada, ya que existen regiones del mundo, como las tropicales, donde el complejo de especies *C. gatti* puede ser más frecuente que el complejo de especies *C. neoformans*.

#### 4.2.1. Sensibilidad de *A. fumigatus*, *C. neoformans* y *C. deneoformans* a Nb2, Nb3, Nb4 y NbSseK1.

Los tres Nbs frente a *Gel4* seleccionados de los 8 originales se enfrentaron en un rango de concentraciones de entre 8 µg/mL y 2048 µg/mL a cultivos de *A. fumigatus* B5233, *C. deneoformans* 1229817 y *C. neoformans* H99 en placas de 96 pocillos con RPMI 1640 a 37°C para *Aspergillus* y a 30°C para *Cryptococcus*, como se describe en los materiales y métodos.

En el caso de *A. fumigatus* B5233, el Nb3 fue capaz de inhibir el crecimiento de dicho hongo hasta en un 70% en las concentraciones más altas ensayadas, pudiendo apreciarse una MIC<sub>50</sub> de 512 µg/mL, entendida como la concentración mínima de, al menos, 3 experimentos a la cual se da más del 50% de inhibición del crecimiento, como se muestra en la Figura 17. Sin embargo, en el caso de los Nbs 2 y 4 apenas se modificó el crecimiento del hongo pese a que ambos Nbs

habían mostrado potentes actividades inhibitorias frente a *Gel4 in vitro*. Si bien es cierto que en el rango medio y bajo de concentraciones alcanzan una discreta inhibición del crecimiento de en torno al 20%, su actividad sobre *A. fumigatus* es anecdótica comparada con el Nb3. Además, el Nb control NbSseK1, diseñado frente a la enzima Ssek-1, una Arg-glicosiltransferasa de *Salmonella* y, usado como control negativo tampoco ejerció efecto negativo alguno sobre el crecimiento de *Aspergillus*, indicando que la actividad del Nb3 no es inespecífica.



**Figura 17:** Inhibición del crecimiento de *A. fumigatus* (A), *C. deneoformans* 1229817 (B), *C. neoformans* H99 (C) y *C. neoformans* H99 CnGel- tras 48h de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de, de izquierda a derecha, Nb3, Nb2, NbSseK1 y Nb4. El % de crecimiento se corresponde con la diferencia de XTT reducido comparado con el control sin Nb.

La eficacia del Nb3 inhibiendo el crecimiento de *A. fumigatus* condujo a ensayar también su efecto en otros géneros fúngicos de especial relevancia en clínica, como fue el caso de *Cryptococcus*. Los experimentos anteriores fueron replicados en *C. neoformans* H99 (serotipo A) y en *C. deneoformans* 1229817 (serotipo D), como se muestra en la Figura 17. Si bien es cierto que el Nb3 ejerció un efecto bastante discreto sobre *C. neoformans* H99, induciendo en torno a un 25% de inhibición del crecimiento a altas concentraciones de Nb3, en el caso de *C. deneoformans* el Nb3 ejerció un potente efecto inhibidor sobre el crecimiento de esta especie, alcanzando un 70% de inhibición del crecimiento a concentraciones altas y su MIC<sub>50</sub> fue de 64 µg/mL, unas 8 veces menor que en *A. fumigatus* B5233. Por otra parte, los Nbs 2 y 4 no tuvieron actividad sobre ninguna de las dos especies de *Cryptococcus*, mostrando un comportamiento similar a la del Nb control NbSseK1 sobre dichos cultivos.

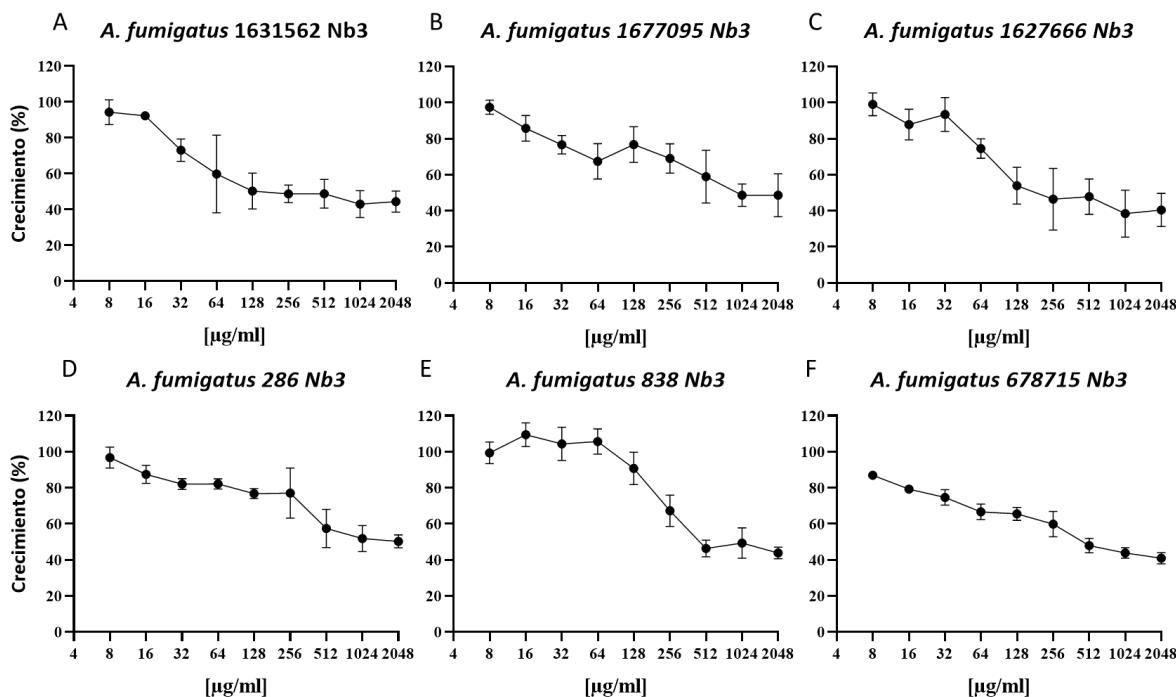
Junto a lo anterior, se ensayó la actividad de, nuevamente, los Nbs 2, 3 y 4 junto con el Nb anti Ssek-1 (Figura 17 D) frente a *C. neoformans* H99 *CnGel*-, mutante para *CnGel* y homólogo de *Gel4* en *C. neoformans*. Ninguno de los 4 Nbs mostró actividad frente al crecimiento de dicho mutante. Como cabía esperar, la ausencia de la diana eliminó el efecto del Nb3 sobre el crecimiento del hongo, dando más peso a la especificidad del efecto del Nb3 sobre el crecimiento de *Aspergillus* y *Cryptococcus*. Si bien es cierto que *C. neoformans* H99 sufría un discreto efecto en el crecimiento al añadir Nb3, los mutantes de *Gel4* y *CnGel* en *A. fumigatus* y *C. deneoformans*, respectivamente, son inviables; por lo que el mutante de *C. neoformans* era la única opción disponible.

#### 4.2.2. Inhibición del crecimiento de otras especies de *Aspergillus* y *Cryptococcus* por parte del Nb3.

Para corroborar que el efecto del Nb3 no era cepa-específico, se repitieron los mismos ensayos de reducción de XTT que se han descrito previamente sobre otras cepas y especies tanto de *Aspergillus* como de *Cryptococcus*, estando el listado recogido en la Tabla 2 de la sección de materiales y métodos, así como su origen, indicando si es cepa o aislado clínico.

En el caso de *A. fumigatus*, se testó la eficacia del Nb3 como inhibidor de crecimiento sobre 6 aislados clínicos diferentes como se recoge en la Figura 18. Aunque en términos generales el efecto sobre el crecimiento es bastante parecido en los seis aislados, alcanzándose una especie de valle a concentraciones altas donde la inhibición del crecimiento por parte del Nb3 sobre *A. fumigatus* se estanca en torno el 50 y el 70%, sí que existen diferencias entre cepas en el rango en el que se sitúa la MIC<sub>50</sub>. Puesto que las gráficas de la Figura 18 son el resultado de al menos

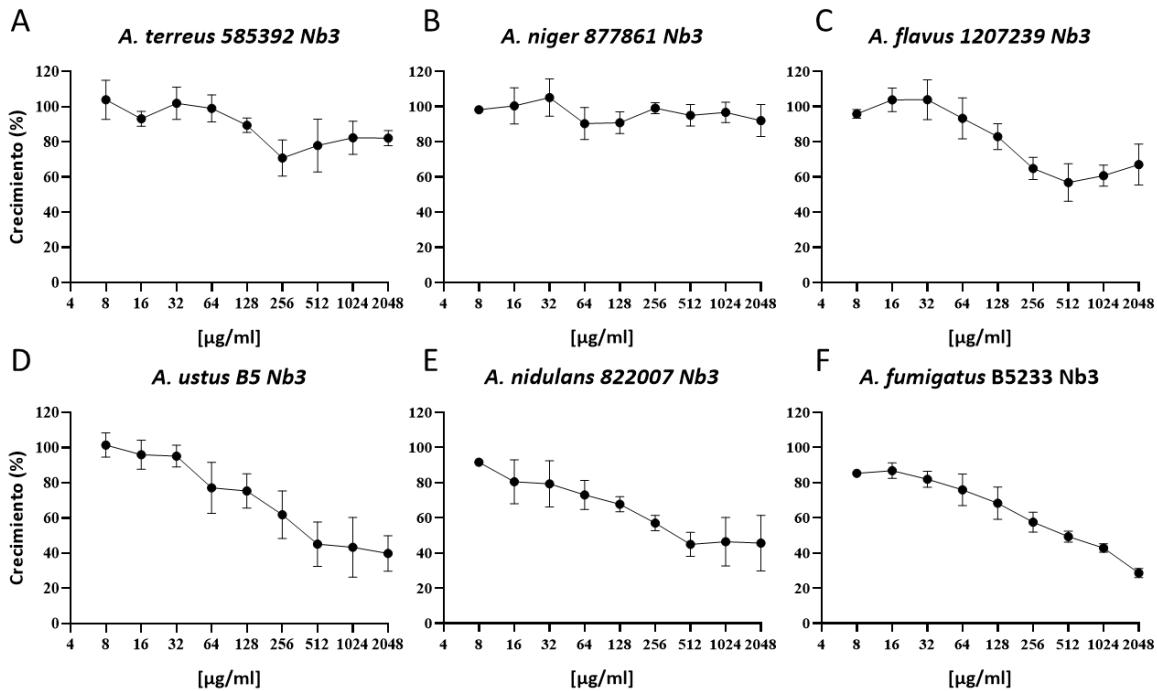
3 experimentos independientes, hay casos como en los aislados 1631562, 1677095, 1627666 y 286 donde la  $\text{MIC}_{50}$  varió entre experimentos, siendo estos rangos de entre 64-256  $\mu\text{g/mL}$ , 512-1024  $\mu\text{g/mL}$ , 128-512  $\mu\text{g/mL}$  y 1024-2048  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.



**Figura 18:** Ensayos de sensibilidad basados en reducción de XTT a 48h al Nb3 en rango de concentraciones variable en cultivos en RPMI 1640 a 37°C de los aislados clínicos de *A. fumigatus* 1631562 (A), 1677095 (B), 1627666 (C), 286 (D), 838 (E) y 678715 (F) llevados a cabo como se describe en materiales y métodos.

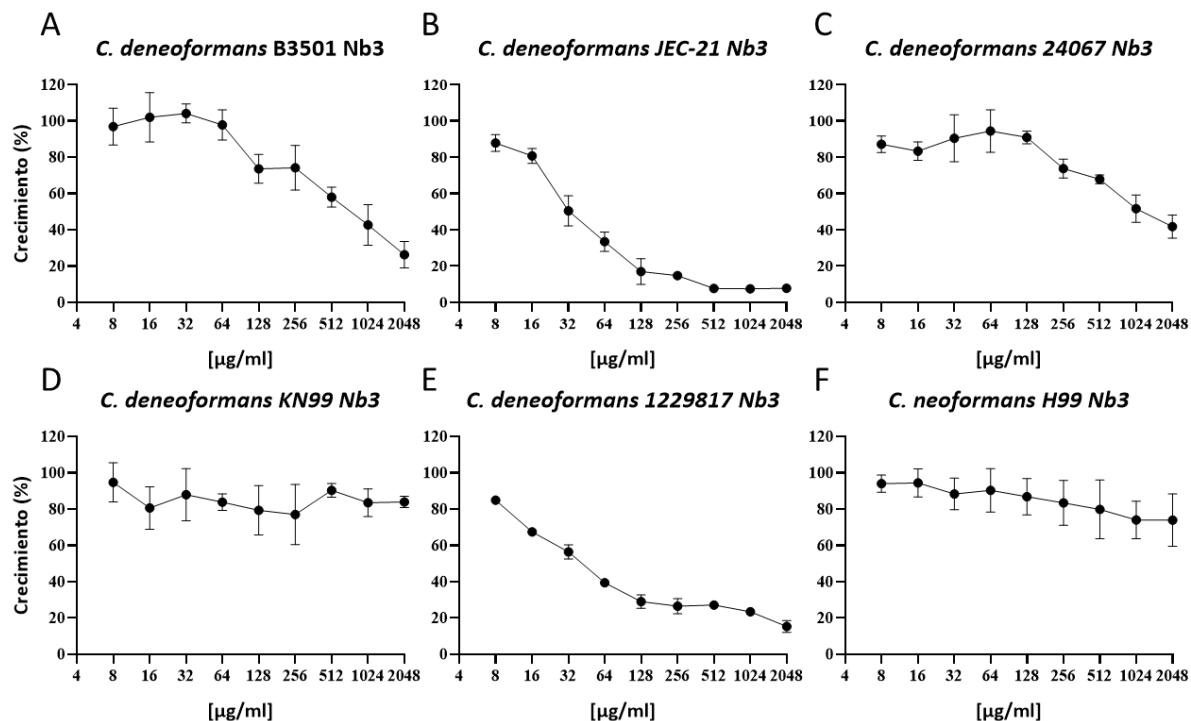
Sin embargo, con excepción de los aislados 1627666 y 1631562 cuyo rango bajo de la MIC es sensiblemente inferior al resto, la mayoría de las  $\text{MIC}_{50}$  convergen en torno a 512  $\mu\text{g/mL}$  de Nb3, como se recoge en la Tabla 4. De hecho, la misma  $\text{MIC}_{50}$  (512  $\mu\text{g/mL}$ ) se da en el caso de la cepa de *A. fumigatus* principal usada en los experimentos anteriores (*A. fumigatus* B5233).

En paralelo, se llevaron a cabo experimentos de sensibilidad similares a los anteriores, pero en aislados clínicos de *Aspergillus* pertenecientes a secciones no-Fumigati y recogidos en la Figura 19. El Nb3 fue capaz de inhibir el crecimiento, de forma muy similar a como ocurre en *A. fumigatus*, de los aislados de las secciones Flavi, Usti y Nidulantes, donde la  $\text{MIC}_{50}$  se situó en 512  $\mu\text{g/mL}$  en los tres casos. Sin embargo, el Nb3 tuvo un efecto muy discreto sobre el cultivo de *A. terreus* 585392 donde el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo apenas alcanzó el 30%, haciendo imposible la determinación de la  $\text{MIC}_{50}$ . Por otra parte, en *A. niger* 877861 el Nb3 no produjo efecto alguno sobre el crecimiento de dicho hongo.



**Figura 19:** Set de ensayos de sensibilidad al Nb3 basados en la reducción de XTT en cultivos de *A. terreus* 585392 (A), *A. niger* 877861 (B), *A. flavus* 1207239 (C), *A. ustus* B5 (D) y *A. nidulans* 822007 (E) en placas de 96 pocillos incubados 48h a 37°C. A modo comparativo, se introduce la sensibilidad al Nb3 de *A. fumigatus* B5233 (F).

Posteriormente, se llevaron a cabo los ensayos de sensibilidad al Nb3 sobre varias especies del género *Cryptococcus*. De forma similar a todos los ensayos de sensibilidad anteriores, aunque con la diferencia de que, al tratarse de *Cryptococcus*, fueron incubados a 30°C en lugar de 37°C, se llevaron a cabo al menos 3 experimentos por especie. En la Figura 20 se recogen las gráficas de sensibilidad para las cepas B3501, JEC-21 y 24067 de *C. deneoformans* (serotipo D) y la KN99 del serotipo A, donde se puede apreciar que el Nb3 tiene efecto únicamente sobre las cepas del serotipo D, mientras que en el serotipo A el efecto es muy discreto. Continuando con el serotipo A, aunque la cepa KN99 y la H99 son bastante parecidas, apenas logró el Nb3 inhibir un 20% el crecimiento de ambos hongos. Sin embargo, en el serotipo D, el efecto es mucho más acusado. Pese a que las cepas B3501 y 24067 mostraron una MIC<sub>50</sub> de en torno a 1024 µg/mL, mayores que la mostrada por *C. deneoformans* 1229817, la cepa JEC-21 se mostró como la más sensible al Nb3 de todos los experimentos, teniendo una MIC<sub>50</sub> de entre 32 y 64 µg/mL y, además, fue la única cepa donde se pudo determinar la MIC<sub>90</sub> (512 µg/mL).



**Figura 20:** Ensayos de sensibilidad al Nb3 en diferentes cepas del complejo de especies *C. neoformans*. Las cepas B3501 (A), JEC-21 (B) y 24067 (C) de *C. deneoformans* y la cepa KN99 de *C. neoformans* se cultivaron durante 48h a 30°C en placas de 96 pocillos en presencia de varias concentraciones de Nb3 y se determinó su actividad metabólica como diferencia en la cantidad de XTT reducido. A modo comparativo, se han incluido las sensibilidades frente al Nb3 de *C. deneoformans* 1229817 (E) y *C. neoformans* H99 (F), que fueron las dos especies más utilizadas de *Cryptococcus* a lo largo de este trabajo.

Organismo	Nb3 MIC <sub>50</sub> [μg/ml]	Organismo	Nb3 MIC <sub>50</sub> [μg/ml]
<i>A. fumigatus</i> B5233	512	<i>C. deneoformans</i> 1229817	64
<i>A. fumigatus</i> 1631562	64 - 256	<i>C. deneoformans</i> B3501	1024
<i>A. fumigatus</i> 1677095	512 - 1024	<i>C. deneoformans</i> JEC21	32 - 64
<i>A. fumigatus</i> 1627666	128 - 512	<i>C. deneoformans</i> 24067	1024
<i>A. fumigatus</i> 838	512	<i>C. neoformans</i> KN99	>2048
<i>A. fumigatus</i> 286	1024 - 2048	<i>C. neoformans</i> H99	>2048
<i>A. fumigatus</i> 678715	512	<i>C. neoformans</i> H99 CnGel-	>2048

**Tabla 4:** Resumen de las MIC<sub>50</sub> de Nb3 obtenidas los experimentos de inhibición del crecimiento.

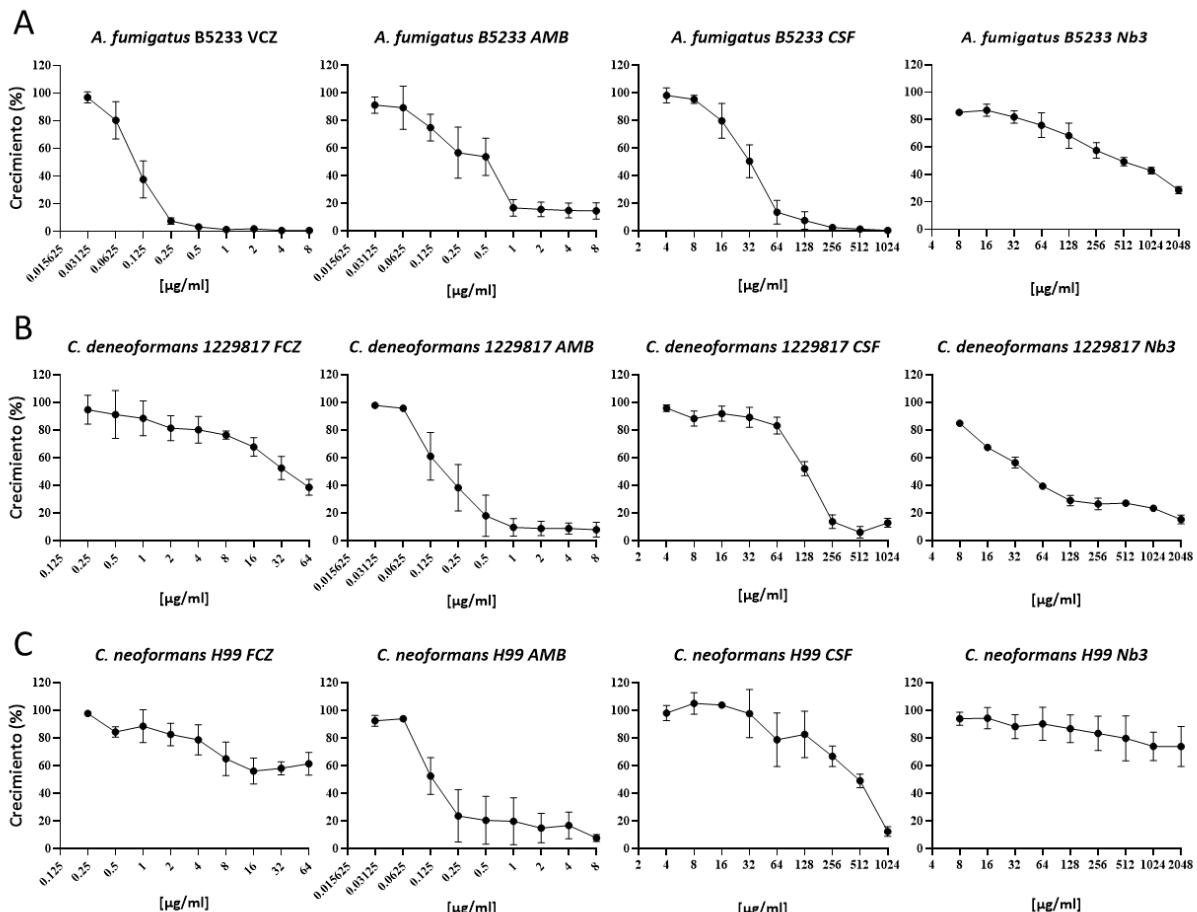
#### 4.2.3. Estudio comparativo de la eficacia de fármacos usados en clínica con el Nb 3.

Puesto que el Nb3 ha mostrado capacidad inhibitoria, más o menos potente en diferentes especies de los géneros *Aspergillus* y *Cryptococcus*, se procedió a caracterizar el perfil de

sensibilidades a antifúngicos de *A. fumigatus* B5233, *C. neoformans* H99 y *C. deneoformans* 1229817, las tres cepas más usadas a lo largo de este estudio. Generalmente, durante el desarrollo de nuevos fármacos suele ser habitual y conveniente comparar la eficacia del fármaco en desarrollo con otros ya aprobados y usados en clínica. En el caso de las enfermedades fúngicas, las opciones terapéuticas son bastante escasas y suelen estar basadas en el uso de fármacos similares para todas ellas. De hecho, los tratamientos más habituales para *Aspergillus* son la AMB y VCZ y para *Cryptococcus* AMB y FCZ, es decir, azoles y polienos para ambos casos. Además, también se ensayó la CSF, debido a que la síntesis de 1,3-β-glucano es un proceso muy estrechamente ligado al posible mecanismo de acción del Nb3.

En ambos géneros, los ensayos de sensibilidad se llevaron a cabo de la forma que ha sido habitual a lo largo de este trabajo, con la salvedad de la diferente temperatura de incubación (30 y 37°C) a la que se incubaron las placas de 96 pocillos de los cultivos de *Cryptococcus* y *Aspergillus*, respectivamente. En dichos ensayos, el VCZ y la AMB fueron probados en un rango de concentraciones de entre 0.031 µg/mL y 8 µg/mL, mientras que el FCZ se ensayó a concentraciones de entre 0.25 y 64 µg/mL. Entre dichos rangos, se encuentran las concentraciones denominadas como terapéuticas para el tratamiento de ambos hongos. Sin embargo, en el caso de la CSF, debido a que *Cryptococcus* es resistente a las concentraciones usadas en clínica, el rango de concentraciones para la CSF fue de entre 8 y 1024 µg/mL, donde el crecimiento a más de 16-32 µg/mL se suele considerar como resistencia.

En el caso de *A. fumigatus* B5233, la MIC<sub>50</sub> del VCZ se situó en el rango de 0.125-0.25 µg/mL, pudiendo determinarse, además, el 90% de inhibición del crecimiento (MIC<sub>90</sub>) entre 0.25 y 0.5 µg/mL, siendo una cepa sensible al efecto de los azoles. De igual manera, *A. fumigatus* B5233 también fue sensible a AMB, obteniéndose unas MIC<sub>50</sub> entre 0.5 y 1 µg/mL y, de nuevo, se pudo determinar la MIC<sub>90</sub> en este fármaco en 1 µg/mL. En comparación, como se puede apreciar en la Figura 21, la sensibilidad a la CSF y al Nb3 fue sensiblemente menor, en términos de cantidad de fármaco necesario para lograr un efecto semejante. De hecho, la MIC<sub>50</sub> se encuentra entre 32 y 64 µg/mL y la MIC<sub>90</sub> se alcanza a partir de 128 µg/mL.



**Figura 21:** Perfil de sensibilidades a antifúngicos de uso en clínica en cultivos de *A. fumigatus* B5233 (A), *C. deneoformans* 1229817 (B) y *C. neoformans* H99 (C). Los antifúngicos ensayados, de izquierda a derecha, fueron: VRZ para *Aspergillus* y FCZ para *Cryptococcus*, AMB y CSF para ambos y, a la derecha del todo y con fines comparativos, se sitúan las sensibilidades al Nb3.

En paralelo y, apoyándose en los mismos ensayos de sensibilidad a fármacos basados en la reducción de XTT, se procedió a determinar la sensibilidad a fármacos típicos en clínica para las dos cepas del complejo de especies *C. neoformans* más utilizadas a lo largo de este estudio, *C. deneoformans* 1229817 y *C. neoformans* H99. El FCZ, que fue el fármaco del grupo de los azoles ensayado en *Cryptococcus*, tuvo un efecto bastante discreto sobre el crecimiento de ambas especies. De hecho, la  $\text{MIC}_{50}$  del FCZ para el serotipo D se situó entre 32 y 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concentraciones que pertenecen al extremo superior del rango de concentraciones ensayadas para dicho fármaco, mientras que, en el caso del serotipo A, ni si quiera se llegó a alcanzar la  $\text{MIC}_{50}$  en la mayoría de las repeticiones. Sin embargo, ambas especies fueron sensibles a AMB de forma bastante similar. La  $\text{MIC}_{50}$  fue de entre 0.125 y 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ambas especies, mientras que la  $\text{MIC}_{90}$  se alcanzó entre 0.5 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el serotipo D y de entre 0.25 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el serotipo A. Por último, respecto a la CSF, como se muestra en la Figura 21, ambas

especies resultaron bastante resistentes a la CSF, especialmente el serotipo A. La MIC<sub>50</sub> para *C. deneoformans* fue de 128 µg/mL, mientras que para *C. neoformans* fueron 512 µg/mL, unas 15 veces más que para *A. fumigatus*. Sin embargo, aunque a concentraciones muy altas, ambos *Cryptococcus* son sensibles al efecto de las equinocandinas, puesto que en ambos casos se pudo determinar la MIC<sub>90</sub> en 256 µg/mL y 1024 µg/mL para los serotipos D y A, respectivamente.

#### 4.2.4. Sinergismo del Nb3 con otros fármacos de uso común en clínica.

Una vez concluidos los perfiles de sensibilidad a antifúngicos de cada una de estas tres cepas, se procedió a comprobar si combinaciones del Nb3 con azoles (VCZ para *Aspergillus* y FCZ para *Cryptococcus*), con AMB y con Nb4 podrían mejorar el efecto antifúngico que ejercen sobre dichos hongos. Para ello, como se describe en materiales y métodos, se elaboraron paneles en los cuales se enfrentaron diferentes concentraciones de cada uno de los dos fármacos ensayados en las combinaciones Nb3-FCZ/VCZ, Nb3-AMB y Nb3-Nb4 a modo tablero de ajedrez en placas de 96 pocillos, las cuales se cultivaron durante 48h a 30 o 37°C en función del organismo. Tras incubar 48h y, de manera similar al resto de ensayos de sensibilidad, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de cada cultivo mediante reducción de XTT, a partir del cual se determinaron los tipos de relaciones entre las diferentes combinaciones de fármacos empleadas.

En el caso de *A. fumigatus*, que es donde mejores resultados se obtuvieron, las combinaciones de Nb3 con AMB y de Nb3 con Nb4 mostraron sinergismo. De hecho, en la combinación Nb3-AMB, se logró un 50% de efecto antifúngico con 4 y 8 veces menos concentración de Nb3 y AMB en combinación, respectivamente, que en solitario. Además, en la combinación entre los dos Nbs, se logró reducir más de 32 veces la concentración necesaria de ambos Nbs para lograr un 50%. En este caso, hay que indicar que la MIC<sub>50</sub> individual del Nb4 se fijó en 512 µg/mL, debido a que no se ha podido determinar su MIC experimentalmente. En el caso de que hubiera sido posible determinar esa concentración, al ser de valor superior y, de acuerdo a la ecuación del apartado 3.2.5 de materiales y métodos, al encontrarse la MIC individual para el Nb4 en el divisor, el índice FIC todavía sería más bajo, indicando, matemáticamente, una sinergia todavía más intensa. Por último, aunque no cuenta como sinergia, en la combinación entre Nb3 y VCZ, la MIC<sub>50</sub> para el Nb3 en combinación se redujo más de 100 veces en comparación con la individual, mientras que la MIC<sub>50</sub> combinada para el VCZ solo se redujo a la mitad.

Organismo	Combinación de fármacos (AF1 + AF2)	AF1 MIC <sub>50</sub> [µg/ml]	AF2 MIC <sub>50</sub> [µg/ml]	combMIC <sub>50</sub> AF1 [µg/ml]	combMIC <sub>50</sub> AF2 [µg/ml]	FICI	Interpretación
<i>A. fumigatus</i> B5233	Nb3 + AMB	512	1	128	0.125	0.375	Sinergia
<i>A. fumigatus</i> B5233	Nb3 + VCZ	512	0.5	1	0.25	0.502	Aditivo
<i>A. fumigatus</i> B5233	Nb3 + Nb4	512	512	16	16	0.063	Sinergia
<i>C. deneoformans</i> 1229817	Nb3 + AMB	64	0.25	32	0.125	1.000	Aditivo
<i>C. deneoformans</i> 1229817	Nb3 + FCZ	64	64	32	2	0.531	Aditivo
<i>C. deneoformans</i> 1229817	Nb3 + Nb4	64	512	32	64	0.625	Aditivo
<i>C. neoformans</i> H99	Nb3 + AMB	512	0.25	4	0.125	0.508	Aditivo
<i>C. neoformans</i> H99	Nb3 + FCZ	512	64	512	64	2.000	Indiferente
<i>C. neoformans</i> H99	Nb3 + Nb4	512	512	256	16	0.531	Aditivo

**Tabla 5:** Cuadro resumen de los experimentos de sinergia donde se muestran las MIC<sub>50</sub> individuales del Nb3, AMB, VCZ/FCZ y Nb4 en *A. fumigatus* B5233, *C. deneoformans* 1229817 y *C. neoformans* H99. Junto a ello, se recogen las concentraciones individuales de cada pocillo donde se alcanzó el 50% del efecto con la menor cantidad de ambos fármacos en combinación (combMIC<sub>50</sub>), dato necesario para poder calcular el índice de concentración inhibitoria fraccional el cual, si es menor que 0.5, se considera combinación sinérgica entre ambos fármacos, mientras que si su valor se encuentra entre 0.5 y 2 se considera un efecto aditivo. Por último, si el índice se sitúa entre 2 y 4 se considera indiferente y, si es mayor de 4, es antagonismo.

Por otra parte, en el caso de *C. deneoformans* 1229817, ninguna de las combinaciones (Nb3-AMB/FCZ/Nb4) resultó en efecto sinérgico, aunque todas ellas fueron aditivas. Mientras que en la combinación Nb3-AMB apenas se redujo a la mitad las MIC<sub>50</sub> combinadas para ambos fármacos en comparación con sus MIC<sub>50</sub> individuales (adición perfecta), las combinaciones Nb3-FCZ y Nb3-Nb4 si lograron reducir más veces la concentración en combinación de uno de los dos fármacos para obtener un 50% de inhibición del crecimiento. De esta manera, en la combinación Nb3-FCZ, se logró reducir la comMIC<sub>50</sub> para el FCZ 32 veces, mientras que para el Nb3 solo se redujo a la mitad. De nuevo, en la combinación Nb3-Nb4 se volvió a reducir enormemente la MIC<sub>50</sub> combinada para el Nb4, pero la del Nb3 tan solo se redujo a la mitad, impidiendo la calificación de efecto sinérgico.

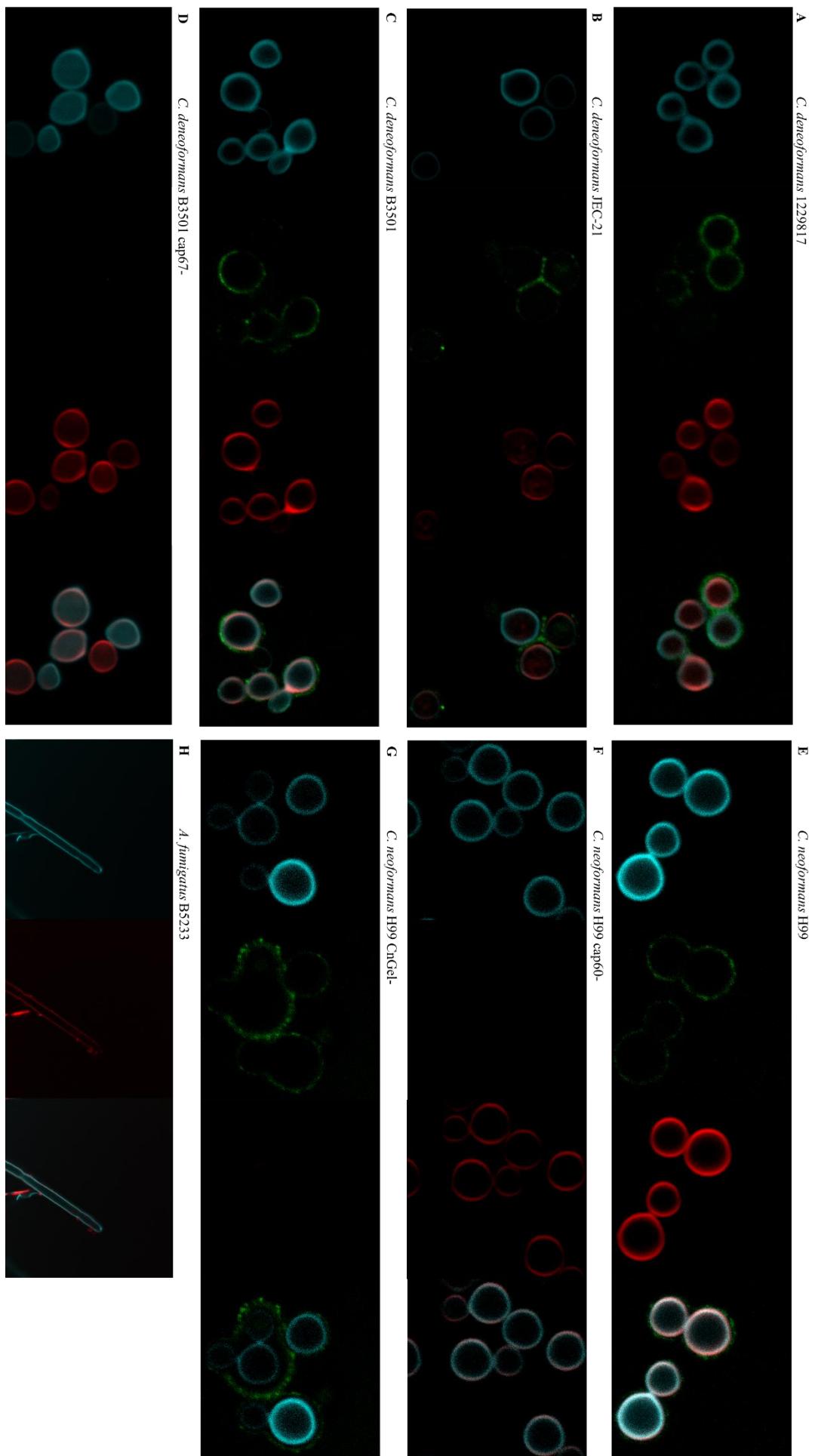
Por último, al igual que en *C. deneoformans*, las combinaciones entre Nb3-AMB y Nb3-Nb4 en cultivos de *C. neoformans* H99 volvieron a mostrar efecto aditivo. Como se ha mostrado en los resultados anteriores, el Nb3 en *Cryptococcus* serotipo A no tiene el efecto suficiente sobre el crecimiento de dichos hongos como para poder llegar a determinar su MIC<sub>50</sub>, como sí se puede hacer en *C. deneoformans* y *A. fumigatus*, por lo que, al igual que en el Nb4 en las otras especies, se fijó la MIC<sub>50</sub> individual del Nb3 en 512 µg/mL. En la combinación Nb3-AMB se logró reducir hasta 4 µg/mL la MIC<sub>50</sub> combinada del Nb3, aunque tan solo se redujo a la mitad la de la AMB.

Por último, la combinación de Nb3 con FCZ no produjo ningún tipo de efecto y su relación se definió como indiferente.

#### 4.3. Dinámica del Nb3 a través de la cápsula de *Cryptococcus*.

Con el objetivo de comprobar si el Nb3 era capaz de alcanzar su diana, es decir, *CnGel* en *C. neoformans* y *C. deneoformans* y *Gel4* en *A. fumigatus* y si las diferencias en la actividad que tiene frente a serotipo A y serotipo D están basadas en una menor capacidad de acceso a la localización de su diana, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia en microscopía confocal, utilizando sondas fluorescentes para marcar la pared celular, la cápsula en el caso de *Cryptococcus* y el propio Nb3. Como se mencionó en la introducción, la cápsula de *Cryptococcus* es una estructura compuesta fundamentalmente por polisacáridos capaces de ocultar otras partes más antigénicas presentes en las estructuras extracelulares de *Cryptococcus*, entre otras funciones. Posiblemente, el polisacárido de la cápsula de *Cryptococcus* pudiera impedir el acceso del Nb3 a su diana que, presumiblemente, se encuentra debajo de dicha cápsula.

Tanto *Gel4* como *CnGel* son enzimas con anclaje GPI por lo que, presumiblemente, son proteínas que se encontrarán en la membrana. Además, como se ha descrito en la introducción, también han sido detectadas en exosomas, tanto en *Aspergillus* como en *Cryptococcus*, por lo que, probablemente, su destino sea la pared celular o, en general, el exterior celular. Por tanto, usando una sonda fluorescente que marcase la pared, que en este caso fue calcofluor, y otra que marcase la cápsula (mab18B7-FITC), mediante microscopía confocal, se comprobó la localización del Nb3 marcado con una tercera sonda fluorescente (Cy5). Si el Nb3 era capaz de localizarse más internamente de la circunferencia que formaría la cápsula en una imagen del microscopio confocal de una célula en 2D significaría que el Nb3 es capaz de atravesar esta estructura y alcanzar las posibles ubicaciones de su diana. Para ello, se marcaron células de *Cryptococcus* de todas las cepas empleadas a lo largo de este estudio, así como de *A. fumigatus* B5233, como se describe en materiales y métodos, con mab18B7-FITC, calcofluor y Nb3-Cy5; y se procedió a examinar la fluorescencia de las muestras mediante microscopía confocal usando la misma intensidad de la fuente, así como la misma ganancia y objetivo.



**Figura 22:** Imágenes de microscopía confocal de células de *C. deneoformans* 1229817 (A), JEC-21 (B), B3501 (C) y B3501 Cap67 (D); *C. neoformans* H99 (E), H99 Cap60 (F) y *A. fumigatus* B5233 (G). Para cada microorganismo, las tres primeras imágenes se corresponden con los canales individuales para la pared (azul), la cápsula (verde) y para la localización del Nb3 (rojo); mientras que, la última imagen se corresponde con la fusión de las otras 3, a excepción de *A. fumigatus* B5233, donde no se empleó mab18B7-FITC puesto que es un organismo que carece de cápsula. Fotografías tomadas con un objetivo 63x y 3 aumentos de zoom digital.

Como se puede apreciar en la Figura 22, el calcofluor marcó más o menos homogéneamente en todas las preparaciones, aunque, en general, quizás se pueda apreciar algo más de intensidad en el serotipo A que en las del D. Por otra parte, el anticuerpo 18B7-FITC marcó una estructura concéntrica superpuesta a la pared que había sido teñida con el calcofluor, siendo esta la cápsula. En este caso, las cápsulas de *C. neoformans* H99, así como las de *C. deneoformans* B3501, JEC-21 y 1229817 tenían un tamaño similar, no muy grande, probablemente porque habían sido cultivadas 24h en un medio rico y, prácticamente, del mismo espesor en todos los casos. Sin embargo, pese a no haber sido cultivadas en un medio especialmente propicio para el desarrollo de cápsula, las células del mutante de *CnGel* (Figura 11G) aparentemente poseen una cápsula más grande y/o más distendida que la del resto de sus compañeros. Por último y, como cabría esperar, las cepas acapsulares B3501 Cap67 y H99 Cap60 no mostraron fluorescencia debida al marcaje con FITC del mab18B7 puesto que no poseen cápsula exterior.

Respecto al Nb3-Cy5, tras 15 min de incubación, como se detalla en materiales y métodos, se encuentra formando una circunferencia concéntrica e interior a la cápsula en todas las cepas de *Cryptococcus* excepto en la mutante de *CnGel*. Además, esa circunferencia concéntrica a la cápsula formada por el Nb3 colocaliza con la pared de *Cryptococcus*, como se puede apreciar en las imágenes fusionadas para cada cepa. Esto hace indicar, por un lado, que el Nb3 sí que es capaz de atravesar la cápsula de *Cryptococcus* independientemente del serotipo y, por otra parte, que el Nb3 probablemente se une a su diana localizada en la pared fúngica. Por último, aunque la distribución de Nb3 por la pared parece relativamente homogénea, pueden apreciarse ciertas zonas de acumulación. De hecho, asumiendo que estas células tienen cierta forma elipsoidal, es en los vértices de la elipse donde se aprecia algo más de intensidad de fluorescencia.

En último lugar (Figura 22 H), se puede apreciar el borde de una hifa de *A. fumigatus* B5233 donde el color azul cian se corresponde de nuevo con la pared fúngica y el rojo, que colocaliza a la perfección con el azul, se trata del Nb3-Cy5. Dado que *A. fumigatus* es un organismo no encapsulado, no se añadió el anticuerpo frente a la cápsula de *C. neoformans*, por lo que solo se recogió información de dos canales y la foto fusionada solo muestra el Nb3-Cy5 junto con el calcofluor. Puesto que, en este caso, *Gel4* también localice en la pared, es probable que el Nb3-Cy5 se une a su diana y se acumule en la pared fúngica, lugar donde, presumiblemente, participa en la remodelación y/o síntesis de la pared.

#### 4.4. Estudio de la composición de la pared de *Cryptococcus*.

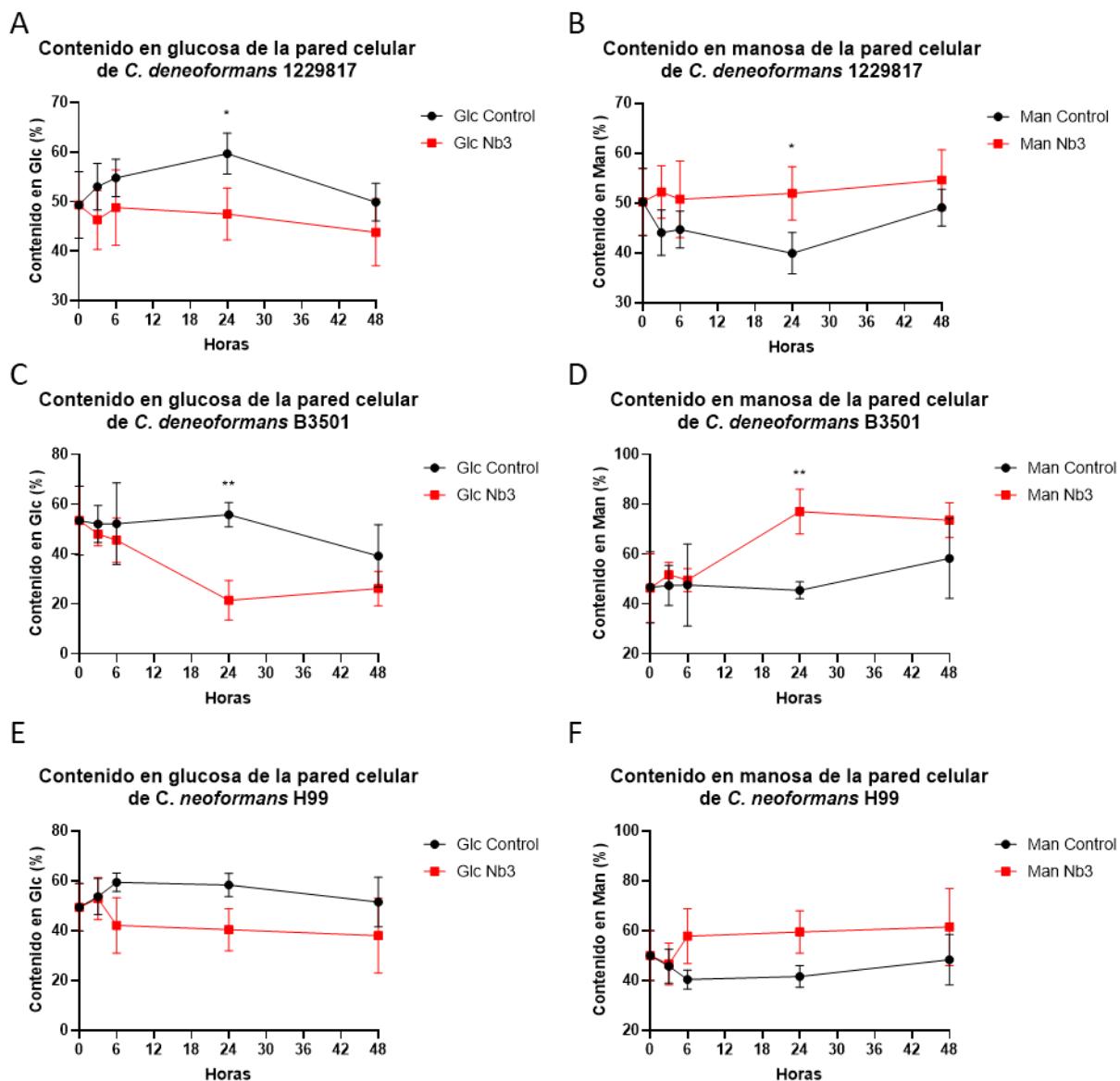
Conociendo ya que el Nb3 es capaz de inhibir la actividad de *Gel4* *in vitro*, que inhibe el crecimiento de cultivos de *Aspergillus* y de *Cryptococcus* y que puede atravesar ciertas barreras físicas como la cápsula de *Cryptococcus*, se procedió a comprobar si el Nb3 podía ejercer un efecto sobre la relación de monosacáridos que componen la pared. Es decir, si la adición de Nb3 suponía un cambio en la composición química de la pared de *Cryptococcus*.

En primer lugar, y procediendo como se describe materiales y métodos, se llevaron a cabo cinéticas en las cuales se monitorizó la cantidad de glucosa, manosa y N-acetilglucosamina, monosacáridos que pertenecen a alfa y beta glucanos, polisacáridos de la cápsula y quitina y quitosano, respectivamente. Para ello, se cultivaron varias especies del género *Cryptococcus*, concretamente *C. deneoformans* 1229817, *C. deneoformans* B35101 y *C. deneoformans* H99 durante 3, 6, 24 y 48 horas en presencia de 128 µg/mL de Nb3, tiempos a los cuales se extrajeron las células de *Cryptococcus* y se extrajeron los monosacáridos simples que forman parte de sus paredes y cápsulas mediante digestión ácida.

Los resultados de estas cinéticas, que se recogen en la Figura 23, muestran que, en general, sí que se produce una variación en las proporciones de glucosa y manosa al comparar cultivos no tratados (control) y los tratados con Nb3. En el caso de *C. deneoformans* 1229817, organismo central a lo largo de este trabajo, se puede observar que en todos los tiempos la proporción de glucosa es menor en los cultivos tratados con Nb3, aunque únicamente tiene significancia estadística la diferencia a las 24h de contacto. Respecto a la manosa, recogida en la Figura 23B, se puede apreciar que su presencia es mayor en cultivos con Nb3 que en los controles. De nuevo, únicamente el punto a las 24h fue significativo y, al igual que para la glucosa, las proporciones tienden a igualarse a partir de las 48h. En general, la proporción de glucosa de los cultivos control a lo largo del tiempo creció hasta un máximo del 60%, antes de volver a caer al 50%. Sin embargo, la proporción de glucosa en los cultivos tratados con Nb3 disminuyó lentamente durante todo el experimento.

De igual manera, la cepa B3501, mostró un patrón parecido al anterior. La proporción de glucosa acomplejada formando parte de los glucanos de la pared se mantuvo relativamente estable, en torno al 60%, reduciéndose a partir de las 48h y, de igual manera, la proporción de manosa también se mantuvo estable hasta las 48h. Sin embargo, el Nb3 indujo una reducción constante de la proporción de glucosa de los extractos, llegando a ser significativa respecto al mismo punto en los no tratados también a las 24h. Por otra parte, la relación de manosa en los cultivos

tratados con Nb3 llegó a alcanzar cifras de hasta casi el 80% a partir de las 24h de cultivo, prácticamente el doble que en los cultivos no tratados.

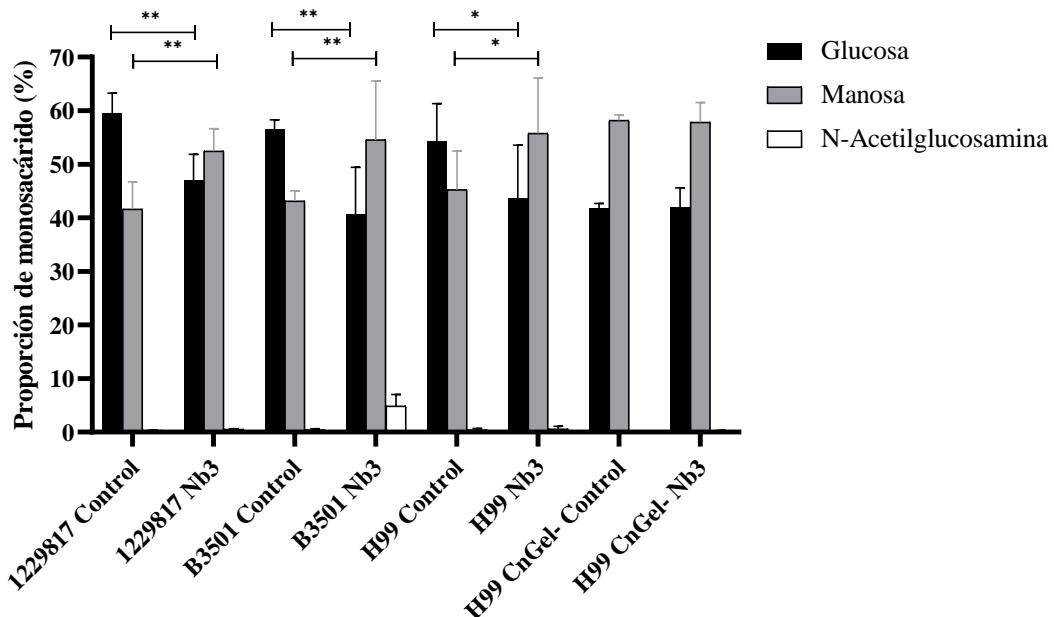


**Figura 23:** Evolución del contenido en glucosa y manosa entendidos como principales monosacáridos de la pared y la cápsula de *Cryptococcus*, respectivamente, en cultivos de *C. deneoformans* 1229817 (A y B), *C. deneoformans* B3501 (C y D) y *C. deneoformans* H99 (E y F) en presencia de Nb3. Two Way ANNOVA \* p<0.05, \*\* p<0.01.

Por último, en el caso de *C. neoformans* H99 (Figura 23 E y F), el efecto general fue menos diferenciado que en las cepas del serotipo D. De hecho, al comparar la evolución del contenido de glucosa entre cultivos tratados y no tratados, se puede apreciar que a partir de las 6h de cultivo se genera una pequeña diferencia del 10-20% que se mantiene hasta el final del

experimento, pero no llega a haber ningún punto significativo, estadísticamente hablando. No obstante, el valor  $p$  para la comparación de los puntos de 6h y 24h estaba alrededor de 0.1.

Hay que indicar que, pese a que se monitorizó también la concentración de N-acetilglucosamina durante todos los experimentos, en la mayoría de los casos, aunque detectable, su concentración se encontraba en torno al límite de detección del equipo y, salvo en contadas ocasiones, siempre menor al 1%.



**Figura 24:** Composición de glucosa, manosa y N-acetilglucosamina en cultivos de *C. deneoformans* 1229817 y B3501 y *C. neoformans* H99 y H99 CnGel- tratados o no con Nb3 durante 24h. Two Way ANNOVA \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

Una vez que la máxima diferencia en proporción de glucosa y manosa fue determinada a las 24h, se llevó a cabo un nuevo experimento similar al anterior, pero con la excepción de que solo se tomó un único punto a las 24h y, además, se añadió la cepa mutante para *CnGel* de *C. neoformans* H99. En la Figura 24, donde se recogen estos experimentos, se puede apreciar que las proporciones de glucosa y manosa tras 24h de cultivo en un medio rico, como es el RPMI 1640, son bastante similar para *C. deneoformans* 1229817 y B3501 y *C. neoformans* H99, de un  $\approx 60\%$  para la glucosa y un  $\approx 40\%$  en todos los cultivos sin Nb3. Sin embargo, al tratar con Nb3, las proporciones tienden a invertirse ( $\approx 40\%$  de glucosa y  $\approx 60\%$  de manosa) en los tres casos, siendo ligeramente más acusada en el caso de *C. deneoformans* B3501 donde, además, fue el

único caso donde se detectó N-acetilglucosamina ( $\approx 7\%$ ) en una proporción sustancialmente mayor comparado con el resto de cultivos y condiciones (1% o menos).

Junto a esto, se introdujo en este experimento la cepa mutante de *CnGel*-, donde la proporción de glucosa y manosa no cambió en presencia de Nb3, sugiriendo que el efecto observado en las otras cepas es debido a la adición de Nb3 al medio. Además, fue interesante observar que el perfil de monosacáridos de la cepa H99 *CnGel*-, independientemente de si se le añadió Nb3, es idéntico a las proporciones que se observan en los cultivos tratados con Nb3 de las otras cepas. Aunque no se indicó en la Figura 24, los cultivos de *C. neoformans* H99 *CnGel*- son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a los cultivos control de las otras cepas, indicando que la ausencia de *CnGel* genera un efecto semejante al que se genera tras la inhibición de *CnGel* con Nb3.

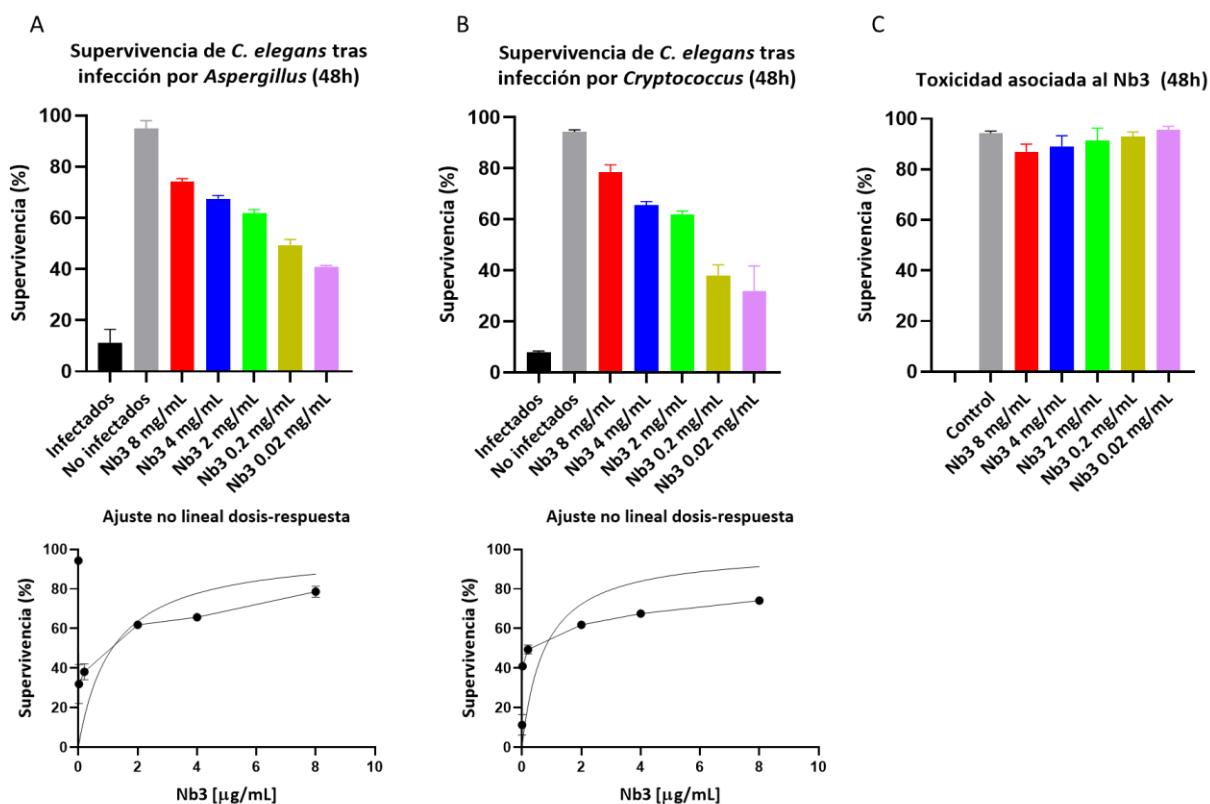
#### 4.5. Modelos de aspergilosis y criptococosis en nemátodos.

Una vez finalizada la caracterización del efecto del Nb3 sobre cultivos de *Aspergillus* y *Cryptococcus*, se procedió al diseño de modelos animales para aspergilosis y criptococosis con el objetivo de ensayar la eficacia del Nb3 más allá de la inhibición del crecimiento *in vitro*. A la hora de diseñar y ensayar un nuevo fármaco, aunque en última instancia siempre sea necesario probar su eficacia en un modelo de enfermedad en animales superiores, empezar por modelos de nemátodos aporta ventajas como la disposición de un número elevado de individuos para el experimento concreto, así como la rapidez en la ejecución de este.

Para ello, en un primer momento se llevó a cabo una valoración del efecto del Nb3 añadido a diferentes concentraciones sobre cultivos de larvas en estado L4 de *C. elegans* infectados con *Aspergillus* y *Cryptococcus* (Figura 25), a los cuales las larvas habían sido expuestas las 12 horas previas al tratamiento. Tras ese periodo de infección, las larvas de *C. elegans* fueron repartidas en placas de 96 pocillos en contacto o no con Nb3 y su supervivencia se comparó frente a cultivos de larvas de *C. elegans* sin infectar. En cada experimento, se sembraron 3 pocillos con unos 20 gusanos cada uno por cada condición ensayada y los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

En el caso de la infección por *A. fumigatus* B5233, la supervivencia tras 48h de infección en animales no tratados es de poco más del 10%, mientras que la supervivencia de animales no infectados es de alrededor del 95%. Cuando los animales infectados se sometieron a concentraciones variables de Nb3, la supervivencia máxima se obtuvo con la concentración

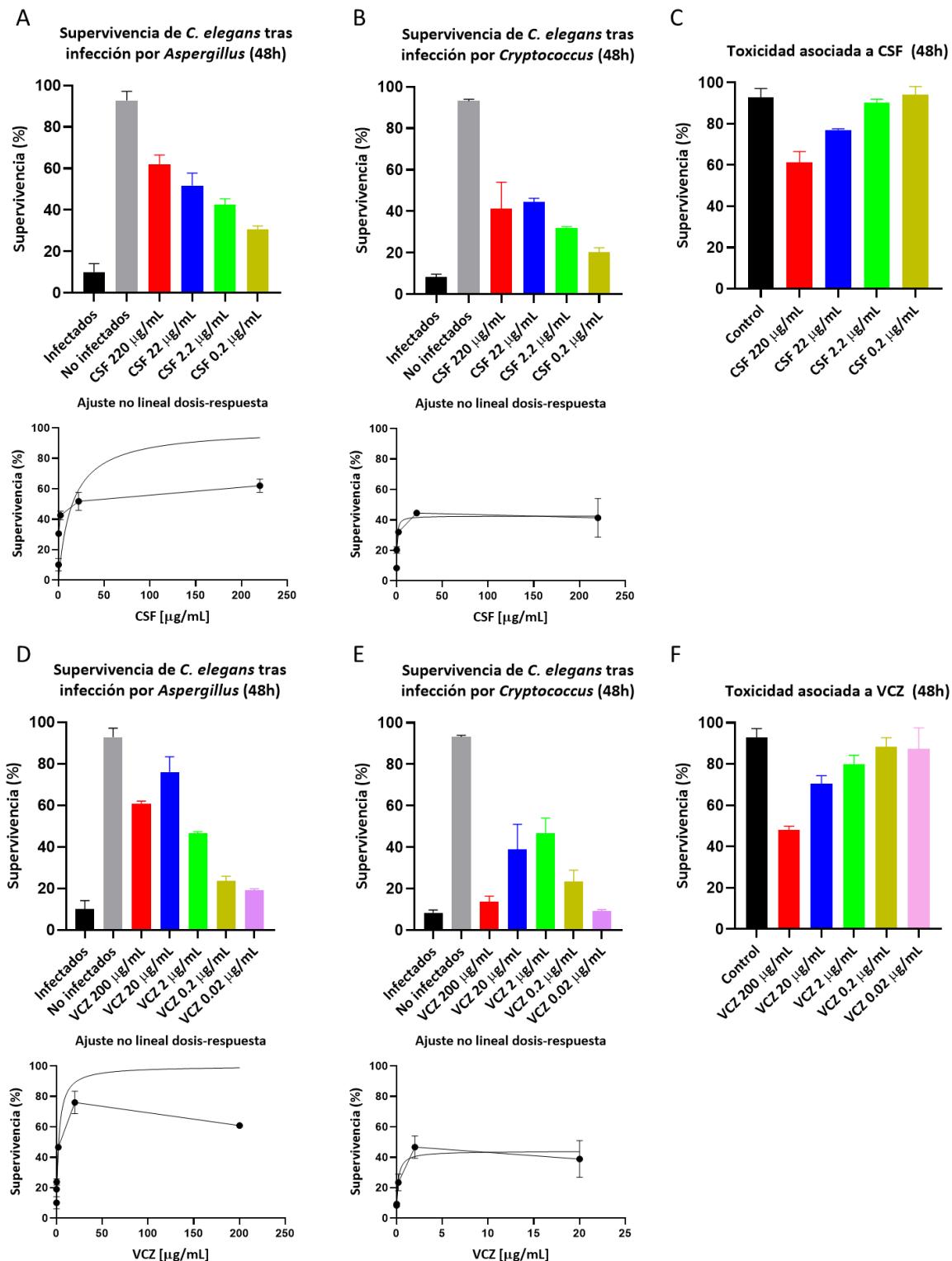
máxima de Nb3 aplicada en este ensayo (8 mg/mL). Conforme se disminuyó la dosis de Nb3, la supervivencia fue cayendo hasta algo menos del 40% de los individuos, alcanzada con la concentración mínima ensayada, 0.02 mg/mL, concentración a la cual el Nb3 apenas muestra actividad en los ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro* previos. Con los datos anteriores, se elaboró una curva dosis-respuesta para el tratamiento con Nb3 de *C. elegans* infectado con *A. fumigatus* con el cual se pudo calcular la EC<sub>50</sub> (concentración efectiva 50%), es decir, la concentración del fármaco a la cual se obtiene un 50% de supervivencia, que fue de 1.21mg/mL de Nb3.



**Figura 25:** Supervivencia a las 48h asociada al tratamiento con concentraciones variables de Nb3 en larvas en estado L4 de *C. elegans* AU37 infectadas con *A. fumigatus* B5233 (A), *C. deneoformans* 1229817 (B) o de larvas L4 no infectadas con ningún patógeno, pero sí sometidas al efecto del Nb3 con el objetivo de cuantificar la toxicidad asociada al tratamiento (C).

En el caso de las larvas infectadas con *C. deneoformans* 1229817 que no se sometieron a tratamiento con Nb3, la supervivencia tras 48h de ensayo fue menor del 10%, mientras que la supervivencia de los cultivos no infectados fue superior al 95%, al igual que en los experimentos del modelo de aspergilosis. De nuevo, dosis altas de Nb3 (8 mg/mL) condujeron a tasas de supervivencia de hasta un 80%, mientras que, con dosis bajas de Nb3, las tasas de supervivencia

se situaron entre un 30% y un 40%. En este caso, tras el ajuste no lineal de la curva dosis respuesta a 48h se obtuvo una EC<sub>50</sub> de 0.86 mg/mL.

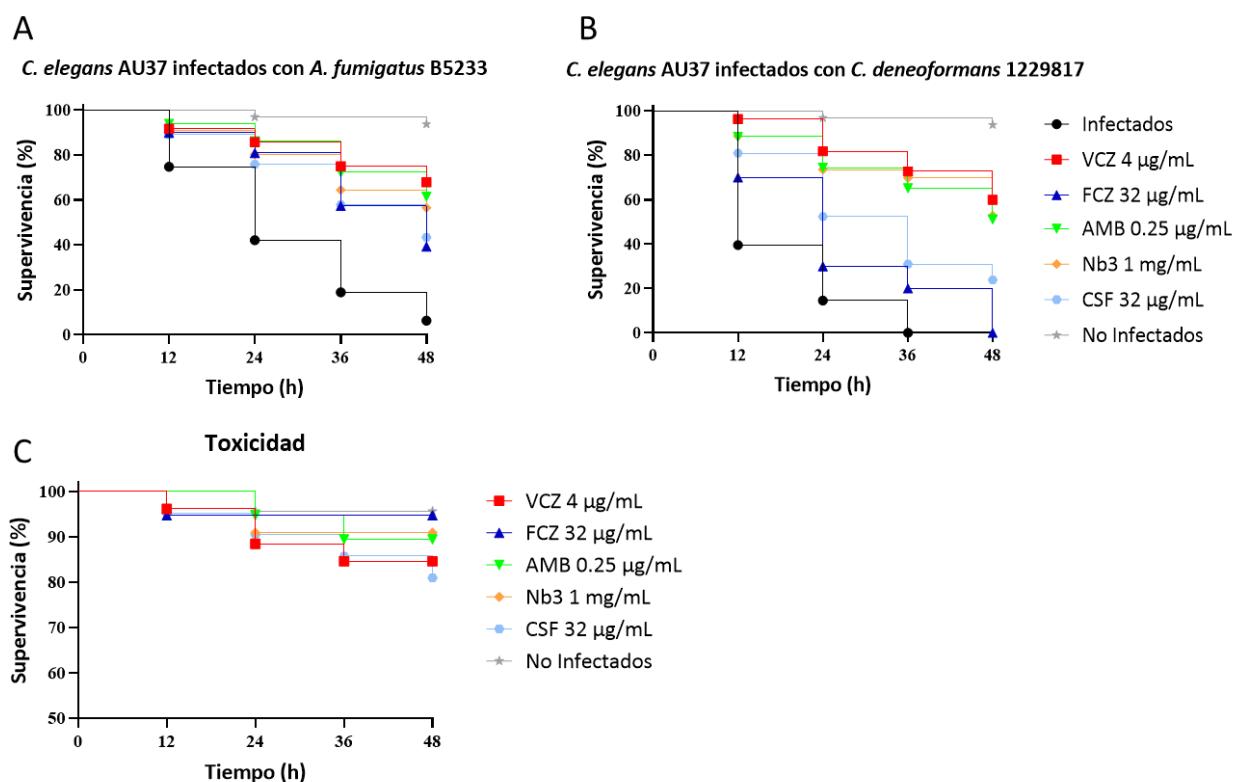


**Figura 26:** Supervivencia de larvas de *C. elegans* infectadas con *A. fumigatus* B5233 (A y D) y *C. deneoformans* 1229817 (B y E) y tratadas con concentraciones variables de CSF (A y B) y VCZ (D y E). (C y F) Toxicidades asociadas al tratamiento de animales no infectados con las mismas concentraciones de CSF y VCZ, respectivamente.

En paralelo, se valoraron diferentes concentraciones de CSF y VCZ en ambos modelos de aspergilosis y criptococosis (Figura 26). Para la CSF, las concentraciones ensayadas fueron de entre 220  $\mu\text{g/mL}$  y 0.22  $\mu\text{g/mL}$  y su efecto fue bastante discreto. En el caso de *A. fumigatus*, la CSF logró en torno a un 60% de supervivencia a 48h a la concentración máxima y dicho efecto disminuyó a medida que descendió la concentración. Es interesante que, a dosis bajas, muy por debajo de la  $\text{MIC}_{50}$  *in vitro*, se obtuvieron supervivencias de entre un 30 y un 40%. Sin embargo, en el caso de *Cryptococcus*, la CSF apenas logró un 50% de inhibición de crecimiento máximo a 22  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la supervivencia con una dosis 10 veces más alta (220  $\mu\text{g/mL}$ ) fue algo inferior. A diferencia de *Aspergillus*, las dosis bajas de CSF apenas protegieron a *C. elegans* de la infección por *Cryptococcus*. La  $\text{EC}_{50}$  calculada fue de 18.06  $\mu\text{g/mL}$  para *A. fumigatus*, mientras que para *C. deneoformans* no pudo ser calculada, aunque entre 22 y 220  $\mu\text{g/mL}$  prácticamente se alcanzaba el 40-50% de supervivencia. Junto a esto, también se realizaron valoraciones de las toxicidades en *C. elegans* asociadas al tratamiento con estos fármacos al poner en contacto las mismas concentraciones de CSF con animales no infectados por ningún hongo. Como se puede observar en la Figura 26, las dosis bajas de CSF apenas producen una variación en la supervivencia de *C. elegans* al compararla con individuos sanos no tratados. Sin embargo, las dosis altas, especialmente 220  $\mu\text{g/mL}$  redujeron la supervivencia hasta el 60% de los individuos.

De igual manera, y como se ha indicado arriba, se llevaron a cabo experimentos similares en ambos modelos de enfermedad, pero tratados con VCZ. En el modelo de aspergilosis, concentraciones de 20  $\mu\text{g/mL}$  de VCZ en el medio condujeron a un máximo de supervivencia a 48h de hasta un 75% de los individuos infectados por *Aspergillus*. Por otra parte, dosis menores de 0.2  $\mu\text{g/mL}$  de VCZ apenas mejoraron la supervivencia en comparación con los individuos infectados no tratados. Hay que indicar que la dosis máxima supuso menos de un 60% de supervivencia en individuos infectados, algo que puede estar relacionado con la elevada toxicidad del VCZ en la dosis máxima empleada en este estudio, donde la supervivencia apenas fue del 50%. En el caso de *Cryptococcus*, los resultados fueron algo más discretos, donde el máximo de supervivencia se alcanzó a 2 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de VCZ, y fue de alrededor del 50%. De nuevo, las dosis bajas apenas protegieron a *C. elegans* AU37 de la infección por *C. deneoformans* 1229817, al igual que la dosis máxima, donde la supervivencia apenas se diferencia de la del control. Respecto a la  $\text{EC}_{50}$ , fue de 2.459  $\mu\text{g/mL}$  para *Aspergillus* y, de nuevo, no se pudo calcular para *Cryptococcus*, aunque prácticamente se alcanzó el 50% de supervivencia entre 2 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de VCZ.

Una vez determinada la EC<sub>50</sub> del Nb3 para ambos modelos de enfermedad, se procedió a comparar la eficacia del Nb3 frente a otros fármacos de uso en clínica que se han ido usando a lo largo de este trabajo, como fueron la AMB, CSF, el VCZ y el FCZ. Para ello, se llevaron a cabo curvas de supervivencia para ambos modelos donde las concentraciones que se ensayaron fueron 0.25 µg/mL de AMB, 32 µg/mL de CSF, 32 µg/mL de FCZ y 4 µg/mL de VCZ frente a 1 mg/mL de Nb3. Se monitorizó la supervivencia de cada uno de los pocillos haciendo recuento de los individuos vivos cada 12 horas durante 72h. Al igual que en los experimentos anteriores, cada condición fue ensayada por triplicado en cada ensayo y se realizaron, al menos, 3 experimentos.



**Figura 27:** Curvas de supervivencia de larvas en estado L4 de *C. elegans* infectadas con *A. fumigatus* B5233 (A) y *C. deneoformans* 1229817 (B) y tratadas con VCZ, FCZ, AMB, CSF y Nb3. Toxicidad asociada al tratamiento con dichos fármacos en individuos no infectados.

Los resultados, recogidos en la Figura 27, muestran que todos los antifúngicos indujeron una protección semejante durante las primeras 24h de ensayo, otorgando una supervivencia general de en torno al 80% en todos los casos, frente al 40-50% de supervivencia de los individuos infectados no tratados en el modelo de aspergilosis. Sin embargo, al alcanzar las 48h, Nb3, AMB y VCZ todavía inducían protección, aportando entre un 60 y un 70% de supervivencia, aunque, sin embargo, la supervivencia ya había caído hasta el 40% en CSF y FCZ. Aunque no se muestra

en los resultados, la supervivencia a 72h resultó ser menor del 20% para todos los tratamientos exceptuando los pocillos tratados con VCZ 4  $\mu\text{g/mL}$ , donde aún se superaba el 30% de supervivencia.

Por otra parte, en el modelo de infección por *Cryptococcus*, la supervivencia a lo largo del tiempo de los individuos infectados y tratados con VCZ, Nb3 y AMB se comportó de manera semejante, obteniéndose, en última instancia, una supervivencia de alrededor del 60% en los 3 casos. No obstante, el efecto terapéutico de la CSF y del FCZ fue más discreto. La supervivencia a 48h para la CSF fue de un 35%, mientras que en el caso del FCZ ningún individuo vivió más de 48h, siendo la supervivencia, por tanto, del 0%. En comparación, todos los individuos infectados no tratados habían muerto a las 36h de experimento. Nuevamente, los ensayos se realizaron hasta las 72h, aunque, como había ocurrido en el modelo de aspergilosis, únicamente la supervivencia del VCZ se encontraba por encima del 20%, siendo la mayoría de ellas inferior al 10% de los individuos que comenzaron el ensayo. Además, aunque todavía quedase algún individuo vivo, resulta bastante complicado contar los animales vivos debido a que el hongo en crecimiento acaba enterrando los nemátodos del ensayo en el pocillo.

#### 4.6. Modelos murinos de aspergilosis y criptococosis.

En base a los buenos resultados obtenidos en los modelos de nemátodos de aspergilosis y criptococosis en términos de supervivencia por parte del Nb3, se decidió continuar con los ensayos de eficacia en modelos murinos. Para ello, se diseñaron dos modelos, uno para cada enfermedad, donde se administraron los inóculos de forma IN sobre individuos previamente inmunocomprometidos farmacológicamente, como se describe en detalle en la sección 6 de materiales y métodos. Sobre dichos animales se llevaron a cabo diferentes ensayos de supervivencia con tratamiento administrado posteriormente a la infección, en profilaxis o tardío; así como determinaciones de carga fúngica, cuantificaciones de toxinas asociadas a la infección o de Nbs administrados y tinciones histológicas de los órganos afectados.

Como es de esperar, la mayoría de los estudios están centrados en la eficacia del Nb3 como fármaco en el tratamiento de ambas enfermedades, aunque, además, también se ensayaron otros Nbs como el Nb2 y el Nb control NbSsek-1. Junto a ello, en el modelo de aspergilosis también se comparó la eficacia del Nb3 frente a otros fármacos habituales en clínica como la AMB o el VCZ. Por último, en los tratamientos profilácticos también se valoró la eficacia de diferentes dosis de Nb3 en la supervivencia de los ratones infectados.

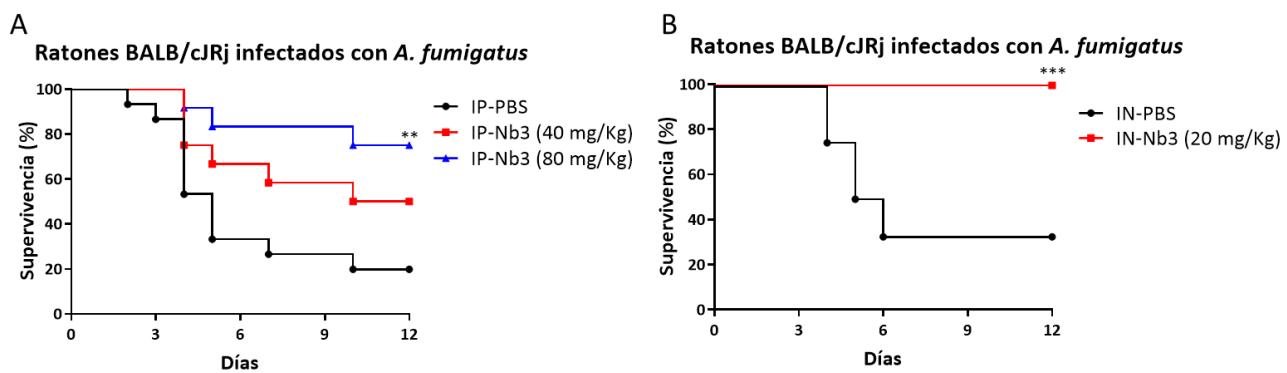
#### 4.6.1. Modelo murino de aspergilosis.

Ratones hembra BALB/cJRj fueron tratados con hidrocortisona y ciclofosfamida, como se describe en materiales y métodos para el modelo de aspergilosis, e infectados intranasalmente con *A. fumigatus* B5233, siendo estos procedimientos comunes a todos los experimentos. A partir de aquí, diferentes tratamientos y/o procedimientos fueron utilizados en los diferentes individuos del ensayo, como se describe más detalladamente a continuación.

##### 4.6.1.1. Eficacia del Nb3 como tratamiento profiláctico contra la AI.

En un primer momento, ratones BALB/cJRj infectados con *A. fumigatus* B5233 fueron tratados intraperitonealmente con vehículo (PBS) o Nb3 a razón de 40 y 80 mg/Kg todos los días durante una semana. La primera dosis de tratamiento se administró a la vez que la infección, por lo que puede considerarse tratamiento profiláctico al no haber esperado, al menos, 24h a que se estableciese la infección en el organismo de los ratones. Como se muestra en la Figura 28A, la supervivencia de los ratones tratados con vehículo intraperitonealmente en este experimento se redujo hasta menos del 20% durante 12 días, siendo la mediana de la supervivencia 5 días, entendida como el tiempo máximo hasta el cual la mitad de los individuos siguen vivos. La administración de una dosis de 40 mg/Kg de Nb3 IP mejoró bastante la supervivencia de los ratones, extendiendo la mediana de la supervivencia hasta 12 días, tiempo final de este experimento donde la supervivencia fue exactamente del 50%. Aunque al comparar estas dos curvas de supervivencia el resultado no fue estadísticamente significativo, el valor p fue de 0.07, indicando que sí existe diferencia entre tratar a esa dosis o no hacerlo, aunque no es lo suficientemente potente como para ser significativo. Sin embargo, el tratamiento con una dosis de 80 mg/Kg proporcionó una supervivencia a 12 días del 75% de los individuos, siendo esta vez significativo al compararse con el grupo control. Hay que indicar que, como la supervivencia del grupo tratado con 80 mg/Kg de Nb3 no bajó del 50%, no se pudo calcular la mediana de la supervivencia.

En una segunda tanda de experimentos, se decidió comparar la eficacia del Nb3 administrado intranasalmente a una dosis bastante menor que las anteriores (20 mg/Kg) frente a la administración IN de vehículo solo. Los resultados, recogidos en la Figura 28B, muestran una mediana de supervivencia de 5 días y medio, así como una supervivencia final a 12 días del 25%. Sin embargo, la administración IN de 20 mg/Kg de Nb3 condujo a la supervivencia de los doce ratones sobre los que se ensayó esta condición, es decir, a un 100% de supervivencia.

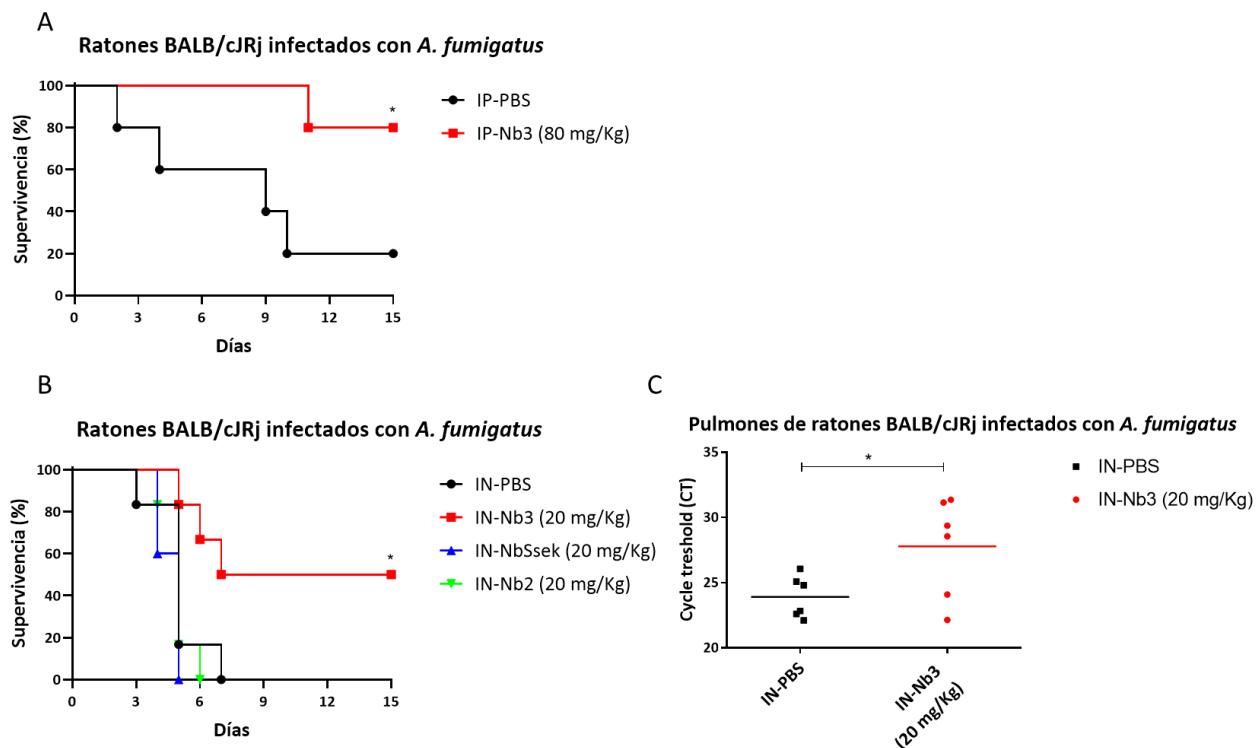


**Figura 28:** Supervivencia de ratones BALB/cJRj tratados en profilaxis intraperitonealmente (A) o intranasalmente (B) con vehículo o Nb3. (A) Un total de 36 ratones infectados con *A. fumigatus* B5233 fueron divididos en 3 grupos y se les administraron 100  $\mu$ L de PBS o Nb3 IP en una dosis de 40 u 80 mg/Kg. Se monitorizó su supervivencia durante 12 días tras la infección. Mantel-Cox valor p (\*\*\*)  $<0.001$  para la comparación de las curvas de supervivencia del grupo control (vehículo) respecto al Nb3 administrado a 80 mg/Kg intraperitonealmente. (B) 24 ratones infectados de forma similar con *A. fumigatus* fueron tratados intranasalmente con 20  $\mu$ L de PBS o de Nb3 a razón de 20 mg/Kg y se monitorizó su supervivencia. Mantel-Cox valor p (\*\*\*\*)  $<0.0001$  para la comparación de las curvas de supervivencia del grupo control (vehículo) respecto al Nb3 administrado a 20 mg/Kg intranasalmente.

#### 4.6.1.2. Eficacia del Nb3 como tratamiento de la AI.

Una vez concluidos los experimentos de tratamiento profiláctico comenzaron los ensayos del uso del Nb3 como tratamiento de la AI activa, es decir, administrado una vez que el patógeno, en este caso *Aspergillus*, ya ha establecido la infección en el hospedador. Para ello, ratones BALB/cJRj infectados con *A. fumigatus* B5233 fueron tratados intranasalmente con Nb2, Nb3, NbSseK1 o vehículo (PBS) a razón de 20 mg/Kg cada uno, o intraperitonealmente con vehículo o Nb3 a una dosis de 80 mg/Kg 24h después del momento de la inoculación del patógeno todos los días durante una semana.

Como se muestra en la Figura 29A, la administración IP de vehículo 24h después de la infección resultó en una supervivencia a 15 días de alrededor del 20%, aunque en comparación con otros experimentos, la mediana de la supervivencia se desplazó hasta 9 días respecto a 5 días, que fue el valor más habitual para el resto de experimentos. Sin embargo, la administración IP de Nb3 a 80 mg/Kg indujo un 80% de supervivencia en los ratones que fueron sometidos a ese tratamiento, siendo estadísticamente significativo cuando se comparó con el control y mostrando eficacia como tratamiento de la AI.



**Figura 29:** Ensayos de supervivencia de ratones BALB/cJRj infectados con *A. fumigatus* B5233 y tratados con vehículo y Nb3 a 80 mg/Kg de forma IP (n=12) (A) o tratados con Nb2, Nb3 y NbSseK1 (n=24) por vía IN a razón de 20 mg/Kg (B) una vez al día durante 1 semana siendo la primera dosis administrada 24h después de haber sido infectados. Mantel-Cox valor p (\*) <0.05 para la comparación de las curvas de supervivencia del grupo control (vehículo) respecto al Nb3 en ambas formas de administración. (C) 12 ratones infectados con *A. fumigatus* y tratados con vehículo o Nb3 por vía IN fueron sacrificados a los 4 días de haber sido infectados y sus pulmones fueron homogenizados para poder determinar la carga fúngica mediante PCR cuantitativa. Test t valor p (\*) <0.05.

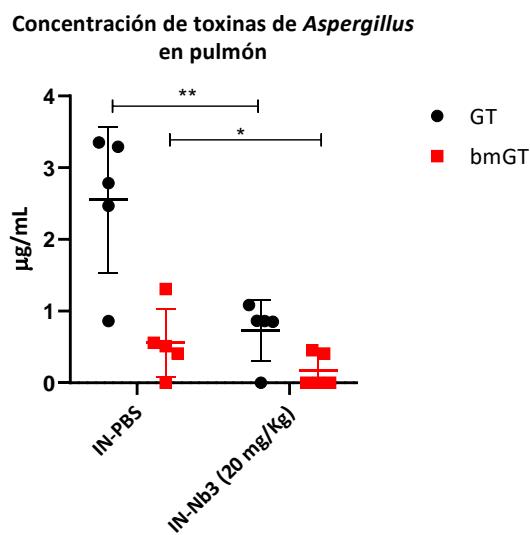
Respecto al experimento con administración IN (Figura 29B), la mediana de la supervivencia del grupo al que solamente se le administró vehículo volvió a ser 5 días, aunque en este caso los ratones control no vivieron más de 7 días. Similar suerte corrieron los ratones tratados con Nb2 y NbSseK1, cuyas curvas de supervivencia fueron muy semejantes a la de los ratones control y cuyas medianas de supervivencia volvieron a ser 5 días en ambos casos. Como era de esperar, el Nb control NbSseK1 no ejerció ningún tipo de actividad en la supervivencia del grupo de ratones al que se le administró. En el caso del Nb2, aunque había mostrado actividad inhibitoria *in vitro* sobre *Gel4*, ya no mostró efecto sobre el crecimiento de cultivos de *A. fumigatus* en los experimentos de sensibilidad a antifúngicos tampoco mostró efecto *in vivo*. Frente a ellos, el grupo al que se le administró Nb3 a razón de 20 mg/Kg logró obtener una supervivencia del 50% frente al grupo de ratones control, siendo estadísticamente significativo y, por tanto, induciendo protección en los ratones a los que se les administró frente a la AI.

Por último, se evaluó la carga fúngica en pulmones de ratones infectados con *Aspergillus* mediante PCR cuantitativa (Figura 29C). Para ello, 12 ratones fueron infectados de la forma habitual y se les administró Nb3 o vehículo por vía IN siendo la primera dosis 24h después de la infección. Se continuó tratando con vehículo o Nb3 hasta el cuarto día post infección, momento en el que los ratones fueron sacrificados y sus pulmones biopsiados y homogenizados para la PCR que se llevó a cabo a continuación. En general, el número de ciclos necesario para alcanzar el umbral de fluorescencia (CT) fue bastante menor en el grupo de ratones tratados con vehículo, cuya media fue de 23.71 ciclos, en comparación con el de los ratones a los que se les administró Nb3 por vía IN a razón de 20 mg/Kg (27.78 ciclos); indicando que los ratones tratados con Nb3 tenían, en general, menor carga fúngica.

#### 4.6.1.3. Determinación de los niveles de GT y bmGT en biopsias de pulmón mediante cromatografía líquida.

Como se describió en la introducción, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de nuevos marcadores para detectar las enfermedades fúngicas, así como para medir la progresión de la enfermedad. En el caso de la AI, uno de esos marcadores estudiados fue la bmGT, así como su metabolito activo, la GT. Dado que la monitorización de los niveles de bmGT en sueros de pacientes con aspergilosis ha sido una de las líneas de investigación de nuestro grupo, se decidió cuantificar los niveles de GT y bmGT en ratones infectados con *A. fumigatus* y tratados intranasalmente con vehículo o Nb3 (20 mg/Kg) 24h después de la infección.

Como se muestra en la Figura 30, se pudo detectar GT en extractos de pulmón en todos los individuos y su concentración media fue de 2.5 µg/mL, niveles sustancialmente superiores a los detectados en los ratones tratados con Nb3, donde la media fue de 0.8 µg/mL y no se detectó GT en uno de los individuos. Respecto a la bmGT, sus niveles fueron inferiores en comparación con los de GT en general, aunque se siguieron observando diferencias entre ratones tratados con Nb3 y los ratones control. De media, los niveles de bmGT en los ratones del grupo control fueron de 0.55 µg/mL y hubo un ratón donde no se detectó, mientras que en los ratones tratados con Nb3 IN la media se redujo a tan solo 0.15 µg/mL, en parte debido a que 3 de los 5 ratones no tenían niveles detectables de bmGT.

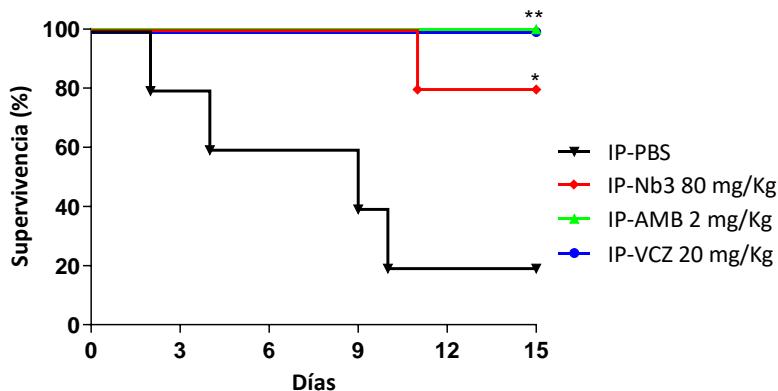


**Figura 30:** Niveles de GT y bmGT en biopsias de pulmón de ratones con aspergilosis tratados con vehículo o con Nb3 (20 mg/Kg). Un total de 12 ratones, 6 por grupo, fue infectado con *A. fumigatus* como se describe en materiales y métodos y se les administró Nb3 o vehículo por vía IN hasta el cuarto día de la infección. En ese momento, fueron sacrificados, sus pulmones homogenizados y la GT y la bmGT extraídas con DCM y sus concentraciones ensayadas mediante HPLC. Test t valor p (\*) <0.05 al comparar la bmGT en ratones tratados con PBS o con Nb3 y (\*\*) <0.01 para la GT en ratones tratados con Nb3 y ratones control. Un ratón por grupo fue sacrificado el día anterior por motivos humanitarios y, por tanto, excluidos de este experimento.

#### 4.6.1.4. Estudio comparativo de la eficacia del Nb 3 como tratamiento de la AI frete a otros fármacos de uso común

Tras caracterizar el efecto del Nb3 sobre la supervivencia o la carga fúngica presente en ratones afectados por aspergilosis, se procedió a comparar el efecto terapéutico del Nb3 sobre este modelo con AMB y VCZ, dos de los fármacos más empleados en el tratamiento de las aspergilosis. Para ello, se monitorizó la supervivencia de 24 ratones infectados con *A. fumigatus* y tratados intraperitonealmente con vehículo, Nb3, AMB y VCZ a razón de 80, 2 y 20 mg/Kg, respectivamente. Como se aprecia en la Figura 31, ambos tratamientos convencionales lograron salvar al 100% de los individuos, mientras que, en el caso del Nb3, falleció un individuo, por lo que la supervivencia a 15 días fue del 80%, muy por encima del 20% de supervivencia a 15 días en los ratones a los que se les había administrado únicamente vehículo de forma IP. De hecho, al comparar las curvas de supervivencia de los tres tratamientos (Nb3, AMB y VCZ) frente a la curva de los ratones control mediante el test de Mantel-Cox, todas ellas fueron significativamente diferentes, especialmente las de los dos tratamientos aprobados para uso en clínica. No obstante, el Nb3 también mostró poder terapéutico al ser comparado mediante el mismo test a las dos curvas de supervivencia de los otros fármacos, donde no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

### Ratones BALB/cJRj tras infección con *A. fumigatus*



**Figura 31:** Comparativa de la supervivencia a 15 días inducidas por el tratamiento con Nb3, AMB o VCZ sobre ratones infectados con *A. fumigatus* B5233. Para ello, se monitorizó la supervivencia de los 24 ratones (6 por grupo) que fueron tratados diariamente durante una semana con PBS, Nb3, AMB y VCZ. Mantel-Cox valor p (\*) <0.05 y (\*\*) <0.01.

#### 4.6.1.5. Tinciones de HE de pulmones de ratones afectados por aspergilosis.

En último lugar, se procedió a evaluar la eficacia del Nb3 como tratamiento de la AI en ratones mediante la elaboración de cortes histológicos de pulmones de individuos infectados con *Aspergillus* teñidos con HE de los cuales se elaboró una puntuación basada en la gravedad de una serie de afecciones descritas a continuación. Para ello, ratones infectados con *Aspergillus* recibieron la primera dosis de Nb3 o solo vehículo de forma IP a las 24h de haber sido infectados, recibiendo un total de dos dosis ya que fueron sacrificados al tercer día de la infección. Con cuidado de no dañarlos, sus pulmones fueron extraídos, fijados y teñidos con HE, y preparados para visualizarse al microscopio.

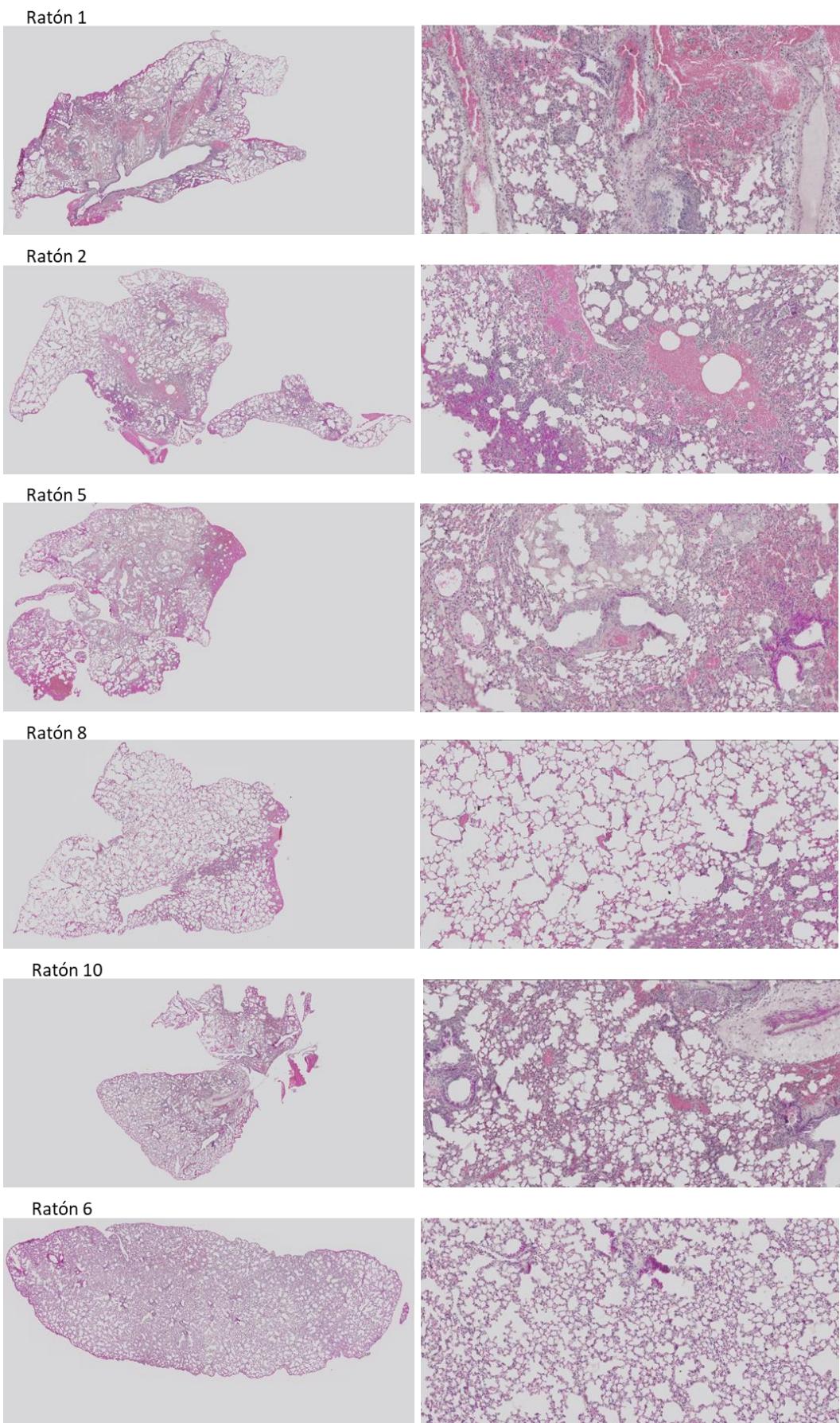
Al observar las preparaciones al microscopio, entre las alteraciones o afecciones más comunes caracterizadas en los cortes histológicos de pulmón de este estudio se encuentran la inflamación intersticial, la hemorragia, la bronquiolitis, la fibrosis o el edema. En la Figura 32 se recogen cortes histológicos representativos de ratones a los que solo se les administró vehículo (ratones 1, 2 y 5), ratones a los que se les administró Nb3 (ratones 8 y 10), junto al corte de pulmón de un ratón sano (ratón 6). De cada corte histológico de los pulmones de los ratones afectados por aspergilosis se muestra una imagen general de todo el corte, así como una imagen detallada o ampliada a su derecha.

Comenzando por la inflamación intersticial, entendida como la acumulación de células inflamatorias en los intersticios pulmonares, es decir, en los espacios que separa un alvéolo de otro, o de otras estructuras como un vaso sanguíneo, se puede evidenciar en todos los ratones a excepción del ratón sano (ratón 6). No obstante, esta afección no es igual de intensa en todos los ratones, siendo especialmente marcada en los ratones tratados con vehículo (1, 2 y 5). En el caso del ratón 10, tratado con Nb3, también se puede apreciar inflamación intersticial bastante

extendida y, sin embargo, aunque también presente, mucho menos intensa y extendida. De hecho, la mayor parte del corte de pulmón de este último ratón aparentemente no tiene inflamación intersticial, al igual que el ratón sano (ratón 6).

La siguiente afección en ser analizada fue la hemorragia, cuya presencia es bastante evidente al poder observarse directamente en los cortes histológicos zonas donde se acumulan hematíes y donde, obviamente, no deberían estar. Dichos hematíes presentan un intenso color rojo en las tinciones de HE y son fácilmente identificables. En las imágenes de los tres ratones tratados con vehículo, los ratones 1, 2 y 5, se pueden observar amplias zonas de acumulación de hematíes en bronquios, intersticios y alvéolos, siendo especialmente evidentes en los dos primeros. De igual manera, también hay hemorragias en los ratones tratados con Nb3, aunque las zonas afectadas son de menor tamaño. De hecho, en el ratón 8, tan solo se observan algunas pequeñas acumulaciones de hematíes en intersticios, a diferencia de las hemorragias masivas que sufren los ratones 1 y 2. Como comparación, el corte histológico del ratón 6 no presenta ningún tipo de hemorragia (ratón sano).

La bronquiolitis, que es una afección de los bronquiolos producida por la inflamación de éstos o por su obstrucción debido a la acumulación de moco, se puede caracterizar en cortes histológicos de HE si se observan infiltraciones de células inflamatorias en ellos, si se descama su epitelio o si se aprecian zonas grisáceas en la luz de los bronquiolos que se corresponden con moco y otros exudados. En general, la bronquiolitis puede afectar negativamente a la cantidad de aire que puede alcanzar las partes más internas del sistema respiratorio (alvéolos) y, por tanto, a la respiración del individuo. En el corte ampliado del ratón 1, se puede apreciar en la parte superior el corte transversal de un bronquiolo donde se observa inflamación alrededor de él, junto con algo de descamación de su epitelio. En el ratón 2, se pueden apreciar 3 pequeños bronquiolos seccionados transversalmente donde se observa claramente descamación, así como inflamación a su alrededor. En los ratones tratados con Nb3, se observa únicamente inflamación en el número 10 alrededor de un bronquiolo situado en la parte izquierda de la imagen ampliada.



**Figura 32:** Cortes histológicos de pulmones de ratones BALB/cJRj infectados con *A. fumigatus* y teñidos con HE. Al cabo de 24h de la inoculación de Aspergillus, los ratones fueron tratados con PBS (vehículo) o Nb3 (80mg/Kg) por vía intraperitoneal una vez al día durante dos días, siendo sacrificados al día siguiente y sus pulmones biopsiados y fijados en formaldehído al 4%. En esta figura se muestran las imágenes generales de todo el corte realizado en cada pulmón, así como una sección de esa misma imagen ampliada y tomada con un objetivo 20x. Los ratones 1, 2 y 5 pertenecen al grupo al que solo se les administró vehículo, mientras que los ratones 8 y 10 pertenecen al grupo al que se le administró Nb3. En último lugar, el corte histológico perteneciente al ratón 6 se corresponde con el de un pulmón sin infectar con *A. fumigatus* B5233.

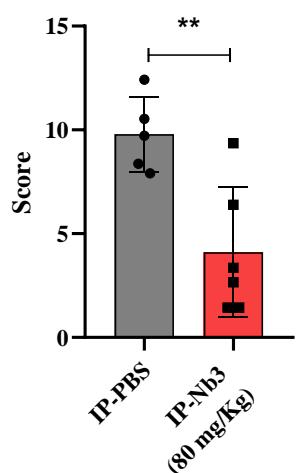
En lo que respecta al edema, que es la acumulación de líquidos en los espacios intersticiales o en los alvéolos, se pueden identificar estos intersticios dilatados, observándose mucho espacio entre los citoplasmas de las células que lo componen o, en el caso de acumulación en los alvéolos, éstos se presentan con una leve coloración rosácea fruto de la acumulación de líquido. Esta alteración fue quizás la más común, ya que se pudo apreciar con facilidad en todos los cortes histológicos de animales infectados, independientemente de si fueron tratados con Nb3 o únicamente con vehículo.

Por último, la fibrosis, que es la acumulación de tejido cicatrizal y fibras de colágeno en alvéolos e intersticios, en este caso puede ser causada por el daño tisular que induce el crecimiento del hongo en dicho tejido, así como el inducido por la respuesta del hospedador al patógeno. En los cortes de HE, puede ser identificado como zonas irregulares de color grisáceo que sustituyen a las paredes de los alvéolos u otras estructuras dañadas, con la consiguiente pérdida de función de dicha estructura. En los ratones 1 y 2 hay zonas fibrosas bastante evidentes y, sobre todo, en el ratón 8 es especialmente notoria. Al contrario que en los ratones control, en los ratones 8 y 10 las zonas fibróticas no son tan claras como en los tratados con vehículo.

En general, se puede afirmar que la pérdida de estructura alveolar es mucho más marcada en ratones que solo recibieron vehículo que en los que fueron tratados con Nb3.

Tras analizar un corte histológico de pulmón teñido con HE de cada uno de los individuos del ensayo, se procedió a generar una puntuación basada en la gravedad de cada una de las afecciones descritas, junto con una estimación del porcentaje de superficie del corte histológico sobre el que se extiende. De esta manera, se puntuó del 0 al 4 cada una de las afecciones, siendo 0 la ausencia de la afección concreta mientras que el 4 representa el grado máximo de afectación. La Figura 33 recoge la comparación de las puntuaciones histopatológicas obtenidas en el grupo control y en el grupo tratado con Nb3, mostrando una puntuación significativamente menor (menos afección) en los pulmones de los ratones tratados con Nb3 respecto a los ratones control, es decir, que los pulmones de los ratones con Nb3 estaban menos afectados por la AI que los pulmones del grupo control.

## Puntuación histopatológica en AI



**Figura 33:** Puntuación histopatológica obtenida al calificar el grado de intensidad de las diversas afecciones asociadas a la AI en ratones tratados con PBS o con Nb3 80 mg/Kg administrado por vía IP. Inflamación intersticial, hemorragia, bronquiolitis, fibrosis o edema fueron puntuadas del 1 al 4, junto con la superficie afectada (del 0 al 1) en función de lo observado tras examinar los cortes histológicos al microscopio.

### 4.6.2. Modelo murino de criptococosis.

Tras los buenos resultados obtenidos en los modelos de nemátodos, así como en el modelo murino de aspergilosis, se decidió continuar ensayando la eficacia del Nb3 en un modelo murino de criptococosis. Al igual que en el modelo de aspergilosis, para el modelo murino de criptococosis también se usaron hembras BALB/cJRG de unas 6-8 semanas a las que, en este caso, se les inoculó intranasalmente *C. deneoformans* 1229817. Antes de la infección, fue necesario administrarles intraperitonealmente una primera dosis de hidrocortisona 2 días antes de la infección, la cual se fue repitiendo desde el día de la infección (2<sup>a</sup> dosis, día 0) una vez por semana hasta el final de cada experimento (14-65 días).

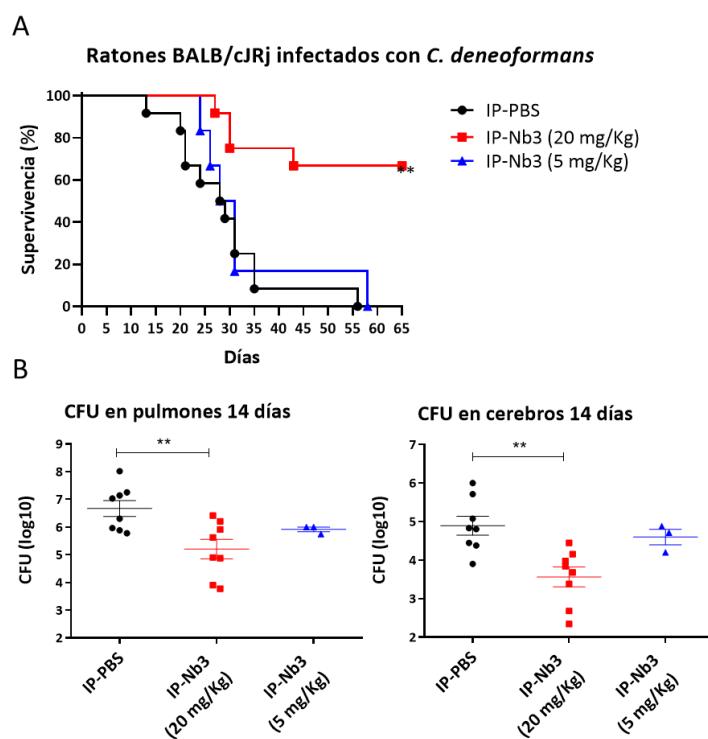
En términos generales, los ensayos que se realizaron se centraron en el uso del Nb3 como tratamiento profiláctico frente a la criptococosis y como tratamiento frente a esta enfermedad ya establecida, es decir, administrado 24h o 14 días después del inicio de la infección. En paralelo, también se investigó la carga fúngica en cerebros y pulmones de ratones infectados con *Cryptococcus*, el estado de dichos órganos mediante tinciones de HE o si el Nb3 es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar el cerebro, órgano importante en la criptococosis ya que, en general, esta enfermedad acaba derivando en meningitis.

#### 4.6.2.1. Eficacia del Nb3 usado como profiláctico en la CI.

En este primer ensayo, se comprobó la eficacia del Nb3 administrado a dosis de 5 mg/Kg y 20 mg/Kg por vía IP frente a ratones a los que únicamente se les administró vehículo. Para ello, se administraron 100 µL de vehículo o Nb3 en una inyección desde el mismo momento en que los

ratones fueron infectados con *C. deneoformans* 1229817. La administración del tratamiento se repitió en el tiempo 3 veces por semana durante todo el experimento, como se describe en materiales y métodos.

Los resultados del ensayo de supervivencia en profilaxis, recogidos en la Figura 34A, muestran que los ratones con criptococosis a los que solo se les administró vehículo por vía IP solo sobrevivieron 55 días, siendo la mediana de su supervivencia 28.5 días. La administración de Nb3 IP a una dosis de 5 mg/Kg no mejoró la supervivencia de los ratones de este grupo y la mediana de la supervivencia fue de 29.5 días, muy similar a la de los ratones control. Por el contrario, la administración de Nb3 a razón de 20 mg/Kg cada dosis sí produjo una mejora significativa en la supervivencia general de los ratones de este grupo, que fue de algo más del 60%, muy superior a la de los otros dos grupos.



**Figura 34:** Eficacia del Nb3 administrado profilácticamente en modelo murino de criptococosis. (A) Supervivencia de ratones BALB/cJRj hembra infectadas con *C. deneoformans* y tratadas con vehículo o Nb3 en profilaxis. Un total de 30 hembras fueron divididas en 2 grupos de 12 y un tercer grupo de 6 a las que se les administró en profilaxis por vía IP vehículo (PBS), Nb3 a razón de 20 mg/Kg o Nb3 a razón de 5 mg/Kg tres veces por semana y se monitorizó su supervivencia durante 65 días. Mantel-Cox valor p (\*\*) <0.01 al comparar el grupo de Nb3 20 mg/Kg frente al control. (B) CFUs totales en pulmones y cerebros de ratones infectados con *C. deneoformans*

y tratados con PBS o Nb3 en profilaxis. En paralelo a los experimentos de supervivencia se infectaron y trajeron de forma similar 21 hembras que se dividieron en dos grupos de 9 (PBS y Nb3 20 mg/Kg) y un tercer grupo de 3 (Nb3 5mg/Kg). Tras 14 días, sus pulmones y cerebros fueron biopsiados, homogenizados y sembrados en placa en diluciones seriadas para determinar la CFU total. Test t valor p (\*\*) <0.01 al comparar tanto en cerebro como en pulmón el grupo al que se le administró vehículo frente al que se le administró Nb3 en una dosis de 20 mg/Kg.

En paralelo al ensayo anterior, se realizaron los ensayos de carga fúngica en órganos afectados por criptococosis, es decir, pulmón y cerebro. Los ratones de este experimento, que siguieron pautas similares de infección, tratamiento e inmunosupresión, fueron sacrificados a los 14 días para poder determinar la carga fúngica, expresada como CFUs en órgano completo. Como se muestra en la Figura 34B, el logaritmo decimal de la carga fúngica media de los pulmones del grupo control (PBS) fue de 6.67, mientras que el logaritmo de la carga fúngica del grupo al que se le administró Nb3 en una dosis de 20 mg/Kg fue de 5.20, algo más de un orden de magnitud decimal de diferencia entre ellos. Sin embargo, en el grupo al que se le administró Nb3 a razón de 5 mg/Kg, el logaritmo de la CFU media fue de 5.91, algo inferior, pero no lo suficiente como para ser significativo.

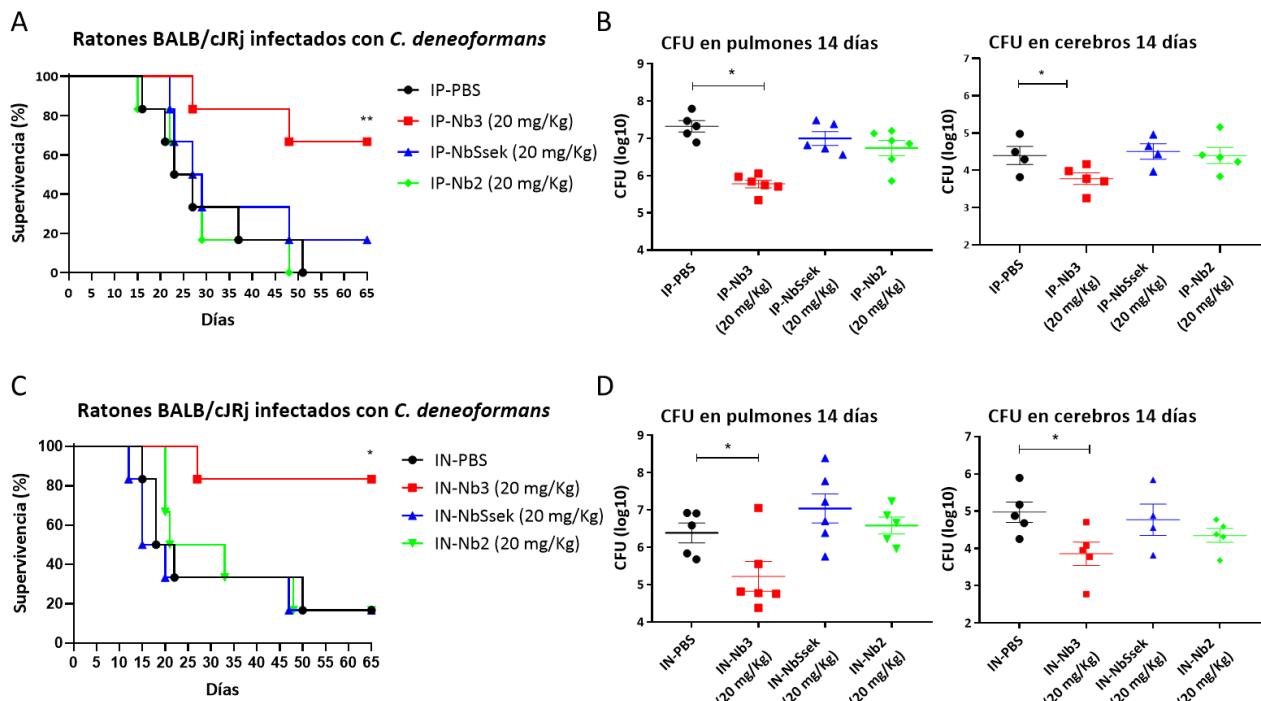
En lo que respecta a la carga fúngica en cerebro, la media del logaritmo de las CFU totales de cerebros completos homogenizados para el grupo al que solamente se le administró vehículo por vía IP fue de 4.89, mientras que para el grupo al que se le administró Nb3 en dosis de 20 mg/Kg fue de 3.57, más de un orden de magnitud de diferencia entre tratar con Nb3 a 20 mg/Kg o no hacerlo. Sin embargo, la administración de Nb3 a razón de 5 mg/Kg no redujo en absoluto la carga fúngica en los cerebros de los animales de este grupo, puesto que la media del logaritmo de la CFU se situó en 4.5, valor muy similar al del grupo control.

#### 4.6.2.2. Eficacia del Nb3 como tratamiento de la CI.

Una vez concluidos los experimentos de profilaxis, seguidamente se evaluó la eficacia del Nb3 administrado sobre ratones hembra BALB/cJRj a las que se les había inoculado *Cryptococcus* por vía IN 24h antes. Es decir, el primer tratamiento, ya fuese vehículo, Nb3, Nb2 o NbSseK1 fue administrado 24h después del momento de la infección y, por tanto, con una infección activa. Tras esto, la administración de Nbs o vehículo se repitió 3 veces por semana, hasta el final del experimento, siendo la dosis ensayada de 20 mg/Kg para todos ellos. Al igual que los experimentos anteriores, se evaluó la eficacia del Nb3 en el tratamiento de la criptococosis en función de su capacidad para mejorar la supervivencia de los ratones, así como de reducir la carga fúngica de los individuos afectados.

Como se muestra en la Figura 35 A y B, en el primer set de experimentos se ensayó la eficacia del Nb3 administrado 24h después de la infección frente a la administración de vehículo, Nb2 o el Nb control frente a Ssek1. El grupo de ratones que solamente recibió vehículo exhibió una mediana de la supervivencia de 25 días y ningún individuo vivió más 51 días. Resultados similares se obtuvieron con la administración de Nb2 o NbSseK1 por vía IP. Las medianas de las

supervivencias fueron de 25 días para el Nb2 y de 27 días para el NbSseK1, valores muy semejantes a los del grupo control. Además, ningún ratón del grupo al que se le administró Nb2 vivió más de 50 días, mientras que en el caso del NbSseK1 sobrevivieron algo menos del 20%. Sin embargo, la administración de Nb3 sí que indujo una mejora significativa de la supervivencia, alcanzando el 60% a 65 días.



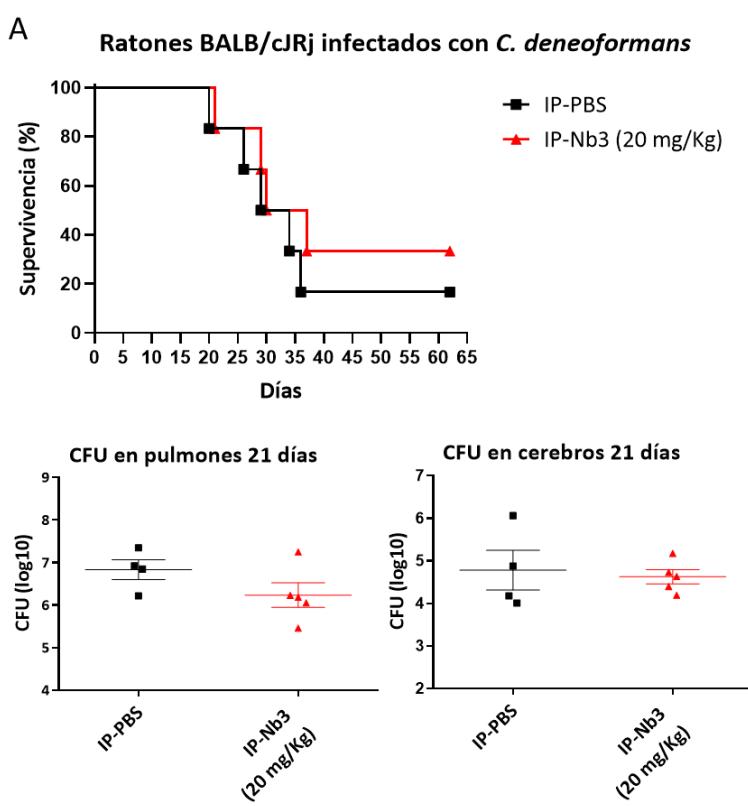
**Figura 35:** Eficacia del Nb3 en el tratamiento de la CI. Supervivencia de ratones infectados con *C. deneoformans* 1229817 y tratados intraperitonealmente (A) (n=24) o intransalmente (B) (n=24) con vehículo (PBS), Nb3, Nb2 y NbSsek-1 24h después de haber sido infectados. Mantel-Cox valor p (\*\*) <0.01 y (\*) <0.05 al comparar la administración de vehículo frente a la del Nb3 por vía IP e IN, respectivamente. Carga fúngica expresada como logaritmo decimal de las CFUs en órganos completos en ratones tratados con vehículo (PBS), Nb3, Nb2 y NbSsek-1 intraperitonealmente (B) o intransalmente (D). Test t valor p (\*) <0.05 al comparar la administración de vehículo frente a la del Nb3 por vía IP e IN, respectivamente.

Estos mismos resultados se vieron reflejados en lo relativo a la carga fúngica en cerebros y pulmones de ratones tratados intraperitonealmente (Figura 35B). En paralelo, se trataron e infectaron de forma similar otro set de ratones que fue sacrificado a los 14 días de haber sido infectados. Sus pulmones y cerebros fueron extraídos, homogenizados y sembrados en placas de Petri en forma de diluciones seriadas para determinar la carga fúngica en cada órgano. De nuevo, únicamente la administración de Nb3 redujo la carga fúngica significativamente en ambos órganos y en todos los tratamientos. De hecho, mientras que las medias de los logaritmos decimales de las CFUs del grupo control tratado intraperitonealmente fueron de 7.33 y de 4.29

para pulmones y cerebros, respectivamente, en el caso del grupo al que se le administró Nb3 las medias fueron de 5.77 y de 3.77 para pulmón y cerebro, respectivamente. También fueron significativas, estadísticamente hablando, las reducciones en las cargas fúngicas en cerebros y pulmones de los ratones tratados intransalmente. En el caso de los ratones del grupo control, las medias de los logaritmos de las CFUs fueron de 6.48 en pulmones y 4.98 en cerebros, mientras que en el caso del grupo al que se le administró Nb3 IN fueron de 5.22 y 3.88 para pulmones y cerebros, respectivamente.

#### 4.6.2.3. Eficacia del Nb3 administrado tardíamente en ratones con criptococosis.

El siguiente experimento que se realizó consistió en la administración de Nb3 a ratones BALB/cJ RJ 14 días después de haber sido infectados, es decir, habiendo posibilitado que se disemine *Cryptococcus* y alcance el cerebro antes de empezar el tratamiento. Con esto, se pretendía comprobar la eficacia del Nb3 en el tratamiento de una criptococosis avanzada sabiendo que la mortalidad en este modelo se concentra entre la tercera y la quinta semana desde la infección.



**Figura 36:** Eficacia del Nb3 administrado a ratones BALB/cJ RJ 14 días después de haber sido infectados con *C. deneoformans* 1229817. (A) Supervivencia a 65 días de ratones hembra (n=12) a las que se les administró vehículo (PBS) o Nb3 20 mg/Kg por vía IP a partir del día 14 de infección tres veces por semana hasta el final del experimento. (B) Carga fúngica en pulmones y cerebros de ratones infectados con *C. deneoformans* 1229817 tras 21 días de infección. En paralelo, se infectaron y trataron 12 ratones de forma tardía y, tras 21 días de infección, los supervivientes fueron sacrificados y sus pulmones y cerebros homogenizados y sembrados en placas de Petri en diluciones seriadas.

Como se muestra en la Figura 36A, en lo relativo a la supervivencia del modelo, los ratones a los que únicamente se les administró vehículo tuvieron una supervivencia de alrededor del 15% a 65 días, mientras que su mediana fue de 31 días. Por otro lado, los ratones a los que se les administró Nb3 alcanzaron una supervivencia del 30%, no siendo significativo en comparación con los ratones a los que solo se les administró vehículo. Además, la mediana de su supervivencia también fue muy similar al grupo control, siendo ésta 34 días.

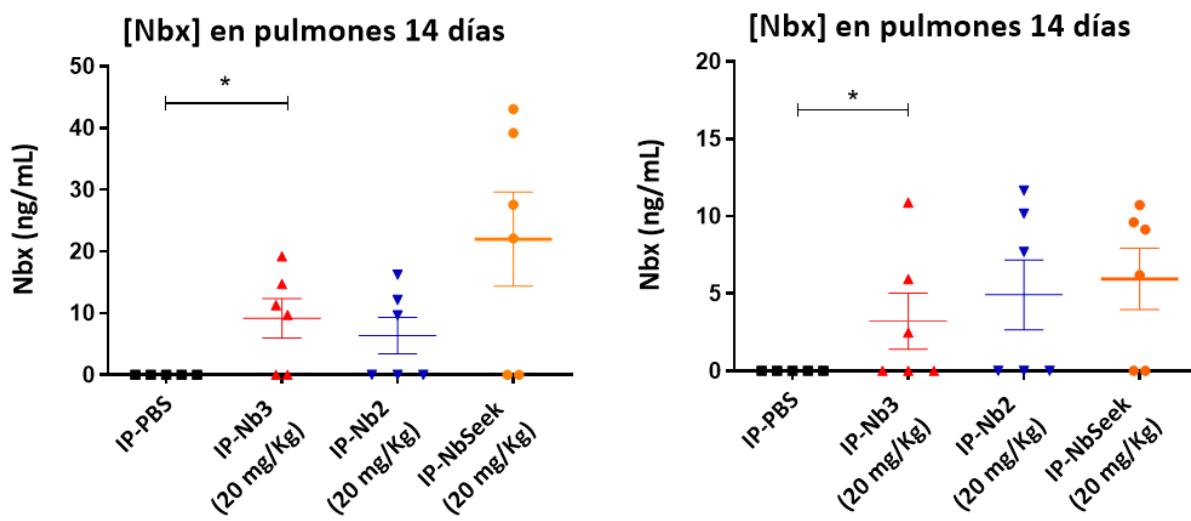
En lo concerniente a las CFU totales en dichos órganos, la media del logaritmo de las CFUs obtenidas en los pulmones del grupo control fue de 6.83, algo superior a la del grupo al que se le administró Nb3 IP, que fue de 6.23. Aunque hay diferencia, no fue suficiente para considerarse significativa (Test t valor  $p < 0.15$ ). En el caso de los cerebros, la diferencia fue inexistente, siendo la media del logaritmo de la CFU para el grupo que recibió únicamente vehículo de 4.78 frente al 4.63 del grupo que recibió Nb3.

#### 4.6.2.4. Distribución del Nb3 en pulmones y cerebros de ratones infectados con *C. deneoformans*.

Con el objetivo de dilucidar si el Nb3 administrado intraperitonealmente alcanzaba los órganos afectados más importantes durante el transcurso de la CI, es decir, pulmones y cerebro, se infectaron ratones hembra BALB/cJRj de la forma habitual con *C. deneoformans* 1229817 y fueron tratados con vehículo, Nb2, Nb3 o NbSseK1, recibiendo el último tratamiento 3h antes de ser sacrificados y biopsiarse sus pulmones y cerebros. Tras homogenizarse, se determinó la concentración de los diferentes Nbs usando el kit His-Tag ELISA de Genscript, como se describe en materiales y métodos.

Como se puede apreciar en la Figura 37, se pudieron detectar todos los Nbs inyectados en los diferentes grupos del ensayo mediante la detección de su señal de histidinas del extremo final de su secuencia. Como cabía esperar, en los ratones a los que solamente se les administró PBS no se detectó ningún Nb en homogenizados de sus órganos, mientras que a los que sí se les administró algún tipo de Nb (Nb2, Nb3 y NbSseK1) siempre se detectó en, al menos, la mitad de los individuos. De esta manera, se demostró que el Nb3, así como otros Nbs, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica en el transcurso de una infección y ser detectable en pulmones y cerebros 3 horas después de la última dosis. Aunque en la Figura 37 se muestra únicamente como significativa la diferencia de concentración entre los ratones control y a los

que se les añadió Nb3, en el resto de grupos donde se detectó algún Nb también fue significativa al compararse con el grupo al que se le administró vehículo.

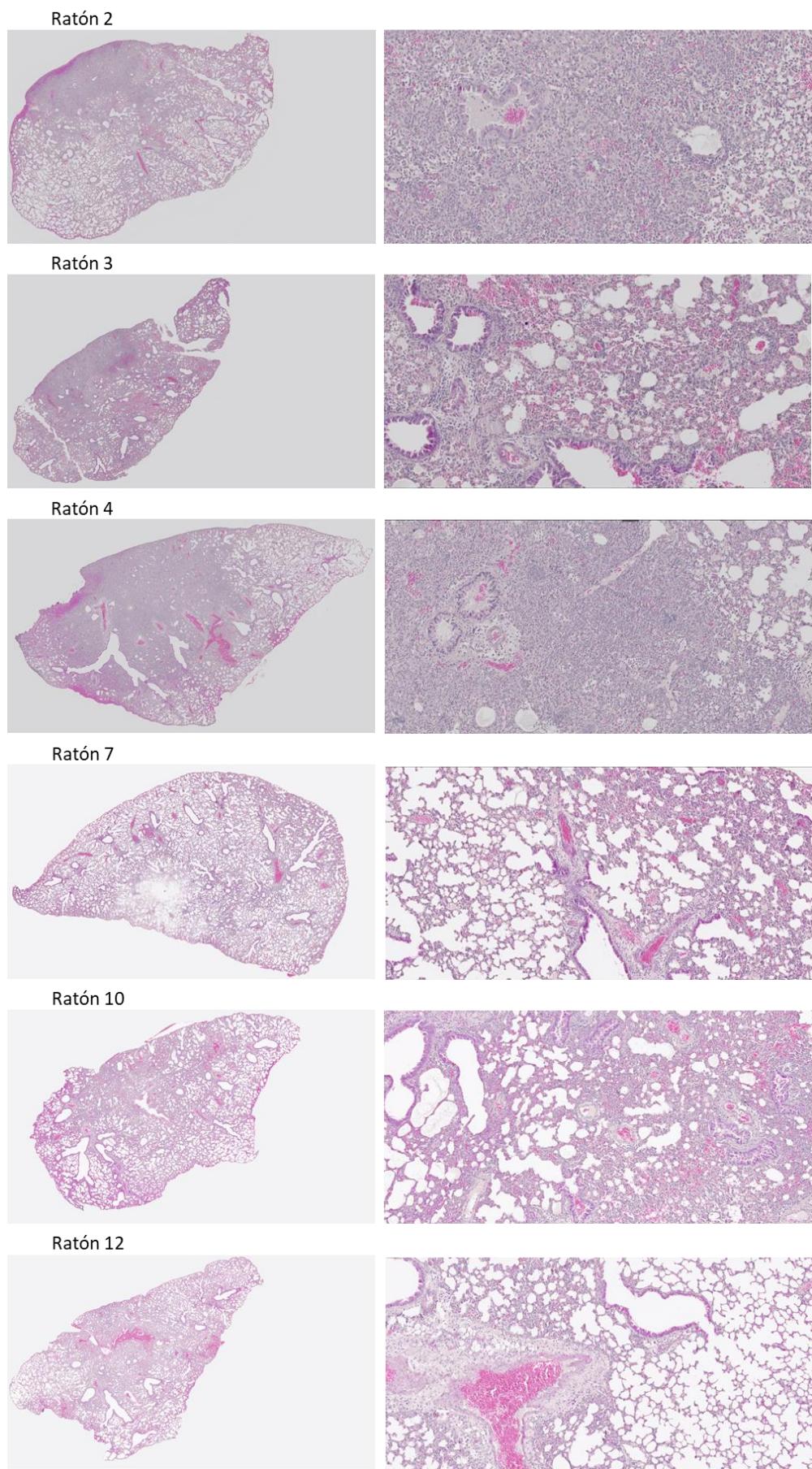


**Figura 37:** Distribución del Nb2, Nb3 y NbSseK1 en pulmones y cerebros de ratones infectados por *Cryptococcus*. Ratones infectados y tratados como habitualmente se ha hecho en este modelo de criptococosis fueron mantenidos hasta el día 14 tras la infección, momento en el cual recibieron la última dosis de vehículo, Nb2, Nb3 o NbSseK1 (20 mg/Kg) y al cabo de 3 horas fueron sacrificados y sus pulmones y cerebros homogenizados para poder medir la cantidad de Nb contenido en ellos mediante el kit His-Tag de Genscript. Test t valor p (\*) <0.05.

#### 4.6.2.5. Tinciones de HE en pulmones y cerebros de ratones afectados por criptococosis

Al igual que en el modelo anterior, para concluir los experimentos de eficacia del Nb3 se procedió a realizar cortes histológicos de pulmones y cerebros de ratones infectados con *C. deneofomans*. Dichos ratones fueron infectados como viene siendo habitual y tratados por vía IP con vehículo o Nb3 (20 mg/Kg). La primera dosis se administró 24h después de la infección y se repitió 3 veces por semana hasta el día 14, momento en el que los ratones fueron sacrificados y se realizaron tinciones de HE de los cerebros y pulmones biopsiados.

Al igual que en el modelo de aspergilosis, entre las alteraciones o afecciones más comunes caracterizadas en los cortes histológicos de pulmón de este estudio se encuentran la inflamación intersticial, la hemorragia, la bronquiolitis, la fibrosis o el edema. En la Figura 38 se recogen cortes histológicos representativos de ratones a los que solo se les administró vehículo (ratones 2, 3 y 4), así como de ratones a los que se les administró Nb3 (ratones 7, 10 y 12). De cada corte histológico de los pulmones de los ratones afectados por criptococosis, se muestra una imagen general de todo el corte, así como una imagen detallada o ampliada a su derecha.



**Figura 38:** Cortes histológicos de pulmones de ratones BALB/cJRj infectados con *C. deneoformans* y teñidos con HE. Al cabo de 24h de la inoculación de *Cryptococcus*, los ratones fueron tratados con PBS (vehículo) o Nb3 (20mg/Kg) por vía intraperitoneal tres veces por semana durante dos semanas, siendo sacrificados al día 14 y sus pulmones biopsiados y fijados en formaldehído al 4%. En esta figura se muestran las imágenes generales de todo el corte realizado en cada pulmón, así como una sección de esa misma imagen ampliada y tomada con un objetivo 20x. Los ratones 2, 3 y 4 pertenecen al grupo al que solo se les administró vehículo, mientras que los ratones 7, 10 y 12 pertenecen al grupo al que se le administró Nb3. Se utilizaron un total de 12 ratones, 6 por grupo, y se eligieron imágenes lo más representativas posibles.

En términos generales, observando a simple vista la imagen escaneada de los diferentes cortes histológicos, se aprecia perfectamente que la estructura del pulmón está bastante más conservada en los ratones que se les administró Nb3 respecto de los que solo se les administró vehículo. Aunque en todos los cortes se puede apreciar inflamación en los intersticios y en los alvéolos, es mucho más leve en el caso de los ratones tratados con Nb3. Tanto en la imagen del corte completo como en la ampliada, se puede apreciar una mayor presencia de células inflamatorias en los ratones tratados con PBS que en los que se les administró Nb3, llegando a colapsar grandes superficies del pulmón. De hecho, en los ratones 4 y 7 la extensión de dichas zonas inflamadas es prácticamente la totalidad del pulmón. No obstante, aunque de menor intensidad y extensión, también hay acumulaciones de células inflamatorias en los ratones tratados con Nb3.

A continuación, la siguiente afección en ser evaluada fue la presencia de hemorragias o zonas infartadas. En el caso de los ratones del grupo al que únicamente se le administró vehículo, es bastante frecuente encontrar zonas hemorrágicas o hematíes en bronquios y alvéolos, conformando, en general, una hemorragia masiva. Sin embargo, en el caso de los ratones tratados con Nb3 es mucho menos frecuente. En los ratones 7 y 12 no se puede apreciar ninguna zona hemorrágica, aunque, sin embargo, en el ratón 10 sí que se pueden apreciar varias zonas hemorrágicas.

En lo que respecta a la bronquiolitis (inflamación, acumulación de secreciones y/o descamación de las células epiteliales de los bronquios), nuevamente es visible en ratones de ambos grupos, aunque con diferente intensidad. Si bien es cierto que en ambos modelos la descamación es mínima, en comparación con el modelo de aspergilosis, la inflamación y, sobre todo, la acumulación de secreciones es bastante más frecuente, siendo de mayor grado en los ratones a los que se le administró PBS, como se puede apreciar en los cortes de los ratones 2 y 4. Por el contrario, los ratones 7 y 10 no presentaron apenas indicios en los cortes histológicos examinados.

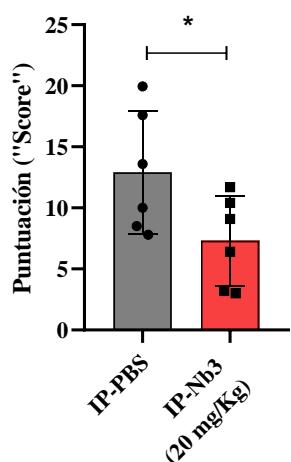
Por otra parte, quizá sea algo más frecuente en ratones tratados con Nb3 la presencia de edema en intersticios y alvéolos. Incluso en el ratón 12, perteneciente al grupo al que se le administró Nb3 y, en general, uno de los cortes histológicos que menos afecciones presenta, o de menor grado, se puede apreciar acumulación de líquido en algunos alvéolos, observándose una especie de relleno pálido grisáceo en ellos. Por otra parte, aunque la estructura alveolar de este ratón está bastante conservada, sí que se puede apreciar un cierto engrosamiento de los septos alveolares, provocado probablemente por la acumulación de líquidos extravasados en dichas

estructuras. No obstante, en este caso es conveniente indicar que en las zonas de los ratones a los que se les administró vehículo que han perdido la estructura alveolar y son una acumulación masiva de células inflamatorias es complicado determinar si también hay edema ahí únicamente observando el corte histológico.

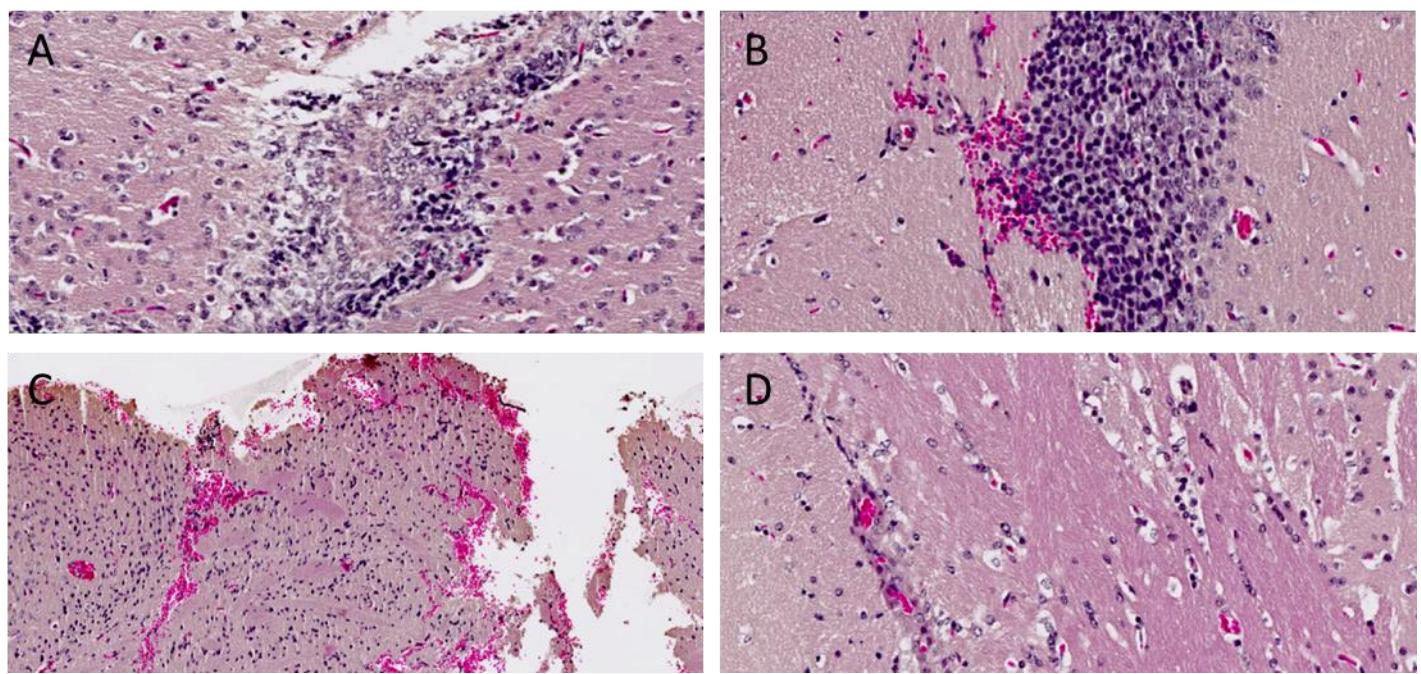
En último lugar, cabe destacar también la mayor fibrosis presentada en los cortes histológicos de los ratones tratados con vehículo en comparación con los que se les administró Nb3. Como era de esperar, la pérdida de la estructura alveolar a causa de la infección en curso también induce, aparte de necrosis, la cicatrización del tejido dañado con tejido fibroso. Por tanto, fue mucho más frecuente encontrar zonas fibróticas en los ratones tratados con PBS IP, especialmente en alvéolos destruidos y alrededor de ciertos vasos sanguíneos.

De igual manera que en la AI, se volvió a elaborar un sistema de puntuación histopatológica en función de las afecciones observadas en los cortes histológicos de pulmones de ratones tratados con Nb3 o con PBS e infectados con *Cryptococcus*. Inflamación intersticial, hemorragia, bronquiolitis, fibrosis o edema fueron calificados del 0 al 4 en función de su gravedad y normalizados frente a la superficie del corte histológico afectado. Como se recoge en la Figura 39, la puntuación histopatológica del grupo control fue significativamente superior a la del grupo de ratones tratados con Nb3, lo que implica que las afecciones presentes en los cortes histológicos de los ratones tratados con Nb3 son de menor grado o intensidad que las presentes en los cortes de los pulmones del grupo control. Por tanto, la administración de Nb3 reduce dicha intensidad o severidad.

### Puntuación histopatológica en CI



**Figura 39:** Puntuación histopatológica obtenida al calificar el grado de intensidad de las diversas afecciones asociadas a la CI en ratones tratados con PBS o con Nb3 20 mg/Kg administrado por vía IP. Inflamación intersticial, hemorragia, bronquiolitis, fibrosis o edema fueron puntuadas del 1 al 4, junto con la superficie afectada (del 0 al 1) en función de lo observado tras examinar los cortes histológicos al microscopio.



**Figura 40:** Cortes histológicos de cerebros de ratones BALB/cJRj teñidos con HE. De los mismos 12 ratones del experimento anterior, se biopsiaron los cerebros tras 14 días de infección. (A y B) Acumulación de células inflamatorias cerca de la lesión. (B, C y D) Presencia de zonas infartadas de dimensiones variables.

Ya para concluir esta sección, mencionar que, aunque en todos casos, ya sean ratones a los que se les administró vehículo o Nb3 por vía IP, se pudieron detectar células de *Cryptococcus* dispersas en los cortes de cerebro. Sin embargo, lo que sí fue menor en los ratones tratados con Nb3 fue la presencia de zonas infartadas o hemorrágicas provocadas por la infección en curso.

## 5. Discusión

Desde su descubrimiento en la década de los 90, los anticuerpos de camélidos (camellos, llamas, alpacas...) han suscitado gran interés debido a sus características únicas<sup>334</sup>. Aunque estas especies producen anticuerpos heterotetraméricos comunes al resto de los mamíferos y altamente conservados, también poseen otros anticuerpos compuestos únicamente por dos cadenas pesadas<sup>335</sup>. Un anticuerpo convencional está compuesto por dos cadenas pesadas junto con dos cadenas ligeras, mientras que, además, estas especies son capaces de producir anticuerpos homodiméricos, compuestos únicamente por dos cadenas pesadas<sup>334,336</sup>. Las cadenas pesadas de un anticuerpo convencional están formadas por tres dominios constantes agrupados como fracción constante, junto a un cuarto dominio, variable en secuencia y con capacidad de unión a antígeno, mientras que la cadena ligera consta de un dominio constante y otro variable. Por otra parte, los anticuerpos homodiméricos de camélidos solo contienen dos dominios constantes, junto con un tercer dominio variable en cada cadena, siendo el resultado de la unión de estas dos cadenas pesadas<sup>334,336</sup>.

Con el objetivo de reducir el tamaño de los anticuerpos a la mínima expresión a lo largo de los años se han ido construyendo versiones más reducidas de éstos como los scFv<sup>337</sup>. Puesto que en un anticuerpo convencional existen dos regiones de unión a antígeno, cada una de ellas compuesta por la interacción de un dominio variable de la cadena pesada y otro dominio variable de la cadena ligera, la forma más habitual de reducir el tamaño conservando la capacidad de unión a antígeno con técnicas de biología molecular es crear un scFv. Un scFv consiste en la unión de los dos dominios variables, uno de la cadena ligera y otro de la pesada, mediante una pequeña secuencia de unión para contener a los dos dominios en una única proteína, librándose del resto de dominios sin capacidad de unión a antígeno<sup>337</sup>. Sin embargo, en los anticuerpos homodiméricos de camélidos, las dos regiones de unión a antígeno están compuestas por un único dominio variable contenido en una única secuencia (dominio V<sub>H</sub>H). Dicha secuencia producida en solitario se conoce como Nb<sup>336</sup>.

El pequeño tamaño de estos Nbs, así como la mayor estabilidad y facilidad de producción o la capacidad de presentarse en estado monomérico, han suscitado que en los últimos años el uso y diseño de nuevos Nbs se haya incrementado notablemente<sup>336,338</sup>. Entre las múltiples aplicaciones que pueden tener se encuentran casi las mismas que un anticuerpo convencional, como por ejemplo en ELISAs, inmunohistoquímicas, trazado de antígenos y en el diagnóstico de enfermedades o en su tratamiento, siendo este último punto el que motiva este estudio<sup>338</sup>.

Entre las aplicaciones clínicas más frecuentes sobre las que se están llevando a cabo estudios con Nbs se encuentran la neutralización de toxinas, venenos, virus, bacterias o células tumorales<sup>336,338–342</sup>. Aunque los Nbs carezcan de región Fc, necesaria para ser reconocidos por el sistema inmunológico, se les puede conjugar una región Fc para posibilitar dicha función, así como otras sustancias que añadan más funciones a la molécula final, como por ejemplo un Nb para reconocer células tumorales y una toxina conjugada para destruirlas<sup>336,339,342</sup>.

Al igual que otros anticuerpos, también se han descrito en la literatura Nbs con capacidad inhibitoria, como es el caso de Nbs frente p38, una MAP quinasa capaz de fosforilar otras proteínas y que participa en múltiples rutas de transducción de señal<sup>343</sup>. Aunque no se han descrito en la literatura Nbs terapéuticos con capacidad inhibitoria sobre enzimas fúngicas, lo cierto es que sí se han publicado estudios en los que se diseñaron scFvs frente a la superficie de una toxina, HM-1, con capacidad inhibitoria frente a la 1,3-β-glucano sintasa de *Cryptococcus*<sup>236</sup>, lo que apoyaría la hipótesis de que algún Nb de los generados en este estudio exhibiera capacidad inhibitoria sobre *Gel4/CnGel*, así como efecto terapéutico en el tratamiento de las enfermedades fúngicas contra las que se dirigió.

La falta de opciones terapéuticas en el tratamiento de las EFIs, siendo una de las principales motivaciones de este estudio, condujo al desarrollo de una estrategia terapéutica basada en el desarrollo de Nbs frente a una diana fúngica que, por un lado, fuese muy importante para la supervivencia del hongo y, por otra parte, fuese muy específica del reino de los hongos o, mejor dicho, no estuviese presente en animales. Estudios recientes centrados en la síntesis y remodelación de la pared fúngica, en especial de las 1,3-β-glucanosiltransferasas, que sugerían que *Gel4* era esencial para el crecimiento de *Aspergillus*, motivaron la búsqueda y el desarrollo de un inhibidor para esta enzima<sup>138</sup>.

Para ello, se decidió emplear *Gel4* recombinante deglicosilada para inmunizar una alpaca. El uso de proteínas sin glicosilar garantiza que todos los Nbs que se generan lo hacen frente a epítopos aminoacídicos de la proteína con la que se inmuniza. La glicosilación de una proteína puede ser diferente y no homogénea en función de diferentes factores, como el tipo y la condición de la célula que los produce, así como si la proteína en cuestión es generada en otro organismo diferente<sup>344</sup>. Por tanto, usar una proteína deglicosilada garantiza que los Nbs no se generan contra epítopos variables (glicanos) y sí contra las partes más constantes de una proteína, que van a estar ahí, independientemente de la glicosilación.

Tras la inmunización, se generan linfocitos B con diferentes secuencias para las regiones  $V_{HH}$  y no todas reaccionarán frente a *Gel4*, por lo que es necesario clonar dichas secuencias en

fagémidos y “purificarlas” mediante varios ciclos de *phage display* donde son eliminadas las secuencias que pertenecen a Nbs que no son capaces de unirse al antígeno con el que se inmunizó a la llama. Los 8 Nbs que completaron este proceso en este estudio se dividieron en 3 grupos en función de su similitud en las secuencias de sus *loops* dado que, muy probablemente, una secuencia muy similar en las zonas de reconocimiento antigénico reconozca al mismo epítopo, variando ligeramente entre ellos en la fuerza de unión a éste, así como la superficie enterrada bajo la unión. De hecho, al determinar las estructuras del Nb4 (grupo 1) y del Nb3 (grupo 2) unidas a *Gel4* mediante difracción de rayos X, se pudo comprobar que se unían a dos epítopos diferentes. Mientras que el Nb4 se unía al domino CBM43, el Nb3 se unía directamente al centro activo de la enzima, característica interesante si se está buscando generar una sustancia con propiedades inhibitorias sobre dicha enzima.

Antes de comprobar las capacidades inhibitorias de los Nbs se determinaron los parámetros derivados de su unión tanto a *Gel4* glicosilada como deglicosilada. Como cabía esperar, varios Nbs (4, 6, 22 y 32) vieron aumentadas sus  $K_D$  en más de 10 veces al ser enfrentados a la *Gel4* glicosilada, aunque otros, como los Nbs 2 y 3, apenas las vieron modificadas, indicando, por tanto, que en esos casos las glicosilaciones no eran apenas relevantes. Por otra parte, la caracterización de los parámetros termodinámicos de las uniones de los diferentes Nbs a sus dianas también arrojaron otra serie de datos interesantes. En la mayoría de los casos, la unión del Nb a su diana fue dirigida entálpicamente, es decir, que la unión del Nb a *Gel4* producía una liberación de energía térmica al medio derivada principalmente de la formación de enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno, iónicos o fuerzas de van der Waals entre el Nb concreto y *Gel4*<sup>345</sup>. Sin embargo, en el caso del Nb3 frente a las dos *Gel4*, así como el Nb6 a la *Gel4* glicosilada, el principal motor de la unión fue un aumento en la entropía. El hecho de que el Nb3 se una a *Gel4* impulsado por un cambio en la entropía indica que dicha unión está aumentando el desorden al sistema, probablemente al desolvatarse moléculas de agua de la superficie de unión entre ambas proteínas o, de alguna manera, al inducir un cambio conformacional en el complejo o al aumentar los grados de libertad de este<sup>345</sup>.

Tras la caracterización de la unión de los diferentes Nbs a *Gel4* glicosilada y deglicosilada, se procedió a determinar si eran capaces de inhibir la actividad *in vitro* de *Gel4* glicosilada. Aunque todos los Nbs fueron capaces de inhibir, en mayor o menor medida, a *Gel4* glicosilada, no todos lo hicieron con la misma intensidad, sirviendo este primer ensayo para descartar varios Nbs por no ser capaces de inhibir completamente la actividad de *Gel4*. No obstante, el hecho de que los Nbs del grupo 1 fueran capaces de inhibir la actividad de *Gel4* uniéndose al dominio CBM43 sugiere que éste tiene un papel importante en la actividad de esta enzima. Junto a éste, en un

segundo ensayo se redujo la ratio Nb:*Gel4* a 2:1, con lo que, de nuevo, se consiguió eliminar otros Nbs que no fueron capaces de parar la generación de fluorescencia en el ensayo debido a la actividad de la enzima (más fluorescencia, más L6-SR que ha pasado a formar parte de un polisacárido de  $\beta$ -glucano más complejo, menor grado de inhibición)<sup>346,347</sup>. La caracterización de la unión y de la inhibición *in vitro* dejó dos claros candidatos para seguir trabajando con ellos en los ensayos posteriores, los Nbs 2 y 3, así como el Nb4 que, aunque en menor medida, también proporcionó buenos resultados.

Los buenos resultados obtenidos arriba condujeron a la siguiente etapa del estudio, es decir, a la comprobación de si la actividad inhibitoria observada *in vitro* sobre la enzima *Gel4* se trasladaba en una reducción en el crecimiento de cultivos de *Aspergillus*. Los Nbs 2, 3 y 4, que fueron los seleccionados por sus características exhibidas en los ensayos anteriores, llevaron a resultados dispares. Ni el Nb4 ni el Nb2 mostraron inhibiciones potentes del crecimiento, solamente algo de capacidad inhibitoria a dosis medias y bajas en *A. fumigatus*, perdiéndose el efecto a dosis altas. Este escaso efecto podría ser debido a que el dominio CBM43 está orientado de cara a la membrana lipídica, por lo que quizás los Nbs sufran alguna forma de impedimento estérico que imposibilita un correcto acceso de los Nbs 2 y 4 a su diana. Afortunadamente, el Nb3, dirigido frente al centro activo, sí que mostró capacidad inhibitoria sobre cultivos de *A. fumigatus* B5233. Además, también mostró capacidad inhibitoria más o menos similar sobre otras cepas y aislados de *A. fumigatus*, demostrando que su efecto no es cepa-específico.

Sin embargo, al saltar a otras secciones del género *Aspergillus*, los resultados vuelven a ser dispares. El Nb3 mostró efecto prácticamente similar al mostrado en la sección Fumigati al ser añadido sobre cultivos de *A. ustus*, *A. nidulans* y *A. flavus*. En el caso de *A. terreus*, también logró inhibir el crecimiento de éste, aunque con menor potencia que en otras especies, mientras que en los cultivos de *A. niger* no se indujo ningún efecto. Las variaciones en el efecto podrían ser debidas a diferencias de secuencia en las zonas de unión al Nb3 que puedan impedir su unión o, por otra parte, a la presencia de otra enzima distinta capaz de llevar a cabo la misma función o a que esta función transglucosilasa sea menos importante en la biología de *A. niger* que en la del resto de *Aspergillus*.

Dado que, en general, el Nb3 funcionó bastante bien inhibiendo a la mayoría de las secciones de *Aspergillus* ensayadas en estos estudios, se decidió comprobar su efecto sobre otros géneros fúngicos implicados en enfermedades invasoras. Concretamente, se probó su actividad frente a cultivos de *C. deneoformans* 1229817. Sorprendentemente, el Nb3 inhibió bastante bien el crecimiento de este aislado clínico, llegando a superar con creces el efecto ejercido sobre *A.*

*fumigatus* B5233. De hecho, la MIC<sub>50</sub> para *C. deneoformans* fue de unos 64 µg/mL, mientras que la de *A. fumigatus* B5233 fue de 512 µg/mL y el efecto máximo fue de más del 80% para el primero en comparación con un 70% de inhibición del segundo. Aunque en *A. fumigatus* la familia *Gel* está compuesta por al menos 7 genes diferentes<sup>138,139,141,144,225</sup>, en el caso de *Cryptococcus* solo hay una única enzima (*CnGel*) tras realizar una búsqueda en BLAST y, además, es ortóloga de *Gel4*. El hecho de que no haya ninguna enzima redundante, a priori, en su genoma puede justificar que, si se elimina su función, inhibiéndola en este caso con Nb3, el efecto sobre *Cryptococcus* pueda ser importante.

Al igual que en *A. fumigatus*, también se ensayó el posible efecto inhibitorio del Nb2 y el Nb4 sobre *C. deneoformans* 1229817. Sin embargo, estos ensayos no reportaron actividad inhibitoria alguna sobre dicho aislado clínico. Probablemente, ambos Nbs sean incapaces de alcanzar su diana al encontrarse orientada hacia la membrana lipídica mediante anclaje GPI. Además, el dominio CBM43 está menos conservado que el dominio catalítico entre estas dos especies, por lo que es posible que sus constantes de unión también sean peores.

De nuevo, se ensayaron más cepas y especies de *Cryptococcus* a las que se les añadió Nb3 para comprobar que el efecto no era cepa o especie-específico. En este caso, el Nb3 mostró una excelente actividad frente a todos los cultivos de *C. deneoformans*, pero, sin embargo, el efecto sobre las cepas de *C. neoformans* fue bastante discreto pese a que sus *CnGel* son bastante parecidas. Como se ha descrito en la literatura, no se ha conseguido realizar un mutante viable para *Gel4* en *A. fumigatus*, sugiriendo que dicha proteína es esencial para *A. fumigatus*<sup>138</sup>. Además, en otros hongos como *S. cerevisiae*, el mutante doble del homólogo de *Gel4* (*gas1*) y *bgf2*, aunque viables, tienen un aspecto enfermizo y padecen problemas en el crecimiento<sup>136</sup>. Para ello, el doctor Óscar Zaragoza intentó elaborar sendos mutantes para *CnGel* en *C. deneoformans* y *C. neoformans*, siendo únicamente posible generarlo en *C. neoformans* y no en *C. deneoformans*. Esto pone de manifiesto que, probablemente, la función de *CnGel* es más importante en el serotipo D que en el A o que las cepas del serotipo A pueden compensar mejor su pérdida de función, lo cual va en línea con los resultados obtenidos en este estudio. Además, también existen varios estudios que afirman que las paredes celulares de *C. neoformans* son más gruesas y más resistentes a diferentes tipos de estrés que las del serotipo D, algo que puede explicar la diferente intensidad del efecto del Nb3 sobre ambos serotipos<sup>220,348,349</sup>. Por otra parte, las cepas del serotipo D son más sensibles a alteraciones en el transporte de vesículas extracelulares, vesículas que contienen, entre otras proteínas, *CnGel*<sup>253</sup>, algo que explicaría también la mayor sensibilidad del serotipo D a sustancias que perturban el estado de la pared celular, como podría ser el Nb3.

Junto a estos experimentos, para comprobar que el efecto del Nb3 sobre el crecimiento de *Aspergillus* y *Cryptococcus* no era inespecífico, se ensayó cómo afectaba a dicho crecimiento la adición de cantidades similares de otro Nb (NbSseK1) cuya diana no se encontraba en ambos hongos. Puesto que se han publicado estudios<sup>350</sup> en los que la adición de proteína en grandes cantidades ha conducido a confundir efectos antifúngicos generados de forma inespecífica, se ensayó el posible efecto del NbSseK1 sobre el crecimiento de ambos hongos, resultando, en este caso, inexistente. De esta manera, se descartó un posible efecto inespecífico del Nb3 sobre ambos géneros.

Tras comprobar el prometedor efecto antifúngico del Nb3 en la mayoría de las especies del género *Aspergillus*, así como en *C. deneoformans*, se procedió a elaborar un perfil de sensibilidad a otros antifúngicos de uso habitual en clínica. Al comparar las diferentes sensibilidades obtenidas para *A. fumigatus* B5233, los resultados más discretos los obtiene el Nb3. Esta cepa concreta es bastante sensible a VCZ, AMB e incluso CSF. Si bien es cierto que el Nb3 es una molécula considerablemente más grande que los otros fármacos (48x, 16x y 15x veces más grande, respectivamente), hay que indicar que se necesitan un mayor número de moléculas para alcanzar un efecto parecido en comparación con VCZ, CSF y AMB. Sin embargo, en *Cryptococcus*, la efectividad de los antifúngicos comerciales también fue diferente. La AMB fue la única capaz de inhibir el crecimiento del hongo de forma potente, al igual que en *A. fumigatus* B5233. Por otra parte, aunque el FCZ es el tratamiento de mantenimiento utilizado tras una o dos semanas de administración de AMB en la CI, ya que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica muy fácilmente<sup>351</sup>, los experimentos de sensibilidad mostraron que ni *C. deneoformans* 1229817 ni *C. neoformans* H99 fueron muy sensibles al FCZ y, en lo que respecta al efecto de la CSF en comparación con *A. fumigatus*, aunque sensibles, lo fueron bastante menos. De hecho, la MIC<sub>50</sub> para la CSF en *C. deneoformans* 1229817 fue de 117 µM, mientras que la del Nb3 fue de 4.26 µM. Los buenos resultados al comparar el efecto de la CSF, junto con los del FCZ (MIC<sub>50</sub> FCZ 103 µM vs. 4.26 µM MIC<sub>50</sub> Nb3) al del Nb3, convierten tanto a *CnGel* como al Nb3 en dianas y fármacos muy interesantes en el tratamiento de la CI.

Aunque en *A. fumigatus* B5233 los resultados fueron más discretos, en los últimos años vienen sucediéndose múltiples apariciones de cepas resistentes a azoles<sup>102,103,297</sup>, que son la primera y principal línea de defensa frente a las aspergilosis. Además, no todos los pacientes de unaEFI pueden soportar tratamientos con AMB pese a que las nuevas formulaciones lipídicas han reducido algo la toxicidad asociada a su administración<sup>352-354</sup>. En conjunto, la falta de opciones terapéuticas, la toxicidad de éstas o la aparición de resistencias impulsan las opciones del Nb3 a ser una alternativa viable como terapia de rescate en el tratamiento de la aspergilosis.

Dado que las opciones terapéuticas en el tratamiento de las EFIs son bastante escasas, es importante que los tratamientos disponibles no se comporten de forma antagónica entre sí. Habitualmente, las EFIs son bastante difícil de eliminar en los pacientes afectados, a menudo inmunocomprometidos, y su tratamiento suele ser muy dilatado en el tiempo. Por tanto, en el campo de la microbiología clínica el estudio de las sinergias es un tema muy importante ya que aumentar la potencia del efecto de dos fármacos o más en combinación puede suponer reducciones en el tiempo necesario de tratamiento, en la toxicidad asociada a éste y, en última instancia, en la mortalidad.

Partiendo de las 3 cepas ensayadas anteriormente, sus cultivos en RPMI fueron sometidos a concentraciones variables combinadas de azoles (VCZ para *Aspergillus* y FCZ para *Cryptococcus*) y Nb3, así como AMB y Nb4 también con Nb3. Desafortunadamente, únicamente se obtuvo sinergia en combinaciones de AMB con Nb3 y de Nb4 con Nb3 en *A. fumigatus* B5233. Aunque se han descrito múltiples sinergias de otros fármacos con AMB en la literatura<sup>73,355,356</sup>, es casi hasta lógico que la combinación de un fármaco que abre poros en la membrana (AMB)<sup>67,68</sup> junto con otro que, probablemente, desestabilice la pared al modificar su composición inhibiendo la elongación y la ramificación del 1,3-β-glucano sea sinérgica. Por otra parte, lo que fue realmente más sorprendente fue la potente sinergia exhibida entre el Nb3 y el Nb4. Recordando que el Nb4 prácticamente no ejerció apenas efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *A. fumigatus*, logró reducir la MIC<sub>50</sub> de *A. fumigatus* B5233 de 512 µg/mL a tan solo 16 µg/mL en combinación con cantidades similares de Nb3 (FICI 0.063). Hipotéticamente, la unión del Nb3 a Gel4 puede inducir un cambio conformacional en esta última que propicie una mayor exposición del dominio CBM43 hacia el exterior, lo que podría posibilitar un mayor acceso del Nb4 a su diana (dominio CBM43). Por tanto, aunque el Nb3 pudiese desprenderse de la enzima, desbloqueando su inhibición, el Nb4 podría seguir unido al dominio CBM43 induciendo efecto inhibitorio sobre la enzima.

Aunque no se encontraron combinaciones sinérgicas en los fármacos ensayados en *Cryptococcus* (tanto serotipo A como D), sí que fueron interesantes las combinaciones de FCZ, AMB y Nb4 con Nb3 que supusieron un efecto aditivo, a excepción de la combinación Nb3-FCZ en *C. neoformans* H99, cuya interacción resultó indiferente. Aunque todas estas interacciones no lleguen a ser sinérgicas, lo importante es que en todos los casos de efecto aditivo se logra reducir las concentraciones necesarias para alcanzar la MIC<sub>50</sub> en AMB y FCZ, los fármacos utilizados habitualmente en clínica. Dado que, como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, reducir la toxicidad y aumentar la efectividad de estos fármacos es algo muy necesario, incluso los efectos aditivos con el Nb3 se pueden considerar positivos.

No obstante, las diferencias en la efectividad de la inhibición del crecimiento por parte del Nb3 sobre *C. deneoformans* y *C. neoformans* condujeron a la pregunta de si había algo en el serotipo A que le confería resistencia al Nb3 que no estuviese en el serotipo D. Una de las primeras hipótesis que se barajaron fue que el Nb3 no era capaz de alcanzar su diana (*CnGel*) en serotipo A, ya que, a priori, en ambos serotipos *CnGel* comparte un alto grado de homología de secuencia (95%). Más concretamente, si alguna característica de la pared o de la cápsula de *C. neoformans* impedía el acceso del Nb3 a *CnGel* ya que, como se ha mencionado antes, la pared y la cápsula de serotipo A suelen ser más grandes, densas y resistentes que las del serotipo D<sup>220,348,349</sup>. Además, se encontraron algunas diferencias en las sensibilidades al Nb3 y a la CSF entre cepas con cápsula y acapsulares tanto del serotipo D como del A (Figura S2), algo que apoyaba la hipótesis de que la cápsula del serotipo A podría jugar un papel clave en la protección de *Cryptococcus* frente al Nb3.

Usando un Nb3 al que se le había acoplado una sonda fluorescente (Nb3-Cy5), junto con otras sondas para marcar la pared y la cápsula, se pudo determinar que el Nb3 se alojaba fundamentalmente en la pared de *C. deneoformans* 1229817 tras 15 minutos de tinción. En los últimos años, se han publicado una serie de estudios en los que se identificaban tanto a *Gel4* como a *CnGel* embebidas a lo largo de la pared de *Aspergillus* y *Cryptococcus*, ya sea contenidas en la superficie de exosomas o acomplejada con glucanos en el interior de la pared<sup>145,214,239</sup>. En conjunto, nuestros resultados confirman que, más allá de que también se encuentre en la membrana plasmática con anclaje GPI, su principal localización podría ser la pared fúngica, lugar donde llevaría a cabo su función. De igual manera, los resultados se repitieron en el resto de cepas del serotipo D.

Sin embargo, también se llevó en paralelo el mismo experimento, pero con el serotipo A, donde también se observó fluorescencia asociada al Nb3-Cy5 en la pared celular. Además, la intensidad de fluorescencia es mayor en la pared del serotipo A que en la del D. Aunque su grosor es mayor, visualmente se puede apreciar que la tinción es mucho más intensa que en cualquiera del serotipo D, echando por tierra la hipótesis de que la cápsula o la pared impedían el acceso del Nb3 a su diana en serotipo A.

A su vez, se habían introducido en el mismo experimento las cepas acapsulares cap60- y cap67- de *C. neoformans* H99 y *C. deneoformans* B3501, respectivamente, con el objetivo de comprobar si la eliminación de la cápsula favorecía el acceso del Nb3 a su diana. Pese a que en todo el experimento se usaron los mismos parámetros de intensidad y ganancia en el microscopio confocal, la intensidad de fluorescencia asociada al Nb3-Cy5 fue menor en las cepas acapsulares

en comparación con sus homólogas capsulares. Aunque tanto *C. neoformans* H99 cap60- como *C. deneoformans* cap67- carecen de dos manosiltransferasas y son incapaces de secretar GXM, aunque sí GalXM<sup>357,358</sup>, podría ser que la ausencia de los componentes de la capsula perjudiquen, de alguna manera, a la secreción o a la retención de otros componentes de la pared, como *CnGel*. Por otra parte, también podría ser explicada esta menor fluorescencia por el hecho de que los lavados de la tinción podrían ser más efectivos en las cepas acapsulares, al estar todo más expuesto al agua que en las cepas con capsula. Es decir, que los lavados hayan arrastrado más cantidad de Nb3 unido a su diana al ser más accesible en las cepas acapsulares.

Otra de las cepas analizadas fue la que se le delecionó *CnGel*. Lo más interesante fue la ausencia total de fluorescencia asociada al Nb3-Cy5, lo cual sugiere que el Nb3 se está uniendo a *CnGel* de forma específica. Tanto la ausencia de fluorescencia en este mutante como la ausencia de efecto antifúngico en el NbSseK1 son resultados que dan soporte a la consigna de que el efecto del Nb3 es específico. Además, pese a que todas las cepas de este estudio fueron cultivadas en los mismos tiempos y en las mismas condiciones, se puede apreciar que las células de *C. neoformans* H99 *CnGel*- poseen una cápsula de mayores dimensiones que el resto de cepas empleadas, algo que concuerda con los resultados obtenidos en el experimento de composición de monosacáridos de la pared y cápsula de *Cryptococcus* y que se discutirá más adelante. Junto a esto, para confirmar que el Nb3 se unía a la diana contra la que fue diseñado (*Gel4*), se introdujo un experimento similar con *A. fumigatus* B5233, donde se observó, de nuevo, que el Nb3 se acumulaba en la pared de *Aspergillus*.

Sabiendo que el Nb3 era capaz de alcanzar su diana, que su unión es específica y que su efecto también lo es, se comprobó la hipótesis de si el Nb3 era capaz de alterar la composición química de la pared de *Cryptococcus*. Las células de las diferentes cepas de *C. neoformans* y *C. deneoformans*, que fueron cultivadas previamente en agar Sabouraud durante 1 semana, tiempo para el cual el agotamiento de los recursos de la placa de Petri haya inducido la síntesis de más cápsula que la que tuvieran creciendo en condiciones favorables<sup>211,212,257,258</sup>, fueron puestas en medio RPMI 1640 fresco en contacto, o no, con Nb3. Al cultivarse en un medio fresco y rico en nutrientes, las nuevas células que se generan apenas poseen cápsula<sup>209,211,212,252,257,258</sup>, por lo que la proporción entre glucosa y manosa debería decantarse a favor de la glucosa, componente principal de los glucanos de la pared. De hecho, al comprobar las proporciones de ambos monosacáridos en las cinéticas de los cultivos control (sin Nb3), se puede apreciar que durante las primeras 24h se produce un aumento de la cantidad de glucosa acumulada en las 3 cepas de *Cryptococcus* ensayadas, tiempo tras el cual cambia la tendencia y comienza a

disminuir la proporción de glucosa. Quizá esta disminución observada a partir de las 24h de cultivo se corresponda con un agotamiento del medio.

Sin embargo, tras añadir Nb3 a cultivos de estas tres cepas, se puede observar que la proporción de glucosa acomplejada en *Cryptococcus* desciende a lo largo de todo el experimento, siendo especialmente importante en las dos cepas del serotipo D, mientras que en el serotipo A también se produce descenso, aunque no llega a ser significativo. Este descenso implica, obviamente, un aumento en la manosa acomplejada, que estaría relacionado con un incremento en la cantidad de cápsula sintetizada y que se discutirá más adelante.

Volviendo a los experimentos de acceso del Nb3 a su diana, en el caso de la cepa mutante de *CnGel* se pudo observar una capsula sobredimensionada pese a haber sido cultivada en las mismas condiciones que el resto de cepas. Tras analizar la composición en monosacáridos de esta cepa a 24h, se puede apreciar que la composición es idéntica a la del resto de cepas a las que se les añadió Nb3, pudiendo relacionar la ausencia de la enzima del mutante con la inhibición de la enzima por parte del Nb3 en el resto de cepas. Es decir, que la adición de Nb3 en las cepas WT indujo el mismo efecto sobre la capsula y la pared de *Cryptococcus* que la ausencia de dicha enzima tras ser eliminada por edición genética. Por tanto, de acuerdo a las imágenes obtenidas por microscopía confocal del mutante, la adición de Nb3 estaría induciendo un aumento de síntesis de cápsula.

Como se ha descrito en la literatura, aunque no se ha descubierto una 1,6- $\beta$ -glucano sintasa, se han descubierto seis genes (genes KRE) relacionados, de alguna manera, con su síntesis<sup>240</sup>. Las cepas mutantes de varios de ellos mostraron reducción en la cantidad de 1,6- $\beta$ -glucano en la pared y, lo más interesante, mostraron una cápsula agrandada, aunque de aspecto menos liso y compacto que en las cepas WT, sugiriendo que, aunque más grande, no necesariamente era más funcional, ya que mostraron diferentes problemas como virulencia reducida, menor integridad de la pared y resistencia a químicos, así como menor retención de proteínas con anclaje GPI en la pared, algo que también puede ser consecuencia de una reducción en el transporte de vesículas extracelulares, dado que varios de estos genes participan en esas funciones<sup>240</sup>.

Pese a que *Gel4/CnGel* participan en la elongación del 1,3- $\beta$ -glucano recién sintetizado, también son las únicas enzimas conocidas en *Aspergillus* y *Cryptococcus* por introducir enlaces  $\beta$ -1,6 en forma de ramificación<sup>358</sup> por lo que estas enzimas presentan varias actividades. Por un lado, tienen actividad  $\beta$ -1,3 endoglucanasa, es decir, que son capaces de escindir un fragmento de  $\beta$ -1,3-glucano de una molécula mayor. Por otro,  $\beta$ -1,3 transglicosilasa, es decir, que son capaces de unir mediante un enlace  $\beta$ -1,3 el fragmento de  $\beta$ -1,3-glucano escindido previamente al C3

del residuo de glucosa del extremo no reductor de otra molécula  $\beta$ -1,3 glucano. Junto a las anteriores, también poseen actividad  $\beta$ -1,6 transglicosilasa, ya que son capaces de añadir el fragmento de  $\beta$ -1,3-glucano escindido mediante enlace  $\beta$ -1,6 interno (ramificación en cualquiera de los C6 libres) a otra molécula de  $\beta$ -1,3 glucano. Sabiendo que el  $\beta$ -1,6 glucano fúngico es una molécula compuesta por enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 y que no se ha encontrado hasta la fecha ninguna  $\beta$ -1,6-glucano sintasa similar a las que sintetizan otros glucanos de la pared fúngica, se puede lanzar la hipótesis de que si *Gel4/CnGel* actúasen un tiempo infinito sobre una molécula de  $\beta$ -1,3-glucano lineal al final se acabarían acumulando un montón de enlaces  $\beta$ -1,6 en un polisacárido altamente ramificado y con una cantidad decreciente de enlaces  $\beta$ -1,3 enterrados entre las numerosas ramificaciones. Es decir, que la síntesis del  $\beta$ -1,6-glucano presente en la pared fúngica comenzaría con la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano por parte de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa y, posteriormente, sería modificado por *Gel4/CnGel* hasta tomar la forma final de  $\beta$ -1,6-glucano. Además, una alta tasa de actividad de *Gel4/CnGel* in vivo podría provocar una alta tasa de modificación del  $\beta$ -1,3-glucano presente en la pared fúngica, haciendo compleja su detección mediante el tratamiento de las muestras con  $\beta$ -1,3 endo y exoglucanasas, el cual es el método habitual<sup>359,360</sup>.

En conjunto con lo anterior, como se ha mencionado varias veces, *CnGel/Gel4* forman parte del proteoma de la pared de *Aspergillus* y *Cryptococcus* y son secretadas en exosomas junto con otras enzimas implicadas en la síntesis y remodelación de la pared. Puesto que varios genes KRE están relacionados con el transporte, entre otras cosas, de esas proteínas a través del interior de la célula y, probablemente, de la pared, es muy posible que la reducción en la cantidad de  $\beta$ -1,6-glucano que observaban en sus mutantes se debiese a una reducción en la cantidad de *CnGel* traslocada a la pared<sup>240</sup>.

Por otra parte, el aumento en la síntesis de cápsula en las cepas tratadas puede ir en concordancia con una reducción en la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano de forma indirecta. Se ha descrito en la literatura que tanto la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa fúngica como de plantas se ven inhibidas por UDP<sup>360-362</sup>. Las  $\beta$ -1,3-glucano sintasas se alimentan de UDP-glucosa que acaban incorporando al  $\beta$ -1,3-glucano, generando, a su vez, UDP como subproducto capaz de inhibir potenteamente a la enzima. Por otra parte, pese a que la manosa se incorpora en la cápsula partiendo de GDP-manosa, otros monosacáridos necesarios en la síntesis del GXM y de GXMGal como glucurónico, xilosa y galactosa van unidos a UDP, así como la N-acetilglucosamina de la quitina<sup>212,258</sup>, por lo que un incremento en su síntesis podría inducir una acumulación de UDP que inhibiese la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa.

Por último, comentar que, aunque la N-acetilglucosamina se detectó en la mayoría de los casos, en muchas ocasiones se encontraba en torno al límite de detección del HPLC (15nM), con excepción de la cepa B3501, donde se pudieron detectar en los cultivos tratados con Nb3 cantidades mayores de este monosacárido, directamente relacionado con la quitina y el quitosano, probablemente en respuesta al estrés generado por el Nb3 en la integridad de la pared celular<sup>128,363–365</sup>.

En conjunto, la inhibición de la actividad de *Gel4/CnGel* puede alterar la generación de  $\beta$ -1,3 glucano funcional, así como de, probablemente,  $\beta$ -1,6-glucano. La ausencia o la disfunción de estos polisacáridos puede acarrear otra serie de problemas y/o respuestas de las células afectadas de forma directa o indirecta, como puede ser un incremento en el tamaño de la cápsula o una inhibición de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa por el UDP generado de más debido a una síntesis de cápsula aberrante.

A lo largo de este trabajo, los buenos resultados de inhibición enzimática *in vitro* de *Gel4* se tradujeron en una inhibición del crecimiento de cultivos de *Aspergillus spp.* y, lo que fue más sorprendente, de *Cryptococcus spp.*, especialmente de *C. deneoformans*. El siguiente paso fue el desarrollo de modelos animales, en un primer momento de nemátodos, para después continuar con los modelos murinos de aspergilosis y criptococosis invasivas.

Comenzar a probar un nuevo fármaco en sistemas vivos puede desvelar riesgos o toxicidades para el hospedador que en los ensayos llevados a cabo hasta ahora no habrían podido ser descubiertos. Por lo tanto, con el objetivo de reducir posibles efectos secundarios no deseados del fármaco sobre modelos de animales superiores, como el murino, es habitual ensayar la eficacia y la seguridad de un fármaco en modelos animales más simples, como es el caso de *C. elegans*. Si bien es cierto que algunas toxicidades asociadas al empleo del fármaco sobre el organismo hospedador pueden no estar presentes en nemátodos, pero sí en mamíferos, ensayar primero con estos modelos aporta la posibilidad de obtener una primera previsualización de la eficacia del fármaco en términos de mejora de la supervivencia, siendo ésta, al final, la principal razón de ser de un antibiótico.

Por otra parte, aunque *C. elegans* se lleva usando como modelo de estudio en diferentes campos desde hace más de 50 años, los modelos de enfermedades fúngicas invasoras son relativamente recientes, habiendo pasado apenas 10 años desde los primeros ensayos publicados<sup>317,321,322,324</sup>. Hay que indicar que la enfermedad causada tanto por *Aspergillus* como por *Cryptococcus* en *C. elegans* no es muy semejante a la que transcurre en mamíferos. Mientras que en *C. elegans* las esporas o células fúngicas son ingeridas por el gusano y se alojan a lo largo del tracto digestivo

de éste, donde se desarrollan y acaban generando la infección<sup>321</sup>, la forma de entrada en humanos para ambos organismos suele ser por vía respiratoria. De hecho, en el modelo de aspergilosis las conidias que germinan en el interior del nemátodo dan lugar a hifas que acaban traspasándolo, incluida hasta la cutícula, y salen al exterior. Además, ambos modelos de infección en *C. elegans* discurren de forma muy rápida, eliminando a más del 80% de los individuos infectados a las 48-72h de infección<sup>321,322</sup>.

De igual manera, en los dos modelos de EFI en *C. elegans* que se han llevado a cabo en este trabajo, ambas infecciones discurrieron rápidamente, acabando con más del 85% de los nemátodos infectados no tratados en 60h (48h de experimento + 12h de inoculación). No obstante, la adición de Nb3 en concentraciones crecientes sobre estos nemátodos también indujo una mejora creciente en la supervivencia, alcanzándose la máxima supervivencia ( $\approx$ 75% para ambos modelos) con la máxima concentración empleada. De esta manera, se confirmó que el efecto del Nb3 sobre *A. fumigatus* y *C. deneoformans* era dosis-dependiente. Además, dichas concentraciones de Nb3 aplicadas sobre nemátodos no infectados no afectaron en absoluto a la supervivencia a 48h, implicando ausencia de toxicidad aguda.

Por otra parte, también fueron ensayadas las efectividades de otros fármacos, como el VCZ y la CSF, titulados en ambos modelos. En el caso de la CSF, también mostró efecto dosis-dependiente en ambos modelos, aunque su efectividad fue algo peor en *Cryptococcus* que en *Aspergillus*, en concordancia con los resultados obtenidos de inhibición del crecimiento de ambos hongos *in vitro*, así como con la literatura publicada<sup>230,232,233</sup>, donde se indica que su  $\beta$ -1,3-glucano sintasa es sensible a equinocandinas aunque este hongo tiene mecanismos de resistencia que le protegen del efecto de éstas, siendo necesario elevar las dosis para alcanzar el efecto inhibitorio deseado. Sin embargo, altas dosis de CSF (220  $\mu$ g/mL) resultaron tóxicas en gusanos. Si bien es cierto que en clínica no se alcanzan concentraciones tan elevadas en pacientes, resulta poco efectivo intentar ganar en supervivencia si también aumenta la toxicidad.

Algo parecido a lo de la CSF sucedió con el VCZ. *A. fumigatus* B5233 fue mucho más sensible al VCZ en los ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro* que *C. deneoformans* 1229817 (Figura S1), resultados que se trasladaron a los modelos de nemátodos para ambos microorganismos. Por otra parte, altas concentraciones de azoles en el medio afectaron a la supervivencia de nemátodos no infectados, sugiriendo que éstos presentaban toxicidad en *C. elegans* y explicando por qué las dosis más altas (200  $\mu$ g/mL) no inducían las mejores tasas de supervivencia a 48h, como sí lo hacían concentraciones intermedias. Los azoles, inhiben una 14- $\alpha$  demetilasa que participa en la síntesis de ergosterol fúngico<sup>76,78,80</sup>, pero que está muy

conservada en otros reinos y es común a la síntesis de esteroles. *C. elegans*, que es auxótrofo para el colesterol y necesita incorporar este del medio, carece de las tres primeras enzimas necesarias para su síntesis, aunque contiene las demás<sup>366-369</sup>. De hecho, ciertas hormonas necesarias para el desarrollo del nemátodo son de origen esteroideo, por lo que una posible inhibición de algún paso por parte de los azoles puede ser perniciosa para *C. elegans*.

Si bien es cierto que los fármacos anteriores solo presentaron toxicidades altas, se volvieron a ensayar cinéticas con concentraciones no tóxicas y cercanas a la MIC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> para los mismos fármacos junto con alguno más de uso en clínica, como la AMB y el FCZ, mostrando que el efecto del Nb3 sobre ambos modelos de enfermedad es semejante al que ofrecen los fármacos más usados en clínica. De hecho, se comportó mejor de lo esperado, lo que, sumado a su escasa toxicidad, motivó el diseño de los dos modelos de enfermedad en ratones.

El cambio de un modelo de nemátodos a uno de mamíferos supone una mayor aproximación a la realidad y un paso clave en el desarrollo de un nuevo fármaco. Tanto el modelo murino de aspergilosis como el de criptococosis que se desarrollaron son, al menos, más semejantes al curso que llevan ambas en humanos, aunque con alguna diferencia. Como se mencionó en la introducción, los ratones son bastante resistentes a una infección por *Aspergillus*. Aunque sí existen trabajos en los que se infectan ratones inmunocompetentes con *A. fumigatus*<sup>370,371</sup>, es necesario inocularles grandes cantidades de conidias y lo normal es que éstos sobrevivan a la infección y acaben regenerando el tejido pulmonar afectado. Sin embargo, aunque en humanos aparentemente inmunocompetentes también pueden darse aspergilosis, lo común es que sea en individuos inmunocomprometidos, por lo que la aplicación de fármacos inmunomoduladores en el modelo aproxima más éste a la realidad.

Por tanto, en un modelo basado en la administración de fármacos como la hidrocortisona, que modifica la respuesta inmunológica desde tipo Th1 hasta tipo Th2, es decir, hacia una respuesta menos protectora frente al patógeno, así como ciclofosfamida, que induce neutropenia en el ratón, la AI inducida en ese modelo será muy severa<sup>190,191,195,196</sup>. Puesto que los pacientes neutropénicos son uno de los principales grupos de riesgo de esta enfermedad, se creyó oportuno generar este modelo en el que el posible efecto antifúngico del Nb3 puede ser más definitorio que en otros más leves. De hecho, la mediana de la supervivencia de estos ratones es de tan solo 5 días en la mayoría de los experimentos, avanzando esta enfermedad inducida de forma muy agresiva en los individuos afectados.

Sin embargo, la administración de Nb3 de forma profiláctica profirió hasta un 75% de supervivencia si se administró intraperitonealmente (80 mg/Kg) y mostró efecto dosis-

dependiente ya que la mitad de la dosis indujo en torno a un 50% de supervivencia a 12 días. Comparado con los ratones control, cuya supervivencia se redujo a menos del 20%, demostró un efecto protector frente a la AI administrado en profilaxis. Además, la administración por vía IN de una dosis menor (20 mg/Kg) indujo un 100% de protección, lo que puede ser debido a que una aplicación directa sobre el tejido afectado garantiza que una mayor cantidad de fármaco, en este caso Nb3, está en contacto con las conidias de *Aspergillus* desde el momento en que germinan, comprometiendo la viabilidad de este hongo en el interior del organismo hospedador y, en última instancia, promocionando la supervivencia del individuo.

Al comparar los resultados de la profilaxis con la administración de Nb3 para el tratamiento de una enfermedad ya establecida (24h tras la inoculación), los resultados fueron bastante semejantes en el caso de haber sido administrado intraperitonealmente (80 mg/Kg), aportando en torno a un 80% de supervivencia 15 días, mientras que la administración IN con la infección ya establecida supuso un 50% de supervivencia. No obstante, hay que indicar que al comparar tratamiento IN con IP administrados a las 24h de la infección, la mediana de los grupos control se desvía un poco (5 días frente a 9 días), pudiendo ser debido a que la acumulación de líquido en los pulmones (vehículo) exacerbe el daño pulmonar asociado a la infección. Además, en estos experimentos también se ensayaron el Nb2 y el NbSseK1, que no mostraron diferencias con los animales infectados no tratados, indicando que no presentan actividad alguna frente a *A. fumigatus* B5233, algo que va en concordancia con lo observado en los experimentos de inhibición del crecimiento *in vitro*.

En conjunción con lo anterior, se evaluó la carga fúngica en pulmones de ratones tratados con vehículo o Nb3 mediante PCR cuantitativa ya que puede ser un método válido para comprobar el efecto de un antifúngico *in vivo*<sup>372-374</sup>. El tratamiento con Nb3 IN amplió el ciclo umbral en una diferencia de 4 ciclos de media en comparación con el grupo control, relacionándose directamente con una reducción en la carga fúngica. Por tanto, el Nb3 fue capaz de reducir la carga fúngica de forma efectiva, algo que también se pudo comprobar en los cortes histológicos de ratones tratados con Nb3 por vía IP. En dichos cortes, se podían observar enormes aspergilomas tras 72h de infección que habían invadido todo el tejido circundante y destruido cualquier estructura en su interior, haciendo más que evidente la destrucción de dicho tejido. Por otra parte, en los ratones tratados con Nb3, aunque habiendo también hongo presente, éste se encontraba fundamentalmente creciendo en el interior de bronquiolos y algún alveolo, sin destruir el tejido circundante donde estaban contenidos.

Aunque todavía no sea un método establecido en la detección de la AI, en la última década se han publicado varios trabajos que sugieren que metabolitos secundarios producidos por *A. fumigatus*, como son la GT o la bmGT, pueden ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico y en la monitorización de la progresión de las aspergilosis, tema en el que nuestro grupo de investigación también ha participado<sup>328,329,375–380</sup>. Cuando la GT, factor de virulencia de *A. fumigatus* en la aspergilosis, así como su metabolito regulatorio bmGT, son detectados en mayores cantidades se correlaciona con una mayor supervivencia del hongo y, por tanto, con una progresión de la enfermedad decantada hacia el lado del patógeno, ya que toxinas como la GT poseen propiedades inmunosupresoras que, añadidas al estado inmunocomprometido del individuo, contribuyen a exacerbar más la enfermedad<sup>166</sup>. En concordancia con los resultados previos de carga fúngica medida con PCR cuantitativa, los ratones a los que se les administró Nb3 por vía IN contenían menos GT y bmGT que los ratones a los que se les administró únicamente vehículo, correlacionando menor carga fúngica con menor presencia de toxinas en pulmón y mayor supervivencia que los ratones a los que únicamente se les administró vehículo.

Los buenos resultados obtenidos en el tratamiento por vía IP condujeron a la comparación con otros tratamientos, VCZ y AMB, en dosis que, utilizadas en otros modelos de aspergilosis encontrados en la literatura, indujeron altas tasas de eficacia en el tratamiento de la AI<sup>381–384</sup>. Aunque los tratamientos comerciales protegieron al 100% de los ratones en comparación con el 80% de supervivencia de los tratados con Nb3, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos ( $p=0.32$ ) como sí la hubo entre administrar Nb3 o vehículo ( $p<0.05$ ) o tratamientos comerciales frente a vehículo ( $p<0.01$ ). Por tanto, estos resultados apoyan la idea de que el Nb3 pueda convertirse en una opción terapéutica de segunda línea o de salvación cuando otros tratamientos no puedan ser administrados o no funcionen debidamente en pacientes con aspergilosis.

De forma similar, en el modelo de CI en ratón que se diseñó en este trabajo se decidió administrar hidrocortisona como tratamiento inmunosupresor con el fin de reducir el balance de respuesta Th1/Th2 en favor de una respuesta Th2 no protectora frente a *Cryptococcus* pese a que no es necesario inmunosuprimir a los ratones ya que son sensibles a la infección por *Cryptococcus*<sup>268,276,282,283</sup>. No obstante, al igual que en la AI, los pacientes afectados por CI suelen estar inmunocomprometidos en la mayoría de los casos, razón por la cual se decidió administrar hidrocortisona, además del hecho de reducir los tiempos del modelo de 6 a 2 meses.

En los primeros ensayos con el modelo de criptococosis, en los que se probó la administración IP en profilaxis de Nb3 a dos dosis diferentes frente a la administración de vehículo, se pudo

observar un efecto dosis-dependiente, donde la dosis máxima de Nb3 proporcionó más de un 60% de supervivencia a 65 días, comparado con el grupo control (PBS), donde la supervivencia fue 0. Por otra parte, las dosis bajas de Nb3 (5 mg/Kg) no tuvieron efecto alguno en la supervivencia de los ratones a los que se les administró, indicando que, probablemente, no se alcanzaba una concentración efectiva suficiente en los órganos afectados. Esta afirmación está apoyada por los datos obtenidos de carga fúngica en pulmones y cerebros de individuos sacrificados a los 14 días de infección, donde se observa una reducción de más de un orden de magnitud decimal en las CFUs obtenidas en los pulmones y cerebros de los ratones tratados con Nb3 a 20 mg/Kg, comparado con los datos obtenidos en los ratones control y los que se les administró Nb3 a 5 mg/Kg.

En concordancia con estos resultados, la administración de Nb3 (20 mg/Kg) por vía IP a ratones 24h después de haber sido infectados reportó resultados semejantes, un 60% de supervivencia a 65 días, al tratamiento en profilaxis, probablemente debido a que la infección por *Cryptococcus* es más lenta que lo que sucede, por ejemplo, en el modelo de aspergilosis, por lo que un retraso de 24h en el tratamiento puede no suponer mucha diferencia. De hecho, la administración de Nb3 IP 24h después de la infección volvió a proporcionar reducciones de más de un orden de magnitud en las CFUs de pulmones y cerebros de los individuos tratados respecto a los del grupo control. Sin embargo, retrasar el tratamiento 14 días después de la infección apenas mejoró la supervivencia de los ratones tratados con Nb3 respecto a los del grupo control (30% de supervivencia respecto al 15%) y, aunque sí se redujo la carga fúngica en pulmones y cerebros de estos ratones en tratamiento tardío respecto al control, no fue suficientemente significativo. Por tanto, aunque no hubo diferencia entre tratar a las 24h o en forma profiláctica, la efectividad del tratamiento se reduce muchísimo si se retrasa demasiados días, probablemente porque *Cryptococcus* ya haya invadido otros tejidos como cerebro o hígado para entonces, y sea mucho más difícil detener la progresión.

Los buenos resultados obtenidos en el tratamiento IP con Nb3 condujeron a la réplica del experimento donde se comprobó el estado de pulmones y cerebros mediante la valoración de cortes teñidos con HE. Aunque tanto ratones tratados con Nb3 como ratones control presentan signos de infección, el grado de afección de los miembros de un grupo y los del otro se puede apreciar a simple vista. La mayoría de las alteraciones asociadas a la infección son mucho más marcadas en los ratones a los que no se les administró Nb3. De hecho, la administración de Nb3 garantizó una mayor conservación de la estructura pulmonar al ser menos evidentes afecciones como la inflamación de los intersticios, la bronquiolitis o un menor número y dimensión de zonas hemorrágicas que en los ratones control, donde fueron más destacadas.

De igual manera, se ensayó el efecto de otros Nbs (Nb2 y NbSseK1) en el modelo de criptococosis donde, administrados intraperitonealmente e intranasalmente, no reportaron ni mejora en la supervivencia ni reducción en las CFU al compararse con los ratones del grupo control. No obstante, estos resultados eran esperables ya que estos Nbs no mostraron actividad ni en el modelo de aspergilosis, ni en los experimentos de inhibición del crecimiento *in vitro* de ambos hongos. Sin embargo, la administración IN de Nb3 sí que proporcionó una mejora en la supervivencia apoyada por una reducción significativa en la carga fúngica presente en pulmones y cerebros de los individuos tratados frente a los del grupo control, mejorando incluso la tasa de supervivencia, aunque no significativamente, en comparación con la administración IP de Nb3, convirtiéndose probablemente en la forma más efectiva de administración del Nb3 en el modelo de criptococosis.

Además, también se detectó la presencia de los tres Nbs a las 3h de ser administrados intraperitonealmente en homogenizados de biopsias de cerebro y pulmón de ratones infectados con *C. deneoformans* 1229817, relacionándose la mejora en la supervivencia y en la carga fúngica con la presencia de Nb3 en los tejidos afectados. Por otra parte, haber sido detectados en biopsias cerebrales confirma que éstos Nbs fueron capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, punto fundamental para un efectivo tratamiento de la criptococosis.

Con todos estos resultados, se puede afirmar que el diseño de Nbs frente a enzimas fúngicas como inhibidores de estas son una opción factible en la generación de nuevos fármacos antifúngicos. De hecho, ya se han generado scFvs frente a la 1,3-β-glucano sintasa de *Cryptococcus* teniendo éxito en la inhibición del crecimiento y reportando MIC<sub>50</sub> comparables a las obtenidas con el Nb3 frente a *CnGel* de *Cryptococcus* (0.3 μM respecto a 4.2 μM)<sup>236</sup>. Además, también se han administrado anticuerpos anti β-glucano en modelos murinos de *Cryptococcus*, mostrando actividad inhibitoria en la formación de cápsula y logrando reducir la carga fúngica en cerebros e hígado tras ser infectados por vía IV tanto en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes<sup>238</sup>, algo que apoya los resultados obtenidos para el Nb3.

Aunque otros fármacos aprobados para uso clínico, como el VCZ o la AMB, sean más efectivos en el tratamiento de aspergilosis y criptococosis, no siempre funcionan y es frecuente la aparición de cepas resistentes a ellos, por lo que en estos casos en los que, además, las opciones terapéuticas son escasas, es importante el desarrollo de nuevos fármacos, así como de nuevas estrategias para la obtención de estos. El desarrollo de un Nb con características inhibitorias sobre dicha enzima y sobre el crecimiento de dicho hongo puede posibilitar el desarrollo de otros fármacos de origen biológico o sintético cuya efectividad sobre la enzima que inhibirán,

así como la inhibición del crecimiento del organismo al que afectarán, puedan ser evaluados como prueba de concepto en forma de un Nb antes incluso de ser diseñados o descubiertos. La generación de estos Nbs con capacidades inhibitorias es, por tanto, un proceso mucho más dirigido que buscar sustancias capaces de inhibir una enzima en bibliotecas de miles de moléculas esperando tener un golpe de suerte.

## 6. Conclusiones

- Todos los Nbs generados en este estudio poseyeron capacidad inhibitoria sobre *Gel4*.
- El Nb3 fue el único Nb que ejerció actividad antifúngica sobre cultivos de *Aspergillus*.
- El Nb3 también mostró actividad inhibitoria sobre cultivos de *Cryptococcus*.
- El Nb3 mostró efecto aditivo con todos los fármacos ensayados en este estudio y usados en clínica exceptuando la combinación con FCZ en *C. neoformans*, además de efecto sinérgico con la AMB y el Nb4 al ser aplicados sobre cultivos de *A. fumigatus*.
- El Nb3 es capaz de atravesar la cápsula de *Cryptococcus* y unirse específicamente a su diana, además de inducir cambios en la composición química de la pared de este hongo debido, probablemente, a su acción inhibitoria sobre *CnGel*.
- El Nb3 mejoró significativamente la supervivencia de nemátodos infectados con *A. fumigatus* y con *C. deneoformans*, además de exhibir muy poca o nula toxicidad sobre ellos.
- El Nb3 indujo mejoras significativas en la supervivencia de los modelos murinos de aspergilosis y criptococosis independientemente de la vía de administración o el momento en el que se le administró, con excepción del tratamiento de la criptococosis 14 días después de ser infectados, donde no fue lo suficientemente potente para mejorar la supervivencia.
- La mejora en la supervivencia siempre ha estado en concordancia con una reducción en la carga fúngica en ambos modelos, ya sea cuantificada por PCR cuantitativa (*Aspergillus*) o por recuentos de diluciones seriadas sembrados en placa (*Cryptococcus*).
- La administración de Nb3 también propició mejoras notables en el estado general de los órganos de los ratones afectados por ambas enfermedades al compararse sus cortes histológicos teñidos con HE con los de los ratones del grupo control.
- En general, la generación de Nbs con propiedades antibióticas supone un buen as bajo la manga para contrarrestar el creciente aumento en la aparición y el afianzado de resistencias en microorganismos de interés clínico.

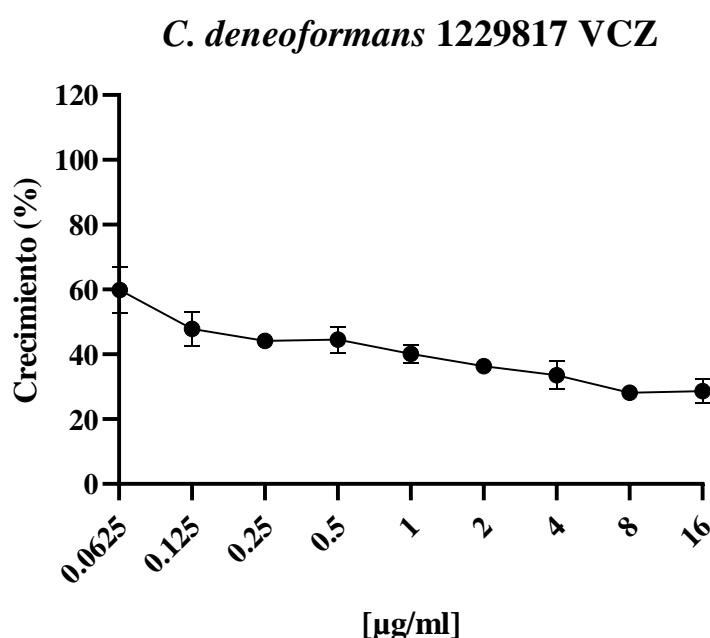
## 7. Abreviaturas

<b>ABPA</b>	Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica
<b>AI</b>	Aspergilosis Invasiva
<b>AMB</b>	Anfotericina B
<b>APC</b>	Aspergilosis Pulmonar Crónica
<b>BAL</b>	Lavado broncoalveolar, del inglés “Bronchoalveolar Lavage”
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón, del inglés “ <i>Brain Herath Infusion</i> ”
<b>bmGT</b>	Bismetilgliotoxina
<b>CGC</b>	<i>Caenorhabditis Genetics Centre</i>
<b>CI</b>	Criptococosis invasiva
<b>CnGel</b>	<i>Cryptococcus neoformans</i> Glucan elongator
<b>CSF</b>	Caspofungina
<b>CT</b>	Tomografía computerizada, del inglés “ <i>Computerized Tomography</i> ”
<b>Cy5</b>	Fluoruro de sulfocianina-5
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>EFI</b>	Enfermedad fúngica invasora
<b>EORTC</b>	Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer, del inglés “ <i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i> ”
<b>EUCAST</b>	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos, del inglés “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
<b>FCZ</b>	Fluconazol
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GalXM</b>	Galactoxilomanano
<b>GDP</b>	Guanosildifosfato
<b>GEL</b>	<i>Glucan elongator</i>
<b>GLC</b>	Glucosa
<b>GMN</b>	Galactomanano
<b>GT</b>	Gliotoxina
<b>GXM</b>	Glucuronoxilomanano
<b>GXMGal</b>	Glucuronoxilomananogalactano
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HEPES</b>	N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(ácido etanosulfónico)
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución, del inglés “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”
<b>IN</b>	Intranasal
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IT</b>	Intratraqueal
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>L6-SR</b>	Laminarinhexaosa marcada con sulfurodamina
<b>MAN</b>	Manosa

<b>MIC</b>	Concentración Mínima Inhibitoria, del inglés “ <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ”
<b>MS</b>	Metabolito secundario
<b>NacGLN</b>	N-acetilglucosamina
<b>Nb</b>	Nanobody
<b>NETs</b>	Trampas extracelulares de neutrófilos, del inglés “ <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> ”
<b>NGM</b>	Medio de crecimiento de nemátodos, del inglés “ <i>Nematode Growth Medium</i> ”
<b>NRPS</b>	Péptido sintasa no ribosomal
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés “ <i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i> ”
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino, del inglés “ <i>Phosphate Buffered Saline</i> ”
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
<b>PKS</b>	Poliquétido sintasa
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno, del inglés “ <i>Reactive Oxygen Species</i> ”
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>UDP</b>	Uracildifosfato
<b>VCZ</b>	Voriconazol
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>XTT</b>	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

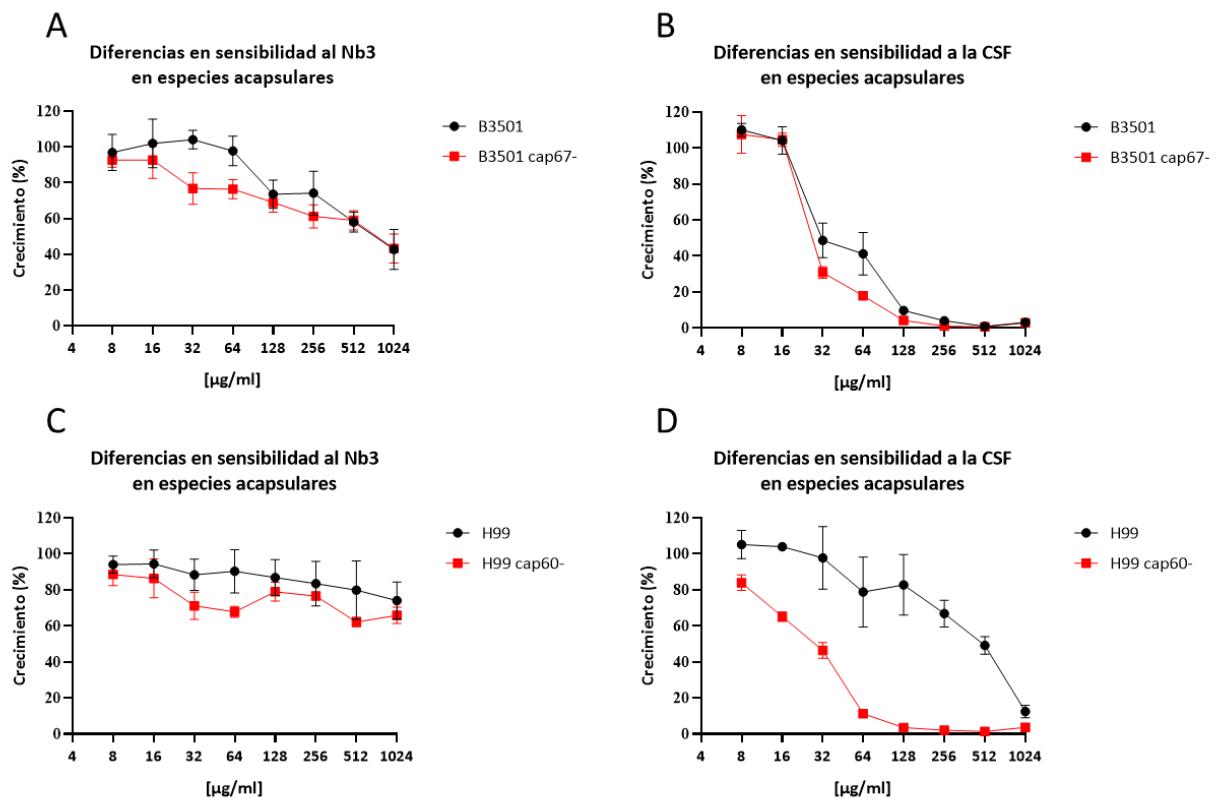
## 8. Anexos

### 8.1. Sensibilidad de *C. deneoformans* 1229817 a VCZ



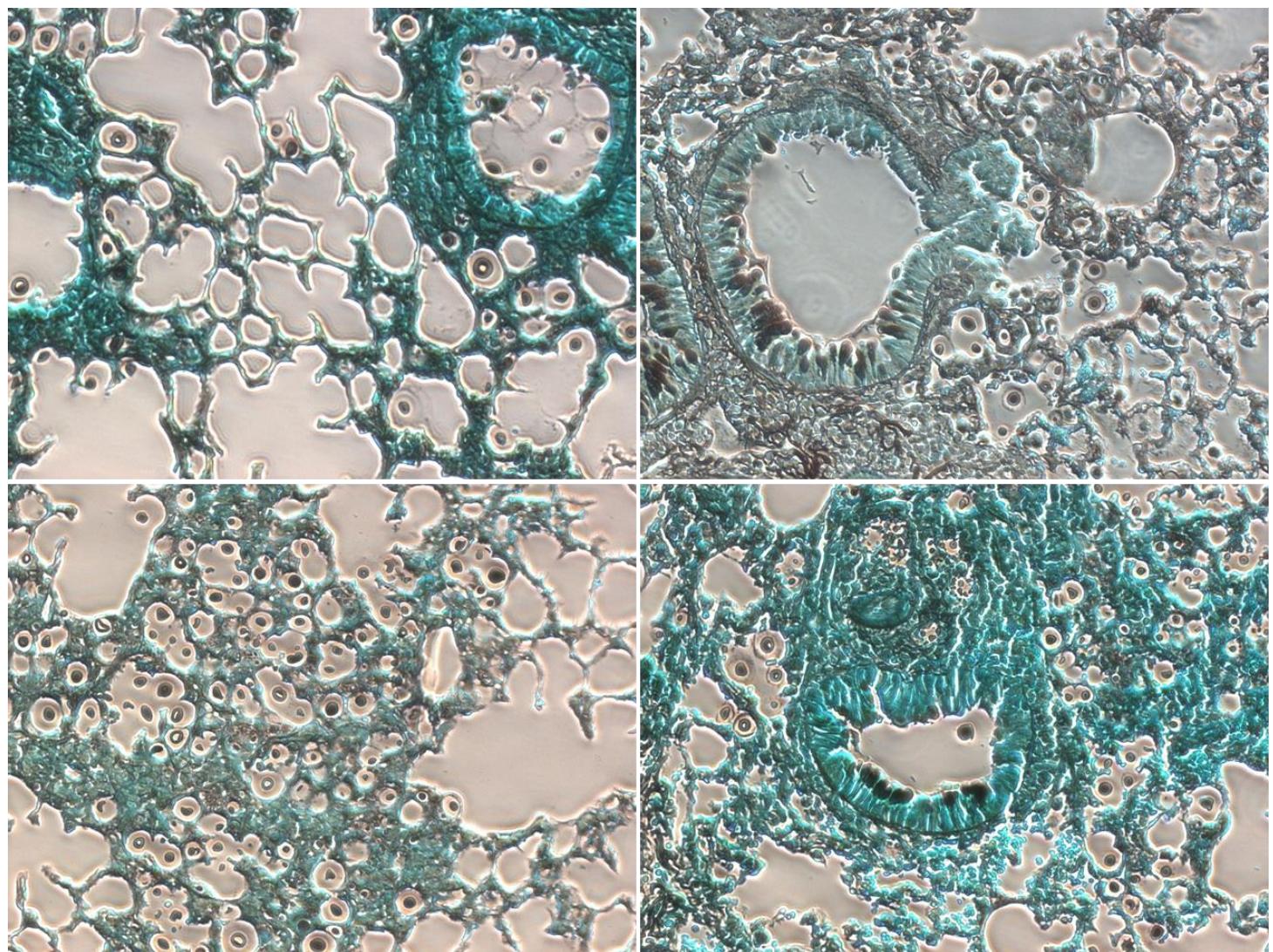
**Figura S1:** Sensibilidad de *C. deneoformans* 1229817 a VCZ. Cultivos de *C. deneoformans* fueron sometidos a concentraciones variables de VCZ y cultivados en RPMI 1640 a 30°C durante dos días, tras lo cual, se midió la inhibición del crecimiento ejercida mediante colorimetría basada en la reducción de XTT como se describe en materiales y métodos.

## 8.2. Diferencias en la sensibilidad al Nb3 y a la CSF entre cepas con cápsula y acapsulares



**Figura S2:** Diferencias en sensibilidad al Nb3 y a la CSF en cepas con cápsula y acapsulares del serotipo D (A y B) y del serotipo A (C y D). Los cultivos de las cepas de ambas especies se llevaron a cabo de la forma habitual descrita en materiales y métodos y el porcentaje de crecimiento se relacionó con la reducción de XTT medida mediante colorimetría.

### 8.3. Tinciones de plata-metenamina en cortes de pulmones infectados con *C. deneoformans*



**Figura S3:** Cortes histológicos de pulmones de ratones infectados con *C. deneoformans* 1229817 y teñidos con plata-metenamina. En ellas se puede observar en negro las células de *Cryptococcus* creciendo en el tejido pulmonar con un espacio a su alrededor transparente ocupado por su cápsula.

## 9. Bibliografía

1. Pappas PG, Chen SCA, Donnelly JP. The Evidence Supporting the Revised EORTC/MSGERC Definitions for Invasive Fungal Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72:S77-S78. doi:10.1093/cid/ciaa1765
2. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1508:17-65. doi:10.1007/978-1-4939-6515-1\_2/TABLES/6
3. Lass-Flörl C, Samardzic E, Knoll M. Serology anno 2021—fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(9):1230-1241. doi:10.1016/j.cmi.2021.02.005
4. Von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Fungal Infection: New Treatments to Meet New Challenges. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116(16):271. doi:10.3238/ARZTEBL.2019.0271
5. World Health Organization (WHO). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.
6. Jenks JD, Cornely OA, Chen SCA, Thompson GR, Hoenigl M. Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? *Mycoses*. 2020;63(10):1021-1032. doi:10.1111/MYC.13148
7. Rüping MJGT, Vehreschild JJ, Cornely OA. Patients at High Risk of Invasive Fungal Infections. *Drugs 2008* 68:14. 2012;68(14):1941-1962. doi:10.2165/00003495-200868140-00002
8. Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14281. doi:10.4414/SMW.2016.14281
9. Denis B, Guiguet M, De Castro N, et al. Relevance of EORTC Criteria for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in HIV-Infected Patients, and Survival Trends Over a 20-Year Period in France. *Clin Infect Dis*. 2015;61(8):1273-1280. doi:10.1093/CID/CIV492
10. Francisco EC, de Jong AW, Hagen F. Cryptococcosis and *Cryptococcus*. *Mycopathologia*. 2021;186(5):729. doi:10.1007/S11046-021-00577-7
11. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015;78:16-48. doi:10.1016/J.FGB.2015.02.009
12. Steenbergen JN, Casadevall A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1974-1976. doi:10.1128/JCM.38.5.1974-1976.2000
13. Tortorano AM, Viviani MA, Rigoni AL, Cogliati M, Roverselli A, Pagano A. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative

- patients in Italy. *Mycoses*. 1997;40(7-8):297-302. doi:10.1111/J.1439-0507.1997.TB00235.X
14. Gago S, Serrano C, Alastraße-Izquierdo A, et al. Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. *Mycoses*. 2017;60(1):40-50. doi:10.1111/MYC.12543
  15. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TÁL, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(7). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A019760
  16. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi* 2017, Vol 3, Page 57. 2017;3(4):57. doi:10.3390/JOF3040057
  17. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin North Am*. 2021;35(2):415-434. doi:10.1016/J.IDC.2021.03.008
  18. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review*. 2011;20(121):156. doi:10.1183/09059180.00001011
  19. Pappas PG. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2013;124:61-79. Accessed November 21, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23874010/>
  20. Hurtado JC, Castillo P, Fernandes F, et al. Mortality due to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in low-income settings: an autopsy study. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/S41598-019-43941-W
  21. Sajadi MM, Roddy KM, Chan-Tack KM, Forrest GN. Risk factors for mortality from primary cryptococcosis in patients with HIV. *Postgrad Med*. 2009;121(2):107-113. doi:10.3810/PGM.2009.03.1983
  22. Iyer KR, Revie NM, Fu C, Robbins N, Cowen LE. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(7):454. doi:10.1038/S41579-021-00511-0
  23. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(8):873. doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8
  24. Rai LS, Wijlick L Van, Bougnoux ME, Bachellier-Bassi S, d'Enfert C. Regulators of commensal and pathogenic life-styles of an opportunistic fungus—*Candida albicans*. *Yeast*. 2021;38(4):243-250. doi:10.1002/YEA.3550
  25. D'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;45(3):1-55. doi:10.1093/FEMSRE/FUAA060
  26. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):103-124. doi:10.1016/j.idc.2015.10.013

27. McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):389-413. doi:10.1016/J.IDC.2021.03.007
28. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):415-434. doi:10.1016/J.IDC.2021.03.008
29. Baddley JW. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2011;49 Suppl 1(SUPPL. 1). doi:10.3109/13693786.2010.505204
30. Herbrecht R, Bories P, Moulin JC, Ledoux MP, Letscher-Bru V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1272(1):23-30. doi:10.1111/J.1749-6632.2012.06829.X
31. Freiwald T, Büttner S, Cheru NT, et al. CD4+ T cell lymphopenia predicts mortality from *Pneumocystis pneumonia* in kidney transplant patients. *Clin Transplant.* 2020;34(9). doi:10.1111/CTR.13877
32. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(1). doi:10.1128/CMR.00140-18
33. Xia R, Wang D. Risk factors of invasive candidiasis in critical cancer patients after various gastrointestinal surgeries: A 4-year retrospective study. *Medicine.* 2019;98(44):e17704. doi:10.1097/MD.00000000000017704
34. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(1):179-206. doi:10.1016/J.IDC.2015.10.006
35. Gushiken AC, Saharia KK, Baddley JW. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):493-514. doi:10.1016/j.idc.2021.03.012
36. Noguchi H, Matsumoto T, Kimura U, Hiruma M, Kusuvara M, Ihn H. Cutaneous Cryptococcosis. *Med Mycol J.* 2019;60(4):101-107. doi:10.3314/MMJ.19.008
37. Esteller D, Llansó L, Escoda O. Disseminated cryptococcosis in an immunocompetent patient. A case report. *Med Clin (Barc).* 2021;156(8):411-412. doi:10.1016/J.MEDCLI.2020.01.014
38. Qu F, Qu Z, Lv Y, Song B, Wu B. Disseminated Cryptococcosis revealed by transverse myelitis in Immunocompetent patient: a case report and review of the literature. *BMC Neurol.* 2020;20(1). doi:10.1186/S12883-020-1598-6
39. Ruan Q, Zhu Y, Chen S, Zhu L, Zhang S, Zhang W. Disseminated cryptococcosis with recurrent multiple abscesses in an immunocompetent patient: a case report and literature review. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1). doi:10.1186/S12879-017-2459-9
40. Sun L, Chen H, Shao C, Song Y, Bai C. Pulmonary cryptococcosis with trachea wall invasion in an immunocompetent patient: a case report and literature review. *Respiration.* 2014;87(4):324-328. doi:10.1159/000357715
41. Nasser N, Filho NN, Vieira AG. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient. *An Bras Dermatol.* 2011;86(6):1178-1180. doi:10.1590/S0365-05962011000600018

42. Leroy J, Vuotto F, Le V, et al. Invasive rhino-orbital-cerebral aspergillosis in an immunocompetent patient. *J Mycol Med.* 2020;30(3). doi:10.1016/J.MYCMED.2020.101002
43. Abazid RM, Kattea M, Haroon S, Alhujilan AH, Alkathlan MS. Recurrent Invasive Aspergillosis in Immunocompetent Patient. *Radiol Cardiothorac Imaging.* 2021;3(3). doi:10.1148/RYCT.2021210015
44. Ratermann KL, Ereshefsky BJ, Fleishaker EL, Thornton AC, Buch KP, Martin CA. Fulminant Invasive Pulmonary Aspergillosis After a Near-Drowning Accident in an Immunocompetent Patient. *Ann Pharmacother.* 2014;48(9):1225-1229. doi:10.1177/1060028014537611
45. Ray A, Mittal A, Vyas S. CT Halo sign: A systematic review. *Eur J Radiol.* 2020;124. doi:10.1016/J.EJRAD.2020.108843
46. Arias M, Santiago L, Vidal-García M, et al. Preparations for Invasion: Modulation of Host Lung Immunity During Pulmonary Aspergillosis by Gliotoxin and Other Fungal Secondary Metabolites. *Front Immunol.* 2018;9(NOV). doi:10.3389/FIMMU.2018.02549
47. Kwon-Chung KJ, Sogui JA. Aspergillus fumigatus—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003743. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1003743
48. Brakhage AA, Langfelder K. Menacing mold: the molecular biology of Aspergillus fumigatus. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:433-455. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160625
49. Kwon-Chung KJ, Sogui JA. Aspergillus fumigatus--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog.* 2013;9(12):1-4. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1003743
50. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1. 2018;4(1):1-20. doi:10.1038/nrdp.2018.26
51. D'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon Candida albicans infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* 2021;45(3):1-55. doi:10.1093/FEMSRE/FUAA060
52. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. Candida albicans cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(2):96. doi:10.1038/NRMICRO.2016.157
53. Bassetti M, Scudeller L, Giacobbe DR, et al. Developing definitions for invasive fungal diseases in critically ill adult patients in intensive care units. Protocol of the FUNgal infections Definitions in ICU patients (FUNDICU) project. *Mycoses.* 2019;62(4). doi:10.1111/MYC.12869
54. Peter Donnelly J, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 2020;71(6):1367. doi:10.1093/CID/CIZ1008

55. Von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Fungal Infection: New Treatments to Meet New Challenges. *Dtsch Arztbl Int.* 2019;116(16):271. doi:10.3238/ARZTEBL.2019.0271
56. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-1821. doi:10.1086/588660
57. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clinical Microbiology and Infection.* 2018;24:e1-e38. doi:10.1016/J.CMI.2018.01.002/ATTACHMENT/8391D917-C74B-49C7-877A-F8E9B9DFE1F6/MMC1.XLSX
58. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):415-434. doi:10.1016/J.IDC.2021.03.008
59. Latgé JP. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(2):310-350. doi:10.1128/CMR.12.2.310
60. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(1):125-142. doi:10.1016/J.IDC.2015.10.015
61. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review.* 2011;20(121):156. doi:10.1183/09059180.00001011
62. Lamothe F, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Investigational Antifungal Agents for Invasive Mycoses: A Clinical Perspective. *Clin Infect Dis.* 2022;75(3):534-544. doi:10.1093/CID/CIAB1070
63. Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30(6):487-495. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2007.07.019
64. Ruhnke M, Cornely OA, Schmidt-Hieber M, et al. Treatment of invasive fungal diseases in cancer patients—Revised 2019 Recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Mycoses.* 2020;63(7):653-682. doi:10.1111/MYC.13082
65. Ruhnke M, Cornely OA, Schmidt-Hieber M, et al. Treatment of invasive fungal diseases in cancer patients-Revised 2019 Recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Mycoses.* 2020;63(7):653-682. doi:10.1111/MYC.13082
66. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol.* 2017;133:86-96. doi:10.1016/J.BCP.2016.11.019

67. Grela E, Zdybicka-Barabas A, Pawlikowska-Pawlega B, et al. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Scientific Reports* 2019;9:1. 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-019-53517-3
68. Neumann A, Czub J, Baginski M. On the possibility of the amphotericin B-sterol complex formation in cholesterol- and ergosterol-containing lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*. 2009;113(48):15875-15885. doi:10.1021/JP905133F/SUPPL\_FILE/JP905133F\_SI\_001.PDF
69. Hamill RJ. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013;73(9):919-934. doi:10.1007/S40265-013-0069-4/TABLES/2
70. Sabra R, Branch RA. Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Saf*. 1990;5(2):94-108. doi:10.2165/00002018-199005020-00003
71. Goldman RD, Koren G. Amphotericin B nephrotoxicity in children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(7):421-426. doi:10.1097/00043426-200407000-00004
72. IS P, M P. Flucytosine. *Essentials of Clinical Mycology: Second Edition*. Published online 2022:57-60. doi:10.1007/978-1-4419-6640-7\_4
73. Schwarz P, Janbon G, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. Combination of amphotericin B with flucytosine is active in vitro against flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(1):383-385. doi:10.1128/AAC.00446-06
74. Schwarz P, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. Efficacy of amphotericin B in combination with flucytosine against flucytosine-susceptible or flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* during disseminated murine cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):113-120. doi:10.1128/AAC.50.1.113-120.2006
75. Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(2):171-179. doi:10.1093/JAC/46.2.171
76. Shafiei M, Peyton L, Hashemzadeh M, Foroumadi A. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorg Chem*. 2020;104:104240. doi:10.1016/J.BIOORG.2020.104240
77. Tolentino FI, Foster CS, Lahav M, Liu LHS, Rabin AR. Toxicity of intravitreous miconazole. *Arch Ophthalmol*. 1982;100(9):1504-1509. doi:10.1001/ARCHOPHT.1982.01030040482021
78. Gupta AK, Lyons DCA. The Rise and Fall of Oral Ketoconazole. *J Cutan Med Surg*. 2015;19(4):352-357. doi:10.1177/1203475415574970
79. Yi WM, Schoeppler KE, Jaeger J, et al. Voriconazole and posaconazole therapeutic drug monitoring: a retrospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1). doi:10.1186/S12941-017-0235-8
80. Seyedmousavi S, Mouton JW, Verweij PE, Brüggemann RJM. Therapeutic drug monitoring of voriconazole and posaconazole for invasive aspergillosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(9):931-941. doi:10.1586/14787210.2013.826989

81. Lamothe F, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Investigational Antifungal Agents for Invasive Mycoses: A Clinical Perspective. *Clin Infect Dis.* 2022;75(3):534-544. doi:10.1093/CID/CIAB1070
82. Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: The newest class of antifungals. *Annals of Pharmacotherapy.* 2009;43(10):1647-1657. doi:10.1345/aph.1M237
83. Chen SCA, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: A comparison. *Drugs.* 2011;71(1):11-41. doi:10.2165/11585270-000000000-00000
84. Cappelletty D, Eiselstein-McKittrick K. The echinocandins. *Pharmacotherapy.* 2007;27(3):369-388. doi:10.1592/PHCO.27.3.369
85. Patil A, Majumdar S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2017;69(12):1635-1660. doi:10.1111/JPHP.12780
86. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. <http://dx.doi.org/101586/eri0918>. 2014;7(4):453-460. doi:10.1586/ERI.09.18
87. Pappas PG, Chen SCA, Donnelly JP. The Evidence Supporting the Revised EORTC/MSGERC Definitions for Invasive Fungal Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 2021;72:S77-S78. doi:10.1093/cid/ciaa1765
88. Bassetti M, Azoulay E, Kullberg BJ, et al. EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Diseases: Summary of Activities of the Intensive Care Unit Working Group. *Clin Infect Dis.* 2021;72(Suppl 2):S121-S127. doi:10.1093/CID/CIAA1751
89. Bassetti M, Azoulay E, Kullberg BJ, et al. EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Diseases: Summary of Activities of the Intensive Care Unit Working Group. *Clin Infect Dis.* 2021;72(Suppl 2):S121-S127. doi:10.1093/CID/CIAA1751
90. Sanguinetti M, Posteraro B, Beigelman-Aubry C, et al. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;74(Supplement\_2):ii27-ii37. doi:10.1093/JAC/DKZ041
91. García J, Pemán J. Microbiological diagnosis of invasive mycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(4):179-185. doi:10.1016/J.RIAM.2018.05.003
92. Ibáñez-Martínez E, Ruiz-Gaitán A, Pemán-García J. Update on the diagnosis of invasive fungal infection. *Revista Española de Quimioterapia.* 2017;1:16-21.
93. Bouza E, Almirante B, Rodríguez JG, et al. Biomarkers of fungal infection: Expert opinion on the current situation. *Revista Española de Quimioterapia.* 2020;33(1):1. doi:10.37201/REQ/2260.2019
94. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27(6):484-492. doi:10.1097/QCO.0000000000000111
95. Rogers TR, Verweij PE, Castanheira M, Dannaoui E, White PL, Arendrup MC. Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(8):2053-2073. doi:10.1093/JAC/DKAC161
96. Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Resistance to Antifungal Drugs. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):279-311. doi:10.1016/J.IDC.2021.03.003

97. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(7):792-798. doi:10.1016/j.cmi.2019.03.028
98. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, Meis JF. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin Infect Dis*. 2016;62(3):362-368. doi:10.1093/CID/CIV885
99. Pasula S, Chandrasekar PH. Azole resistance in *Aspergillus* species: promising therapeutic options. *Expert Opin Pharmacother*. 2021;22(15):2071-2078. doi:10.1080/14656566.2021.1940134
100. Roilides E, Iosifidis E. Acquired resistance in fungi: how large is the problem? *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(7):790-791. doi:10.1016/j.cmi.2019.02.018
101. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):792-798. doi:10.1016/J.CMI.2019.03.028
102. Jeanvoine A, Rocchi S, Bellanger AP, Reboux G, Millon L. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment? *Med Mal Infect*. 2020;50(5):389-395. doi:10.1016/J.MEDMAL.2019.07.014
103. Rivelli Zea SM, Toyotome T. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* as an emerging worldwide pathogen. *Microbiol Immunol*. 2022;66(3):135-144. doi:10.1111/1348-0421.12957
104. Park HS, Jun SC, Han KH, Hong SB, Yu JH. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Adv Appl Microbiol*. 2017;100:161-202. doi:10.1016/BS.AAMBS.2017.03.001
105. Rokas A. *Aspergillus*. *Current Biology*. 2013;23(5):R187-R188. doi:10.1016/j.cub.2013.01.021
106. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 2014;78(1):141-173. doi:10.1016/J.SIMYCO.2014.07.004
107. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol*. 2016;7(MAY). doi:10.3389/FMICB.2016.00683
108. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and Related Species. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(2). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A019786
109. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia*. 2014;178(5-6):427-433. doi:10.1007/S11046-014-9775-Z
110. Arias RS, Orner VA, Martinez-Castillo J, Sobolev VS. *Aspergillus* Section Flavi, Need for a Robust Taxonomy. *Microbiol Resour Announc*. 2021;10(48). doi:10.1128/MRA.00784-21
111. Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, et al. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud Mycol*. 2019;93:1-63. doi:10.1016/j.simyco.2018.06.001

112. Lass-Flörl C, Dietl AM, Kontoyiannis DP, Brock M. *Aspergillus terreus* Species Complex. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(4). doi:10.1128/CMR.00311-20
113. Samson RA, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. New species in *Aspergillus* section Terrei. *Stud Mycol.* 2011;69(1):39. doi:10.3114/SIM.2011.69.04
114. Tekaia F, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(4):385-392. doi:10.1016/j.mib.2005.06.017
115. Rhodes JC. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Med Mycol.* 2006;44(Supplement\_1):S77-S81. doi:10.1080/13693780600779419
116. Baltussen TJH, Zoll J, Verweij PE, Melchers WJG. Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2019;84(1). doi:10.1128/MMBR.00049-19
117. Pál K, Van Diepeningen AD, Varga J, Hoekstra RF, Dyer PS, Debets AJM. Sexual and vegetative compatibility genes in the aspergilli. *Stud Mycol.* 2007;59:19. doi:10.3114/SIM.2007.59.03
118. Dyer PS, O'Gorman CM. A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(6):649-654. doi:10.1016/j.mib.2011.10.001
119. Kwon-Chung KJ, Sogui JA. Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: Why so fastidious? *Trends Microbiol.* 2009;17(11):481. doi:10.1016/j.tim.2009.08.004
120. Baltussen TJH, Coolen JPM, Zoll J, Verweij PE, Melchers WJG. Gene co-expression analysis identifies gene clusters associated with isotropic and polarized growth in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Fungal Genetics and Biology.* 2018;116:62-72. doi:10.1016/j.fgb.2018.04.013
121. de Medina-Redondo M, Arnáiz-Pita Y, Clavaud C, et al.  $\beta$ (1,3)-Glucanosyl-Transferase Activity Is Essential for Cell Wall Integrity and Viability of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One.* 2010;5(11). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0014046
122. O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009 457:7228. 2009;457(7228):471-474. doi:10.1038/nature07528
123. Pyrzak W, Miller KY, Miller BL. Mating Type Protein Mat1-2 from Asexual *Aspergillus fumigatus* Drives Sexual Reproduction in Fertile *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 2008;7(6):1029. doi:10.1128/EC.00380-07
124. Ramsak B, Markau J, Pazén T, Dahlmann TA, Krappmann S, Kück U. The master regulator MAT1-1-1 of fungal mating binds to its targets via a conserved motif in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *G3: Genes/Genomes/Genetics.* 2021;11(2). doi:10.1093/G3JOURNAL/JKAA012
125. Lee MJ, Sheppard DC. Recent advances in the understanding of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Microbiology.* 2016;54(3):232-242. doi:10.1007/S12275-016-6045-4/METRICS

126. Latgé JP, Beauvais A, Chamilos G. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. <https://doi.org/101146/annurev-micro-030117-020406>. 2017;71:99-116. doi:10.1146/ANNUREV-MICRO-030117-020406
127. Yoshimi A, Miyazawa K, Abe K. Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016;80(9):1700-1711. doi:10.1080/09168451.2016.1177446
128. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*. 2017;5(3). doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0035-2016/ASSET/D74CA821-EC4E-4AEA-8929-97FBFF0DE838/ASSETS/GRAPHIC/FUNK-0035-2016-FIG7.GIF
129. Muszkieta L, Aimanianda V, Mellado E, et al. Deciphering the role of the chitin synthase families 1 and 2 in the in vivo and in vitro growth of *Aspergillus fumigatus* by multiple gene targeting deletion. *Cell Microbiol*. 2014;16(12):1784-1805. doi:10.1111/CMI.12326/SUPPINFO
130. Mellado E, Aufauvre-Brown A, Gow NAR, Holden DW. The *Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode Class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol*. 1996;20(3):667-679. doi:10.1046/J.1365-2958.1996.5571084.X
131. Mellado E, Dubreucq G, Mol P, et al. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*. 2003;38(1):98-109. doi:10.1016/S1087-1845(02)00516-9
132. Mouyna I, Delliére S, Beauvais A, et al. What Are the Functions of Chitin Deacetylases in *Aspergillus fumigatus*? *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:28. doi:10.3389/FCIMB.2020.00028/FULL
133. Dichtl K, Samantaray S, Aimanianda V, et al. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall  $\beta$ -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Mol Microbiol*. 2015;95(3):458-471. doi:10.1111/MMI.12877/SUPPINFO
134. Mouyna I, Aimanianda V, Hartl L, et al. GH16 and GH81 family  $\beta$ -(1,3)-glucanases in *Aspergillus fumigatus* are essential for conidial cell wall morphogenesis. *Cell Microbiol*. 2016;18(9):1285-1293. doi:10.1111/CMI.12630
135. Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, et al. Characterization of a New  $\beta$ (1-3)-Glucan Branching Activity of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem*. 2010;285(4):2386. doi:10.1074/JBC.M109.077545
136. Aimanianda V, Simenel C, Garnaud C, et al. The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of  $\beta$ -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. *mBio*. 2017;8(3). doi:10.1128/MBIO.00619-17
137. Wagener J, Striegler K, Wagener N.  $\alpha$ - and  $\beta$ -1,3-glucan synthesis and remodeling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2020;425:53-82. doi:10.1007/82\_2020\_200/FIGURES/2
138. Gastebois A, Fontaine T, Latgé JP, Mouyna I. Notes:  $\beta$ (1-3)Glucanosyltransferase Gel4p Is Essential for *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2010;9(8):1294. doi:10.1128/EC.00107-10

139. Mouyna I, Morelle W, Vai M, et al. Deletion of GEL2 encoding for a  $\beta$ (1–3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*. 2005;56(6):1675–1688. doi:10.1111/J.1365-2958.2005.04654.X
140. Muszkieta L, Fontaine T, Beau R, et al. The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored DFG Family Is Essential for the Insertion of Galactomannan into the  $\beta$ -(1,3)-Glucan–Chitin Core of the Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*. *mSphere*. 2019;4(4). doi:10.1128/MSPHERE.00397-19
141. Zhao W, Lü Y, Ouyang H, et al. N-Glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall  $\beta$ -glucan synthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology*. 2013;23(8):955–968. doi:10.1093/GLYCOB/CWT032
142. Aimanianda V, Simenel C, Garnaud C, et al. The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of  $\beta$ -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. *mBio*. 2017;8(3). doi:10.1128/MBIO.00619-17
143. Mouyna I, Fontaine T, Vai M, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(20):14882–14889. doi:10.1074/jbc.275.20.14882
144. Zhao W, Li C, Liang J, Sun S. The *Aspergillus fumigatus*  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase Gel7 plays a compensatory role in maintaining cell wall integrity under stress conditions. *Glycobiology*. 2014;24(5):418–427. doi:10.1093/GLYCOB/CWU003
145. Rizzo J, Chaze T, Miranda K, et al. Characterization of Extracellular Vesicles Produced by *Aspergillus fumigatus* Protoplasts. *mSphere*. 2020;5(4). doi:10.1128/MSPHERE.00476-20/ASSET/06D08E7A-CB39-4D23-9A4A-D4D5539F1854/ASSETS/GRAPHIC/MSPHERE.00476-20-F0006.JPG
146. Beauvais A, Bozza S, Kniemeyer O, et al. Deletion of the  $\alpha$ -(1,3)-Glucan Synthase Genes Induces a Restructuring of the Conidial Cell Wall Responsible for the Avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*. 2013;9(11):1003716. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1003716
147. Beauvais A, Maubon D, Park S, et al. Two  $\alpha$ (1-3) Glucan Synthases with Different Functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(3):1531. doi:10.1128/AEM.71.3.1531-1538.2005
148. Le Mauff F, Sheppard DC. Understanding *Aspergillus fumigatus* galactosaminogalactan biosynthesis: A few questions remain. *The Cell Surface*. 2023;9. doi:10.1016/J.TCSW.2023.100095
149. Bleichrodt RJ, Foster P, Howell G, Latgé JP, Read ND. Cell Wall Composition Heterogeneity between Single Cells in *Aspergillus fumigatus* Leads to Heterogeneous Behavior during Antifungal Treatment and Phagocytosis. *mBio*. 2020;11(3). doi:10.1128/MBIO.03015-19
150. Gibbons JG, Rokas A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol*. 2013;21(1):14. doi:10.1016/J.TIM.2012.09.005

151. Fedorova ND, Khaldi N, Joardar VS, et al. Genomic Islands in the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet*. 2008;4(4):1000046. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1000046
152. Yaegashi J, Oakley BR, Wang CCC. Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014;41(2):433. doi:10.1007/S10295-013-1386-Z
153. Redrado S, Esteban P, Domingo MP, et al. Integration of In Silico and In Vitro Analysis of Gliotoxin Production Reveals a Narrow Range of Producing Fungal Species. *Journal of Fungi*. 2022;8(4). doi:10.3390/JOF8040361/S1
154. Guo CJ, Yeh HH, Chiang YM, et al. Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *J Am Chem Soc*. 2013;135(19):7205-7213. doi:10.1021/JA3123653
155. Yin Y, Cai M, Zhou X, Li Z, Zhang Y. Polyketides in *Aspergillus terreus*: biosynthesis pathway discovery and application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(18):7787-7798. doi:10.1007/s00253-016-7733-z
156. Tamiya H, Ochiai E, Kikuchi K, et al. Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, and *Aspergillus viridinutans*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2015;21(5):385-391. doi:10.1016/J.JIAC.2015.01.005
157. Askenazi M, Driggers EM, Holtzman DA, et al. Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. *Nat Biotechnol*. 2003;21(2):150-156. doi:10.1038/NBT781
158. Esteban P, Redrado S, Comas L, et al. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of Gliotoxin Alone and in Combination with Antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)*. 2021;13(2). doi:10.3390/TOXINS13020085
159. Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E. Antifungal activity of microbial secondary metabolites. *PLoS One*. 2011;6(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0025321
160. Hatabu T, Hagiwara M, Taguchi N, et al. *Plasmodium falciparum*: the fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmodicidal effect on *P. falciparum*. *Exp Parasitol*. 2006;112(3):179-183. doi:10.1016/J.EXPPARA.2005.11.012
161. Aljofan M, Sganga ML, Lo MK, et al. Antiviral activity of gliotoxin, gentian violet and brilliant green against Nipah and Hendra virus in vitro. *Virol J*. 2009;6:187. doi:10.1186/1743-422X-6-187
162. McDougall JK. Antiviral action of gliotoxin. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1969;27(2):255-267. doi:10.1007/BF01249648
163. Rightsel WA, Schneider HG, Sloan BJ, et al. ANTIVIRAL ACTIVITY OF GLIOTOXIN AND GLIOTOXIN ACETATE. *Nature*. 1964;204(4965):1333-1334. doi:10.1038/2041333B0
164. Larin NM, Copping MP, Herbst-Laier RH, Roberts B, Wenham NM. Antiviral activity of gliotoxin. *Chemotherapy*. 1965;10(1):12-23. doi:10.1159/000220389

165. Spikes S, Xu R, Nguyen CK, et al. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis.* 2008;197(3):479-486. doi:10.1086/525044
166. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, et al. Gliotoxin Is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP Deletion Attenuates Virulence in Mice Immunosuppressed with Hydrocortisone. *Eukaryot Cell.* 2007;6(9):1562. doi:10.1128/EC.00141-07
167. Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvaney NG. Immuno-evasive *aspergillus* virulence factors. *Mycopathologia.* 2014;178(5-6):363-370. doi:10.1007/S11046-014-9768-Y/FIGURES/1
168. Kamei K, Watanabe A. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Med Mycol.* 2005;43(Supplement\_1):S95-S99. doi:10.1080/13693780500051547
169. Perrone G, Gallo A. *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Methods in Molecular Biology.* 2017;1542:33-49. doi:10.1007/978-1-4939-6707-0\_3/TABLES/2
170. Coyle CM, Kenaley SC, Rittenour WR, Panaccione DG. Association of ergot alkaloids with conidiation in *Aspergillus fumigatus*. <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2007.11832512>. 2017;99(6):804-811. doi:10.1080/15572536.2007.11832512
171. Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27(4):155-182. doi:10.1016/J.RIAM.2010.10.003
172. Perrone G, Gallo A. *Aspergillus* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol Biol.* 2017;1542:33-49. doi:10.1007/978-1-4939-6707-0\_3
173. He Y, Wang B, Chen W, Cox RJ, He J, Chen F. Recent advances in reconstructing microbial secondary metabolites biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Biotechnol Adv.* 2018;36(3):739-783. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2018.02.001
174. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2019;33(1). doi:10.1128/CMR.00140-18
175. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(1). doi:10.1128/CMR.00140-18
176. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clinical and Experimental Allergy.* 2013;43(8):850-873. doi:10.1111/cea.12141
177. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: A clinical review. *European Respiratory Review.* 2011;20(121):156-174.
178. Moldoveanu B, Gearhart AM, Jalil BA, Saad M, Guardiola JJ. Pulmonary Aspergillosis: Spectrum of Disease. *American Journal of the Medical Sciences.* 2021;361(4):411-419. doi:10.1016/j.amjms.2020.12.009
179. Denning DW, Cadarne J, Beigelman-Aubry C, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J.* 2016;47(1):45-68. doi:10.1183/13993003.00583-2015

180. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(1). doi:10.1128/CMR.00140-18
181. Osherov N. Interaction of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* with lung epithelial cells. *Front Microbiol.* 2012;3(SEP). doi:10.3389/FMICB.2012.00346
182. Reedy JL, Crossen AJ, Negoro PE, et al. The C-Type Lectin Receptor Dectin-2 Is a Receptor for *Aspergillus fumigatus* Galactomannan. *mBio*. Published online January 4, 2023. doi:10.1128/MBIO.03184-22/SUPPL\_FILE/MBIO.03184-22-S0001.PDF
183. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, et al. Phagocytosis and Intracellular Fate of *Aspergillus fumigatus* Conidia in Alveolar Macrophages. *Infect Immun.* 2003;71(2):891. doi:10.1128/IAI.71.2.891-903.2003
184. Cunha C, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Human Genetic Susceptibility to Invasive Aspergillosis. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003434. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1003434
185. Espinosa V, Jhingran A, Dutta O, et al. Inflammatory Monocytes Orchestrate Innate Antifungal Immunity in the Lung. *PLoS Pathog.* 2014;10(2):1003940. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1003940
186. Hebart H, Bollinger C, Fisch P, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood.* 2002;100(13):4521-4528. doi:10.1182/BLOOD-2002-01-0265
187. Carvalho A, De Luca A, Bozza S, et al. TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8+ T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. *Blood.* 2012;119(4):967-977. doi:10.1182/BLOOD-2011-06-362582
188. Beck O, Topp MS, Koehl U, et al. Generation of highly purified and functionally active human TH1 cells against *Aspergillus fumigatus*. *Blood.* 2006;107(6):2562-2569. doi:10.1182/BLOOD-2005-04-1660
189. Fahmy SR, Soliman AM, Ali EM. Antifungal and Antihepatotoxic Effects of Sepia Ink Extract Against Oxidative Stress as a Risk Factor of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Neutropenic Mice. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines.* 2014;11(3):148. doi:10.4314/AJTCAM.V11I3.22
190. Mirkov I, Stojanovic I, Glamoclija J, et al. Differential mechanisms of resistance to sublethal systemic *Aspergillus fumigatus* infection in immunocompetent BALB/c and C57BL/6 mice. *Immunobiology.* 2011;216(1-2):234-242. doi:10.1016/J.IMBIO.2010.04.007
191. Mirkov I, Glamoclija J, Stosic-Grujicic S, Zolotarevski L, Kataranovski D, Kataranovski M. Differential strain-related tissue immune response to sublethal systemic *Aspergillus fumigatus* infection in mice. *APMIS.* 2013;121(3):211-220. doi:10.1111/J.1600-0463.2012.02958.X
192. Hoselton SA, Samarasinghe AE, Seydel JM, Schuh JM. An inhalation model of airway allergic response to inhalation of environmental *Aspergillus fumigatus* conidia in sensitized BALB/c mice. *Med Mycol.* 2010;48(8):1056-1065. doi:10.3109/13693786.2010.485582

193. Mirkov I, Popov Aleksandrov A, Lazovic B, Glamoclija J, Kataranovski M. Usefulness of animal models of aspergillosis in studying immunity against *Aspergillus* infections. *J Mycol Med.* 2019;29(1):84-96. doi:10.1016/J.MYCMED.2019.01.006
194. Szigeti ZM, Talas L, Palicz Z, et al. Murine model to follow hyphal development in invasive pulmonary aspergillosis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(6):2817-2825. doi:10.1007/S00253-018-8800-4/TABLES/2
195. Xu X, Zhang X. Effects of cyclophosphamide on immune system and gut microbiota in mice. *Microbiol Res.* 2015;171:97-106. doi:10.1016/J.MICRES.2014.11.002
196. Feng C, Zhang M, Zhang S, Zhang J, Li C, Zhou J. Therapeutic effects of pentoxyfylline on invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *BMC Pulm Med.* 2021;21(1). doi:10.1186/S12890-021-01396-8
197. May RC, Stone NRH, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(2):106. doi:10.1038/NRMICRO.2015.6
198. Rathore SS, Sathiyamoorthy J, Lalitha C, Ramakrishnan J. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. *Microb Pathog.* 2022;166:105521. doi:10.1016/J.MICPATH.2022.105521
199. Rajasingham R, Govender NP, Jordan A, et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(12):1748-1755. doi:10.1016/S1473-3099(22)00499-6
200. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The Human Fungal Pathogen *Cryptococcus* Can Complete Its Sexual Cycle during a Pathogenic Association with Plants. *Cell Host Microbe.* 2007;1(4):263-273. doi:10.1016/j.chom.2007.05.005
201. Enache-Angoulvant A, Chandenier J, Symoens F, et al. Molecular Identification of *Cryptococcus neoformans* Serotypes. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1261. doi:10.1128/JCM.01839-06
202. Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S, Vidotto V. Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Mycoses.* 2007;50(4):277-281. doi:10.1111/J.1439-0507.2007.01357.X
203. Ginns J, Malloch DW. *Filobasidiella depauperata* (Tremellales): Haustorial branches and parasitism of *Verticillium lecanii*. *Mycological Progress* 2003 2:2. 2003;2(2):137-140. doi:10.1007/S11557-006-0051-6
204. Zhao Y, Lin X. *Cryptococcus neoformans*: sex, morphogenesis, and virulence. *Infect Genet Evol.* 2021;89:104731. doi:10.1016/J.MEEGID.2021.104731
205. Zhao Y, Lin J, Fan Y, Lin X. Life Cycle of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73:17-42. doi:10.1146/ANNUREV-MICRO-020518-120210
206. Sun S, Coelho MA, David-Palma M, Priest SJ, Heitman J. The evolution of sexual reproduction and mating-type locus: links to pathogenesis of *Cryptococcus* human pathogenic fungi. *Annu Rev Genet.* 2019;53:417. doi:10.1146/ANNUREV-GENET-120116-024755

207. Roach KC, Feretzaki M, Sun S, Heitman J. Unisexual Reproduction. *Adv Genet.* 2014;85:255. doi:10.1016/B978-0-12-800271-1.00005-6
208. Hsueh YP, Xue C, Heitman J. A constitutively active GPCR governs morphogenetic transitions in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 2009;28(9):1220. doi:10.1038/EMBOJ.2009.68
209. Doering TL. How Sweet it is! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:223. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.62.081307.162753
210. Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol.* 2008;10(10):2043-2057. doi:10.1111/J.1462-5822.2008.01186.X
211. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 2009;68:133. doi:10.1016/S0065-2164(09)01204-0
212. Wang ZA, Li LX, Doering TL. Unraveling synthesis of the cryptococcal cell wall and capsule. *Glycobiology.* 2018;28(10):719-730. doi:10.1093/GLYCOB/CWY030
213. Wolf JM, Espadas-Moreno J, Luque-Garcia JL, Casadevall A. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Extracellular Vesicles with the Cell Wall. *Eukaryot Cell.* 2014;13(12):1484. doi:10.1128/EC.00111-14
214. Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Cell wall proteome of pathogenic fungi. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):339-351. doi:10.18388/ABP.2015\_1032
215. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/FMICB.2019.02993
216. Alspaugh JA. "Virulence Mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis." *Fungal Genet Biol.* 2015;78:55. doi:10.1016/J.FGB.2014.09.004
217. Fonseca FL, Nimrichter L, Cordero RJB, et al. Role for chitin and chitooligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2009;8(10):1543-1553. doi:10.1128/EC.00142-09
218. Rodrigues J, Ramos CL, Frases S, Godinho RM da C, Fonseca FL, Rodrigues ML. Lack of chitin synthase genes impacts capsular architecture and cellular physiology in *Cryptococcus neoformans*. *The Cell Surface.* 2018;2:14. doi:10.1016/J.TCSW.2018.05.002
219. Hole CR, Lam WC, Upadhyia R, Lodge JK. *Cryptococcus neoformans* Chitin Synthase 3 Plays a Critical Role in Dampening Host Inflammatory Responses. *mbio.* 2020;11(1). doi:10.1128/MBIO.03373-19
220. Reese AJ, Yoneda A, Breger JA, et al. Loss of cell wall alpha(1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol Microbiol.* 2007;63(5):1385. doi:10.1111/J.1365-2958.2006.05551.X

221. Reese AJ, Doering TL. Cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol*. 2003;50(4):1401-1409. doi:10.1046/J.1365-2958.2003.03780.X
222. Bacon JSD, Jones D, Farmer VC, Webley DM. The occurrence of  $\alpha$ (1-3)glucan in *Cryptococcus*, *schizosaccharomyces* and *Polyporus* species, and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1968;158(2):313-315. doi:10.1016/0304-4165(68)90153-0
223. James PG, Cherniak R, Jones RG, Stortz CA, Reiss E. Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans* Cap 67. *Carbohydr Res*. 1990;198(1):23-38. doi:10.1016/0008-6215(90)84273-W
224. Almeida F, Wolf JM, Casadevall A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2015;14(12):1173-1185. doi:10.1128/EC.00103-15/ASSET/50133634-CB11-4D5D-8F35-52E68527308E/ASSETS/GRAPHIC/ZEK9990944990001.jpeg
225. Eigenheer RA, Jin Lee Y, Blumwald E, Phinney BS, Gelli A. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*. 2007;7(4):499-510. doi:10.1111/J.1567-1364.2006.00198.X
226. Casadevall JR, Perfect J, Heitman B, et al. *Cryptococcus neoformans*. Published online 1998. doi:10.1128/IAI.73.8.4922-4933.2005
227. Davis C, Joseph Wheat L, Myint T, Boulware DR, Bahr NC. Efficacy of Cerebrospinal Fluid Beta-d-Glucan Diagnostic Testing for Fungal Meningitis: a Systematic Review. *J Clin Microbiol*. 2020;58(4). doi:10.1128/JCM.02094-19
228. Thompson JR, Douglas CM, Li W, et al. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol*. 1999;181(2):444-453. doi:10.1128/JB.181.2.444-453.1999
229. Maligie MA, Selitrennikoff CP. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)beta-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2851-2856. doi:10.1128/AAC.49.7.2851-2856.2005
230. Feldmesser M, Kress Y, Mednick A, Casadevall A. The Effect of the Echinocandin Analogue Caspofungin on Cell Wall Glucan Synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis*. 2000;182(6):1791-1795. doi:10.1086/317614
231. Kalem MC, Subbiah H, Leipheimer J, Glazier VE, Panepinto JC. Puf4 Mediates Post-transcriptional Regulation of Cell Wall Biosynthesis and Caspofungin Resistance in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 2021;12(1):1-20. doi:10.1128/MBIO.03225-20
232. Cao C, Wang Y, Husain S, Soteropoulos P, Xue C. A Mechanosensitive Channel Governs Lipid Flippase-Mediated Echinocandin Resistance in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 2019;10(6). doi:10.1128/MBIO.01952-19

233. Cao C, Xue C. More than flipping the lid: Cdc50 contributes to echinocandin resistance by regulating calcium homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. *Microbial Cell*. 2020;7(4):115. doi:10.15698/MIC2020.04.714
234. Beattie SR, Jezewski AJ, Ristow LC, Wellington M, Krysan DJ. FKS1 Is Required for *Cryptococcus neoformans* Fitness In Vivo: Application of Copper-Regulated Gene Expression to Mouse Models of Cryptococcosis. *mSphere*. 2022;7(3). doi:10.1128/MSPHERE.00163-22
235. Moreira-Walsh B, Ragsdale A, Lam W, et al. Membrane Integrity Contributes to Resistance of *Cryptococcus neoformans* to the Cell Wall Inhibitor Caspofungin. Andrew Alspaugh J, ed. *mSphere*. 2022;7(4). doi:10.1128/MSPHERE.00134-22
236. Selvakumar D, Miyamoto M, Furuichi Y, Komiyama T. Inhibition of  $\beta$ -1,3-Glucan Synthase and Cell Growth of *Cryptococcus* species by Recombinant Single-chain Anti-idiotypic Antibodies. *The Journal of Antibiotics* 2006 59:2. 2006;59(2):73-79. doi:10.1038/ja.2006.10
237. Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, et al. Protection by Anti- $\beta$ -Glucan Antibodies Is Associated with Restricted  $\beta$ -1,3 Glucan Binding Specificity and Inhibition of Fungal Growth and Adherence. *PLoS One*. 2009;4(4). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0005392
238. Rachini A, Pietrella D, Lupo P, et al. An Anti- $\beta$ -Glucan Monoclonal Antibody Inhibits Growth and Capsule Formation of *Cryptococcus neoformans* In Vitro and Exerts Therapeutic, Anticryptococcal Activity In Vivo. *Infect Immun*. 2007;75(11):5085. doi:10.1128/IAI.00278-07
239. Rizzo J, Wong SSW, Gazi AD, et al. *Cryptococcus* extracellular vesicles properties and their use as vaccine platforms. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(10). doi:10.1002/JEV2.12129
240. Gilbert NM, Donlin MJ, Gerik KJ, et al. KRE genes are required for  $\beta$ -1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2010;76(2):517. doi:10.1111/J.1365-2958.2010.07119.X
241. Nosanchuk JD, Stark RE, Casadevall A. Fungal melanin: What do we know about structure? *Front Microbiol*. 2015;6(DEC):1463. doi:10.3389/FMICB.2015.01463/BIBTEX
242. Cordero RJB, Casadevall A. Melanin. *Current Biology*. 2020;30(4):R142-R143. doi:10.1016/j.cub.2019.12.042
243. Lee D, Jang EH, Lee M, et al. Unraveling Melanin Biosynthesis and Signaling Networks in *Cryptococcus neoformans*. *mbio*. 2019;10(5). doi:10.1128/MBIO.02267-19
244. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):931. doi:10.1007/S00253-011-3777-2
245. Pukkila-Worley R, Gerald QD, Kraus PR, et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*. 2005;4(1):190-201. doi:10.1128/EC.4.1.190-201.2005

246. Camacho E, Vij R, Chrissian C, et al. The structural unit of melanin in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem*. 2019;294(27):10471. doi:10.1074/JBC.RA119.008684
247. Casadevall A, Coelho C, Cordero RJB, et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*. 2019;10(1):822. doi:10.1080/21505594.2018.1431087
248. Cherniak R, Valafar H, Morris LC, Valafar F. *Cryptococcus neoformans* Chemotyping by Quantitative Analysis of  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Glucuronoxylomannans with a Computer-Simulated Artificial Neural Network. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5(2):146. doi:10.1128/CDLI.5.2.146-159.1998
249. Li LX, Rautengarten C, Heazlewood JL, Doering TL. UDP-Glucuronic Acid Transport Is Required for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *mbio*. 2018;9(1). doi:10.1128/MBIO.02319-17
250. Li LX, Ashikov A, Liu H, Griffith CL, Bakker H, Doering TL. *Cryptococcus neoformans* UGT1 encodes a UDP-Galactose/UDP-GalNAc transporter. *Glycobiology*. 2017;27(1):87. doi:10.1093/GLYCOB/CWW078
251. Li LX, Rautengarten C, Heazlewood JL, Doering TL. Xylose donor transport is critical for fungal virulence. *PLoS Pathog*. 2018;14(1). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1006765
252. Wear MP, Jacobs E, Wang S, et al. *Cryptococcus neoformans* capsule regrowth experiments reveal dynamics of enlargement and architecture. *J Biol Chem*. 2022;298(4). doi:10.1016/J.JBC.2022.101769
253. Yoneda A, Doering TL. A Eukaryotic Capsular Polysaccharide Is Synthesized Intracellularly and Secreted via Exocytosis. *Mol Biol Cell*. 2006;17(12):5131. doi:10.1091/MBC.E06-08-0701
254. Wolf JM, Espadas-Moreno J, Luque-Garcia JL, Casadevall A. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Extracellular Vesicles with the Cell Wall. *Eukaryot Cell*. 2014;13(12):1484. doi:10.1128/EC.00111-14
255. Sakaguchi N, Baba T, Fukuzawa M, Ohno S. Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. *Mycopathologia*. 1993;121(3):133-141. doi:10.1007/BF01104068
256. Zaragoza O, Telzak A, Bryan RA, Dadachova E, Casadevall A. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol*. 2006;59(1):67-83. doi:10.1111/J.1365-2958.2005.04928.X
257. Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online*. 2004;6(1):10-14. doi:10.1251/BPO68
258. Gates MA, Thorkildson P, Kozel TR. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol*. 2004;52(1):13-24. doi:10.1111/J.1365-2958.2003.03957.X
259. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology (Reading)*. 2001;147(Pt 8):2355-2365. doi:10.1099/00221287-147-8-2355

260. Setianingrum F, Rautemaa-Richardson R, Denning DW. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. *Med Mycol*. 2019;57(2):133-150. doi:10.1093/MMY/MYY086
261. Ye F, Xie JX, Zeng QS, Chen GQ, Zhong SQ, Zhong NS. Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. *Lung*. 2012;190(3):339-346. doi:10.1007/S00408-011-9362-8
262. Hu XP, Wang RY, Wang X, et al. Dectin-2 polymorphism associated with pulmonary cryptococcosis in HIV-uninfected Chinese patients. *Med Mycol*. 2015;53(8):810-816. doi:10.1093/MMY/MYV043
263. Spec A, Powderly WG. Cryptococcal meningitis in AIDS. *Handb Clin Neurol*. 2018;152:139-150. doi:10.1016/B978-0-444-63849-6.00011-6
264. Vu K, Garcia JA, Gelli A. Cryptococcal Meningitis and Anti-virulence Therapeutic Strategies. *Front Microbiol*. 2019;10(FEB):353. doi:10.3389/FMICB.2019.00353
265. Chen R, Zhang Y, Zhou P, et al. Cryptococcemia According to Immune Status: An Analysis of 65 Critical Cases. *Infect Dis Ther*. 2021;10(1):363. doi:10.1007/S40121-020-00375-6
266. Zhao H, Zhou M, Zheng Q, et al. Clinical features and Outcomes of Cryptococcemia patients with and without HIV infection. *Mycoses*. 2021;64(6):656-667. doi:10.1111/MYC.13261
267. García-Rodas R, Zaragoza O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64(2):147-161. doi:10.1111/J.1574-695X.2011.00871.X
268. Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol*. 2015;10(4):565. doi:10.2217/FMB.14.132
269. Del Poeta M. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2004;3(5):1067. doi:10.1128/EC.3.5.1067-1075.2004
270. Campuzano A, Wormley FL. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(1). doi:10.3390/JOF4010033
271. Kitai Y, Sato K, Tanno D, et al. Role of Dectin-2 in the Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by Dendritic Cells. *Infect Immun*. 2021;89(10). doi:10.1128/IAI.00330-21
272. Kozel TR, Wilson MA, Murphy JW. Early events in initiation of alternative complement pathway activation by the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1991;59(9):3101-3110. doi:10.1128/iai.59.9.3101-3110.1991
273. Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol*. 2003;33(7):1957-1967. doi:10.1002/EJI.200323848
274. Mukaremera L, Lee KK, Wagener J, Wiesner DL, Gow NAR, Nielsen K. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *The Cell Surface*. 2018;1:15. doi:10.1016/J.TCSW.2017.12.001

275. Dylag M, Colon-Reyes RJ, Kozubowski L. Titan cell formation is unique to *Cryptococcus* species complex. *Virulence*. 2020;11(1):719. doi:10.1080/21505594.2020.1772657
276. Mukaremra L, Nielsen K. Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4). doi:10.3390/JOF3040064
277. Chen GH, McDonald RA, Wells JC, Huffnagle GB, Lukacs NW, Toews GB. The gamma interferon receptor is required for the protective pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2005;73(3):1788-1796. doi:10.1128/IAI.73.3.1788-1796.2005
278. Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Generation of antifungal effector CD8+ T cells in the absence of CD4+ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol*. 2005;174(12):7920-7928. doi:10.4049/JIMMUNOL.174.12.7920
279. Woo YH, Martinez LR. *Cryptococcus neoformans*–astrocyte interactions: effect on fungal blood brain barrier disruption, brain invasion, and meningitis progression. *Crit Rev Microbiol*. 2021;47(2):206. doi:10.1080/1040841X.2020.1869178
280. Coelho C, Camacho E, Salas A, Alanio A, Casadevall A. Intranasal Inoculation of *Cryptococcus neoformans* in Mice Produces Nasal Infection with Rapid Brain Dissemination. *mSphere*. 2019;4(4). doi:10.1128/MSPHERE.00483-19
281. Carroll SF, Guillot L, Qureshi ST. Overviews Mammalian Model Hosts of Cryptococcal Infection.
282. Irokanulo EAO, Akueshi CO. Virulence of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, B, C and D for four mouse strains. *J Med Microbiol*. 1995;43(4):289-293. doi:10.1099/00222615-43-4-289
283. Capilla J, Maffei CML, Clemons K V., Sobel RA, Stevens DA. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. grubii and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. *Med Mycol*. 2006;44(7):601-610. doi:10.1080/13693780600810040
284. Chrétien F, Lortholary O, Kansau I, Neuville S, Gray F, Dromer F. Pathogenesis of Cerebral *Cryptococcus neoformans* Infection after Fungemia. *J Infect Dis*. 2002;186(4):522-530. doi:10.1086/341564
285. Beattie SR, Jezewski AJ, Ristow LC, Wellington M, Krysan DJ. FKS1 Is Required for *Cryptococcus neoformans* Fitness In Vivo: Application of Copper-Regulated Gene Expression to Mouse Models of Cryptococcosis. *mSphere*. 2022;7(3). doi:10.1128/MSPHERE.00163-22
286. Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Stockman L, Roberts GD, Ellis D, Howard DH. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. gattii. *Infect Immun*. 1992;60(5):1869-1874. doi:10.1128/IAI.60.5.1869-1874.1992
287. Litvintseva AP, Mitchell TG. Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. grubii (serotype A) are not lethal for mice. *Infect Immun*. 2009;77(8):3188-3195. doi:10.1128/IAI.00296-09

288. Meletiadis J, Siopi M, Kanioura L, et al. A multicentre study to optimize echinocandin susceptibility testing of *Aspergillus* species with the EUCAST methodology and a broth microdilution colorimetric method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;75(7):1799. doi:10.1093/JAC/DKAA102
289. Delso I, Valero-Gonzalez J, Gomollón-Bel F, et al. Inhibitors against Fungal Cell Wall Remodeling Enzymes. *ChemMedChem*. 2018;13(2):128-132. doi:10.1002/CMDC.201700720
290. Vincke C, Gutiérrez C, Wernery U, Devoogdt N, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Muyldermans S. Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs. *Methods in Molecular Biology*. 2012;907:145-176. doi:10.1007/978-1-61779-974-7\_8/FIGURES/1
291. Romão E, Poignavent V, Vincke C, Ritzenthaler C, Muyldermans S, Monsion B. Construction of High-Quality Camel Immune Antibody Libraries. *Methods Mol Biol*. 2018;1701:169-187. doi:10.1007/978-1-4939-7447-4\_9
292. Qi H, Lu H, Qiu HJ, Petrenko V, Liu A. Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. *J Mol Biol*. 2012;417(3):129-143. doi:10.1016/J.JMB.2012.01.038
293. Bastos M, Abian O, Johnson CM, et al. Isothermal titration calorimetry. *Nature Reviews Methods Primers* 2023 3:1. 2023;3(1):1-23. doi:10.1038/s43586-023-00199-x
294. Johnson CM. Isothermal Titration Calorimetry. *Methods in Molecular Biology*. 2021;2263:135-159. doi:10.1007/978-1-0716-1197-5\_5/FIGURES/4
295. Mazá M, Ragni E, Popolo L, Farkas V. Catalytic properties of the Gas family  $\beta$ -(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. *Biochemical Journal*. 2011;438(2):275-282. doi:10.1042/BJ20110405
296. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(6):681-687. doi:10.1016/j.cmi.2018.09.008
297. Dellièvre S, Verdurme L, Bigot J, et al. Comparison of the MICs Obtained by Gradient Concentration Strip and EUCAST Methods for Four Azole Drugs and Amphotericin B against Azole-Susceptible and -Resistant *Aspergillus* Section Fumigati Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(3). doi:10.1128/AAC.01597-19
298. Hawser SP, Jessup C, Vitullo J, Ghannoum MA. Utility of 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(Phenyl-Amino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide (XTT) and Minimum Effective Concentration Assays in the Determination of Antifungal Susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the Lipopeptide Class of Compounds. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2738. doi:10.1128/JCM.39.7.2738-2741.2001
299. Antachopoulos C, Meletiadis J, Roilides E, Sein T, Walsh TJ. Rapid susceptibility testing of medically important zygomycetes by XTT assay. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):553-560. doi:10.1128/JCM.44.2.553-560.2006

300. Elefanti A, Mouton JW, Krompa K, et al. Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against *Aspergillus* species in the presence of serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1625-1631. doi:10.1128/AAC.01573-12
301. Elefanti A, Mouton JW, Krompa K, et al. Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against *Aspergillus* species in the presence of serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1625-1631. doi:10.1128/AAC.01573-12
302. Singh U, Akhtar S, Mishra A, Sarkar D. A novel screening method based on menadione mediated rapid reduction of tetrazolium salt for testing of anti-mycobacterial agents. *J Microbiol Methods*. 2011;84(2):202-207. doi:10.1016/J.MIMET.2010.11.013
303. Te Dorsthorst DTA, Verweij PE, Meletiadis J, et al. In Vitro Interaction of Flucytosine Combined with Amphotericin B or Fluconazole against Thirty-Five Yeast Isolates Determined by both the Fractional Inhibitory Concentration Index and the Response Surface Approach. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(9):2982. doi:10.1128/AAC.46.9.2982-2989.2002
304. Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and In Vitro-In Vivo Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):602. doi:10.1128/AAC.00999-09
305. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020;92(1):e68. doi:10.1002/CPCY.68
306. Bayguinov PO, Oakley DM, Shih CC, Geanon DJ, Joens MS, Fitzpatrick JA. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr Protoc Cytom*. 2018;85(1). doi:10.1002/CPCY.39
307. Perrine-Walker F, Payne J. Rapid screening method of *Saccharomyces cerevisiae* mutants using calcofluor white and aniline blue. *Braz J Microbiol*. 2021;52(3):1077-1086. doi:10.1007/S42770-021-00515-1
308. Florcuk A, Załecki M, Aljewicz M. The applicability of Calcofluor White (CWS) and Fluorescent Brightener (CFB) dyes for confocal laser microscopic analysis (CLSM) of various  $\beta$ -glucans in selected dairy products and water. *Food Chem*. 2023;404:134508. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2022.134508
309. Feldmesser M, Casadevall A. Mechanism of action of antibody to capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans* infection. *Front Biosci*. 1998;3. doi:10.2741/A270
310. Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, et al. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(6):1437-1446. doi:10.1128/AAC.42.6.1437
311. Larsen RA, Pappas PG, Perfect J, et al. Phase I Evaluation of the Safety and Pharmacokinetics of Murine-Derived Anticryptococcal Antibody 18B7 in Subjects with Treated Cryptococcal Meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(3):952. doi:10.1128/AAC.49.3.952-958.2005

312. Jiang Z, Bryan RA, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Casadevall A, Dadachova E. Treatment of Early and Established *Cryptococcus neoformans* Infection with Radiolabeled Antibodies in Immunocompetent Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):552. doi:10.1128/AAC.00473-11
313. Schiavone M, Vax A, Formosa C, Martin-Yken H, Dague E, François JM. A combined chemical and enzymatic method to determine quantitatively the polysaccharide components in the cell wall of yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2014;14(6):933-947. doi:10.1111/1567-1364.12182
314. François JM. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2995-3000. doi:10.1038/NPROT.2006.457
315. François JM. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. *Nat Protoc*. 2007;1(6):2995-3000. doi:10.1038/nprot.2006.457
316. Nguyen TH, Fleet GH, Rogers PL. Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;50(2):206-212. doi:10.1007/S002530051278
317. VM N, MA F. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook*. 2017;2017:1-84. doi:10.1895/WORMBOOK.1.181.1
318. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2015;200(2):387-407. doi:10.1534/GENETICS.115.176099
319. Hunt PR. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol*. 2017;37(1):50-59. doi:10.1002/JAT.3357
320. Kawasaki I, Jeong MH, Yun YJ, Shin YK, Shim YH. Cholesterol-Responsive Metabolic Proteins Are Required for Larval Development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*. 2013;36(5):410. doi:10.1007/S10059-013-0170-2
321. Okoli I, Bignell EM, Alves D, Mario N. *Caenorhabditis elegans*-*Aspergillus fumigatus* (Nematode-mould) Model for Study of Fungal Pathogenesis. *Microbiol Res J Int*. 2015;7(2):93-99. doi:10.9734/BMRJ/2015/15838
322. Ahamefule CS, Qin Q, Odiba AS, et al. *Caenorhabditis elegans*-Based *Aspergillus fumigatus* Infection Model for Evaluating Pathogenicity and Drug Efficacy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.00320
323. Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E. Antifungal activity of microbial secondary metabolites. *PLoS One*. 2011;6(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0025321
324. Ahamefule CS, Ezeuduji BC, Ogbonna JC, et al. *Caenorhabditis elegans* as an Infection Model for Pathogenic Mold and Dimorphic Fungi: Applications and Challenges. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11. doi:10.3389/FCIMB.2021.751947
325. Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Cerón J. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. *J Vis Exp*. 2012;(64). doi:10.3791/4019
326. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*. Published online 2006:1-11. doi:10.1895/WORMBOOK.1.101.1

327. Desoubeaux G, Cray C. Rodent Models of Invasive Aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus*: Still a Long Path toward Standardization. *Front Microbiol.* 2017;8(MAY). doi:10.3389/FMICB.2017.00841
328. Sogui JA, Pardo J, Chang YC, et al. Gliotoxin Is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP Deletion Attenuates Virulence in Mice Immunosuppressed with Hydrocortisone. *Eukaryot Cell.* 2007;6(9):1562. doi:10.1128/EC.00141-07
329. Vidal-García M, Redrado S, Domingo MP, et al. Production of the invasive aspergillosis biomarker bis(methylthio)gliotoxin Within the genus aspergillus: In vitro and in vivo metabolite quantification and genomic analysis. *Front Microbiol.* 2018;9(JUN). doi:10.3389/fmicb.2018.01246
330. Bye JM, Carter C, Cui Y, et al. Germline variable region gene segment derivation of human monoclonal anti-Rh(D) antibodies: Evidence for affinity maturation by somatic hypermutation and repertoire shift. *Journal of Clinical Investigation.* 1992;90(6):2481-2490. doi:10.1172/JCI116140
331. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:441-457. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.14.1.441
332. Truong TTT, Huynh VQ, Vo NT, Nguyen HD. Studying the characteristics of nanobody CDR regions based on sequence analysis in combination with 3D structures. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology.* 2022;20(1):157. doi:10.1186/S43141-022-00439-9
333. Mazáň M, Blanco N, Kováčová K, et al. A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochem J.* 2013;455(3):307-318. doi:10.1042/BJ20130354
334. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363(6428):446-448. doi:10.1038/363446A0
335. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>. 2013;82:775-797. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-063011-092449
336. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:775-797. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-063011-092449
337. Tiller KE, Tessier PM. Advances in Antibody Design. *Annu Rev Biomed Eng.* 2015;17:191. doi:10.1146/ANNUREV-BIOENG-071114-040733
338. Muyldermans S. Applications of Nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci.* 2021;9:401-421. doi:10.1146/ANNUREV-ANIMAL-021419-083831
339. Behdani M, Zeinali S, Karimipour M, et al. Development of VEGFR2-specific Nanobody Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *N Biotechnol.* 2013;30(2):205-209. doi:10.1016/J.NBT.2012.09.002
340. Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science.* 2018;362(6414):598-602. doi:10.1126/SCIENCE.AAQ0620

341. Hmila I, Saerens D, Abderrazek R Ben, et al. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.* 2010;24(9):3479-3489. doi:10.1096/FJ.09-148213
342. Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.* 2004;64(8):2853-2857. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3935
343. Zhang C, Tang Q, Xia H, Xu H, Bi F. Identification and characterization of inhibitory nanobody against p38δ. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;600:60-66. doi:10.1016/J.BBRC.2022.01.080
344. Dell A, Galadari A, Sastre F, Hitchen P. Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int J Microbiol.* 2010;2010. doi:10.1155/2010/148178
345. Varese M, Guardiola S, García J, Giralt E. Enthalpy- versus Entropy-Driven Molecular Recognition in the Era of Biologics. *Chembiochem.* 2019;20(24):2981-2986. doi:10.1002/CBIC.201900270
346. Mazáň M, Blanco N, Kováčová K, et al. A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochemical Journal.* 2013;455(3):307-318. doi:10.1042/BJ20130354
347. Mazá M, Ragni E, Popolo L, Farkas V. Catalytic properties of the Gas family  $\beta$ -(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. *Biochemical Journal.* 2011;438(2):275-282. doi:10.1042/BJ20110405
348. Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):1021-1033. doi:10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006
349. Yockey J, Andres L, Carson M, Ory JJ, Reese AJ. Cell Envelope Integrity and Capsule Characterization of *Rhodotorula mucilaginosa* Strains from Clinical and Environmental Sources. *mSphere.* 2019;4(3). doi:10.1128/MSPHERE.00166-19
350. Richie DL, Ghannoum MA, Isham N, Thompson K V., Ryder NS. Nonspecific Effect of Mycograb on Amphotericin B MIC. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(7):3963. doi:10.1128/AAC.00435-12
351. Pyrgos V, Mickiene D, Sein T, et al. Effects of immunomodulatory and organism-associated molecules on the permeability of an in vitro blood-brain barrier model to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1305-1310. doi:10.1128/AAC.01263-09
352. FORSTER D, WASHINGTON C, DAVIS SS. Toxicity of solubilized and colloidal amphotericin B formulations to human erythrocytes. *J Pharm Pharmacol.* 1988;40(5):325-328. doi:10.1111/J.2042-7158.1988.TB05260.X
353. Sabra R, Branch RA. Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Saf.* 1990;5(2):94-108. doi:10.2165/00002018-199005020-00003

354. Johansen HK, Gøtzsche PC. Amphotericin B lipid soluble formulations versus amphotericin B in cancer patients with neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(9). doi:10.1002/14651858.CD000969.PUB2
355. Martin-Vicente A, Capilla J, Guarro J. In Vivo Synergy of Amphotericin B plus Posaconazole in Murine Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(1):296-300. doi:10.1128/AAC.01462-15
356. Han Y, Lee JH. Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(3):541-544. doi:10.1248/BPB.28.541
357. Grijpstra J, Gerwig GJ, Wösten H, Kamerling JP, De Cock H. Production of Extracellular Polysaccharides by CAP Mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(8):1165. doi:10.1128/EC.00013-09
358. Aimanianda V, Simenel C, Garnaud C, et al. The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of  $\beta$ -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. *mBio*. 2017;8(3). doi:10.1128/MBIO.00619-17
359. Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC, Björndal H, Lindberg B. The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J*. 1973;135(1):31-36. doi:10.1042/BJ1350031
360. Sentandreu R, Elorza M V., Villanueva JR. Synthesis of yeast wall glucan. *J Gen Microbiol*. 1975;90(1):13-20. doi:10.1099/00221287-90-1-13
361. Morrow DL, Lucas WJ. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucan Synthase from Sugar Beet : II. Product Inhibition by UDP. *Plant Physiol*. 1987;84(3):565. doi:10.1104/PP.84.3.565
362. Read SM, Delmer DP. Inhibition of Mung Bean UDP-Glucose: (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glucan Synthase by UDP-Pyridoxal. *Plant Physiol*. 1987;85(4):1008-1015. doi:10.1104/PP.85.4.1008
363. Goldman DL, Vicencio AG. The chitin connection. *mBio*. 2012;3(2). doi:10.1128/MBIO.00056-12
364. Free SJ. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet*. 2013;81:33-82. doi:10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6
365. Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(5):855-867. doi:10.1128/EC.00399-06
366. Shamsuzzama, Lebedev R, Trabelcy B, Langier Goncalves I, Gerchman Y, Sapir A. Metabolic Reconfiguration in *C. elegans* Suggests a Pathway for Widespread Sterol Auxotrophy in the Animal Kingdom. *Curr Biol*. 2020;30(15):3031-3038.e7. doi:10.1016/j.cub.2020.05.070
367. Capell-Hattam IM, Brown AJ. Sterol Evolution: Cholesterol Synthesis in Animals Is Less a Required Trait Than an Acquired Taste. *Current Biology*. 2020;30(15):R886-R888. doi:10.1016/j.cub.2020.06.007
368. Hannich JT, Entchev E V., Mende F, et al. Methylation of the Sterol Nucleus by STRM-1 Regulates Dauer Larva Formation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell*. 2009;16(6):833-843. doi:10.1016/j.devcel.2009.04.012

369. Rauthan M, Pilon M. The mevalonate pathway in *C. elegans*. *Lipids Health Dis.* 2011;10. doi:10.1186/1476-511X-10-243
370. Malacco NLSO, Souza JAM, Mendes AC, et al. Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice. *Future Microbiol.* 2019;14(17):1511-1525. doi:10.2217/FMB-2019-0214
371. Buskirk AD, Green BJ, Lemons AR, et al. A murine inhalation model to characterize pulmonary exposure to dry *Aspergillus fumigatus* conidia. *PLoS One.* 2014;9(10). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0109855
372. Zhao Y, Park S, Warn P, Shrief R, Harrison E, Perlin DS. Detection of *aspergillus fumigatus* in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1378-1383. doi:10.1128/JCM.02214-09
373. Ukai Y, Nishiyama Y, Okazaki K, Maki H, Naito A. A highly sensitive and specific method to evaluate viable fungal burden of *Aspergillus fumigatus* in mice by RT-qPCR for 18S ribosomal RNA. *J Microbiol Methods.* 2021;184. doi:10.1016/J.MIMET.2021.106214
374. White PL, Posso RB, Barnes RA. Analytical and Clinical Evaluation of the PathoNostics AsperGenius Assay for Detection of Invasive Aspergillosis and Resistance to Azole Antifungal Drugs during Testing of Serum Samples. *J Clin Microbiol.* 2015;53(7):2115-2121. doi:10.1128/JCM.00667-15
375. Domingo MP, Colmenarejo C, Martínez-Lostao L, et al. Bis(methyl)gliotoxin proves to be a more stable and reliable marker for invasive aspergillosis than gliotoxin and suitable for use in diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):57-64. doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2012.01.012
376. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun.* 2005;73(1):635-637. doi:10.1128/IAI.73.1.635-637.2005
377. Sogui JA, Rose SR, Nardone G, et al. Host immune status-specific production of gliotoxin and bis-methyl-gliotoxin during invasive aspergillosis in mice. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-10888-9
378. Gomez-Lopez A, Rueda C, Pando Pozo R, Sanchez Gonzalez LM. Dynamics of gliotoxin and bis(methylthio)gliotoxin production during the course of *Aspergillus fumigatus* infection. *Med Mycol.* 2022;60(4). doi:10.1093/MMY/MYAC025
379. Reeves EP, Messina CGM, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia.* 2004;158(1):73-79. doi:10.1023/B:MYCO.0000038434.55764.16
380. Davis C, Gordon N, Murphy S, et al. Single-pot derivatisation strategy for enhanced gliotoxin detection by HPLC and MALDI-ToF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401(8):2519-2529. doi:10.1007/S00216-011-5344-1
381. Najvar LK, Caciapuoti A, Hernandez S, et al. Activity of posaconazole combined with amphotericin B against *Aspergillus flavus* infection in mice: comparative studies in two laboratories. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):758-764. doi:10.1128/AAC.48.3.758-764.2004

382. Denning DW, Warn P. Dose range evaluation of liposomal nystatin and comparisons with amphotericin B and amphotericin B lipid complex in temporarily neutropenic mice infected with an isolate of *Aspergillus fumigatus* with reduced susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(11):2592-2599.  
doi:10.1128/AAC.43.11.2592
383. Siopi M, Siafakas N, Vourli S, Mouton JW, Zerva L, Meletiadis J. Dose optimization of voriconazole/anidulafungin combination against *Aspergillus fumigatus* using an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model and response surface analysis: Clinical implications for azole-resistant aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(11):3135-3147. doi:10.1093/jac/dkw276
384. Seyedmousavi S, Brüggemann RJM, Melchers WJG, Rijs AJMM, Verweij PE, Mouton JW. Efficacy and pharmacodynamics of voriconazole combined with anidulafungin in azole-resistant invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):385-393.  
doi:10.1093/JAC/DKS402