



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
“VESÍCULAS EXTRACELULARES
FÚNGICAS”**

Autor: Marta Hernández Puertas

Tutor: María Concepción Gil

García Convocatoria: Junio 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
2.1 VESÍCULAS EXTRACELULARES EN EUCARIOTAS	1
2.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES FÚNGICAS	3
3. OBJETIVOS	4
4. METODOLOGÍA	4
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES FÚNGICAS	4
5.2 SECRECIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES FÚNGICAS	6
5.2.1. Implicación de la membrana plasmática en la secreción	7
5.2.2. Relación del Aparato de Golgi con las vesículas extracelulares	8
5.2.3. Secreción a través de la pared celular	8
5.2.4. Viscoelasticidad de la pared como posible puerta de salida para las vesículas extracelulares	9
5.3 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES FÚNGICAS EN SU INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS DEL HOSPEDADOR	10
5.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES FÚNGICAS COMO MEDIO DE POTENCIACIÓN DE VIRULENCIA	12
5.5 PAPEL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES FÚNGICAS COMO VACUNAS	14
6. CONCLUSIONES	15

1. RESUMEN

Los conocimientos sobre las vesículas extracelulares en hongos son tan novedosos que su comprensión y aplicación se está desarrollando en la actualidad. Estas estructuras se desarrollan en todos los dominios, pero en el reino fungi todavía existen numerosas incógnitas sobre todo en cuanto a su proceso de secreción. Hoy en día se piensa que ésta puede producirse gracias a la existencia de enzimas degradadoras de la pared fúngica. También, hay que tener en cuenta que su membrana lipídica y el aparato de Golgi son fundamentales en la secreción de estas vesículas.

Gracias al Ambiosome se puso de manifiesto la propiedad viscoelástica de la pared fúngica desarrollando así una nueva vía para el conocimiento de dicho mecanismo. Esta propiedad confiere la característica por la cual la pared celular podría deformarse permitiendo el paso de las vesículas al medio externo.

Las vesículas extracelulares fúngicas presentan numerosos componentes proteicos entre los que se pueden destacar enzimas como gliceraldehido-3-fosfato, enolasa, fosfoglicerato mutasa I y proteínas de choque térmico (HSP70) que intervienen favoreciendo tanto la diseminación de la infección como la evasión del sistema inmune en el hospedador.

Los últimos avances en este campo determinan que las vesículas extracelulares de especies fúngicas patógenas son capaces de potenciar el crecimiento intracelular de especies no virulentas fagocitadas sin ser necesario su proximidad entre ellas.

Hoy en día, se está trabajando en el desarrollo de diferentes vacunas conformadas con vesículas extracelulares fúngicas para su futura aplicación en la clínica.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Vesículas extracelulares en eucariotas

A lo largo de los últimos veinte años ha surgido un auge en el interés científico por el estudio de las vesículas extracelulares (EVs) debido al papel tan importante que desempeñan en muchos procesos fisiológicos y patológicos [1].

Aunque existen discrepancias en cuanto a su clasificación por la falta de un “gold standard” metodológico, gracias a la “citometría de flujo” se están logrando numerosos avances [2].

Las EVs son un conjunto heterogéneo de estructuras membranosas liberadas por las células. Poseen una gran variedad de componentes (ácidos nucleicos, toxinas,

lipoproteínas, enzimas...) y desempeñan importantes funciones en la patogénesis y fisiología microbiana [3].

En la actualidad se diferencian 3 grandes subgrupos de EVs: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas [4] [Figura 1].

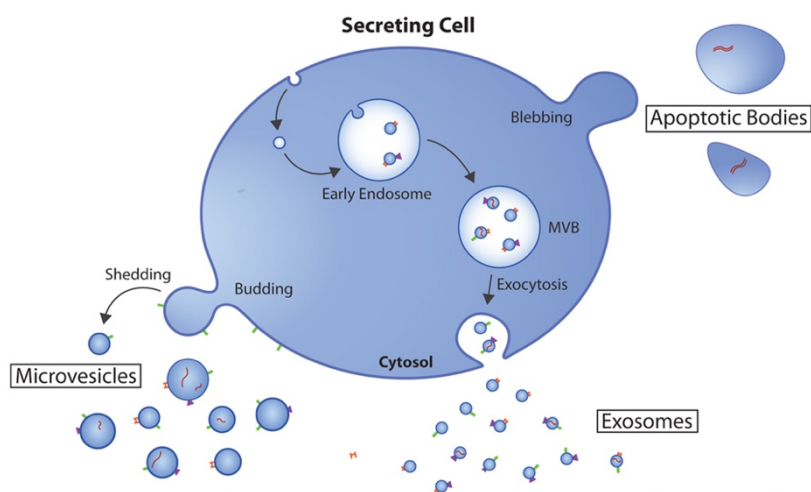


Figura 1: Tipos de vesículas extracelulares. Imagen modificada de Gustafson y colaboradores [5].

Los cuerpos apoptóticos son restos celulares que se generan en la etapa tardía de la apoptosis y se forman como consecuencia de la fragmentación celular generada en este proceso. Presentan un alto contenido en proteínas resistentes a la proteólisis y su tamaño puede comprender desde $1\mu\text{m}$ a $5\mu\text{m}$ [6].

Las microvesículas o ectosomas se forman por pequeñas evaginaciones de la membrana plasmática. La mayoría de ellas se rompen al poco de ser liberadas pero otras pueden llegar a recorrer largas distancias. Su tamaño varía entre 150 nm a $1\mu\text{m}$ [7].

Los exosomas, son estructuras membranosas de un tamaño entre $30\text{-}100\text{ nm}$ que albergan distintas macromoléculas. Estas se ensamblan en el endosoma dando lugar a los cuerpos multivesiculares (MVBs) que se fusionan con la membrana plasmática [8].

En la actualidad, la función de los exosomas está en pleno estudio de investigación, atribuyéndoles una función en la comunicación intercelular y, en ocasiones, la intervención asociada a procesos patológicos.

Sus propiedades están estrechamente relacionadas con su membrana lipídica y la composición de la misma. La primera procede en su mayor parte de la membrana plasmática de la célula progenitora y presenta al mismo tiempo características distintivas tales como; la presencia o ausencia de ciertas proteínas, ligandos y moléculas

de adhesión específicas. Todo ello, lleva a pensar que cada exosoma tiene sus propias características y funciones determinadas.

Cabe destacar que la composición de la membrana lipídica es responsable de las características de los exosomas. Entre las cuales podemos destacar; inmunogenicidad, toxicidad, selectividad de acción y capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica que son necesarias para desempeñar sus funciones propias [9].

Las EVs, en definitiva, han sido descritas como un mecanismo para el tráfico de moléculas al espacio extracelular producido por todas las células existentes, lo que hace pensar que es un fenómeno universal [10].

2.2 Vesículas extracelulares fúngicas

A fecha de hoy, se sabe que todas las especies fúngicas que se han estudiado, incluyendo levaduras e hifas, son capaces de usar las vesículas extracelulares como mecanismo general de transporte de proteínas intracelulares a través de la pared celular. Todavía no se ha descrito cómo es el proceso del paso a través de su gruesa pared celular.

Su caracterización comenzó en 2007 con *Cryptococcus neoformans* [3], mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

En un primer momento existía la hipótesis de que las EVs sólo estaban relacionadas con procesos patogénicos, debido a que en la mayoría de ellas se identificaban factores de virulencia en su interior. Esto cambió cuando se descubrió en el modelo no patogénico de *Saccharomyces cerevisiae* (yeast model) [11] en el que se evidenciaba la producción de EVs.

La principal aproximación para el estudio de la biogénesis de las EVs en hongos fue mediante la caracterización de las vesículas producidas por mutantes con defectos en ambos mecanismos de secreción (convencional y no convencional). Se estudiaron 8 mutantes de diferentes especies y aunque no se obtuvieron resultados concluyentes se determinó la gran complejidad de los procesos para la formación de las EVs fúngicas [12].

Uno de los problemas que existe para el estudio de las EVs fúngicas es el bajo número de marcadores conocidos así como de técnicas para la observación *in situ* de las vesículas. Se describió uno de ellos en un transformante de *C. neoformans* al expresar la proteína 14-3-3 fusionada con la proteína verde de fluorescencia (GFP) por su extremo

C-terminal. Esto permitió la utilización del microscopio de fluorescencia para su observación [13].

3. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es dar a conocer la importancia de las vesículas extracelulares fúngicas en los procesos fisiológicos y patogénicos.

En este trabajo se plasman los últimos avances de estas estructuras fúngicas que son claves para conocer tanto su composición, la complejidad de su secreción, su modo de interactuar con el hospedador como su posible futura aplicación en el campo clínico como diagnóstico y terapéutico.

4. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo, basado en una revisión bibliográfica, se utilizó en su gran mayoría la base de datos PubMed® y buscadores de internet como Google Académico y Google de donde se obtuvieron los diferentes artículos que comprende este trabajo. Posteriormente, se contrastó toda la información recopilada y se procedió a la elaboración de esta revisión.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta revisión bibliográfica se pretende abordar diferentes aspectos e hipótesis sobre las vesículas extracelulares fúngicas. Su análisis, hoy en día, presenta numerosas incógnitas que a lo largo de este apartado iremos mostrando.

5.1 Caracterización de las vesículas extracelulares fúngicas

Es muy importante llegar a conocer la composición de las EVs fúngicas pues permite estudiar tanto su origen como el tipo celular del que fueron secretadas y aporta información sobre su papel fisiológico.

Las vesículas de *C.neorformans* fueron las primeras en identificarse y se las asoció con capas externas e internas de la membrana celular, relacionándolas con el proceso de secreción, explicado anteriormente. Por espectrometría de masa, se detectaron componentes glucídicos, esteroides y glucoceramidas propias de la pared fúngica. Además, por técnicas de proteómica, se revelaron las similitudes que existían entre las proteínas de las EVs de diferentes hongos como: *S. cerevisiae* (348 proteínas),

C. neoformans (97 proteínas), *Histoplasma capsulatum* (260 proteínas) y *Paracoccidioides brasiliensis* (205 proteínas) [Figura 2] [14].

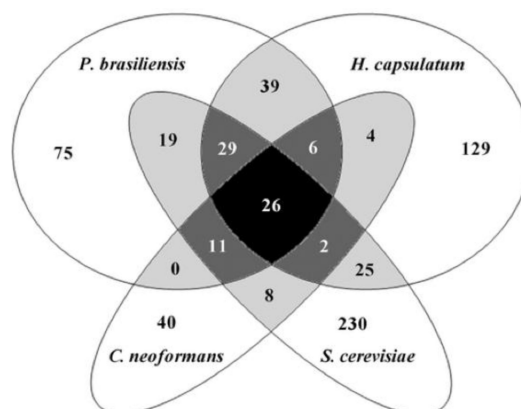


Figura 2: Comparativa del análisis de proteínas vesiculares de EVs de diferentes especies fúngicas. Imagen tomada de Rodrigues y colaboradores [14].

Por otro lado, este análisis demostró la existencia de una especificidad propia de cada especie como ocurre en el caso de *S. cerevisiae* que presenta 5 proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) dentro de las cuales se diferencia: asparticoproteasa, endogluconasa y otras 3 proteínas GPI de función desconocida, no localizadas en las otras especies comparadas [11] o como en *C. neoformans* que es el único en el que se han identificado la UDP-glucurónido descarboxilasa y la UDP-glucosa deshidrogenasa, enzimas esenciales en el metabolismo del ácido glucurónico [15]. Todo esto sugiere que a pesar de las similitudes en las proteínas existen procesos específicos de las especies.

Se pone de manifiesto la presencia de múltiples enzimas de rutas metabólicas como glicolisis, fermentación, gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato, entre otras. Siendo las enzimas más relevantes: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, enolasa y transaldolasa detectadas en *C. neoformans*, *C. albicans*, *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* [16].

También se han detectado enzimas que en situaciones de estrés celular, podrían favorecer a la liberación de las vesículas como son hidrolasas, lipasas, glicosilasas y proteasas [17].

Además, las EVs fúngicas pueden contener RNAm y microRNA [2].

5.2 Secreción de las vesículas extracelulares fúngicas

El proceso de secreción de las EVs fúngicas es tan diverso y complejo que ha generado numerosos estudios e hipótesis.

Se pueden diferenciar tres hipótesis, no excluyentes entre sí, sobre la liberación de las vesículas en los microorganismos [3] [Figura 3]:

1. La primera hipótesis sugiere que una vez liberadas por el citoplasma son forzadas a pasar por su pared gracias a la presión del turgor.
2. La segunda hace referencia a la existencia de enzimas modificadoras de la pared celular que se secretan junto a las vesículas y pueden generar el ablandamiento de esta pared favoreciendo su liberación.
3. Tercera hipótesis. Las vesículas pueden pasar a través de los canales de la pared celular debido a la deformación que estas pueden sufrir.

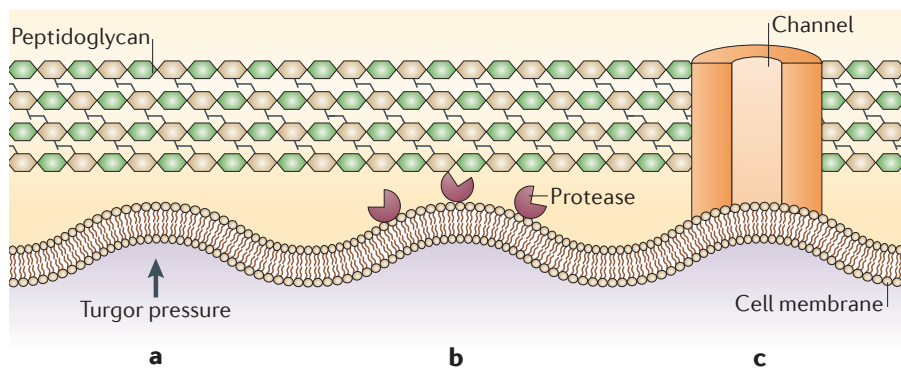


Figura 3: Modelos de secreción de vesículas. **a** Presión del turgor. **b** Enzimas modificadoras. **c** Canales de la pared. Imagen tomada de Brown y colaboradores [3].

En cuanto a las rutas de secreción a través de las células se diferencian dos modelos; convencional y no convencional. Esto se conoció al estudiar el secretoma de *C. albicans* [18]. Los procesos de regulación de ambas vías interfieren en la composición, proceso y cinéticas de las EVs [11] [Figura 4].

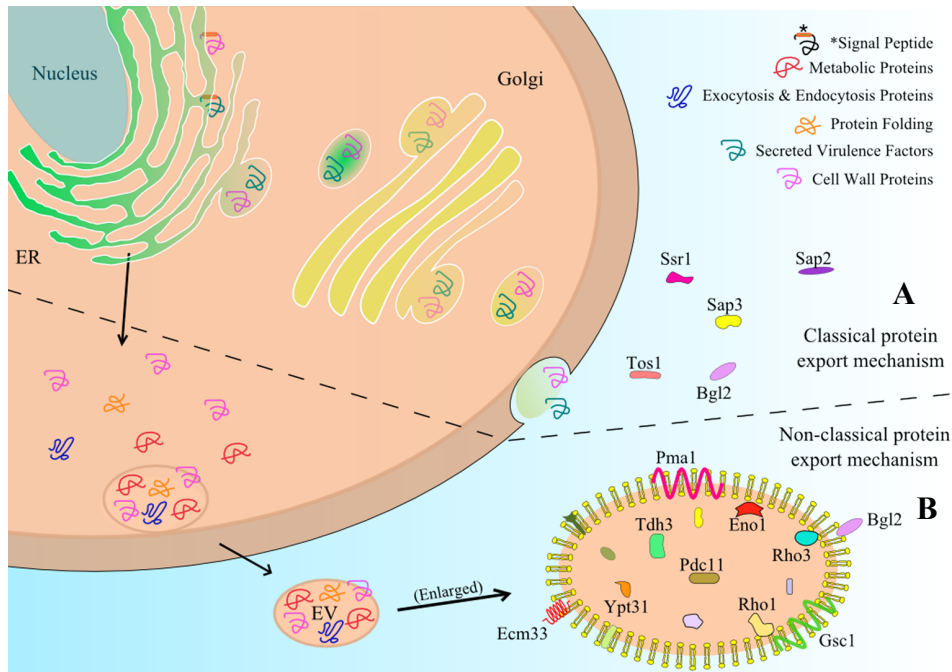


Figura 4: Vías de secreción. **A** vía clásica o convencional. **B** vía alternativa o no clásica. Imagen modificada de Gil-Bona A y colaboradores [18].

En las células eucariotas, la ruta de secreción mayoritaria es la denominada ruta convencional basada en la presencia del péptido señal en el extremo amino terminal. Son translocadas al retículo endoplásmico posteriormente transportadas a través del aparato del Golgi y de ahí a la superficie celular, secretando su contenido al exterior [3]. Se ha observado que numerosas proteínas que carecen del péptido señal utilizan procesos vesiculares para ser secretadas, por lo que desarrollan una vía alternativa de secreción a la convencional [18].

Como se sabe, el proceso de secreción tiene su última interacción con la membrana plasmática de las células pero a nivel de hongos dicha interacción surge a nivel de la pared celular [14]. Aquí es donde aparece una de las grandes incógnitas del proceso de secreción puesto que por un lado, esta pared es una densa y compleja trama de moléculas y por otro, la mayor parte de las proteínas fúngicas carecen del péptido señal necesario para la secreción convencional [18].

Se pone de manifiesto la posible existencia de la ruta de secreción no convencional al determinar que la eficacia de formación de vesículas extracelulares es semejante entre mutantes de *S. cerevisiae*, con defectos en la formación de cuerpos vesiculares derivados del endosoma (MVBs), y su cepa silvestre [19].

5.2.1. Implicación de la membrana plasmática en la secreción

La membrana plasmática es un componente a tener en cuenta para el conocimiento del proceso de secreción de las EVs a través de la pared fúngica. Esto conlleva a tres posibles procesos diferentes de implicación de la membrana plasmática [Figura 5]:

(I) macropinocitosis invertida, donde entra en juego su propia membrana plasmática, (II) evaginación de la membrana desarrollando un ectosoma y (III) procesos de endocitosis desarrollando los MVBS, basados en la semejanza con los exosomas de mamíferos que pueden fusionarse con la membrana plasmática en el momento de secreción para conformar así las vesículas extracelulares [20].

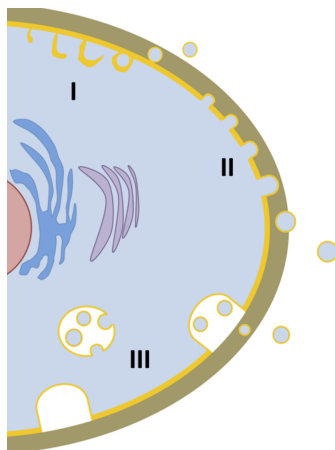


Figura 5: Procesos de interacción de la membrana (I) macropinocitosis invertida, (II) ectosoma, (III) MVBS. Imagen tomada de Rodrigues y colaboradores [20].

5.2.2. Relación del Aparato de Golgi con las vesículas extracelulares

Existe una concreta evidencia de que los patrones de secreción derivados del aparato del Golgi interfieren en las vesículas extracelulares fúngicas [19]. Esto se evidencia porque si se interfiere en la expresión de los genes *SEC 4* y *SEC 6* (codifican para el control del transporte de proteínas a través del RE y Golgi en la vía alternativa) se inhibe la formación EVs.

No se puede cuestionar la implicación del aparato de Golgi en la formación de estas vesículas.

5.2.3. Secreción a través de la pared celular

En *C. neoformans* se desarrollaron 3 hipótesis para poder explicar el paso de las EVs a través de la pared celular [20] que sugieren: (I) el movimiento por los canales de la misma, (II) la presión mecánica que fuerza a las vesículas a pasar a través de los poros de la pared y (III) la remodelación de dicha estructura para favorecer a su tránsito.

Al contrario que en las plantas, en la pared fúngica no se han observado canales en su estructura y las vesículas interactúan de forma directa con la pared sin ninguna estructura previa, por lo cual la primera hipótesis queda descartada.

Por otro lado, mediante estudios de microscopía se ha demostrado la existencia de poros de un tamaño de 1 a 400 nm en la pared pero al no evidenciarse la relación vesícula-poro [20], esta teoría queda descartada.

De este modo la hipótesis más acertada es la tercera, remodelación de la pared desarrollada por Nimrichter y sus colaboradores [15]. Gracias a estudios de las vesículas de *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *S. cerevisiae*, y *C. neoformans* se pudo conocer que en su composición se localizan enzimas degradadoras de peptidoglucano y/o quitina, lo que apoya dicha hipótesis [14].

Atendiendo a esta hipótesis, las vesículas son preformadas en el interior de la célula, situándose en las invaginaciones de la membrana y ocupando el espacio periplasmático de tal manera, que así pueden atravesar la pared celular y ser secretadas al exterior. Las EVs fúngicas al atravesar la pared celular del hongo remodelan su estructura mediante la hidrólisis de polisacáridos, manoproteínas y al mismo tiempo, esta lisis sirve para exponer componentes internos al exterior.

5.2.4. Viscoelasticidad de la pared como posible puerta de salida para las vesículas extracelulares

La pared fúngica presenta propiedades viscoelásticas y deformables que pueden llegar a permitir el tránsito de las vesículas a través de ella. Esto se demostró gracias a Walker y colaboradores [21] mediante la reciente investigación en la vía de entrada del AmBisome en *C. albicans* y *C. neoformans*.

El AmBisome es un agente antifúngico conformado por anfotericina B empaquetada en liposomas de 60-80 nm. Es uno de los pocos fungicidas de amplio espectro que se usa en la clínica para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, el cual ha de atravesar la pared celular para poder alcanzar la membrana plasmática donde interactúa con el ergosterol.

Esta forma farmacéutica de la anfotericina B es la menos tóxica para el ser humano de las 3 formas lipídicas usadas en la clínica por esto, se usa como uno de los tratamientos de elección en los casos de sospecha de una infección fúngica en los que se desconoce el agente etiológico [22].

El AmBisome, puede transitar por la matriz de la pared celular sin problemas a pesar de que el tamaño de los poros de la pared (5,8 nm) es mucho menor al tamaño del los liposomas. Esto hace pensar que se aprovecha de la viscoelasticidad de la pared para su entrada, por lo que las vesículas pueden utilizar dicha propiedad para su secreción [21].

En realidad, el tamaño de estas partículas eran de 20 nm más pequeños que los liposomas nativos, lo que puede ser debido al proceso de formación del AmBisome. Se observó por TEM que los liposomas estaban intactos en la parte externa, interna y en la membrana plasmática de la célula fúngica [Figura 6] pero se cree que se disocian al llegar a la membrana plasmática, no se observan en el citoplasma, permitiendo la acción de la anfotericina con el ergosterol.

Posteriormente, para determinar la razón por la cual el AmBisome atraviesa la pared, se realizó el mismo proceso pero englobando además de anfotericina B en el liposoma partículas de oro de 1,5 nm para aportar mayor rigidez e impedir su deformación. Del mismo modo, se probó con partículas de oro sin estructura liposómica y se observó por TEM que los liposomas de oro eran capaces de atravesar la pared y la membrana, mientras que las partículas de oro aisladas eran incapaces de entrar [Figura 6]. Esto implica que es el propio liposoma capaz de desplazar los polisacáridos de la pared para poder penetrarla [21].

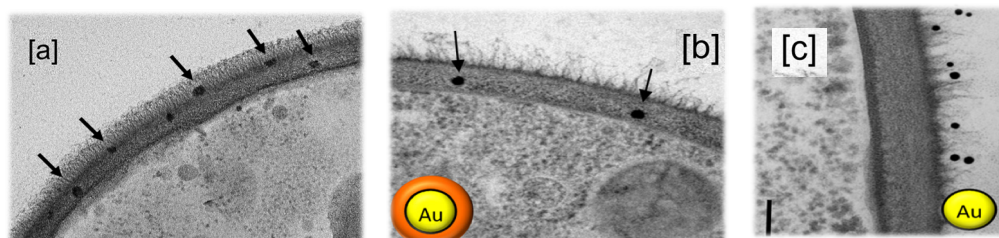


Figura 6: Imágenes de TEM de la pared de *C. albicans* SC5314 incubada con 12 $\mu\text{g/ml}$ Ambiosome. [a] Liposomas intactos en la pared externa. [b] Liposomas con oro encapsulado atraviesan la pared celular [c] partículas de oro no encapsuladas son incapaces de atravesar la pared. Imagen tomada de Walker y colaboradores [21].

Estas observaciones sobre el paso del Ambiosome por la pared celular presentan importantes implicaciones para esclarecer el proceso de secreción de las vesículas extracelulares fúngicas. El hecho de que el liposoma pueda penetrar a través de la pared hace pensar que exista un mecanismo semejante pero en dirección contraria, de tal manera que las vesículas encuentran un camino para ser secretadas.

5.3 Análisis proteómico de las vesículas extracelulares fúngicas en su interacción con las células del hospedador

La interacción de las EVs fúngicas con el hospedador se basa en el contacto existente entre algunos componentes de la superficie de estas (α y β -glucanos, manoproteínas,

galactomananos, glucuronoxilomanano (GXM), quitina y proteínas atípicas) y células del hospedador [16].

También, se ha podido constatar que componentes de las EVs como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la enolasa, la transaldolasa intervienen en la interacción con el hospedador.

La GAPDH es una proteína citoplasmática que se localiza también en el exterior de *C. albicans* mediando en la interacción con la fibronectina y laminina, proteína de la lámina basal, además se encuentra en *P. brasiliensis* interviniendo en la misma unión que en el caso anterior pero interactúa con las fibras de colágeno I facilitando la infección [16]. Gracias a estos conocimientos, hoy en día, la GAPDH es una diana de vacunación ya que al poder bloquear su acción se puede limitar la diseminación del microorganismo, desarrollando así anticuerpos frente a ella.

La enolasa, proteína inmunogénica, es importante en la interacción con el hospedador tanto es así, que se sugiere que Ig G anti-enolasa y aldolasa frente a *C. albicans* en combinación pueden ser marcadores para las candidiasis invasivas. Además, dicha enzima puede inducir a la fibrolisis, facilitando la diseminación del parásito [16].

Se han determinado otras enzimas metabólicas que intervienen en las interacciones con el hospedador como es la fosfoglicerato mutasa 1 (Pgmt1) que cataliza la 8ª reacción de la glicólisis. Dicha enzima, presente en las EVs de *C. albicans*, interacciona con el factor H, FHL-1 el plasminógeno, fibronectina... facilitando la infección, la evasión del sistema inmune y la degradación de la matriz extracelular [16].

Se ha de resaltar la acción de las proteínas de choque térmico (HSP) que se localizan en las EVs como por ejemplo, HSP70 recombinante (Cn-rHSP70) de *C. neoformans*. La interacción de ésta con los macrófagos no daña a la fagocitosis pero sí incrementa la supervivencia del hongo dentro de los macrófagos por un descenso de los niveles de NO. Cn-rHSP70 puede regular la expresión de los receptores TLR4 de los macrófagos e interfiere de forma directa en su temprana polimerización por lo que no pueden generar un buen control sobre el hongo [23]. Todo ello indica que las EVs contienen proteínas que favorecen la supervivencia de *C. neoformans* en el hospedador.

Por otro lado, *C. albicans* expresa en sus EVs dos proteínas del tipo de HSP70: SSA1 y SSA2. Esta última se localiza en la pared y en la membrana plasmática tanto en su forma de levadura como de hifa [16].

A su vez, SSA1 interactúa de forma parcial en la penetración de este hongo en las células M del intestino, favoreciendo la evasión del sistema inmune.

Al mismo tiempo, en las EVs se localizan componentes importantes de la pared celular como son β -1,3 glucanasas (Xog1p, Sun41y MP65) caracterizadas en *C. albicans* [16]. Siendo la más importante la primera que es un receptor para el péptido antimicrobiano LL-37 producido por los neutrófilos.

Sun41 interacciona con las citoquinas, interviene en la adhesión a los tejidos del hospedador y en la formación de biofilms [24].

También existe influencia por otras glucanasas secretadas por *C. albicans*, *H. capsulatum*, *C. neoformans*, and *P. brasiliensis* en el momento del reconocimiento por el hospedador pero queda por determinar su acción.

5.4 Vesículas extracelulares fúngicas como medio de potenciación de virulencia

Una de las características más importantes de las cepas patógenas fúngicas es su rápida proliferación dentro de los macrófagos del hospedador. El estudio de Bielska y colaboradores en *Cryptococcus gattii* [25] revela que existe una específica coordinación en el comportamiento de cada una de estas células para llegar a multiplicarse lo más posible. Este proceso se conoce como el mecanismo de “division of labour”.

Este mecanismo está mediado por las EVs fúngicas, concretamente se demostró en *C. gattii* y se observó que únicamente las EVs de cepas patógenas son capaces de potenciar el crecimiento intercelular de cepas no virulentas cuando se desarrolla una coinfección. Además, para generar esa interacción no tienen que estar ambas cepas en el mismo macrófago, es decir, el mecanismo de “division of labour” se realiza a distancia [25].

Se comprobó mediante un sistema transmembrana donde se separaba físicamente a la cepa patógena (*C. gattii* R265) de la no virulenta (*C. gattii* ICB 180) que estaba en contacto con macrófagos, pero sí se permitía el paso de partículas menores a los 400 nm. Bajo estas condiciones se desarrolló un aumento significativo del crecimiento de ICB 180 dentro de los macrófagos, demostrando así que las moléculas secretadas por R265 son suficientes para dicha proliferación a distancia [25]. Al realizarse al contrario no se produjo ningún aumento del crecimiento [Figura 7].

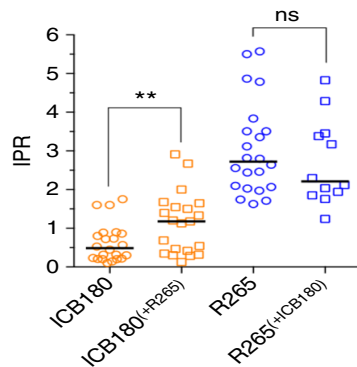


Figura 7: Representación gráfica del aumento de proliferación de *C. gattii* ICB 180 en presencia de Evs de *C. gattii* R265. Imagen tomada de Bielska y colaboradores [25].

Se determinó que el material capsular fúngico no era suficiente para generar el aumento del crecimiento, lo que sugiere que es necesario un sistema de secreción intacto. Se realizaron técnicas de ultracentrifugación, microscopía electrónica y análisis de nanopartículas manifestándose la existencia de EVs de *C. gattii* con un tamaño menor a 100 nm.

Para demostrar si las EVs de R265 son las que presentan la capacidad de producir dicho aumento de la proliferación en ICB 180, una vez fagocitada esta cepa se añadieron dichas EVs y se produjo la respuesta esperada de manera dosis dependiente [Figura 8]. También se trabajó introduciendo las vesículas antes de la infección pero no se observó tal crecimiento mientras, que si se trataba a los macrófagos con las EVs antes de la infección si se desarrollaba un leve crecimiento [25]. Esta pequeña proliferación puede deberse a que las EVs se desestabilizan en presencia de las proteínas séricas.

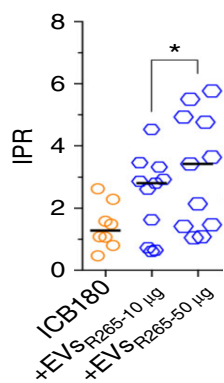


Figura 8: Gráfica del efecto dosis dependiente del aumento de proliferación de *C. gattii* ICB180 en presencia de EVs de *C. gattii* R265. Imagen tomada de Bielska y colaboradores [25].

Todos estos resultados determinan a las EVs fúngicas como aceleradores del crecimiento intracelular y por lo tanto, de la virulencia en *C. gattii*, pero sólo para cepas que presenten una mínima capacidad de proliferación intracelular.

Este fenómeno no sólo se desarrolla por la presencia de EVs sino que también es fundamental su composición porque si se alteran sus proteínas, membrana lipídica o RNA se elimina su capacidad de aumentar la proliferación. Por otro lado, se ha constatado que la alteración o presencia del DNA no es imprescindible para dicha función [25].

5.5 Papel de las vesículas extracelulares fúngicas como vacunas

Las EVs además de proporcionar mejores condiciones y estabilidad a los componentes proteicos, facilitan su diseminación por el organismo y la interacción con las células del sistema inmune del hospedador.

Las vacunas vesiculares son siempre más seguras y presentan menos problemas que las conformadas por cepas atenuadas. En la actualidad, se han desarrollado vacunas con vesículas de membrana externa de bacterias Gram negativas (OMV), como la vacuna para la meningitis B (Bexsero) [26].

Este tipo de vacunas son muy eficaces cuando la cepa que circula por el medio es la misma que las de las EVs. Sin embargo, no todas son óptimas para desarrollar vacunas como ocurre en *C.neoformans* que son inestables en presencia de las proteínas del suero del hospedador [26].

En *Malassezia sympodialis*, se ha observado la acción inmunológica de las EVs fúngicas por su capacidad de modular el sistema inmune *in vivo* a través de la estimulación de la IL-4 y el TNF- α .

En la clínica no existe todavía ninguna vacuna antifúngica y mucho menos conformada por EVs, pero se está trabajando con diferentes estrategias como proteínas recombinadas y glucoconjugados, ya que las células del hospedador carecen de estos últimos compuestos [27].

Un ejemplo de posible vacuna proteica de *C. albicans* es la desarrollada en el estudio llevado a cabo por Gil-Bona y colaboradores [18]. En el que se seleccionó una proteína de la pared 1,3- β -glucosiltransferasa (Bgl2) que se localiza tanto en las vesículas como en su secretoma y presenta un carácter inmunogénico, lo cual interesó para su posible uso como vacuna. Además, por análisis proteómicos se clasificó como un biomarcador de las candidiasis sistémica.

Los problemas que se deben tener en cuenta para el desarrollo de una vacuna anti-*Candida* son; su gran capacidad de variación morfológica, la existencia de una posible

tolerancia inmunológica por parte del hospedador y la dificultad de generar inmunidad activa en pacientes inmunocomprometidos [27].

Se ha de destacar que las Evs fúngicas activan la inmunidad por múltiples mecanismos hasta el punto de poder actuar a favor del hospedador frente a la infección, lo cual refuerza su sentido como vacuna.

Se necesitan más estudios sobre las Evs fúngicas para su aplicación como vacunas en el futuro.

6. CONCLUSIONES

Los estudios realizados sobre las EVs fúngicas son tan recientes que todavía queda mucho camino por recorrer para conocer toda su complejidad y funciones más relevantes.

1. Todas las células son capaces de producir EVs y en concreto las EVs fúngicas presentan numerosos componentes proteicos, glucídicos, esterol, glucoceramidas, RNAm y microRNA.
2. Numerosas proteínas fúngicas carecen del péptido señal y utilizan procesos vesiculares para ser secretadas.
3. La pared fúngica presenta propiedades viscoelásticas y deformables que pueden llegar a permitir el tránsito de las vesículas a través de ella.
4. Las EVs fúngicas son estructuras ricas en antígenos que ayudan a la secreción de enzimas metabólicas que intervienen y facilitan la infección. Además, podrían activar la inmunidad por múltiples mecanismos.
5. La GAPDH, la enolasa y la Pgmt1 interaccionan con la fibronectina facilitando la diseminación del microorganismo y la evasión del sistema inmune.
6. Es necesario realizar estudios para ver la utilidad de las EVs fúngicas como vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Vesículas extracelulares y su importancia en biomedicina [Internet] [citado el 21 marzo de 2018] Disponible en:
<http://www.madrimasd.org/blogs/biocienciatecnologia/2017/01/06/13360>.

- 2) [PDF] Identificación y separación de las vesículas extracelulares [Internet] [citado el 21 de marzo 2018]. Disponible en: http://www.vhir.org/portal1/Global/pdf/ucts/Exosomas_Oscar%20Fornas.pdf
- 3) Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*. 2015; 13 (10): 620. Doi: 10.1038/nrmicro3480.
- 4) Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas K, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015; 4 (1): 27066. Doi: 10.3402/jev.v4.27066.
- 5) Gustafson D, Veitch S, Fich JE. Extracellular vesicles as Protagonist of Diabetic Cardiovascular Pathology. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2017; 4: 71. Doi: doi.org/10.3389/fcvm.2017.00071
- 6) ¿Qué es un cuerpo apoptótico? Clínica Universidad de Navarra 2015 [Internet] [citado el 4 de mayo 2018] Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/cuerpo-apoptoticos>.
- 7) Vesículas extracelulares [Internet] [citado el 4 de mayo 2018]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/5-vesiculas-extracel.php>.
- 8) Tang XJ, Sun XY, Huang KM, Zhang L, Yang ZS, Zou DD, et al. Therapeutic potential of Cart-T cell-derived exosomes: a cell-free modality for targeted cancer therapy. *Oncotarget*. 2015; 6 (42): 44179. Doi: 10.18632/oncotarget.6175.
- 9) Bell BM, Krik ID, Hiltbrunner S, Gabrielsson S, Bultema JJ. Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016; 12 (1): 163-169. Doi: 10.1016/j.nano.2015.09.011
- 10) Gil-Bona A. Estudio proteómico de las vesículas extracelulares y del secretoma de *Candida albicans* y análisis funcional de proteínas de superficie celular. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. 2015: 207.
- 11) Oliveira DL, Nakayasu ES, Joffe LS, Guimaraes AJ, Sobreira JP, Nosanchuk JD, et al. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLOS ONE*. 2010; 5 (6): e11113. Doi: journal.pone.0011113.

- 12) Rodrigues ML, Franzen AJ, Nimrichter L, Miranda K. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. *Current opinion in microbiology*. 2013; 16 (4): 414-420. Doi: 10.1016/j.mib.2013.04.002.
- 13) Huang SH, Wu CH, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Brown RJ, Jong A. *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLOS ONE*. 2012; 7 (11): e48570. Doi: 10.1371/journal.pone.0048570.
- 14) Rodrigues ML, Nakayasu ES, Igir CA, Nimrichter L. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *Journal of Proteomics*. 2014; 97: 177-186. Doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.001.
- 15) Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*. 2008; 7: 58–67. Doi: 10.1128/EC.00370-07.
- 16) Nimrichter L, de Soza MM, Del poeta M, Nosanchuk JD, Joffe L, Tavares Pde M, et al. Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 1034. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01034.
- 17) Pérez, V. Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en especies del género *Candida*. [Tesis Doctoral]. Valencia: Universitat de Valencia, Facultat de Farmacia. 2017: 185.
- 18) Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, Vivancos F, Nombela C, Monteoliva L, et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *Journal of Proteome Research*. 2014; 14 (1): 142-153. Doi: 10.1021/pr5007944.
- 19) Rodrigues ML, Nosanchuk J, Schrank A, Vainstein MH, Casadevall A, Nimrichter L. Vesicular transport systems in fungi. *Future Microbiology*. 2001; 6 (10): 1371-1381. Doi: 10.2217/fmb.11.112.
- 20) Rodrigues ML, Nakayasu ES, Almeida IC, Nimrichter L. Traveling into outer space: unanswered questions about fungal extracellular vesicles. *PLOS PATHOGENS*. 2015; 11 (12): e1005240. Doi: 10.1371/journal.ppat.1005240.
- 21) Walker L, Sood P, Lenardon MD, Milne G, Olson J, Jensen G, et al. The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as

- Intact Liposome Vesicles. *mBio*. 2018; 9 (1): e02383-17. Doi: 10.1128/mBio.02383-17.
- 22) Hann IM, Grant H. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001; 17 (3): 161-169. Doi: 10.1016/S0924-8579(00)00341-1.
- 23) Silveira CP, Piffer AC, Kmetzsch L, Fonseca FL, Soares DA, Staats CC, et al. et al. The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. *Fungal Genetics and Biology*. 2013; 60: 53-63. Doi: 10.1016/j.fgb.2013.08.005.
- 24) Hiller E, Heine S, Brunner H, Rupp S. *Candida albicans* Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation. *Eukaryotic Cell*. 2007; 6 (11): 2056–2065. Doi: 10.1128/EC.00285-07.
- 25) Bielska E, Sisquella MA, Aldeieg M, Birch C, O'Donoghue EJ, May RC. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nature Communications*. 2018; 9 (1): 1556. Doi: 10.1038/s41467-018-03991-6.
- 26) Joffe LS, Nimrichter L, Rodrigues ML, Del Poeta M. Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. *mSphere*. 2016; 1 (4): e00099-16. Doi: 10.1128/mSphere.00099-16
- 27) Tso G, Reales-Calderon JA, Pavelka N. The Elusive Anti-Candida Vaccine: Lessons From The Past And Opportunities For The Future. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 897. Doi: 10.3389/fimmu.2018.00897.