

# LIPASAS DE ESPECIES CÁNDIDA: UNA REVISIÓN SOBRE ASPECTOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES Y PATOGENICOS.

CANDIDA LIPASES: A REVIEW ON BIOCHEMICAL, MOLECULAR AND PATHOGENIC ASPECTS

LIPASES DE CANDIDA: UMA REVISÃO SOBRE ASPECTOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E PATOGENICOS

Graciela del Valle Castillo<sup>1</sup>, Ana Isabel Azcurra<sup>2</sup>, Claudia Elena Sotomayor<sup>3,4</sup>.

1 Doctora en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Odontología, Departamento de Biología Bucal, Córdoba, Argentina.

2 Doctora en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Odontología, Departamento de Biología Bucal, Córdoba, Argentina.

3 Doctora en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio De Inmunidad Innata a Patógenos Fúngicos. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica (CIBICI)-CONICET, Córdoba, Argentina.

4 Email de contacto: [csotomay@fcq.unc.edu.ar](mailto:csotomay@fcq.unc.edu.ar)

## Conceptos clave:

- Las lipasas secretadas por *C. albicans* facilitan la penetración activa en las células y contribuyen a la invasión del tejido.
- *Candida* expresa diferentes genes de lipasa, dependiendo de su localización y estadio de la infección.
- Su rol como factor de virulencia permitiría el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos

Recibido: 2019-03-27 Aceptado: 2019-04-14

DOI: <http://dx.doi.org/10.31053/1853.0605.v76.n2.23822>



© Universidad Nacional de Córdoba

## Resumen:

En el último medio siglo se produjo un aumento significativo en la incidencia de infecciones fúngicas siendo probable que se conviertan en una prioridad de salud global. El sofisticado grado de interacción hospedador-*Candida* es producto de diferentes estrategias de virulencia que utiliza el hongo para invadir los tejidos y de los diversos mecanismos de defensa que este último desarrolla para controlarlo. Existe bibliografía que indica que este hongo comensal oportunista posee componentes que pueden ser considerados factores de virulencia asociados a la etapa del proceso infeccioso. Dentro de los factores de virulencia de este hongo pueden mencionarse la adherencia a las superficies celulares, la formación de *biofilms* y la producción de enzimas hidrolíticas. Las hidrolasas secretadas por *C. albicans* más estudiadas son las aspartil proteinasas, las fosfolipasas y las esterases, mientras que las lipasas han sido las menos exploradas. Estas enzimas tendrían como función facilitar la penetración activa en las células, participar en la digestión y síntesis de ésteres de lípidos para su nutrición y contribuir a la invasión del tejido al hidrolizar los componentes lipídicos de las membranas celulares del hospedador. También hay evidencia bibliográfica que indica que estas enzimas son capaces de dañar células y moléculas del sistema inmune para evitar la actividad antimicrobiana. Teniendo en cuenta lo precedente, esta revisión, proporciona una actualizada descripción de las características bioquímicas y moleculares de las lipasas secretadas por el hongo *Candida*, su rol como factor de virulencia y su potencial para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos.

*Palabras clave:* lipasas; candida; terapia molecular dirigida.

## Abstract:

In the last half century there was a significant increase in the incidence of fungal infections being likely to become a global health priority. The sophisticated degree of host-*Candida* interaction is the product of different virulence strategies used by the fungus to invade the tissues and the various defense mechanisms that it develops to control it. There is a significant amount of literature that indicates that this opportunistic commensal fungus has components that can be considered virulence factors related to the stage of the infectious process. Among the virulence factors of this fungus can be mentioned the adherence to cell surfaces, the formation of biofilms and the production of hydrolytic enzymes. The most studied hydrolases secreted by *C. albicans* are aspartyl proteinases, phospholipases and esterases, while lipases have been the least studied. These enzymes would have the function to facilitate active penetration into the cells, participating in the digestion and synthesis of lipid esters for their nutrition and contributing to the invasion of the tissue by hydrolyzing the lipid components of the host cell membranes. There is also bibliographic evidence that these enzymes are capable to damage cells and molecules of the immune system to avoid the antimicrobial activity. Taking into account the foregoing, this review provides an updated description of biochemical and molecular characteristics of the lipases secreted by *Candida*, its role as a virulence factor and its potential for the development of new antifungal drugs.

*Keywords:* lipases; candida; molecular targeted therapy

## Resumo:

No último meio século, houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas, o que provavelmente se tornará uma prioridade de saúde global. O grau de interação sofisticado produto hospedeiro-*Candida* é diferentes estratégias de virulência, utilizando o fungo para invadir tecidos e diversos mecanismos de defesa para controlar este último desenvolve. Não existe literatura que indica que este fungo oportunista comensais tem componentes que podem ser considerados factores de virulência associados com a fase de infecção. Dentro dos factores de virulência do fungo podem ser mencionados aderência a superfícies de células, a formação de biofilme e de produção de enzimas hidrolíticas. Hidrolases segregadas por *C. albicans* mais estudados são de aspartil proteinasas, fosfolipasas e esterases, enquanto que as lipases têm sido menos explorado. Estas enzimas têm a função de facilitar a penetração activa em células envolvidas na digestão, e a síntese de ésteres de lípidos para a nutrição e contribuir para a invasão de tecidos por hidrólise dos componentes lipídicos das membranas das células do hospedeiro. Há também evidência na literatura de que estas enzimas são capazes de células e moléculas do sistema imunológico para evitar danificar a actividade antimicrobiana. Face ao exposto, esta avaliação, fornece uma descrição actualizada das características bioquímicas e moleculares de lipases segregadas pelo fungo *Candida*, o seu papel como um factor de virulência e o potencial para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

*Palavras chave:* lipases; candida; terapia de alvo molecular

## Introducción

El reino Fungi comprende especies que están asociadas a un amplio espectro de enfermedades en el hombre. En el último medio siglo se produjo un aumento significativo en la incidencia de infecciones fúngicas asociadas a la pandemia del VIH, las terapias inmunosupresoras, al cáncer y los trasplantes, como también debido al aumento en el uso de dispositivos médicos como catéteres, implantes y dispositivos intrauterinos, que eluden las barreras biológicas innatas y sirven como plataforma para la formación de *biofilm*. Algunos autores sugieren que, a medida que se avanza en estrategias que aumenten la esperanza de supervivencia de individuos inmunocomprometidos, es probable que esta tendencia continúe en aumento y que las infecciones micóticas se conviertan en una prioridad de salud global<sup>(1)</sup>. A pesar que en la actualidad no existen datos epidemiológicos precisos, *Candida* junto a otros hongos del género *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis*, son agentes causales de tantas muertes anuales como la tuberculosis o la malaria<sup>(2)</sup>. El sofisticado grado de interacción hospedador-*Candida* es producto de diferentes estrategias de virulencia que utiliza el hongo para invadir los tejidos y de los diversos mecanismos de defensa que este último desarrolla para controlarlo. Existe relevante cantidad de bibliografía que indica que este hongo comensal oportunista posee componentes que pueden ser considerados factores de virulencia y están agrupados de acuerdo a la etapa del proceso infeccioso<sup>(3-5)</sup>. Dentro de los factores de virulencia de este hongo pueden mencionarse la adherencia a las superficies celulares, la formación de *biofilms* y la producción de enzimas hidrolíticas. Las hidrolasas secretadas por *C. albicans* más estudiadas son las aspartil proteinasas, las fosfolipasas y las esterasas, mientras que las lipasas han sido las menos exploradas<sup>(6)</sup>. Estas enzimas tendrían como función facilitar la penetración activa en las células, participar en la digestión y síntesis de ésteres de lípidos para su nutrición y contribuir

a la invasión del tejido al hidrolizarlos componentes lipídicos de las membranas celulares del hospedador. Existe evidencia experimental sobre el rol de estas enzimas y sus capacidad de dañar células y moléculas del sistema inmune para evitar la actividad antimicrobiana del mismo<sup>(9-12)</sup>.

Esta revisión, explora y recopila información existente sobre las características bioquímicas y moleculares de las lipasas secretadas por el hongo *Candida*, su rol como factor de virulencia y su potencial para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos.

### Características bioquímicas de las lipasas: estructura y función

Las lipasas fúngicas son enzimas extracelulares con características hidrolíticas. Su actividad máxima se da a un pH 7 a las 24 horas de cultivo y a una temperatura de 37°C. Estructuralmente presentan el plegamiento típico de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas ( $\alpha/\beta$  *hydrolase fold*), que consiste en una estructura central formada por 8 láminas  $\beta$  interconectadas por  $\alpha$ -hélices (Fig. 1). El centro activo de estas enzimas está constituido por tres aminoácidos: una serina, un ácido aspártico o un ácido glutámico y una histidina. En medio acuoso, la mayoría de las lipasas son activadas por la presencia de una interfase agua / lípido, un fenómeno conocido como activación interfacial, que implica el desplazamiento de una estructura superficial denominada tapa o *flap*<sup>(8,13-16)</sup>. La tapa integrada por un bucle de péptidos  $\alpha$ -helicoidal es una estructura anfipática; así, en la estructura enzimática cerrada, su lado hidrofílico hace frente al disolvente, mientras que el hidrofóbico se dirige hacia el núcleo proteico; a medida que la enzima cambia a la conformación abierta, la cara hidrofóbica queda expuesta y contribuye a la unión del sustrato (Fig. 2).

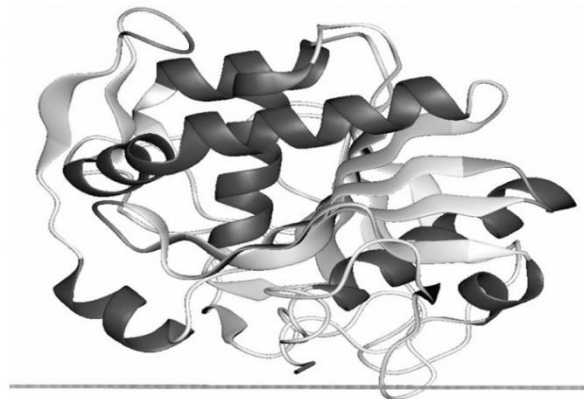


Figura N° 1. Conformación estructural de la lipasa. En: <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1trh>. Orientations of proteins in membranes. Lipasa de *Candida rugosa*.

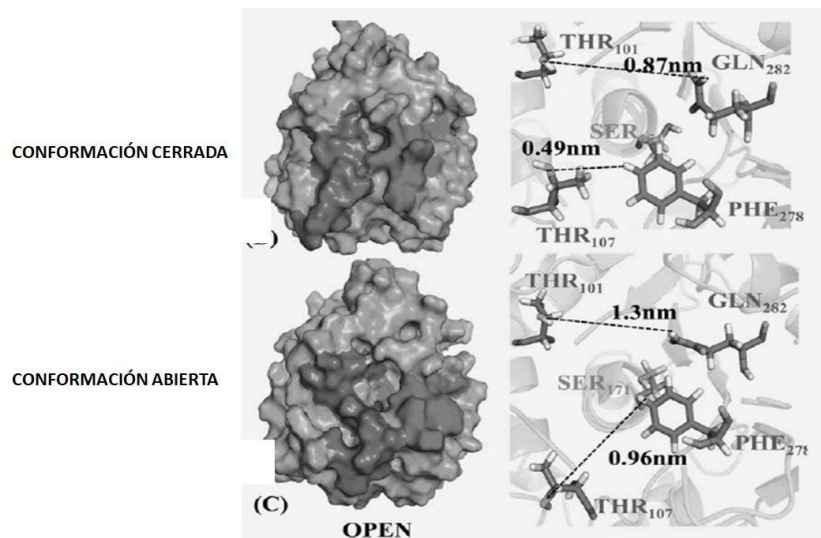


Figura N° 2. Conformación de la lipasa. Conformación cerrada (inactiva) con el sitio activo bloqueado por una cadena polipeptídica llamada *lid*, y una conformación abierta (activa) con el *lid* desplazado. De Rehm y cols.S, Trodler P, Pleiss J. Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. *Protein Sci* 2010;19(11):2122-30.

Por lo tanto, no sólo la naturaleza anfipática de la tapa, sino también su secuencia de aminoácidos específica podría ser de importancia para la actividad y especificidad de las LIP. Se ha demostrado que la expresión de los genes que codifican las lipasas está condicionada por las características de crecimiento y, en particular, por la fuente de carbono disponible en el medio de cultivo. La comparación de las secuencias de aminoácidos revela que la variabilidad entre las isoenzimas se agrupa en los sitios de unión del sustrato y en la región de la tapa, que interactúa con las moléculas del sustrato en la conformación de la enzima abierta. Este mecanismo de activación, así como las estructuras de las lipasas y la composición del centro activo son altamente conservados evolutivamente<sup>(16,17)</sup>.

El mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de cuatro etapas. Tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina sobre el enlace éster del lípido, lo que lleva a la rotura del enlace y a la formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica. Seguidamente, se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca el enlace éster del intermediario transitorio, lo que produce la liberación del ácido graso y la

regeneración del centro catalítico<sup>13</sup>. Este proceso catalítico tiene una doble función, ya que no sólo se generan moléculas importantes como fuente nutricional para la sobrevivencia del hongo, sino que también desempeñan un papel crítico en la invasión del hospedador por su capacidad de ejercer daño sobre paredes celulares y tejidos<sup>(6, 18,19)</sup>.

Si bien la función más prominente de las lipasas fúngicas extracelulares es la digestión de lípidos para la adquisición de nutrientes, otra función descrita de las lipasas es favorecer la adherencia del microorganismo al tejido huésped y / o a las células vecinas al degradar las moléculas de la superficie y, por lo tanto, liberar nuevos receptores. La Figura 3 describe las características bioquímicas y moleculares de estas enzimas y su rol fisiológico y patológico. Otros autores han demostrado acciones sinérgicas entre las lipasas y las fosfolipasas del hongo, como así también con las sap. las lipasas disminuyen el pH del medio al liberar ácidos grasos y, de este modo, optimizan el pH de acción de las sap secretadas, reconocidos factores de virulencia<sup>(20)</sup>. Además las lipasas microbianas pueden tener actividades enzimáticas auxiliares, a través de la escisión de los fosfolípidos, componentes principales de las membranas celulares del huésped.

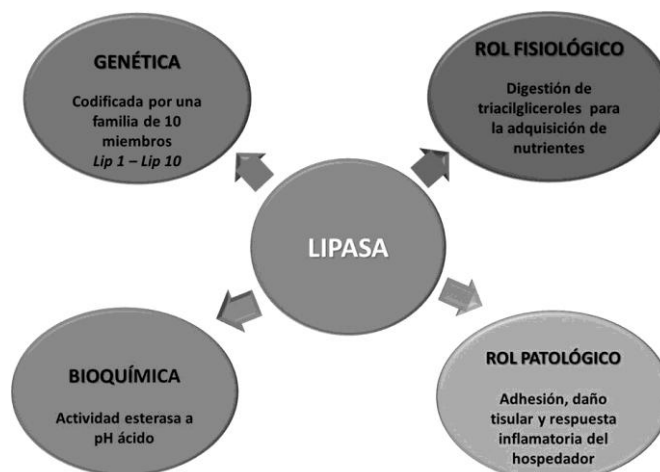


Figura N° 3. Características bioquímicas, moleculares, rol fisiológico y patológico de las lipasas de *Candida*.

### Características moleculares de las lipasas

La actividad lipasa en cepas patógenas de *Candida* fue descrita por primera vez por Werner<sup>(21)</sup>. En el año 1997 se aisló el primer gen de lipasa clonado en *C. albicans* que se denominó *Lip1*<sup>(6)</sup>. Años más tarde, Hube y col reportaron la existencia de nueve nuevos miembros de esta familia de genes de lipasas (*Lip2* a *Lip10*) que se clonaron y caracterizaron<sup>(7)</sup>. Posteriormente cuando *Lip1* y *Lip8* se usaron como sonda contra el ADN genómico de *C. albicans* en un análisis por *Southern blot*, se observaron varias bandas de hibridización, respaldando la existencia de genes similares en este hongo<sup>(22)</sup>.

Otras especies de *Candida* médicamente relevantes presentan secuencias de ADN homólogas a las de *C. albicans*; así mientras se detectaron dos bandas en *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, no se identificaron secuencias similares en *C. krusei* y *C. glabrata*, mientras que se reportaron al menos cinco secuencias en el genoma de *C. dubliniensis*<sup>(22)</sup>. Esta es la primera evidencia de que *C. dubliniensis* puede tener una familia de genes de lipasa que está altamente relacionada con la de *C. albicans*.

Los genes de las lipasas se encuentran en cuatro cromosomas diferentes: 1, 6, 7 y R (cromosoma de mayor tamaño del genoma de *C. albicans*) y según sus homologías en el nivel de aminoácidos, es posible dividir la familia de las lipasas en tres subgrupos. El primer subgrupo está conformado por las lipasas 1,2,3,6 y 10 ya que muestran similitud de al menos un 74%. El segundo grupo lo integran las lipasas 4,5, 8 y 9 con una similitud de al menos un 68%. Los miembros del primer subgrupo se encuentran codificados en el cromosoma 1, mientras que los del segundo grupo están situados en

el cromosoma 7, excepto lipasa 4, codificada en el cromosoma 6. La lipasa 7 forma un grupo propio ya que muestra la mayor divergencia del resto de la familia y es el único gen codificado en el cromosoma R. La información disponible sugiere que existieron y se duplicaron al menos dos ancestros de genes de lipasa. También se ha sugerido la presencia de una alta flexibilidad genética<sup>(23)</sup>; esta amplia gama de reordenamientos cromosómicos le permite al hongo hacer frente a los diferentes condiciones, lo que sugiere que la expresión de una familia de genes de lipasas es un mecanismo de adaptación de *C. albicans* a su hospedador. Luego de la identificación completa de esta familia, surgió el interrogante acerca de si cada miembro es transcripcionalmente activo y si a su vez podría haber una regulación diferencial<sup>(24)</sup>.

Se han reportado secuencias similares a lipasa 1 a lipasa 10 en otras especies de *Candida* patógenas como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, pero no en *C. glabrata*<sup>(25)</sup>. De igual manera, en *C. rugosa* se ha descrito la existencia de cinco isoenzimas de lipasas<sup>(26-28)</sup>.

El primer informe que sugirió la presencia de lipasas secretadas en *C. parapsilosis* fue publicado por Fu y cols.<sup>(10)</sup>. Cinco años después, Neugnoty cols.<sup>(29)</sup> identificaron dos ORFs que codifican a la lipasa en esta especie. La comparación de la secuencia de aminoácidos reveló que estas proteínas identificadas podrían pertenecer a la misma familia de genes de lipasa de *C. albicans* descritas por Hube y colaboradores<sup>(7)</sup>, por lo tanto, también podrían estar involucrados en la patogenia de las infecciones fúngica, debido a que los ORF que codifican a la lipasa de *C. parapsilosis* presentan homología más alta con *LIP1* de *C. albicans*. En consecuencia, los ORFs fueron nombrados *CpLIP1* y *CpLIP2*<sup>(30)</sup>. El análisis de la expresión de estos genes reveló que sólo *CpLIP2* es funcional, y con un sitio catalítico

común en las enzimas hidrolíticas formado por Gly – X – Ser – X - Gly y que se encuentra altamente conservado<sup>(29)</sup>.

**Lipasas como factor de virulencia**

Las lipasas no sólo cumplen funciones biológicas de nutrición y digestión, como la obtención de nutrientes y el aprovechamiento de fuentes de carbono, sino que además desempeñan un papel crítico en la invasión del hospedador<sup>(8,18,19)</sup>. Así, las lipasas secretadas por las especies *Candida* están asociadas con la adhesión a la célula del hospedador y al daño tisular<sup>(31)</sup> y a la inducción de respuestas inflamatorias del hospedador<sup>(7,30,32)</sup>. Se observó que de los 10 genes caracterizados existe una expresión diferencial durante la colonización en modelos experimentales y en muestras de pacientes y que está ampliamente influenciada por la etapa de la infección y por el sitio de colonización<sup>(7,22,33)</sup>, por lo que algunos de estos genes se expresan constitutivamente y otros son regulados por el ambiente<sup>(34)</sup>. Los estudios realizados usando un modelo de infección en mucosa gástrica y orofaríngea de ratón mostraron que mientras los genes *Lip4* y *Lip8* se expresaron tempranamente en muestras de estómago, paladar, esófago y lengua, la expresión de *Lip1*, *Lip3* y *Lip9* se observada sólo en tejido gástrico y es indetectables en mucosa bucal al igual que la *Lip2*<sup>(35)</sup>. Otro estudio realizado en ocho pacientes con candidiasis bucal también reportó una expresión diferencial; mientras que *Lip1* y *Lip9* se expresaron en todas las muestras, indicando asociación al nicho colonizado, *Lip10* no fue detectado y los transcritos *Lip4*, *Lip5* y *Lip8* se detectaron en el 50% de las muestras<sup>(34)</sup>.

La evidencia científica asocia a estas lipasas como factores de virulencia en determinadas patologías<sup>(36)</sup>. Distintos estudios realizados evidencian el rol de las lipasas como factor de virulencia de *Candida* (Tabla 1). Paraje y cols., empleando una lipasas purificada de *C. albicans*, aportaron importante evidencia sobre el

efecto directo de esta lipasas sobre las células del sistema inmune y células parenquimales del hospedador. También reportaron la capacidad de esta lipasas de inducir la producción de elevadas concentraciones de compuestos tóxicos de oxígeno y apoptosis celular<sup>(10,11)</sup>. Park y cols. reportaron la expresión de todas las lipasas durante la transición de la morfología de levadura a hifa; también detectaron los transcritos de *Lip5*, *Lip6*, *Lip8* y *Lip9* durante infecciones experimentales, evidenciando el rol de esta enzima en la virulencia y persistencia de la micosis<sup>(37)</sup>. En un modelo murino de candidiasis diseminada, empleando *C. albicans* mutante *Lip8 Δ / Δ*, no se observó infección hepática ni mortalidad en comparación con la infección con la cepa parental, donde la mortalidad fue del 55 al 70%, lo que demuestra claramente que LIP8 es un factor clave de virulencia durante la infección<sup>(38,39)</sup>.

El uso de cepas mutantes de *C. parapsilosis* con delección de los genes *Lip1* y *Lip2* en modelos *in vitro* e *in vivo* de infección, reveló una disminución en la virulencia de la cepa y cambios en la complejidad y arquitectura de su *biofilm* comparados con la cepa parental. A su vez, estas cepas mostraron bajos niveles de LDH (enzima láctico dehidrogenasa) marcadora de daño celular cuando se inoculó epitelio oral humano reconstituido<sup>(38,39)</sup>. Además, esta cepa mutante de *C. parapsilosis* *CpΔΔLip1 - ΔΔLip2* durante su interacción con macrófagos murinos y humanos evidenció la alteración de las funciones en estas células fagocíticas, confirmando así que las lipasas secretadas por el hongo desempeñan un papel clave en las etapas tempranas de las interacciones hospedador-patógeno<sup>(30)</sup>. Otros estudios realizados en un modelo de ratas neonatales infectadas con *C. albicans* y *C. parapsilosis* con mutaciones en esta enzima, empleando las vías intraperitoneal, gástrica y endovenosa mostraron bajos niveles de carga fúngica en hígado, bazo y riñón y por lo tanto una menor patogenicidad<sup>(36)</sup>.

**Tabla N° 1: Lipasas como factor de virulencia**

Modelo animal	Estudios <i>in vitro</i>	Estudios en humanos	Hallazgos	Referencia
Candidiasis diseminada			-Expresión diferencial de genes de LIP en tejidos y estadios de la infección	Stehr et al, 2004; Schofield et al, 2005
		Pacientes con candidiasis bucal	Expresión diferencial de genes <i>Lip</i> en ocho pacientes con candidiasis bucal	Stehr et al, 2004
	Macrófagos de rata		-Citotoxicidad y apoptosis dosis dependiente.	Paraje et al, 2008
	Hepatocitos de rata		Daño celular y apoptosis. -Depósitos lipídicos intracitoplasmáticos.	
	Tejido humano oral reconstituido		Inducción de respuesta inflamatoria.	Trofa et al, 2009
	Macrófagos de rata		-Sobreexpresión de iNOS y elevada producción de NO en macrófagos sin activar. - Activación de la vía de la arginasa en macrófagos activados, promoción de perfil M2	Paraje et al, 2009
Candidiasis diseminada Modelo en ratas neonatas			Contribución de las lipasas de <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> a la virulencia.	Trofa et al, 2011
		Pacientes con cáncer bucal	-Aumentada producción de LIP respecto a aislados clínicos de <i>Candida</i> residentes en la cavidad bucal de individuos sanos.	Castillo et al, 2018
	Fibroblastos gingivales humanos		Inducción de daño celular.	Castillo, 2017
	Macrófagos humanos		Alteración de funciones fagocíticas.	Tóth et al, 2015
	Macrófagos de rata			

## Lipasas como diana para el diseño de fármacos

La terapia antifúngica sigue siendo un desafío; actualmente el manejo clínico se ve seriamente comprometido por el aumento en el número de micosis oportunistas, por los efectos secundarios de los antimicóticos y sobre todo por la aparición de una creciente resistencia a los fármacos antifúngicos que, especialmente en el género *Candida*<sup>(40)</sup>. En este marco, muchas líneas de investigación han centrado sus estudios en hallar nuevas estrategias para el tratamiento de estas micosis a través del estudio de los factores de virulencia menos investigados ya que podrían representar blancos para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos. Considerar a las lipasas como un factor revelante en la virulencia del hongo abre nuevos perspectivas terapéuticas.

Uno de los fármacos de uso masivo por la población por sus múltiples acciones farmacológicas en la aspirina. Estudios recientes realizados sobre factores de virulencia han propuesto a la aspirina o ácido acetilsalicílico como una alternativa de tratamiento por afectar y suprimir la formación de *biofilm* de especies *Candida in vitro*<sup>(41,42)</sup>. Experiencias realizadas *in vitro* con *C. albicans* y *C. parapsilosis* demuestran que al ácido acetil salicílico, es además un potente inhibidor de lipasas<sup>(36)</sup>. Estos autores reportaron la disminución del crecimiento fúngico y protección contra el daño tisular producido por las especies de *Candida* por efecto de inhibidores de la LIP, como la quinina y el ebelactona B.

## Nuestros aportes experimentales

En nuestro laboratorio se evaluó la actividad de las lipasas en cepas patógenas de especies *Candida* aisladas de pacientes con lesiones bucales: líquenes atípicos, lesiones malignas (carcinoma bucal de células escamosas), candidiasis crónica y de mucosa sana. Interesantemente todos los aislados clínicos de lesiones presentaron actividad lipasa, pero no así en los provenientes de controles sanos en los que no se detectó actividad lipasa. Cabe destacar que los aislados de cáncer bucal mostraron una mayor actividad lipasa, comparada con los aislados de otras lesiones bucales, indicando un mayor potencial patogénico<sup>(43)</sup>. Si bien no existen otros trabajos publicados que exploren estos aspectos, Pereira y cols.<sup>(44)</sup> observaron una asociación entre el grado de lesión de candidiasis bucal y la expresión de la virulencia de *Candida*. Nuestro trabajo y el reporte mencionado aportan nueva evidencia a la controversia existente entre la presencia de *Candida* y cancerización de una lesión, lo que enfatiza la necesidad del estudio conjunto de la múltiple y compleja interacción entre el hospedador y este hongo<sup>(44)</sup>.

En concordancia con estos hallazgos, al estudiar la expresión de genes de lipasas de *C.albicans* en pacientes con lesiones estomatológicas y de mucosa sana, observamos que la sobreexpresión de los transcritos de los genes de lipasas fue diferencial según las distintas lesiones incluidas en nuestros estudios. Encontramos una significativa ausencia del transcritos *Lip3* en los aislados sin lesión y una mayor frecuencia del transcritos *Lip8* en las cepas aisladas de pacientes con cáncer bucal<sup>(43)</sup> en acuerdo con la alta patogenicidad reportada por otros autores<sup>(39,45)</sup>.

Al evaluar el efecto del ácido acetilsalicílico sobre la actividad lipasa en cultivos de fibroblastos humanos expuestos a *C. albicans* provenientes de diferentes lesiones estomatológicas, observamos diferencias significativas en los niveles de inhibición en las lipasas producidas por los distintos aislados clínicos. Una mayor concentración de ácido acetil salicílico fue necesaria para inhibir la actividad lipolítica de los aislados de cáncer bucal comparado con líquenes y candidiasis crónica, lo que refuerza el concepto de la habilidad de hongo de adaptarse a los diferentes entornos y condiciones en cada tipo de lesiones, en acuerdo con Pereira y cols.<sup>(44)</sup>. Significativamente nuestro hallazgos evidencian que, entre las lesiones estudiadas, los aislados provenientes de cáncer bucal se destacaron por la sobreexpresión de un perfil particular transcritos de lipasas de *C. albicans*, a una mayor actividad lipolítica y a una mayor concentración de ácido acetil salicílico necesaria para su inhibición. Además, en estudios efectuados en

cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos pudimos establecer mediante el uso de inhibidores específicos, que las lipasas de *C.albicans* son capaces de provocar daño celular. Interesantemente la injuria provocada fue mayor cuando los aislados del hongo fueron recuperados de pacientes con cáncer bucal comparado con aislados clínicos de pacientes sin lesión<sup>(43)</sup>. Estos resultados en su conjunto aportan nueva e importante información sobre el rol de estas enzimas, su contribución en la patogenia del proceso infeccioso en pacientes y propone alternativas de tratamiento.

## Conclusiones finales

El papel de las lipasas en los procesos de invasión y persistencia de la infección por *Candida* queda evidenciado por su comportamiento adaptativo según el nicho y el estrés que el ambiente le ocasiona. La diferente virulencia, patogenicidad y perfil genético de *Candida* según su procedencia refuerzan la necesidad del control de este patógeno comensal cuando sobre-infecta lesiones, considerando su discutido rol como promotor de la carcinogénesis. Además, el conocimiento de este factor de virulencia abre nuevas posibilidades en la terapéutica antimicótica.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-FONCYT (N° PICT-2015-1393); Secretaría de Ciencia y Tecnología-SECYT-UNC (N° 30720150100934CB y 30720150100925CB) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET (N° PIP-112 201501 00652 CO).

## Conflictos de interés

No existen conflictos de interés.

## Bibliografía

- 1- Miró MS, Vigezzi C, Rodríguez E, Icely PA, Caeiro JP, Riera F, et al. Innate receptors and IL-17 in the immune response against human pathogenic fungi. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2016;73(3):188-96.
- 2- Moyes DL, Richardson JP, Nageli JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*. 2015;6(4):338-46.
- 3- Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 2007; 61:529-53.
- 4- Cheng SC, Joosten LAB, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun*. 2012; 80:1304-13.
- 5- Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014;1 (Suppl 1):S81-5.
- 6- Fu Y, Ibrahim AS, Fonzi W, Zhou X, Ramos CF, Ghannoum MA. Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology*. 1997; 143:331-40.
- 7- Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*. 2000; 174(5):362-74.
- 8- Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005; Nov; 48 (6):365-77.
- 9- Staniszewska M, Bondaryk M, Piłat J, Siennicka K, Magda U, Kurzatkowski W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Przegl Epidemiol*. 2012; 66(4):629-33.
- 10- Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE. *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can J Microbiol*. 2008; 54(8):647-59.
- 11- Paraje MG, Correa SG, Albesa I, Sotomayor CE. Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-

- arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(2):263-8.
- 12- Castillo GDV, Blanc SL, Sotomayor CE, Azcurra AI. Study of virulence factor of *Candida* species in oral lesions and its association with potentially malignant and malignant lesions. *Arch Oral Biol.* 2018;91:35-41.
- 13- Brocca S, Secundo F, Ossola M, Alberghina L, Carrea G, and Lotti M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci.* 2003; 12(10): 2312–9.
- 14- Gupta R, Gupta N, Rathi, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2004;64:763–81.
- 15- Lan D, Hou S, Yang N, Whiteley C, Yang B, Wang Y. Optimal Production and Biochemical Properties of a Lipase from *Candida albicans*. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(10): 7216-37.
- 16- Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z, Wang Y. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;9:16.
- 17- Schmid RD, Verger R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angewandte Chemie International Edition.* 1998; 37:1608-33.
- 18- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1):122-43.
- 19- Borst A, Fluit AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol.* 2003; 52(Pt 11):971-4.
- 20- Jaeger KE, Wohlfarth S. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology and bioengineering. 1993;9: 39-46
- 21- Werner H. Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi. *Zentralbl Bakteriol Orig.* 1966; 200(1):113-24.
- 22- Stehr F, Kretschmar M, Hube B. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic.* 2003; 22:347-55.
- 23- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR. White–opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 1987;189-97.
- 24- Rustchenko EP, Howard DH, Sherman F. Variation in assimilating functions occurs in spontaneous *Candida albicans* mutants having chromosomal alterations. *Microbiology.* 1997;143:1765-78.
- 25- Sónia Silva M, Negri M, Henriques R, Oliveira D, Williams J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews.* 2012; 288–305.
- 26- Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001;9(12):591-6.
- 27- López N, Pernas MA, Pastrana LM, Sánchez A, Valero F, Rúa ML. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnol Prog.* 2004; 20(1):65-73.
- 28- Domínguez de María P, Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV, Alcántara AR. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol Adv.* 2006;24(2):180-96
- 29- Neugnot V, Moulin G, Dubreucq E, Bigey F. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(6), 1734-45.
- 30- Tóth R, Alonso M, Bain JM, Vágvölgyi C, Erwig LP and Gácsér A. Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. *Front. Microbiol.* 2015; 6:1102.
- 31- Christensen SA, Kolomiets MV. The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genet Biol.* 2011; 48(1):4-14.
- 32- Trofa D, Agovino M, Stehr F, Schäfer W, Rykunov D, Fiser A, et al. Acetylsalicylic acid (aspirin) reduces damage to reconstituted human tissues infected with *Candida* species by inhibiting extracellular fungal lipases. *Microbes Infect.* 2009; 11(14-15):1131-9.
- 33- Schaller M, Zakikhany K, Naglik JR, Weindl G, Hube B. Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia. *Nat Protoc.* 2006; 1(6):2767-73.
- 34- Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähns B, Neuber K, et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res.* 2004; 4(4-5):401-8.
- 35- Schofield DA, Westwater C, Warner T, Balish E. Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 244(2):359-65.
- 36- Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gácsér A, Goldman DL. A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Mycopathologia.* 2011; 172 (3):169-78.
- 37- Park M, Do E, Jung W. Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. *Mycobiology.* 2013; 41 (2):67-72.
- 38- Gácsér A, Trofa D, Schafer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J. Clin. Invest.* 2007 ; 117(10) :3049-58.
- 39- Toth R, Tot A, Vagvölgyi C, Gácsér A. *Candida parapsilosis* Secreted Lipase as an Important Virulence Factor. *Current Protein and Peptide Science*, 2017; 18: 1-7.
- 40- Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 5 (7):a019752.
- 41- Stepanovic S, Vukovic D, Jescic M, Ranin L. Influence of acetylsalicylic acid (aspirin) on biofilm production by *Candida* species Florence, Italy. *Journal of Chemotherapy.* 2004; 16 pp. 134–138.
- 42- Al-Bakri AG, Othman G, Bustanji Y. The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin–EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents. *Journal of Applied Microbiology.* 2009; 107: 280–6.
- 43- Castillo GDV, Aguilar JJ, Azcurra AI, Sotomayor CE. Expresión a nivel molecular de las lipasas de *C. albicans* asociadas a lesiones estomatológicas crónicas, potencialmente malignas y malignas de la cavidad bucal. *En prensa*, 2019.
- 44- Pereira CA, Domingues N, Araújo MI, Junqueira JC, Back-Brito GN, Jorge AO. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 85:66-72.
- 45- Gácsér A, Stehr F, Kröger C, Kredics L, Schäfer W, Nosanchuk J D. Lipase 8 Affects the Pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2007; 75(10): 4710–8.