



CONGRESO  
INTERNACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN  
DOS MIL DIECISEIS



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Titulo del trabajo:

*Candida glabrata* bloquea los efectos cardiacos dependientes de flujo mediante interacción lectinica.

Nombre completo del autor:

José David Torres Tirado.

Autores colaboradores de este proyecto:, **1** Patrón Soberano Olga Araceli, **2** Pérez Flores Gabriela, **1** De Las Peñas Alejandro, **1** Castaño Irene, **2** Leon Buitimea Angel, **3** Rubio Rafael .

**1** Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

**2** Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

**3** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Grado académico:

Doctorado en Ciencias Biomédicas Básicas.

Correo electrónico:

[davtirado@yahoo.com.mx](mailto:davtirado@yahoo.com.mx)

Nombre de la Institución:

Escuela de Medicina. Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Universidad Autónoma de San Luis potosí. Romualdo del Campo 501, Fraccionamiento Rafael Curiel, CP 79060. Cd. Valles, S.L.P.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

### Título

Candida glabrata bloquea los efectos cardiacos dependientes de flujo mediante interacción lectinica

### Resumen

Candida glabrata (CG) es una levadura que puede invadir tejidos y causar la muerte. Su superficie es lectinica, uniéndose con alta afinidad a Oligosacaridos (O) presentes en la membrana celular, como la membrana luminal del endotelio coronario (MLEC). En corazón el flujo coronario (FC) estimula la transmisión eléctrica auricula-ventriculo (TAV). CG actúa en lectinas (L) y O de la MLEC, formando un complejo L-O necesario para la estimulación TAV inducida por FC. Nuestra hipótesis es que CG se une a O de la MLEC previniendo la formación del complejo L-O inducido por el FC, inhibiendo la TAV. En corazón aislado de cobayo la TAV fue determinada bajo diferente FC. A menor FC incremento la TAV (curva control). Después, CG fue administrada intracoronariamente durante 5 minutos y lavada durante 5 minutos, posteriormente se realizó una curva experimental de FC y TAV. La respuesta en la curva experimental fue mayor que en la curva control indicando que la unión de CG incrementa el valor de la TAV en cualquier FC. Para demostrar que estos efectos fueron debidos a la unión de CG a O, CG fue desplazada al perfundir azucres componentes de O; manosa o galactosa. Estos azucres bloquearon los efectos de CG y regresaron las respuesta de TAV inducida por FC a una situación control. Así, CG se une a O de la MLEC a través de L previniendo la formación del complejo L-O inducido por FC, por tanto inhibe la estimulación de la TAV inducida por FC.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

### Abstract

*Candida glabrata* (CG) is a yeast that can invade tissues and cause death. Its surface is lectinic, binding with high affinity to oligosaccharides (O) present in the cell membrane, such as the coronary endothelium luminal membrane (CELM). In heart coronary flow (CF) stimulates atrial-ventricular electric transmission (AVT). CG acts on lectins (L) and O MLEC, forming a complex LO required for AVT induced stimulation CF. Our hypothesis is that CG binds to O of CELM preventing LO complex formation induced by CF inhibiting AVT. In isolated guinea pig heart AVT was determined under different CF. A lower CF increase the AVT (control curve). Then CG was administered intracoronary for 5 minutes and washed for 5 minutes, then an experimental curve CF and AVT was performed. The response in the experimental curve was higher than the control curve indicating that binding of CG increases the value of the AVT at any CF. To demonstrate that these effects were due to the binding of CG to O, CG was displaced using infused sugars components of O; mannose or galactose. These sugars blocked the effects of CG and returned the response AVT induced by CF to a control situation. Thus CG bind to CELM through O L complex formation preventing CF induced, thereby inhibits AVT stimulation CF induced.

Palabras clave: *Candida glabrata*, endotelio coronario, lectinas. Keywords: *Candida glabrata*, coronary endothelium, lectins.

### I. Introducción

La membrana luminal de células endoteliales tiene una gran variedad de proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, glicolípidos proteínas transmembranales los cuales constituyen el glicocalix luminal endotelial. El



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

glicocalix está expuesto directamente al flujo y a hormonas circulantes. Diversas proteínas luminales endoteliales son sensibles a flujo, pero, su común denominador es que son glicosiladas y de naturaleza lectínica (1,2).

Nosotros hemos establecido que el sensado del flujo requiere la presencia de oligosacáridos (O) y lectinas (L) debido a que la respuesta parenquimal inducida por flujo es modulada cuando el glicocalix es tratado con:

Hidrolisis enzimática de O, o con L exógenas que se unen a estos O (3,4).

Con exógeno O que se une a L endógena.

De esta manera L de la membrana luminal del endotelio coronario (MLEC) y O participan en la detección del flujo. Este puede inducir una reversión de la formación del complejo L-O, causando respuesta cardíaca endotelial inducida por flujo.

Previamente hemos propuesto que la respuesta inducida por flujo resulta de la alterar el equilibrio:



Donde L es una señal paracrina proteica.

Por otro lado *Candida glabrata*, es la segunda causa de candidiasis y en algunos casos resulta en la muerte. La adherencia de *Candida glabrata* a células epiteliales humanas en cultivo es mediada en gran medida por adhesinas. Estas adhesinas tienen un comportamiento tipo lectina y podrían unir O de proteínas en la membrana luminal endotelial (2).

La hipótesis de este trabajo propone que la unión de *Candida glabrata* a O de la MLEC podría estar alterando el equilibrio:



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

O + L  $\longleftrightarrow$  O - L

Donde L podría ser un receptor transmembranal para hormonas de la MLEC.

Los objetivos de este trabajo fueron: demostrar en la preparación de Langendorff de corazón aislado de cobayo si:

Si el flujo coronario que induce un efecto dromotropico positivo (retardo auriculo – ventricular; retardo A-V) es afectado por la administración intracoronaria de *Candida glabrata*.

Si *Candida glabrata* se une a O a través de un mecanismo lectinico. Por ejemplo si sus efectos persisten después de que su administración a sido terminada debido a que permanece unida; es decir no se lava.

Para demostrar que *Candida glabrata* se une a O vía lectina, si sus efectos persisten en la respuesta inducida por flujo tratar de revertir sus efectos por la administración de Manosa, Galactosa, N-Acetilgalactosamina y Acido Hialuronico.

Identificar algunas de las proteínas de señalización presentes en la MLEC que se unen a *Candida glabrata*. Identificar la presencia de *Candida glabrata* después de infundirla y lavarla con solución fisiológica Krebs-Henseleit por microscopia electrónica en tejido cardiaco.

## II. Metodología

Preparación de Corazón Aislado.

Cobayos (300 – 400 g de peso corporal) fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital (50 mg/kg) y heparina sódica (500 UI). El corazón fue removido y perfundido retrógradamente con solución fisiológica Krebs-Henseleit burbujeado



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. La frecuencia cardiaca fue mantenida a 4 Hz colocando un par de electrodos en la aurícula derecha. Para medir el retardo A-V un electrodo fue colocado en la aurícula y el otro en el ventrículo.

Curvas de flujo coronario (retardo A-V) fueron realizadas a flujos de 4, 5, 6, 8 y 10 ml/min. Cada flujo fue mantenido durante 3 min.

Efectos de *Candida glabrata* y reversión por O.

Curva control de flujo y su retardo A-V fue determinada. *Candida glabrata* (CGM35 sir3Δ, 3.7x10<sup>3</sup> células/ml) fue infundida durante 5 minutos, seguido de un lavado de 20 min, el cual es un periodo para eliminar *Candida glabrata* no unida a la MLEC. En este punto, una segunda curva de flujo retardo A-V fue realizada. Posteriormente, se administró Manosa o Galactosa o N-acetilgalactosamina (30 mM) o Acido Hialuronico (10 µg/ml) durante 5 minutos, seguido de 5 minutos de lavado. Una tercera curva de flujo retardo A-V fue realizada

Identificación de receptores de MLEC unidos a *Candida glabrata*.

Proteínas de la MLEC fueron extraídas de corazones control. Aproximadamente 4 ml de proteínas de la MLEC (1 mg/ml) fueron disueltas en un medio buffer (solución fisiológica Krebs Henseleit) en los cuales 5 ml de solución con *Candida glabrata* fue añadida (3.7x10<sup>3</sup> células/ml). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente bajo agitación suave constante durante 10 min.

La suspensión de *Candida glabrata* con proteínas de la MLEC fue centrifugada (5000 rpm, 4°C, 10 min), sedimentándose *Candida glabrata* unida a proteínas de la MLEC.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

El sobrenadante se colecto y se nombró “Non Bound Fraction; NBF”.

Pelet de *Candida glabrata* se le añadieron 5 ml de solución fisiológica Krebs Henseleit conteniendo Manosa, Galactosa, N-Acetilgalactosamina (30 mM de cada una) y se agito suavemente (5 min, 4°C). Se centrifugo (5000 rpm, 4°C, 10 min), el sobrenadante fue etiquetado como “Bound Fraction; BF”.

SDS-PAGE fue realizada; se cargaron las proteínas control MLEC (Control), NBF y BF, seguido de un western blot determinando Receptores (Angiotensina II tipo 1) AT1R, (Endotelina 2) ET2R, (Adrenergico) alfa ADR y (Vascular Cell Adhesion molecule 1) VCAM 1, por quimioluminiscencia.

### III. Resultados

Efectos de *Candida glabrata* y su reversión por oligosacáridos.

EL flujo coronario estimula la transmisión A-V, *Candida glabrata* inhibe el efecto del flujo coronario. Los efectos de *Candida glabrata* no pueden ser lavados sugiriendo que esta se une a las proteínas de la MLEC. Concentraciones de *Candida glabrata* mayores a  $3.7 \times 10^4$  células/ml causan bloqueo completo del retardo A-V. Manosa y Galactosa revierten los efectos de *Candida glabrata*. N-Acetilgalactosamina y Acido Hialuronico no revierten estos efectos.

Interpretación: *Candida glabrata* presenta efectos vía unión lectinica a proteínas de la MLEC las cuales contienen Manosa y Galactosa. Estos azucars infundidos desplazan *Candida glabrata* unida a las proteínas de la MLEC revirtiendo sus efectos.



**“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”**  
 Multidisciplinario  
 21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Identificación de receptores a los que se une *Candida glabrata*.

*Candida glabrata* tiene la capacidad de unir receptores AT1, ET2 y alfa adrenérgico de la MLEC además de unirse a VCAM1. Una vez unida estas proteínas pueden ser liberadas con la adición de alta concentración de manosa, galactosa y n-acetilgalactosamina. Esto sugiere que la unión de *Candida glabrata* es de naturaleza lectínica.

Identificación de *Candida glabrata* en tejido cardíaco después de su lavado con solución fisiológica Krebs Henseleit por microscopía electrónica.

*Candida glabrata* permanece en la vasculatura cardíaca aun después de ser lavada con Krebs Henseleit, lo que muestra que existe una unión alta entre la *Candida glabrata* y las proteínas de la MLEC, esta unión puede ser desplazada por la adición de manosa.

IV. Conclusión.

Nosotros probamos la hipótesis:

La unión de *Candida glabrata* a O de la MLEC altera el equilibrio:



Alterando la respuesta cardíaca inducida por flujo. Donde L puede ser un receptor transmembranal hormonal de la MLEC.

Nuestros resultados apoyan la propuesta:

La unión de *Candida glabrata* a proteínas de la MLEC inhibe la respuesta cardíaca inducida por flujo. La unión es de tipo lectínica debido a que *Candida glabrata* es desplazada por altas concentraciones de manosa.





## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Candida glabrata en suspensión se une de manera lectínica a proteínas de la MLEC ya que su unión puede ser desplazada utilizando altas concentraciones de azúcar.

La microscopia electrónica muestra que a pesar de ser lavado el tejido cardiaco durante 20 minutos aún se puede encontrar Candida glabrata unida al vaso sanguíneo. Nosotros proponemos que esta unión es directamente con el glicocalix endotelial, el cual no fue teñido en la imagen. En este trabajo se demostró que el flujo coronario el cual induce un efecto dromotropico positivo (retardo auriculo – ventricular; retardo A-V) es afectado por la administración intracoronaria de Candida glabrata. También se mostró que el mecanismo en que Candida se une a O es de tipo lectínico.

Agradecimientos: Este proyecto fue financiado por fondos PROMEP DSA/103.5/14/11016, CONACYT-SEP No. 101850, CONACYT CB-2010 No. 153929, CONACYT CB 2014 No. 239629, CONACYT CB-2010 No. 153929 y FAI 2014.

### V. Bibliografía.

1. Barajas-Espinosa A, Ramiro-Diaz J, Briones-Cerecero E, Chi-Ahumada E, De la Rosa AB, Arroyo-Flores B, Rubio R. Involvement of endothelial Man and Gal-



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

binding lectins in sensing the flow in coronary arteries. *Front Biosci.* 2008. 13:5421-5431.

2. Castaño I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, Cormack BP. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol.* 2005. 55(4):1246-58.

3. Perez-Aguilar S, Torres-Tirado D, Martell-Gallegos G, Velarde-Salcedo J, Barba de la Rosa A, Knabb M, Rubio R. G-protein coupled receptors mediate coronary flow and agonist-induced responses via lectin- oligosaccharide interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014. 306:H699-H708.

4. Ramiro-Diaz J, Barajas-Espinosa A, Chi-Ahumada E, Perez-Aguilar S, Torres-Tirado D, Castillo-Hernandez J, Knabb M, Barba de la Rosa A, Rubio R. Luminal endothelial lectins with affinity for N-acetylglucosamine determine flow-induced cardiac and vascular paracrine-dependent responses. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010. 299:743- 751.