



ACADEMIA ESPAÑOLA
DE DERMATOLOGÍA
Y VENEREOLÓGIA

ACTAS Dermo-Sifiliográficas

Full English text available at
www.actasdermo.org



COMUNICACIÓN BREVE

La unión de *Candida albicans* y *Malassezia* spp. a células de piel promueve cambios de expresión en los genes responsables de la síntesis de las cadenas de heparán y condroitín sulfato



H. Ordiales^{a,b,c}, F. Vázquez-López^{d,e}, M. Pevida^{a,f}, B. Vázquez-Losada^d, F. Vázquez^{a,b,g}, L.M. Quirós^{a,b,c} y C. Martín^{a,b,c,*}

^a Instituto Universitario Fernández-Vega (IUFV), Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^b Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^c Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, España

^d Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España

^e Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^f Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, Oviedo, España

^g Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España

PALABRAS CLAVE

Glucosaminoglicanos;
Infección;
qRT-PCR;
Heparán sulfato;
Condroitín sulfato

Resumen Las micosis superficiales son patologías prevalentes en dermatología, causadas frecuentemente por hongos oportunistas de los géneros *Candida* y *Malassezia*. El objetivo de este trabajo es analizar, mediante qRT-PCR, la existencia de alteraciones en la expresión génica de las enzimas biosintéticas de las cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) tras la adhesión de dichas levaduras a líneas celulares de piel. La interacción de *C. albicans* y *Malassezia* spp. produjo las siguientes modificaciones en genes implicados en la biosíntesis del heparán y condroitín sulfato: la subexpresión de *CHPF* en los queratinocitos y 4 subexpresiones (*EXT1*, *EXT2*, *CHSY3* y *CHPF*) en los fibroblastos. Las enzimas implicadas en la modificación de las cadenas de dichos GAG se ven más alteradas en los fibroblastos, produciendo 13 subexpresiones y 2 sobreexpresiones (*CHST15* y *CHST7*). Como consecuencia, la afinidad de las cadenas de GAGs por sus ligandos puede verse afectada, pudiendo alterar su papel como receptores de microorganismos, paso clave para el inicio de su proceso infeccioso.

© 2022 AEDV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Glycosaminoglycans;
Infections;

Adherence of *Candida albicans* and *Malassezia* Species to Skin Cells Induces Changes in the Expression of Genes Responsible for Heparan and Chondroitin Sulfate Chain Synthesis

Abstract Superficial fungal infections are common in dermatology and are often caused by opportunistic species in the *Candida* and *Malassezia* genera. The aim of this study was to analyze

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cmartincueto@gmail.com (C. Martín).

Reverse transcriptase polymerase chain reaction;
Heparan sulfate;
Chondroitin sulfates

changes in the expression of genes coding for enzymes involved in the biosynthesis of glycosaminoglycans (GAGs) chains following the adherence of *Candida* and *Malassezia* yeasts to skin cell lines. Gene expression was analyzed using reverse transcriptase–quantitative polymerase chain reaction assays. Interactions between the yeasts and the skin cells induced the following changes in genes involved in the biosynthesis of heparan sulfate and chondroitin sulfate: downregulation of *CHPF* in keratinocytes and downregulation of *EXT1*, *EXT2*, *CHSY3*, and *CHPF* in fibroblasts. Adherence to fibroblasts had an even greater effect on GAG biosynthetic enzymes, inducing the downregulation of 13 genes and the upregulation of two (*CHST15* and *CHST7*). Interactions between yeasts and skin cells might affect the binding affinity of GAG chains, possibly changing their ability to function as receptors for pathogens and interfering with a key stage at the start of infection.

© 2022 AEDV. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Las micosis superficiales son patologías prevalentes en dermatología, y los hongos oportunistas más frecuentes en este tipo de infecciones son las levaduras de los géneros *Candida* y *Malassezia*, seguidos por otros hongos filamentosos patógenos cutáneos primarios. El desarrollo de estas afecciones cutáneas superficiales implica la participación de receptores que permiten la adherencia y la colonización de los patógenos al tejido. Estos receptores no están solo involucrados en el anclaje del hongo al epitelio, sino también en otros aspectos del proceso infeccioso, como el tropismo por los tejidos, el desencadenamiento de la respuesta inmune o la invasión tisular¹. Estudios previos han demostrado la participación de los proteoglicanos (PGs), y en concreto de sus cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), como receptores en el desarrollo de infecciones bacterianas². Los GAGs más relevantes son el heparán sulfato (HS) y el condroitín sulfato (CS)³. Ambos están compuestos por un residuo de ácido glucurónico (GlcA) que se une en el HS a N-acetilglucosamina (GlcNAc) y a N-acetilgalactosamina (GalNAc) en el CS³. La síntesis del HS y el CS comprende una serie de etapas, como son la polimerización de la cadena y una posterior modificación de la misma a través de una serie de reacciones enzimáticas, como pueden ser la N-desacetilación/N-sulfatación, la epimerización y/o diversas O-sulfataciones.

Los GAGs están implicados en una gran variedad de funciones biológicas, pero también patológicas, incluyendo diferentes procesos infecciosos, en los que se han descrito alteraciones en la expresión de los genes implicados en su biosíntesis^{2,4}. El objetivo de este trabajo es determinar si la adherencia de *C. albicans* y *Malassezia* spp. induce cambios en la expresión de estos genes en células epiteliales. Esto permitiría incrementar nuestro conocimiento sobre el proceso infeccioso de estos hongos que, bajo determinadas condiciones, son capaces de causar diferentes enfermedades.

Material y métodos

El crecimiento de las líneas celulares y los cultivos fúngicos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento previamente

descrito⁵. Posteriormente, a cultivos de queratinocitos y fibroblastos crecidos en placas de 6 pocillos se añadieron 400 μ l de la suspensión de la levadura correspondiente a una A_{600} de 0,5, completando hasta 2 ml con *Dulbecco's Modified Eagle's minimal essential* (DMEM) (Gibco), y se incubó durante 90 minutos a 37 °C al 5% de CO₂. Los pocillos control fueron tratados de la misma manera, salvo que en el último paso se añadió únicamente DMEM. Tras dos lavados con PBS, se añadió el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular⁶ y se incubaron las placas durante 16 horas a 37 °C al 5% de CO₂. La extracción de ARN y síntesis de ADNc se llevó a cabo usando los kits *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) y *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de qRT-PCR y el análisis de los datos se llevaron a cabo según el método descrito previamente⁷, utilizando la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*G3PDH*) como gen control para normalizar las expresiones. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se detalla en la [tabla suplementaria 1](#).

Resultados

La interacción de los queratinocitos y los fibroblastos con las levaduras indujo alteraciones en las transcripciones de distintos genes implicados en la biosíntesis del HS y del CS, dependientes de la línea celular y del microorganismo implicado.

En el caso de los genes responsables de la polimerización de las cadenas de GAGs, la adherencia de *Malassezia* spp. a ambas líneas celulares no indujo cambios en la transcripción de ninguno de ellos ([fig. 1](#)). Por el contrario, la adherencia de *C. albicans* sí indujo cambios, limitados únicamente a la subexpresión del factor de polimerización del CS (*CHPF*) en los queratinocitos, subexpresiones que se extendieron a todos los genes, con la excepción de *CHSY1* en los fibroblastos ([fig. 1](#)). Los resultados fueron en todos los casos análogos, independientemente de la morfología de *C. albicans* ([fig. 1](#)).

Los genes codificantes de enzimas modificadoras de las cadenas de HS experimentaron subexpresiones específicas en presencia de las levaduras ([fig. 2A](#)). En los queratinocitos,

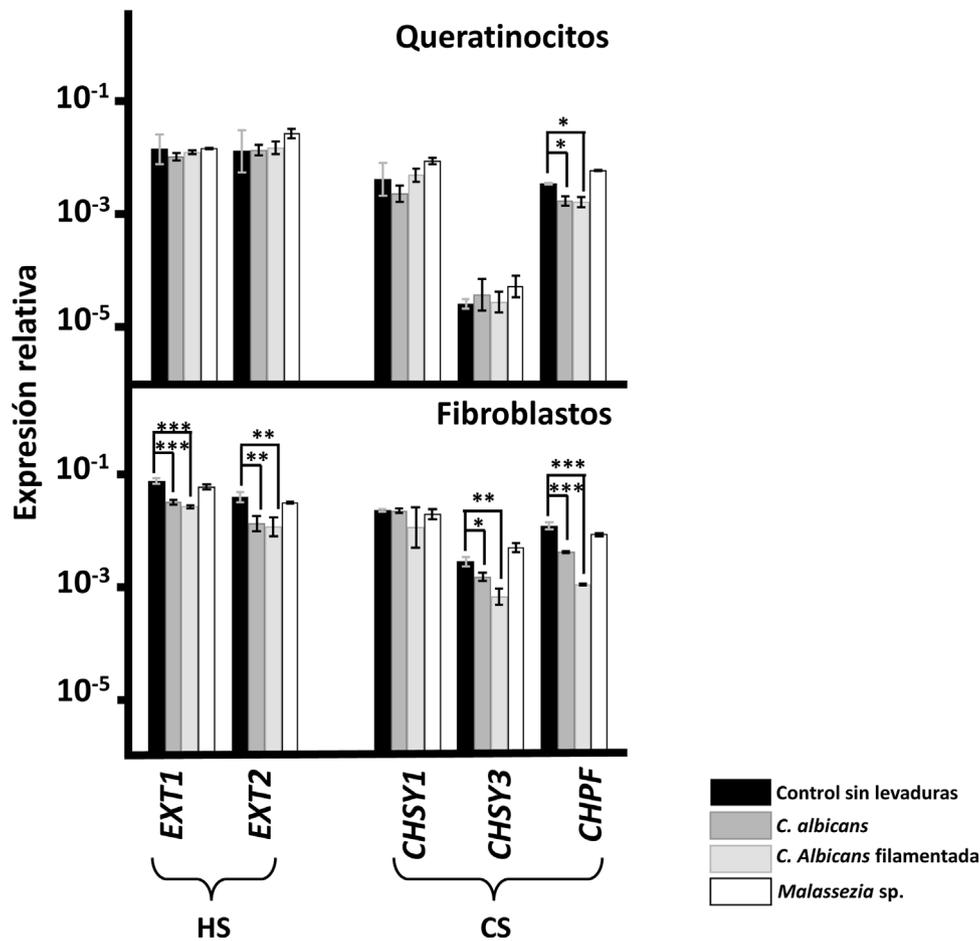


Figura 1 Transcripción diferencial de los genes implicados en la elongación de las cadenas de HS y CS en queratinocitos de epidermis y fibroblastos de la dermis tras la interacción con levaduras. Se representa la abundancia relativa de los transcritos de genes implicados en la polimerización de las cadenas de HS (*EXT1* y *EXT2*) y de las cadenas de CS (*CHSY1*, *CHSY3* y *CHPF*), en ausencia de levaduras (barras negras), en presencia de *C. albicans* (barras gris oscuro), en presencia de la forma filamentada de *C. albicans* (barras gris claro) y en presencia de *Malassezia* spp. (barras blancas). Los resultados se expresan en escala logarítmica, y se indican las desviaciones estándar. Las diferencias significativas están representadas con * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ y *** para $p < 0,001$.

la forma de levadura de *C. albicans* afectó a todos los genes, mientras que la forma micelial únicamente afectó a los implicados en la 6-O-sulfatación de GlcNAc; *Malassezia* spp. únicamente indujo la subexpresión de la isoforma *HS6ST2* (fig. 2A). En los fibroblastos, *C. albicans* indujo subexpresiones de todos los genes, independientemente de su forma celular, mientras que *Malassezia* spp. afectó a todos excepto al gen responsable de la epimerización de GlcA (*GLCE*) y a la isoforma mayoritaria responsable de la 6-O-sulfatación de GlcNAc (*HS6ST1*) (fig. 2A).

Los genes codificantes de enzimas modificadores de las cadenas de CS son los que mostraron un patrón más complejo de modificaciones (fig. 2B). La adhesión de *C. albicans* a queratinocitos indujo la subexpresión de *CHST12* y de *CHST3* y la sobreexpresión de *UST* independientemente de la forma celular. La forma de levadura indujo además la subexpresión de *CHST11* y *CHST7*, mientras que la forma filamentosa sobreexpresó los genes *CHST15* y *CHST7* (fig. 2B). Por su parte, *Malassezia* spp. indujo la subexpresión de *CHST14*, *CHST13*, *DSE* y *UST*, y la sobreexpresión de los genes *CHST13*,

CHST15 y *CHST7* (fig. 2B). Cuando se estudió la adherencia a fibroblastos, ambas formas celulares de *C. albicans* indujeron la subexpresión de *CHST12*, *CHST14*, *CHST3* y *DSE*, y la sobreexpresión de *CHST7*; la forma de levadura también indujo la subexpresión adicional de *UST*, y la filamentada, de *CHST11* (fig. 2B). Por otro lado, *Malassezia* spp. indujo la subexpresión de *CHST12*, *CHST13*, *CHST14*, *CHST3* y *UST*, y la sobreexpresión de *CHST15* y *CHST7* (fig. 2B).

Discusión

C. albicans y *Malassezia* spp. son microorganismos habituales de la piel y las mucosas que, bajo determinadas condiciones, aumentan en cantidad y pueden convertirse en verdaderos patógenos, generando una gran respuesta inmune. Son varias las vías por las que estas levaduras son capaces de colonizar e invadir el tejido epitelial; sin embargo, poco se sabe acerca de la unión inicial de dichos hongos a la superficie epitelial.

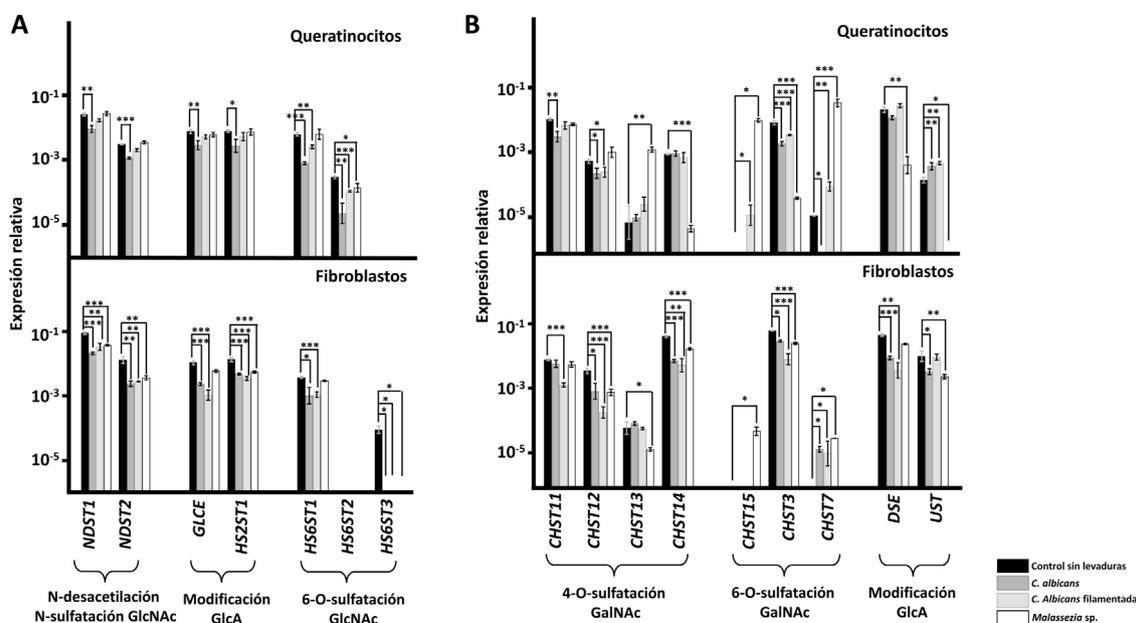


Figura 2 Transcripción diferencial de los genes implicados en la modificación de las cadenas de HS (A) y en la modificación de las cadenas de CS (B) en queratinocitos de la epidermis y fibroblastos de la dermis tras la interacción con levaduras. Se representa la abundancia relativa de los transcritos de genes implicados en la N-desacetilación/N-sulfatación de GlcNAc (*NDST1-2*), epimerización y 2-O-sulfatación de GlcA (*GLCE*, *HS2ST1*), y 6-O-sulfatación de la GlcNAc (*HS6ST1-3*), en ausencia de levaduras (barras negras), en presencia de *C. albicans* (barras gris oscuro), en presencia de la forma filamentada de *C. albicans* (barras gris claro) y en presencia de *Malassezia* spp. (barras blancas). Los resultados se expresan en escala logarítmica, y se indican las desviaciones estándar. Las diferencias significativas están representadas con * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ y *** para $p < 0,001$.

En este trabajo se observaron variaciones en los niveles de expresión de varios genes implicados en la polimerización y la modificación de las cadenas de HS y CS tras la interacción con *C. albicans* y *Malassezia* spp., siendo particularmente notable a nivel de los fibroblastos en comparación con los queratinocitos. Las modificaciones observadas a nivel de transcripción apuntan a cambios relevantes en el patrón de sulfatación de las cadenas, lo que podría reforzarse por la presencia de otros mecanismos post-transcripcionales adicionales o por la regulación de catálisis enzimáticas⁸. Como consecuencia de todo esto, la afinidad de las cadenas de GAGs por diferentes ligandos puede verse alterada, afectando a diferentes procesos biológicos y a su función como receptores de los diferentes microorganismos. Además, dichas modificaciones podrían afectar también a la capacidad de adherencia de otros microorganismos patógenos epidérmicos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* o *Candida* spp.^{2,9}.

La capa dérmica, menos expuesta al entorno en comparación con la epidermis, mostraría diferentes receptores y composición de PGs y GAGs en la superficie celular y, por lo tanto, sería esperable que la interacción con estos microorganismos fuese distinta^{9,10}. Este hecho se ha descrito en la unión de diferentes bacterias a diferentes células pulmonares¹¹. Esto podría explicar el mayor número de alteraciones detectadas a nivel de los fibroblastos de la dermis, ya que los cambios podrían ser producidos por el microorganismo con el fin de desestabilizar el tejido dérmico, facilitando la invasión.

Las enzimas implicadas en la modificación de las cadenas parecen estar más afectadas que las correspondientes a la polimerización de las mismas. Los genes implicados en las modificaciones de las cadenas de HS vieron reducida su expresión en ambas capas de la piel, pero en menor cantidad en los queratinocitos, donde la mayoría de los cambios los produce la forma de levadura de *C. albicans*. Sin embargo, la transición de levadura a hifa parece tener un mayor efecto en los fibroblastos, donde las alteraciones son semejantes. La morfología levaduriforme de *C. albicans* es la responsable normalmente de las fases tempranas de la infección, como son la adhesión inicial y la posterior diseminación, y la formación de hifas se relaciona con la invasión a los tejidos subyacentes¹², lo cual parece que va relacionado con que la primera produzca una mayor alteración de los genes de biosíntesis del HS a nivel de la epidermis. Además, la subexpresión de dichos genes podría relacionarse con la capacidad invasiva y con la respuesta inmune. La unión de *Malassezia* spp. parece inducir un mayor número de alteraciones en las capas profundas de la dermis. El papel de *Malassezia* spp. en las patologías dermatológicas continúa sin ser claro. Mediante la producción de ácidos grasos libres, *Malassezia* spp. altera la integridad de la piel, irritándola e iniciando una respuesta inflamatoria con la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias, lo que se asocia con las diferentes patologías, como la dermatitis seborreica o la foliculitis¹³⁻¹⁵.

Las alteraciones observadas en este trabajo indican que las cadenas de GAGs experimentan diferentes

modificaciones en sus patrones de sulfatación y epimerización en función del hongo y del tipo celular en el cual inicien el proceso de adhesión y colonización. Esto se ha observado en bacterias, donde diferentes adhesinas muestran afinidad por diferentes tipos de GAGs e incluso por el tejido a infectar, indicando la existencia de cierto tropismo^{7,9}. Además, el comportamiento diferencial de *C. albicans* en función de su morfología estaría explicado por una composición de la pared celular diferente¹⁶. Son necesarias más investigaciones para profundizar acerca de las implicaciones que esto tiene sobre los procesos infecciosos que causan; esto abriría la posibilidad de obtener nuevas terapias que reduzcan la incidencia de las micosis superficiales, como la elaboración de preparados tópicos que contengan GAGs que inhiban la adherencia del hongo.

Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por el premio 2019 «AEDV investiga» de la Fundación Piel Sana de la Academia Española de Dermatología y Venereología (AEDV).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ad.2021.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.11.010).

Bibliografía

- Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J*. 2002;78:216–24, <http://dx.doi.org/10.1136/pmj.78.918.216>.
- García B, Merayo-Llodes J, Martín C, Alcalde I, Quirós LM, Vázquez F. Surface proteoglycans as mediators in bacterial pathogens infections. *Front Microbiol*. 2016;7:220, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00220>.
- Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol*. 2015;42:11–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>.
- Kamhi E, Joo EJ, Dordick JS, Linhardt RJ. Glycosaminoglycans in infectious disease. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2013;88:928–43, <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12034>.
- Ordiales H, Vázquez-López F, Pevida M, Vázquez-Losada B, Vázquez F, Quirós LM, et al. Glycosaminoglycans are involved in the adhesion of *Candida albicans* and *Malassezia* species to keratinocytes but not to dermal fibroblasts. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*. 2021, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.001>.
- Meana A, Iglesias J, del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 1998;24:621–30, [http://dx.doi.org/10.1016/s0305-4179\(98\)00107-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0305-4179(98)00107-7).
- García B, García-Suárez O, Merayo-Llodes J, Alcalde I, Alfonso JF, Fernández-Vega Cueto L, et al. Differential expression of proteoglycans by corneal stromal cells in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:2618–28, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.15-16692>.
- Fernández-Vega I, García-Suárez O, García B, Crespo A, Astudillo A, Quirós LM. Heparan sulfate proteoglycans undergo differential expression alterations in right sided colorectal cancer, depending on their metastatic character. *BMC Cancer*. 2015;15:742, <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1724-9>.
- Aquino RS, Park PW. Glycosaminoglycans and infection. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21:1260–77, <http://dx.doi.org/10.2741/4455>.
- Smith MM, Melrose J. Proteoglycans in normal and healing skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4:152–73, <http://dx.doi.org/10.1089/wound.2013.0464>.
- Rajas O, Quirós LM, Ortega M, Vázquez-Espinosa E, Merayo-Llodes J, Vázquez F, et al. Glycosaminoglycans are involved in bacterial adherence to lung cells. *BMC Infect Dis*. 2017;17:319, <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-017-2418-5>.
- Vila T, Romo JA, Pierce CG, McHardy SF, Saville SP, Lopez-Ribot JL. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence*. 2017;8:150–8, <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1197444>.
- Saunders CW, Scheynius A, Heitman J. *Malassezia* fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002701, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002701>.
- Sparber F, LeibundGut-Landmann S. Host responses to *Malassezia* spp. in the mammalian skin. *Front Immunol*. 2017;8:1614, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01614>.
- Hay R. Superficial fungal infections. *Medicine*. 2017;45:11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.08.006>.
- Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect*. 2011;13:963–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.009>.