

---

MIKROBIOLOGIA ETA OSASUNA UNIBERTSITATE MASTERRA /  
MASTER UNIVERSITARIO EN MICROBIOLOGÍA Y SALUD

Master Amaierako Lana / Trabajo Fin de Master

---

**Ca37 antigorputz monoklonalaren efektua**  
***Candida* generoko espezieetan**

**Egilea/Autor/a:**

Oier Rodriguez Ereñaga

**Zuzendariak/Directores:**

Aitziber Antoran Diaz doktorea

Andoni Ramirez Garcia doktorea

**Data/Fecha**

2022ko irailaren 9a

## **AURKIBIDEA**

LABURPENA.....	I
ABSTRACT.....	II
1. SARRERA .....	1
<b>1.1 <i>Candida</i> generoko espezieen ezaugarri orokorrak .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Gaixotasuna eta arrisku-faktoreak.....	3
1.1.2 Birulentzia faktoreak .....	4
1.1.3 Antifungikoekiko erresistentzia .....	5
<b>1.2 Fagozitosia .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 <i>Galleria mellonellaren in vivo</i> infekzio eredua .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Adh1 eta Ca37 antigorputz monoklonala .....</b>	<b>7</b>
2. HELBURUAK.....	9
3. MATERIAL ETA METODOAK.....	10
<b>3.1 Mikroorganismo eta zelula kultiboen mantenu- eta hazkuntza-baldintzak .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Proteinen erauzketa.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Proteinen elektroforesia.....</b>	<b>11</b>
3.3.1 Dimensio bateko (1-D) SDS-PAGE Elektroforesia.....	11
3.3.2 2-Dimentsioko (2-D) elektroforesia.....	12
<b>3.4 Proteinen detekzioa.....</b>	<b>12</b>
3.4.1 Coomassie urdin tindaketa .....	12
3.4.2 Western Blota (WB).....	12
<b>3.5 Hazkuntza-inhibizioa .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6 Fagozitosia .....</b>	<b>13</b>
<b>3.7 <i>Galleria mellonellaren</i> infekzioa .....</b>	<b>14</b>
3.7.1 Biziraupen frogak.....	15
3.7.2 Antigorputzaren efektua larben biziraupenean.....	15
<b>3.8 Analisi estatistikoa .....</b>	<b>15</b>
4. EMAITZAK.....	16
<b>4.1 Ca37 antigorputz monoklonalaren espezifitateak <i>C. parapsilosis</i> eta <i>C. glabrata</i>ren zelula-     paretako Adh proteinarekiko .....</b>	<b>16</b>
<b>4.2 Ca37 antigorputz monoklonalaren efektu terapeutikoa <i>in vitro</i> <i>C. parapsilosis</i> eta <i>C.</i>     <i>glabrata</i>ren hazkuntzan.....</b>	<b>17</b>
<b>4.3 Antigorputzak <i>C. auris</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. parapsilosis</i> eta <i>C. albicans</i> onddoen fagozitosian     duen efektuaren ikerketa RAW 264.7 makrofagoak erabilita .....</b>	<b>18</b>
<b>4.4 Ca37 antigorputz monoklonalaren efektu terapeutikoa <i>in vivo</i> <i>C. parapsilosis</i> eta <i>C. glabrata</i>     onddoetan.....</b>	<b>20</b>
5. EZTABAIDA.....	22
6. ONDORIOAK.....	30
7. ERREFERENTZIAK .....	30

## LABURPENA

*Candida* generoa infekzio nosokomialen onddo-eragile nagusia da, batez ere *Candida albicans* espeziea. Hala ere, azken urteotan *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* eta *Candida auris* espezieen intzidentziak handitu dira, antifungikoekiko erakusten duten erresistentzia handiarekin erlazionatuta. Gaur egun eskuragarri dauden antifungikoak, gutxi izateaz gain, garestiak eta toxikoak dira gizakiontzat eta haiekiko erresistentzia handituko dela dirudi, bere erabilera handiaren ondorioz. Medikamentu berrien premia handiari aurre egiteko antigorputz monoklonalak asko aztertu dira, haien eraginkortasuna frogatu delarik. Hori dela eta, *C. albicans*en zelula-paretako Adh1 proteinarekiko espezifikoak zen Ca37 antigorputz monoklonala sortu zen. Antigorputzak espezie horretan emaitza positiboak azaldu ditu *in vitro* eta *in vivo*, hazkuntza zein birulentzia murriztuz. *Candida* generoko espezieen Adh proteinaren homologia altua kontuan hartuta, Ca37 antigorputzak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddoetan duen efektua ikertu zen, *C. auris*en pasadan urtean burututako Gradu Amaierako Lanean frogatu zelarik. Western Blotean antigorputzak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* zelula-paretako proteinen artean 3 eta 4 puntu ezagutu zituen, hurrenez hurren, espezie horien Adh proteinaren pisu molekular eta puntu isoelektriko teorikoen antzekoak direnak. Gainera, antigorputzak *in vitro* *C. parapsilosis*en % 42ko hazkuntza-inhibizioa eragin zuen. Antigorputzak efektu opsonizatzailea ote zuen ezezaguna zenez espezie guztietan, aipaturiko lau *Candida* espezieak RAW 264.7 makrofagoekin kokubatu ziren. Antigorputzak makrofagoen fagozitosia indartu zuen, espezie guztien fagozitosi ehunekoa handituz eta *C. auris* eta *C. parapsilosis*en indize fagozitikoa handituz, batez ere lehenengo orduan. Bestalde, *in vivo* erabilitako *Galleria mellonella* animalia-ereduan, antigorputzak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddoekin infektatutako larben biziraupena luzatu dezakeela dirudi, lortutako emaitzak estatistikoki adierazgarriak ez izan arren. Hortaz, nahiz eta esperimentu batzuk errepikatu behar diren, lortutako emaitzek Ca37 antigorputz monoklonalak etorkizunean *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* eragindako infekzioen aurka aplikazio terapeutikoa izan dezakeela aditzera ematen dute. Azkenik, *C. albicans* eta *C. auris*en lortutako emaitza berriek, espezie horiekiko antigorputzaren eraginkortasunaren ebidentzia indartzen dute.

## ABSTRACT

*Candida* genus is the principal fungus of nosocomial infections, especially the species *Candida albicans*. In recent years, however, the incidence of the species *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Candida auris* has increased, in relation to their great resistance to antifungals. The antifungals available today, in addition to being few, are expensive and toxic to humans and it seems that resistance to them will continue increasing due to their high use. To address the high need for new drugs against fungus, many monoclonal antibodies have been widely studied and they have been shown to be effective. Ca37 monoclonal antibody is specific to the Adh1 protein in the cell wall of *C. albicans*. The antibody has shown positive results in this species *in vitro* and *in vivo*, reducing growth and virulence. Considering the high homology of the Adh protein of species of the genus *Candida*, the effect of the Ca37 antibody on *C. parapsilosis* and *C. glabrata* was studied. *C. auris* was studied in last year's Undergraduate Thesis Project. In the Western Blot the antibody recognized 3 and 4 points between the proteins of the cell wall of *C. parapsilosis* and *C. glabrata*, respectively, similar to the molecular weights and isoelectric points of the Adh protein of these species. In addition, the antibody produced 42% growth inhibition *in vitro* in *C. parapsilosis*. As it was unknown whether the antibody had an opsonizing effect on all species, the four *Candida* species mentioned were co-incubated with the macrophages RAW 264.7. The antibody strengthened the phagocytosis of macrophages, increasing the percentage of phagocytosis in all species, and increasing the phagocytic index in *C. auris* and *C. parapsilosis*, especially at the first hour. On the other hand, in the animal model *Galleria mellonella* used *in vivo*, the antibody appears to prolong the survival of larvae infected with *C. parapsilosis* and *C. glabrata*, although the results obtained are not statistically significant. Therefore, although some experiments must be repeated, the results obtained suggest that monoclonal Ca37 antibody may have therapeutic application against *C. parapsilosis* and *C. glabrata* infections in the future. Lastly, the new results obtained in *C. albicans* and *C. auris* reinforce the evidence of the effectiveness of the antibody to these species.

## 1. SARRERA

Mikosiak, ondoek eragindako infekzioak, gero eta ugariagoak dira ingurune nosokomialetan; hau da, osasun-arretarekin lotutako ingurunetan, eta ugaritze joera mantenduko dela dirudi, gaixotasun horien arrisku-faktoreak handitzen ari direlarik. Izan ere, mikosiek paziente immunogutxituengan dute intzidentzia handiena, eta hauek gero eta ugariagoak dira: minbizia tratatzeko kimioterapiak eta transplanteetarako terapia immunoezabatzailea jasotzen dutenak zein Giza Immunoeskasiaren Birusarekin (GIB) kutsatutako gaixoak, besteak beste (Quindós, 2018).

Gaixotasun nosokomialak eragiten dituzten ondoen artean *Candida* generoko espezieak dira eragile nagusienak. Ospitalean gerta daitezkeen infekzio guztien laugarren kausa dira (Du *et al.*, 2020) eta zainketa intentsiboetako unitatean (ZIU) ematen diren infekzioen hirugarren kausa (Lamoth *et al.*, 2018), mundu osoan 2-20/100.000 intzidentzia estimatu delarik. *Candida* generoa Fungi erreinu, Ascomycota filum, Saccharomycetes klase eta Saccharomycetales ordenean dago. Bostehun espezie baino gehiago bildu arren (Jackson *et al.*, 2019), 16 baino ez dira giza patogenoak (Uppuluri *et al.*, 2017), *Candida albicans* gaixotasuna eragiten duen espezie nagusia izanik, hain zuzen ere kandidiasien % 40-75a.

*Candida* generoko espezieek eragindako kandidiasiak oso anitzak izan daitezke, azaleko infekzioetatik (kandidiasi oralak eta kandidiasis bulbogainalak, besteak beste) kandidiasi inbaditzaileetara, hala nola kandidemiak eta barne organoen infekzioak. Gaur egun kandidiasi inbaditzaileen % 95a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* eta *Candida krusei* espezieek eragiten dute (Quindós, 2018). Hala ere, azken urteotan aldaketa etiologiko progresibo bat behatu da, *C. albicans* ez diren espezieen intzidentzia igo delarik (Sardi *et al.*, 2013; Pfaller *et al.*, 2019). Horien artean, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* eta *Candida auris* daude, antifungikoekiko sentikortasun txikiagoa dutenak. Aldaketa etiologiko hori antifungikoen erabilera zabalarekin, ezarritako gailu medikuekin, organoen transplanteekin eta espektro zabaleko antibiotikoen erabilerarekin erlazionatu da (Quindós, 2018).

Lan honetan *C. albicans*en aurkako antigorputz monoklonal bat *Candida* generoko 4 espezien gain duen efektua aztertuko da, hain zuzen ere, *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*en. Lehenengo bi espezieetan lortutako emaitzak publikatuta eta Gradu Amaierako Lanean (GrAL) lortu zirenez, hurrenez hurren, beste bi espezieetan sakonduko da batez ere, eta aurretik lortutako emaitzekin konparaketa burutuko da. Hala

eta guztiz ere, *C. albicans* eta *C. auris*en momentura arte egin ez diren esperimentuak ere aurrera eramango dira.

### 1.1 *Candida* generoko espezieen ezaugarri orokorrak

Epidemiologiaren aldetik, *C. albicans* mikosi nosokomialen agente nagusia izan arren, lan honetan erabiliko diren *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* kandidiasi inbaditzaileen bigarren edota hirugarren kausa dira munduan zehar, desberdintasun geografiko garrantzitsuekin. *C. parapsilosis* Australia, Latinoamerika, Afrika zein Asiako hainbat zonalde eta Europako Mediterraneo aldeko herrialdeetan bigarren agente etiologikoa da (Tóth et al., 2019). *C. glabrata*, aldiz, berebiziko garrantzia du AEB eta Erdialdeko zein Iparraldeko Europan, *C. parapsilosis* oso gertu egon arren (Silva et al., 2012; Pfaller et al., 2019).

Bestaldetik, lan honetan *C. auris* ere erabiliko da. 2009. urtean Japonian lehen aldiz isolatu zen onddoa da (Satoh et al., 2009) eta bere intzidentzia hain garrantzitsua ez den arren, gaur egun, patogeno emergentetzat hartzen da, onddo horrek eragindako gaixotasunak 5 kontinenteetan behatu baitira (Jeffery-Smith et al., 2018). Espezie horri buruzko kezka hain da handia zeinen CDCk (*Centers for Disease Control and Prevention*, AEB) osasunerako alerta globala eragin duen lehen onddoa bihurtu duen. *C. auris*ek beste *Candida* espezieetatik bereizten dituen zenbait ezaugarri bereizgarriak ditu. Alde batetik, tenperatura altuetan hazteko gaitasuna du, 42 °C-ra arte haz daitekeelarik (Satoh et al., 2009). Beste aldetik, gatz kontzentrazio altuak (>% 10 NaCl) jasateko gaitasuna ere bereizgarria da. Ondorioz, gainazal abiotiko zein biotikoetan denbora luzez mantentzeko gaitasuna du (Jackson et al., 2019). Halaber, andui batzuk desinfektatzaile batzuekiko jasankortasuna ere erakusten dute, hala nola sodio hipoklorito eta azido perazetikoarekiko (Wang et al., 2018). Hori dela eta, *Candida* beste espezie gehienetan ez bezala, osasun-zentroetan pazienteen artean kutsatu ohi dela dirudi, osasunarekin lotutako agerraldiak eraginez (Welsh et al., 2017). Izan ere, pazienteen larruazalean (Schelenz et al., 2016) eta ospitaleko gainazaletan zein tresnerian aurkitu da (Welsh et al., 2017), transmisioa erraztu dezakeena. *C. parapsilosis* ere agerraldiekin erlazionatu da hainbat eskualde geografikoetan, sarritan transmisio horizontalaren, hau da, ama-eme harremanik ez duten espezie bereko kideen arteko transmisioaren, ondorioz. Izan ere, osasun-arloko profesionalen larruazal eta azazkaletatik isolatzen da maiz, mikrobiotaren parte delarik. Gailu medikoetatik ere isolatu da, hala nola, kateter intrabaskularretatik zein beste gailu prostetikoetatik (Hernández-Castro et al., 2010). *C. albicans* giza mikrobiota osasuntsuko kidea da baita, gorputzeko hainbat nitxo kolonizatuz, besteak beste, traktu gastrointestinala, emakumeen ugal

aparatura, ahoko barrunbea eta larruazala (Gulati eta Nobile, 2017). *C. glabrata* antzeko lekuak kolonizatzen dituen arren, eskuen bidezko transmisio horizontala argitzeko dago oraindik. Izan ere, osasun profesionalen artean *C. glabrata* gutxitan isolatzen da larruazalek eta esku transmisio kasu gutxi dokumentatu dira (Silva *et al.*, 2012).

### 1.1.1 Gaixotasuna eta arrisku-faktoreak

*Candida* generoko espezieek, patogeno oportunistak izanda, antzeko arrisku-faktoreak dituzte; hala nola, *diabetes mellitusa*, zain-kateter zentralaren zein gernu-kateter iraunkorraren presentzia, immunoeskasia egoera, neutropenia, espektro zabaleko antibiotikoen erabilera, nutrizio parenterala, odol-transfusioa, hemodialisia, azken 30 egunetan ebakuntza pairatu izana, ZIUko egonaldiak, giltzurrunetako gaixotasun kronikoak eta kimioterapia (Kullberg eta Arendrup, 2015; Du *et al.*, 2020). Halaber, *C. auris*, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* espezieen detekzioa beste *Candida* espezieen infekzioen kontrako tratamendu antifungikopean dauden pazienteengan eman izan da (Kullberg eta Arendrup, 2015; Jackson *et al.*, 2019). Hain zuzen ere, ekinokandinen erabilera ostean *C. parapsilosis*en detekzioa handitu egiten da eta *C. glabrata*rena azolen kasuan (Kullberg eta Arendrup, 2015).

Banaketa geografikoaz gain, badaude desberdintasunak *Candida* espezieen artean. *C. parapsilosis* jaioberrien eta umeen infekzioekin lotzen da, batez ere pisu baxukoak, transmisio horizontalaren ondorio izan daitekeena. Infekzioen sorburu osasun-langileen eskuak zein nutrizio parenteralaren eta zain kateter zentralaren erabilera luzeak izan ohi dira (Tóth *et al.*, 2019). *C. glabrata*ak, aldiz, intzidentzia handiago du helduetan, gazte zein umeetan baino, batez ere adineko pazienteengan (> 65 urte). Kasu honetan, arrisku-faktore garrantzitsuenetarikoak abdomeneko ebakuntza handiak, tumore solidoak, transplanteak edota kortikoideen tratamendu luzeak dira (Rodrigues *et al.*, 2014). *C. auris*en infekzioak adin tarte desberdinetan agertzen dira baina nagusitasuna erakusten dute gizonengan eta ingurune nosokomialetan, batez ere ZIUan (Jeffery-Smith *et al.*, 2018).

*C. albicans*ek eragindako kandidiasi bulbobaginala emakumeen % 75ek gutxienez bizitzan behin pairatuko duten arren, kandidemiek dakartzate arazo larrienak, heriotza-tasa oso handiekin, % 47ra hurbildu daitekeena (Gulati eta Nobile, 2017). *C. glabrata*ek eragindako kandidemiek heriotza-tasa antzekoak dituztela behatu da ere bai (Glöckner eta Cornely, 2015). Gainera, azken aldi honetan, *Candida* espezieak eragindako infekzio mistoen konbinaziorik ohikoena *C. glabrata* eta *C. albicans* da (Silva *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2021). *C. parapsilosis*ek eragindako kandidemiak, aldiz, heriotza-tasa txikiagoa eragiten

duela dirudi, % 4a hain zuzen ere (Pristov eta Ghannoum, 2019), adierazpen kliniko desberdin asko izan arren (Tóth *et al.*, 2019). Azkenik, aipatzekoa da *C. auris* espezieak eragindako kandidemiak % 32-60 heriotza-tasa duela, pazienteen egoera, leku geografiko, adin eta zerbitzu medikuaren arabera (Rossato eta Colombo, 2018)

### 1.1.2 Birulentzia faktoreak

*Candida* generoko espezie horiek hainbat birulentzia faktore adierazten dute. Horien artean ostalariaren ehunak degradatzeko fosfolipasak, lipasak eta hemolisinak daude (Silva *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2020). *C. albicans*, *C. parapsilosis* eta *C. auris* espezieek, *C. glabrata* ez bezala, SAPak (*secreted aspartyl proteinases*) ere badituzte (Rodrigues *et al.*, 2014).

Horietaz gain, hifek ehunen inbasioan paper garrantzitsua jokatzen dutela uste da. Izan ere, *in vitro* ikerketek frogatu dute hifen formaziorako zailtasunak dituzten *C. albicans* legamiak ehunak inbaditzeko gaitasun txikiagoa dutela *C. albicans* andui basatiekin alderatuta (Jayatilake *et al.*, 2006). Gainera, *Candida* espezieen forma haritsuek (hifak edota pseudohifak) fagozitosiarekiko erresistentzia handiagoa erakusten dute legamia askeekin konparatuz (Gow *et al.*, 2002). Hala ere, *C. albicans* benetako hifak sortzen dituen onddo gutxienetarikoa da genero barruko espezie patogenoen artean. *C. parapsilosis*ek soilik pseudohifak eratzeko gaitasuna du, baina ez dago erlazionatuta aho epitelioaren inbasioarekin, *C. albicans*en kontrara (Silva *et al.*, 2012), birulentzian eragina baduten arren. Nahiz eta fagozitosiaren aldetik zelula fagozitikoek legamiak eta pseudohifak bereizten ez dituzten, *C. parapsilosis*en pseudohifek makrofagoetan gehiago bizirauten dute eta ostalarian *in vitro* kalte zelular maila handiagoak eragiten dituzte, espeziearen patogenian lagunduz (Tóth *et al.*, 2019). *C. glabrata*, aldiz, ez da gai hifarik ezta pseudohifarik sortzeko (Rodrigues *et al.*, 2014). *C. auris*en kasuan ez dago guztiz argi, autore batzuk pseudohifarik garatzen ez dutela argitaratu duten bitartean (Satoh *et al.*, 2009), beste batzuk %10eko gatz kontzentrazioetan zein sagu infekzio batetik berreskuratzean bai osatzen dituztela adierazi dutelako (Wang *et al.*, 2018; Yue *et al.*, 2018). Hala ere, *C. auris*ek morfologia ezberdinak izan ditzakeela ikusi da. Izan ere, isolamendu asko zelula askez osatuta dauden arren (ez-agreganteak), batzuk, gemazio ostean, zelula alabak ez dituzte askatzen, zelula amari lotuta mantenduz. Horiek ezin dira fisikoki banandu, agregatuak sortuz (Borman *et al.*, 2016). Morfologia hori garatzen duten anduiak birulentzia txikiagoa erakusten dutela dirudi (Du *et al.*, 2020).

*Candida* espezieen beste birulentzia-faktore garrantzitsu bat biogeruzak garatzeko gaitasuna da, hau da, mikroorganismo-komunitateek azalera abiotiko zein biotikoetan



sortzen dituzten egiturak, zelula kanpoko matrize batez inguratuak garatzeko gaitasuna. Izan ere, antifungikoen sarrera oztopatu eta ostalariaren erantzun immunearekiko babesa eskaintzen du. Gainera, *Candida* generoko espezieak gailu medikuetan sortzen dituzten biogeruzak infekzio askoren iturri dira (Sherry *et al.*, 2017). *C. albicans*en biogeruzak ikertuenak izan arren, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* eta *C. auris* espezieak ere gai dira biogeruzak eratzeko. Espezieen barruan desberdintasun handiak egon arren, *C. albicans*en biogeruzen masa *C. glabrata* eta *C. parapsilosis*ek eratzen dituztenekin konpara daiteke, azken horiek sinpleagoak diren arren (Silva-Dias *et al.*, 2015). *C. auris*, aldiz, biogeruzak eratzeko gaitasun txikiagoa duela dirudi (Sherry *et al.*, 2017).

### 1.1.3 Antifungikoekiko erresistentzia

*Candida* generoaren eta espezifikoki *C. albicans* ez diren espezien arazo nagusienetarikoa antifungikoekiko aurkezten duten erresistentzia handia eta anitza da, genomaren plastikotasunarekin erlazionatu dena (Pristov eta Ghannoum, 2019). Kandidiasiak tratatzeko erabiltzen diren antifungiko klase nagusiak lau dira: Polienoak (anfoterizina B), azolak, ekinokandinak eta pirimidinen analogoak (Sanglard, 2016). *C. albicans*en azolekiko zein ekindokandinekiko erresistentziak deskribatu dira isolamendu desberdinetan, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* bezala (Pristov eta Ghannoum, 2019). Hala ere, azken bi espezie horietan erresistentzia inтрintsekoak daudela behatu da. *C. glabrata* azolekiko erresistentzia inтрintsekoa du, edo oso erraz hartzen du azolen terapia luze batean zehar, mutazio bidez *in vitro* edo *in vivo* (Rodrigues *et al.*, 2014). Hortaz, ekinokandinak kandidiasi inbaditzailearen aurkako lehen lerroko agenteak dira. Hala ere, espezie honek terapia luzean kaspofunginarekiko sentikortasun murriztua garatzen duela deskribatu da. Gainera, flukonazolekiko zein ekinokandinekiko *C. glabrata*ren isolamendu erresistenteen berri eman da (Rodrigues *et al.*, 2014). Kontrara, *C. parapsilosis*ek, beste *Candida* espezieekin konparatuz, ekinokandinekiko erresistentzia bereizgarria du. Azolekiko ere erresistentzia handia erakutsi du, zenbait isolamenduek *C. albicans* baino erresistentzia 5 aldiz handiagoa erakutsiz eta tratamendu enpirikoa zailduz (Pristov eta Ghannoum, 2019).

Hala ere, *Candida* espezieen artean *C. auris* da erresistentzia handiena aurkezten duena. *C. auris* azolen klaseko gehien erabiltzen den flukonazolekiko erresistentzia handia adierazi du (Chowdhary *et al.*, 2018). Borikonazola, itrakonazazola, posakonazola eta isakukonazolekiko (flukonazolekin batera azolak direnak) sentikortasun murriztua ere behatu da, B anfoterizinarekiko sentikortasun aldakorrarekin batera (Kenters *et al.*, 2019). Ekinokandinekiko erresistenteak diren isolamenduak aurkitu dira baita, eta ezohikoagoak diren arren, etorkizunean erresistentzia hori handituko dela uste da, gaur egun erabiltzen

den lehen mailako tratamendua baita (Lockhart, 2019). Azkenik, nahiz eta fluzitosina (pirimidina analogoa) buruzko informazio eskasa egon, erresistentzia behatu da baita (Kenters *et al.*, 2019). Gainera, isolamendu batzuk aipatutako antifungiko klase guztiekiko erresistenteak dira, tratatu ezin direlarik, *Candida* espezieen artean kasu bakarra izanik (Kenters *et al.*, 2019).

Aipatu bezala, 4 antifungiko klase soilik erabilgarriak dira kandidiasien aurka, haien erabilera handia behartzen duena, erresistentzien garapena erraztuz. Antifungiko gehienak jarduera espektratu estua izateaz gain, garestiak eta gizakiontzat toxikoak dira, medikamentu berrien beharra premiazkoa izanez (Mor *et al.*, 2015). Agente antifungiko eta itu berri asko ikertzen ari diren arren, ez dira oraindik merkaturatu. Estrategia terapeutiko berrien artean antigorputz monoklonalen erabilera dago, adierazpen kliniko zabal baterako, hala nola minbizia, gaixotasun infekzioso zein autoimmuneetan, tresna terapeutiko eta diagnostiko esperantzagarriak direlarik.

## 1.2 Fagozitosia

Berezko immunitate sisteman ematen den fagozitosia ezinbestekoa da *C. albicans* bezalako onddoen aurkako erantzunean, batez ere neutrofiloek burutzen dutena. Izan ere, neutropenia arrisku faktore garrantzitsua da kandidiasi inbaditzaileetan. Hala ere, neutrofiloek eraginkortasun txikiagoa erakusten dute *Candida* espezie batzuen aurrean; hala nola *C. glabrata* eta *C. auris*, non erantzun txikiagoa eta fagozitzeko zailtasunak behatu diren (Johnson *et al.*, 2018). Neutrofiloez gain makrofagoak ere ezinbestekoak dira *Candida* generoko legamien aurkako berezko immunitate sisteman. Zelula mononuklearrek zein makrofagoek badirudite *Candida* generoko espezieak kontrola ditzaketela, *C. auris* barne (Navarro-Arias *et al.*, 2019).

Sortzetiko immunitatearen efektore ez-zelularrak kolektinak, antigorputz naturalak eta konplementua dira. Molekula horiek opsonizazioan bitartekari dira eta, beraz, fagozitoen bidez mikroorganismoak irensten laguntzen dute. Horien artean antigorputzek, opsonina gisa funtzionatzeaz gain, efektu neutralizatzailea izan dezakete (Cutler *et al.*, 2008).

Kandidiasien aurkako antigorputzen efektu babeslea eztabaidatua izan den arren, azken hamarkadetakoa ebidentziek espezifikotasun definituak dituzten antigorputzek kandidiasi inbaditzaile zein mukosalaren aurrean babes maila desberdinak erakutsi ahal dituztela aditzera ematen dute. Antigorputzen mekanismoak ezezagunak izan arren, jakina da atxikipenaren zein hodi germinalaren sorreraren inhibizioan, opsonizazioan, entzima

birulentoen neutralizazioan eta jarduera fungizida zuzenean parte hartzen dutela (Moragues *et al.*, 2003; Cutler *et al.*, 2008). Hortaz, antigorputz monoklonalen erabilera oso baliagarria izan daiteke *Candida* infekzioen aurka. *C. albicansen* aurkako antigorputz monoklonalekin hori guztia behatu da, opsonizazioa barne, fagozitosia indartuz (Sevilla *et al.*, 2006). Beraz, *Candida* espezie desberdinetan makrofagoen fagozitosiaren azterketa zein antigorputz monoklonalak fagozitosian izan dezakeen opsonizazio efektu posiblearen azterketa interesgarria da.

### **1.3 *Galleria mellonellaren in vivo* infekzio eredia**

Mikroorganismo patogenoek eragindako gaixotasunen patogenia eta terapia egokiak aztertzeko eredu esperimentalak behar dira. Kasu gehienetan saguak erabiltzen dira, ugaztunak diren heinean gizakiarekin homologia handia baitute. Aitzitik, aspektu etiko zein ekonomikoek ugaztunen erabilera mugatzen dute. Arazo horri aurre egiteko, beste animalia-ereduak erabili ahal dira, ornogabeak alegia, tresna oso baliagarriak bihurtu direnak onddo patogenoen ikerketarako.

Horien artean lan honetan erabili den *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1756) (Lepidoptera: Pyralidae) dago. Bere habitat naturalak erlauntzak dira, eztiak, polenez eta argizariak elikatzen delarik. Bertan, zenbait mikroorganismoen aurkako immunitate-sistema garatu du, horregatik, patogenoak ikertzeko eredu egokitzat hartzen da (Fuchs *et al.*, 2010).

Aipatutako infekzio-eredua gaur egun oso erabilia den ugaztunen infekzio-metodoa baino sinpleagoa eta merkeagoa da, eta gainera, baliabide gutxiago behar dira. Gainera, asko dira *G. mellonella* erabiltzearen abantailak gainontzeko ornogabeen aurrean. Alde batetik, larbek nahiko tamaina handia dute, infekzioa zein maneiua era erraz batean egitea ahalbidetuz. Bestetik, 25 °C eta 37 °C bitartean mantendu daitezke, hau da, onddo patogenoen habitat naturaletan zein ugaztunetan bizi direnean jasaten dituzten temperatura tartean, *Caenorhabditis elegans* eta *Drosophila melanogaster* animalia-ereduek ez bezala (Fuchs *et al.*, 2010). Azkenik, injekzio bidez infektatu daitezke larbak, onddoa larbaren hemozelean zuzenean eta kontzentrazio-dentsitate ezagunetan sartzea baimenduz (Fuchs *et al.*, 2010).

### **1.4 Adh1 eta Ca37 antigorputz monoklonala**

Azken urteotan, antigorputz monoklonalak (*Monoclonal antibody*, mAb ingelesez), B linfuzito klon bakarrak antigenoaren epitopo bakar baten kontra sortutako antigorputzak, asko aztertu dira kandidiasia eta beste onddo infekzioak tratatzeko terapia gisa, bakarrik

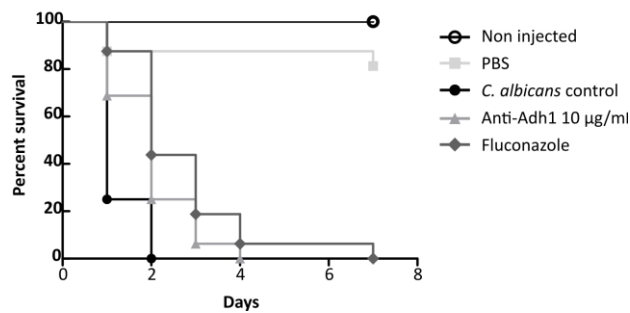
edo antifungikoekin konbinatuz (Boniche *et al.*, 2020). Horien artean, *C. albicans*en bero-shock proteina edo Hsp90-ren aurkako mAb dugu, *Mycograb*, kandidiasi inbaditzailearen aurka emaitza positiboak lortu zituen B anfoterizinarekin konbinatuz. Hala ere, European, segurtasun kezkak zirela eta, ez zen bere erabilpena onartu gizakiak tratatzeko (Boniche *et al.*, 2020). Lan honen gidari den ikerketa taldeak *C. albicans* espeziearen alkohol deshidrogenasa (Adh) proteina hautatu zuen antigorputz monoklonal baten itxura bezala. Horretarako Adh proteina *Escherichia coli* bakterioan ekoiztu zen proteina errekonbinante moduan eta horren aurkako antigorputza monoklonal espezifikoa sortu zen, Ca37 antigorputza deitzen dena.

Alkohol deshidrogenasa organismo desberdinetan agertzen den entzima zitoplasmatikoa da, oxidazio-erredukzio erreakzioetan parte hartzen duena. Hain zuzen ere, azetaldehidoaren erredukzioa katalizatzen du etanola eta NAD<sup>+</sup> sortuz, era itzulgarrian. Entzima horrek *C. albicans* espeziean berebiziko garrantzia du, batez ere metabolismo eta hazkuntzan. Izan ere, pareta zelularrean ere aurkitu daiteke, adhesina funtzioa duelarik. Integrina eta bitronektinarekin lotu daiteke (Chaffin *et al.*, 1998), onddoaren patogenizitatean parte hartuz, *C. albicans*ek jariatutako besikula estrazelularretan ere detektatu delarik (Gil-Bona *et al.*, 2018). Bestalde, antigeno moduan jokatu eta zelula ostalariek detektatu dezaketela ikusi da (Liu *et al.*, 2019). Gainera, *C. albicans* espeziaren Adh1a minbiziarekin erlazionatu da bi mekanismo desberdinen bitartez. Alde batetik, Adh1 proteinak etanoletik sortzen duen azetaldehidoa kartzinogenoa da (Ramirez-Garcia *et al.*, 2016). Bestetik, *C. albicans*en manoproteinek, Adh1a barne, zelula endotelialen estimulazioa eta ondorioz gibleko endotelio zeluletan hantura eragiten dutela proposatu da, atxikidura molekulen adierazpena indusituz eta mikroingurune protumoralak sortuz. Ondorioz, tumore-zelulen erakarmena eta finkapena sustatu lezakete (Ramirez-Garcia *et al.*, 2011).

Onddoetan zelula-horma itxura oso interesgarriak dira terapia itxura bezala, gizakiotan aurkitzen ez den egitura bat baita. Aipaturiko ezaugarri guztiak eta *C. albicans* espeziaren Adh1 gizakiaren proteina berdinarekin duen homologia txikia (% 32 Blast-en arabera (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), gene eta proteina sekuentzien lerrokatzea konparatzeko tresna) kontuan hartuta, Adh1 proteina itxura interesgarria da medikamentu berrien garapenerako (Antoran *et al.*, 2020)

Hori dela eta, Ca37 antigorputz monoklonala *C. albicans* onddoaren gain zuten eragina aztertu zen *in vitro* eta *in vivo* *G. mellonella* animala-ereduan. *In vitro* *C. albicans* espezieak antigorputzarekin inkubatu ostean % 90eko hazkuntza-inhibizioa pairatu zuen, *in vivo* *C.*

*albicans*ekin infektatutako larben biziraupena handitu zuen bitartean (1. irudia; Antoran *et al.*, 2020). Hortaz, antigorputzaren efektu terapeutiko potentziala baieztatu zen.



**1. irudia. *Candida albicans* onddoarekin infektatutako *Galleria mellonella* biziraupen kurbak.** Larbak *C. albicans* onddoaren  $10^6$  zelulekin ziztatu ostean PBS, Ca37 antigorputz monoklonala (10 µg/mL) eta flukonazol antifungikoarekin tratatu ziren, bi kontrol negatiborekin (ziztatu gabeak eta PBSarekin soilik ziztatuak). Larbak 7 egunetan zehar 37 °C-tan mantendu ziren (Antoran *et al.*, 2020-tik eraldatutako irudia).

Antigorputzak *C. albicans* espeziean eragina duela jakin arren, beste *Candida* espezieetan duen efektua ezezaguna da. Hala ere, Adh proteinaren homologia *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* eta *C. auris* espezieen artean % 73-85 da (BLAST bidez analizatuta), beraz, espezie horietan antzeko efektua izateko aukera dago. Hori dela eta, pasadan urtean antigorputz monoklonal hau *C. auris* patogeno emergentean frogatu zen Gradu Amaierako Lanean, *C. albicans*en lortutako emaitza antzekoak lortuz: 5 isolamenduetan batez beste % 55eko hazkuntza-inhibizioa eta *in vivo* *C. auris*ekin infektatutako larben biziraupena egun bat luzatu zuen, mikafungina antifungikoaren antzeko efektua izanik. Hala, *C. auris* espeziearekin lortutako emaitzak batzuk gehitu dira lan honetan konparaketa erraztekoan.

## 2. HELBURUAK

*Candida* generoko espezieak eragindako kandidiasiek, bereziki kandidemiek, heriotza-tasa onartezinak dituzte, bere prebalentzia handiarekin batera arazo larria bihurtuz. *C. albicans* espezie birulentoena eta ohikoena den arren, azken hamarkadetan generoko beste espezieen intzidentzia handitzen ari da, antifungikoen erresistentziarekin erlazionatu dena; hala nola, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* eta bereziki *C. auris*.

Kontuan izanik hurrengo urteetan erresistentzia hori handitzea espero dela, onddo hauen tratamendua zaila bilakatzen ari da. Aldi berean, gaur egun erabiltzen diren antifungikoen toxikotasun-maila altuak eta dibertsitate eskasiak arazo larria suposatzen du osasun globalean. Beraz, tratamendu berriak diseinatzeko beharra dago egun dauden tratamenduak hobetzeko asmoz. Lan honen gidari den ikerketa taldeak Ca37 antigorputz

monoklonala garatu du *C. albicans* Adh1 proteinaren aurka, espezie horretan emaitza positiboak lortuz *in vitro* eta *in vivo*. Adh proteinak *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* zein *C. glabrata* artean duen homologia handia dela eta, *Candida* espezie horietan ere Ca37 antigorputzak efektua izan dezakeela pentsa daiteke. Pasadan urteko Gradu Amaierako Lanean jada frogatu zen aztergai den antigorputzak *C. auris*en efektua hazkuntzan eta *in vivo* infekzio ereduaren. Hala ere, fagozitosiaren gain zuen efektua ez zen aztertu, *C. albicans*en ere ezezaguna delarik.

Hala, lan honen helburua Ca37 antigorputz monoklonalak *Candida* generoko lau espezieen gain duen efektua aztertzea eta konparatzea da, hazkuntzan, fagozitosian eta *in vivo* infekzioan hain zuzen ere. Hori lortzeko lau azpi-helburu definitu dira:

1. Ca37 antigorputz monoklonalak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* espezieetan Adh proteinarekiko duen espezifitasunaren azterketa.
2. Ca37 antigorputzak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddoetan *in vitro* hazkuntzan duen efektuaren ikerketa.
3. Antigorputzak *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* eta *C. albicans* onddoen fagozitosian duen efektuaren ikerketa RAW 264.7 makrofagoak erabilita.
4. Antigorputzaren eraginkortasuna *in vivo* aztertzea, *C. glabrata* eta *C. parapsilosis*ekin infektatutako *Galleria mellonella* animalia-ereduan.

### 3. MATERIAL ETA METODOAK

#### 3.1 Mikroorganismo eta zelula kultiboaren mantenu- eta hazkuntza-baldintzak

Lan honetan lau *Candida* espezie erabili ziren: *C. auris* CJ-197 (isolamendu ez-agregantea) La Fe Unibertsitate Ospitale Politeknikoaren (Valentzia) agerralditik isolatua, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 22019 eta *C. albicans* SC5314. Guztiak Sabouraud Dextrosa Agar (SDA, Panreac Applichem, SLU) hodietan mantendu ziren 4 °C-tan.

Esperimentua egiten hasteko, *Candida* espezie desberdinak hazten jarri ziren SDAn gau osoan zehar, 37 °C-tan. Ondoren, esperimentua baino egun bat lehenago, anduien  $10^5$  zel/mL Sabouraud Dextrosa saldan inokulatu ziren eta gau osoan zehar 37 °C-tan eta 120 rpm irabiazioan inkubatu ziren. Esperimentu egunean, zelulak zentrifugazio bidez jaso ziren (3 min eta  $8,1 \times 10^3$  xg) eta gatz fosfato tanpoia (*Phosphate Buffer Saline*. PBS ingelesez, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) erabiliz birritan egin zen garbiketa. Esperimentu bakoitzean erabili zen mikroorganismo dentsitatea zehatza kalkulatzeko mikroskopio-optikoa eta Burker hemozitometroa erabili ziren.

Ikerketa honetan ere RAW 264.7 arratoi makrofagoak erabili ziren (ATCC TIB-71™). Zelulen mantenurako *Rose Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 mediaoa erabili zen hurrengo osagaiekin batera: % 10 deskonplementatuko behi serum fetala (FBS) (56 °C, 30 minutuz), % 1 L-glutamina, eta % 1 100 µg/ml estreptomizina, 100 U/ml penizilina eta 250 ng/ml anfoterizina B (FBS, Gibco Thermo Fisher Scientific, AEB; beste guztiak: Sigma-Aldrich, AEB).

Zelula horiek 37 °C-tan, % 95eko hezetasunean eta % 5 CO<sub>2</sub>-tan hazi ziren. Zelulen azpikultiboak % 80-90 inguruko konfluentzia lortzean egin ziren kasu guztietan. Horretarako zelula altzatzailleak (*Cell scrapper*) erabili ziren eta medio berridun botila berrian eseki ziren.

Entsegu guztiak M30/2020/154\_REMENTERIARUIZ etika batzordearen onarpenarekin egin ziren.

### **3.2. Proteinen erauzketa**

Zelula paretari lotutako Adh proteinak detektatzeko Pitarch eta lankideek (2002) jarraitutako metodologia erabili zen. *C. auris*, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* legamia zelulak bost aldiz garbitu ziren lisi tanpoiarekin (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 eta 1 mM Fenilmetilsulfonil fluoruroa (PMSF)) eta izotzean mantendutako tanpoi berean eseki ziren berriro. Ondoren, laginak bolumen berdineko kristal bolatxoekin nahastu ziren eta Millmix 20 BeadBeater zelula disruptorea (Tehnica, Železniki, Slovenia) erabiliz apurtu ziren 20 minutuz 30 Hz-etan. Gero, laginak 14.000 xg-tan zentrifugatu ziren 5 minutuz. Gainjalkina, non zitoplasmako proteinak zeuden, -20 °C-tan gorde zen. Horma zelularra berreskuratu zen eta bost aldiz garbitu zen hoztutako soluzio hauetako bakoitzarekin, hurrenez hurren: ur destilatua, % 5 NaCl, % 2 NaCl, % 1 NaCl eta 1 mM PMSF. Orduan, zelula hormak berriro eseki ziren sodio dodezil sulfato (SDS) erauzketa tanpoian (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1 M Azido etilendiaminotetraazetiko konposatua (EDTA), % 2 (p/v) SDS eta 10 mM ditiotreitol (DTT)) eta irakin ziren 100 °C-tan 10 minutuz. Azkenik, laginak 5 minutuz zentrifugatu ziren 14.000 xg-tan eta gainjalkina -20 °C-tan gorde zen, erabiltzeko momentura arte. Horrela, gainjalkinean zelula-paretari loturiko (lotura ez-kobalenteen eta disulfuro loturen bidez) proteinak berreskuratu ziren.

### **3.3. Proteinen elektroforesia**

#### 3.3.1 Dimentsio bateko (1-D) SDS-PAGE Elektroforesia

Ehuneko 10eko akrilamida gelak solidifikatu ondoren (2,5 mL tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,1 mL % 10 (p/v) SDS, 2,5 mL % 40 akrilamida, 4,9 mL ur destilatu, 50 µL % 10 (w/v) Amonio

persulfato (APS) eta 10 µL temed), proteina laginaren 20 µL kargatu ziren kale bakoitzean. Gelak 70 mA, 100 W eta 200 V-tan migratzen jarri ziren 45 minutuz Miniprotean II-an (Bio-Rad). Proteinen pisu molekularra zehazteko, proteina estandar bat gehitu zen (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad).

### 3.3.2 2-Dimentsioko (2-D) elektroforesia

Fokatzeko isoelektrikoa egiteko (FIE), behar den proteina kopuru totala duen laginaren bolumen bat lau bolumen azido Triklorazetiko (TCA)/azetona disoluzioarekin nahastu zen (% 10 (p/v) TCA eta % 0,07 (v/v)) β-merkaptotanolarekin. Proteinak ordu batez -20 °C-tan prezipitatu ziren eta ondoren 20 minutuz zentrifugatu ziren 14.000 xg-tan. Pelleta azetonarekin garbitu eta 125 µL berhidratazio tanpoian berriz eseki zen (% 2 (p/v) CHAPS, % 2 (v/v) anfolitoak, % 2 (v/v) β-merkaptotanol eta % 0,002 bromofenol urdina). Lagina 7 cm-ko luzerako *Immobiline Drystrip*, pH 3-10, geletan kargatu zen (GE Healthcare). Berhidratazio urratsak gutxienez 10 ordu iraun zuen eta Ettan IPGphor sisteman (Amersham, GE Healthcare) burutu zen. FIEaren baldintzak hauek izan ziren: 500 V 2.000 Vhr-tan, 1.000 V 3.000 Vhr-tan, 5.000 V 10.000 Vhr-tan eta 5.000 V 40.000 Vhr-tan.

Proteinak haien puntu isoelektrikoaren (pI) arabera banatu ondoren, 15 minutuz murriztu eta alkilatu egin ziren orekatze tanpoian inkubatuz (6 M urea, 75 mM tris-HCl pH 8,8, % 29,3 (v/v) glizerol (% 87 w/w), % 2 (w/v) SDS eta % 0,002 bromofenol urdina), lehenik eta behin % 1 (w/v) ditiotretolarekin (DTT) eta ondoren %2,5 (w/v) iodazetamidarekin. Proteinak haien pisu molekularren arabera bereizpena aurreko azpiatalean azaldu bezala egin zen.

## **3.4 Proteinen detekzioa**

### 3.4.1 Coomassie urdin tindaketa

Gelak Coomassie urdin tindaketa disoluzioan murgildu ziren (62,5 mL % 1 (w/v) Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich), 137,5 mL ur destilatu, 250 mL metanol eta 50 mL azido azetiko) gau oso batean zehar. Hurrengo egunean, gela 1 orduz marguldu zen tindatzailea kentzeko tanpoi kimikoarekin (% 45 metanol eta % 10 azido azetiko) eta, ondoren, ur destilatuan mantendu. Gelaren azterketa ImageMaster 2DPlatinum programarekin (GE Healthcare) burutu zen.

### 3.4.2 Western Blota (WB)

Lehenik eta behin, geleko proteinak *Amersham Hybond-P* PVDF mintzaetara transfritu ziren (GE Healthcare). Hasteko, mintza metanolarekin eta gero ur destilatuarekin tratatu eta transferentzia tanpoian jarri zen (5,82 g/L tris-base, 2,93 g/L glizina eta 200 mL metanola,



9,2 pH-rekin). Proteinak mintzera transferitu ziren 400 mA erabiliz ordu batez. Transferentzia era egokian gertatu zela ziurtatzeko mintza Ponceau Red soluzioarekin tindatu zen (% 0,2 Ponceau gorri eta % 1 azido azetiko) 5 minutuz, eta ondoren 2 minutuz tindatzailea kendu. Western Blota burutzeko, mintzak 2 orduz blokeatu ziren esnedun Tris gatz tanpoiarekin (*Tris Buffered Saline with milk*-rekin, TBSM ingelesez; 50 mM tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, % 0,1 (v/v) Tween 20 eta % 5 (w/v) gantz gutxiko esne lehorrarekin), eta TBSarekin garbitu 5 minutuz 3 aldiz. Adh1 proteinak detektatzeko anti-Adh1 antigorputz primarioa gehitu zen, 300 µg/mL kontzentrazioan, TBS eta % 0,1 (v/v) Tween 20an eta ordu eta erdiz inkubatu zen 37 °C-tan. Mintza TBSarekin berriro 5 minutuz hiru aldiz garbitu ondoren, saguaren aurkako IgG-HPR markaturiko antigorputz sekundarioa, TBSMn 1:100.000 diluituta, gehitu zen 45 minutuz. Mintza berriro garbitu zen TBSarekin eta intereseko proteinak ikusgai bihurtzeko ECL prime kimioluminiszentzia kita erabili zen (GE Healthcare) G:BOX Chemi aparatuan (Syngene, Cambridge, Erresuma Batua). Inkubazio pauso guztiak giro tenperaturan eta irabiatuz egin ziren, kontrakoa adierazi ezean.

### 3.5 Hazkuntza-inhibizioa

Ca37 antigorputz monoklonalak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddoan izan dezakeen efektua neurtzeko, Magliani eta bere taldeak (1997) ezarritako protokoloa jarraitu zen. Legamien  $1,5 \times 10^3$  zelula/mL inkubatu ziren PBSan, 37 °C-tan, 120 rpm-ko irabiazioan eta 18 orduz. *C. albicans* zein *C. aurisen* kasuan hazkuntza-inhibizio maximoa antigorputzaren 10 µg/mL kontzentrazioarekin lortu zenez, inkubazioa antigorputzaren 10 µg/mL kontzentrazioarekin zein antigorputzik gabe egin zen. Antigorputzaren inhibizioa espezifikoa zela ziurtatzeko IgG isotipo kontrol bat erabili zen eta kontzentrazio berdina erabiliz legamiarekin inkubatu zen. Inkubazio ostean, kontrol, antigorputz monoklonal zein isotipoaren 10 µL-ko 3 erreplika erein ziren SDA solidoan, mikro-tanta teknika erabiliz. Agar plaka ereinduak gau osoan zehar 37 °C-tan inkubatu eta hurrengo egunetan kolonia-unitate sortzaileak (KUS) kontatu ziren, antigorputzaren inhibizio ehunekoa kalkulatz.

### 3.6 Fagozitosia

RAW 264.7 makrofagoak *Candida* espezieen fagozitosia aztertzeko erabili ohi dira, hala nola, *C. albicans*ena. Esperimentuaren hiru erreplika independente bakoitza aurrera eramateko 24 putzuko plakak erabili ziren. Putzu bakoitzean 12 mm diametroko muflatutako estalkia kokatu zen eta horren gainean  $10^5$  makrofagodun 500 µL RPMI 1640 medioa gehitu zen. Plaka 24 orduz inkubatu zen, zelulen kopurua bikoiztuz. Inkubazioa amaitzerakoan, zelulen infekzioa eman zen. Horretarako, putzuetako likidoa bildu eta legamidun medio

berria gehituz zen (lehen erabilitako medio berdina baina antifungikorik gabe). Putzu bakoitzean inokulatu zen legamia kopurua makrofagoena baino bost aldiz handiagoa izan zen (MOI 5, Diez-Orejas *et al.*, 2018). Tratamendu gisa Ca37 antigorputz monoklonala gehitzeko, legamiadun medioari antigorputza gehitu zitzaion (10 µg/mL). Esperimentu berdina *C. auris*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* eta *C. albicans*ekin egin zen. Ko-inkubazio denbora igaro eta gero (1, 2 eta 4 ordu), estalkiak atera eta 500 µL PBS hotzdun putzuetan murgildu ziren, fagozitosia oztopatzeko. Amaitzeko, estalki horiek alderantzizko mikroskopioan (Eclipse TE2000-U, Nikon) begiratu ziren, eta fagozitosi ehunekoa ((makrofago fagozitikoak / makrofago totalak) x 100) zein indize fagozitikoa (fagozitutako legamia kopurua / makrofago fagozitikoak) kalkulatu ziren. Inkubazio denbora bakoitzeko kontrola eta Ca37 antigorputzdun 3 erreplika egin ziren eta bakoitzean 5 kanpo kontatu ziren, erreplikako gutxienez 100 makrofago zenbatuz.

### **3.7 *Galleria mellonellaren* infekzioa**

*G. mellonella* intsektuaren seigarren-aldiko larbak eskuratu ziren Reptimercado S. COOP. enpresaren bitartez eta 200-250 mg-koak aukeratu ziren. Larbak ziztatu baino lehen ilunpean utzi ziren janari gabe gauean zehar eta esperimentu egunean erabiliak izan aurretik % 70 etanolarekin garbitu ziren. Inokulazioa aurrera eramateko 26s G kalibreduneko Hamilton (Estatu Batuak) xiringak erabili ziren. Hasteko, larbaren ezkerreko azken pro-hankan 10 µL-tako inokulua sartu zen. Beste ziztada bat beharrezkoa izan zenean, eskuineko azken pro-hankan egin zen. Xiringaren erabilera bakoitza baino lehen, tratamenduz aldatzerakoan eta tratamendu berdinen barruan seigarren ziztadaren ondoren, xiringa garbitu zen hurrengo produktuekin: % 10 lixiba, % 100 etanola, ur destilatu esteril filtratua eta PBS esteril filtratuarekin, hurrenez hurren (Fuchs *et al.*, 2010). Hamasei larbako taldeak erabili ziren eta talde bakoitzari tratamendu desberdin bat aplikatu zitzaion, bi kontrol negatibo erabiliz: ziztatu gabekoak (soilik % 70 etanolarekin garbitutakoak) eta PBS esteril filtratuarekin ziztatutako taldeak. Modu honetan larben berezko heriotza, eta ziztadaren ondorioz eragindako heriotza kontrolatzen da, hurrenez hurren. Inokulazio ostean, larbak 37 °C-tan inkubatu ziren, eta 7 egunetan zehar egunero behatu ziren hilkortasuna kalkulatzeko, hildakoak baztertuz. Azkenik, inokulatutako legamia kontzentrazio bakoitza zein erabilitako tratamendu guztiak SDA solidoan erein ziren mikro-tanta teknikarekin, bakoitzaren 3 erreplika eginez. Horrela, KUSak kontatu ziren, inokulatu zen dentsitatea ondo kalkulaturik zegoela eta kutsadurarik gertatu ez zela ziurtatzeko.

### 3.7.1 Biziraupen frogak

Lehenik eta behin, larbak inokulatzeko *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddo bakoitzaren dentsitate egokiena aukeratzeko proba egin zen. Larban  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$  eta  $5 \times 10^6$  zelula eta *C. glabrata*ren kasuan aurreko hiru dosiak eta  $10^7$  zelula inokulatu ziren 10  $\mu$ L-ko bolumenean, aipaturiko teknika erabiliz.

### 3.7.2 Antigorputzaren efektua larben biziraupenean

Behin *C. glabrata* eta *C. parapsilosis*en dosi optimoa aukeratuta, antigorputzak tratamendu gisa duen efektua posible aztertu zen. Horretarako, talde guztietako larbei 10  $\mu$ L-ko bi ziztada eman zitzaizkien azken pro-hanketan. Lehenengo ziztadan *Candida* espeziea txertatu zen kasu guztietan, eta bigarrean PBSa, Ca37 antigorputza (10  $\mu$ g/mL) edo mikafungina (5 mg/kg). Azken talde hori erabili zen antifungikoaren eraginkortasuna antigorputzarenarekin konparatzeko. Mikafungina aukeratu zen tratamendu positibo bezala, *Candida* espezieek eragindako infekzioen aurrean gaur egun maiz erabiltzen den tratamendua baita. Dosi hori arratoietan erabili da *C. auris* onddoaren aurkako tratamendu gisa (Hager *et al.*, 2018) eta *G. mellonella* espeziean ere, *Candida* espezieen kontra ez erabili arren (Fuchs *et al.*, 2016)

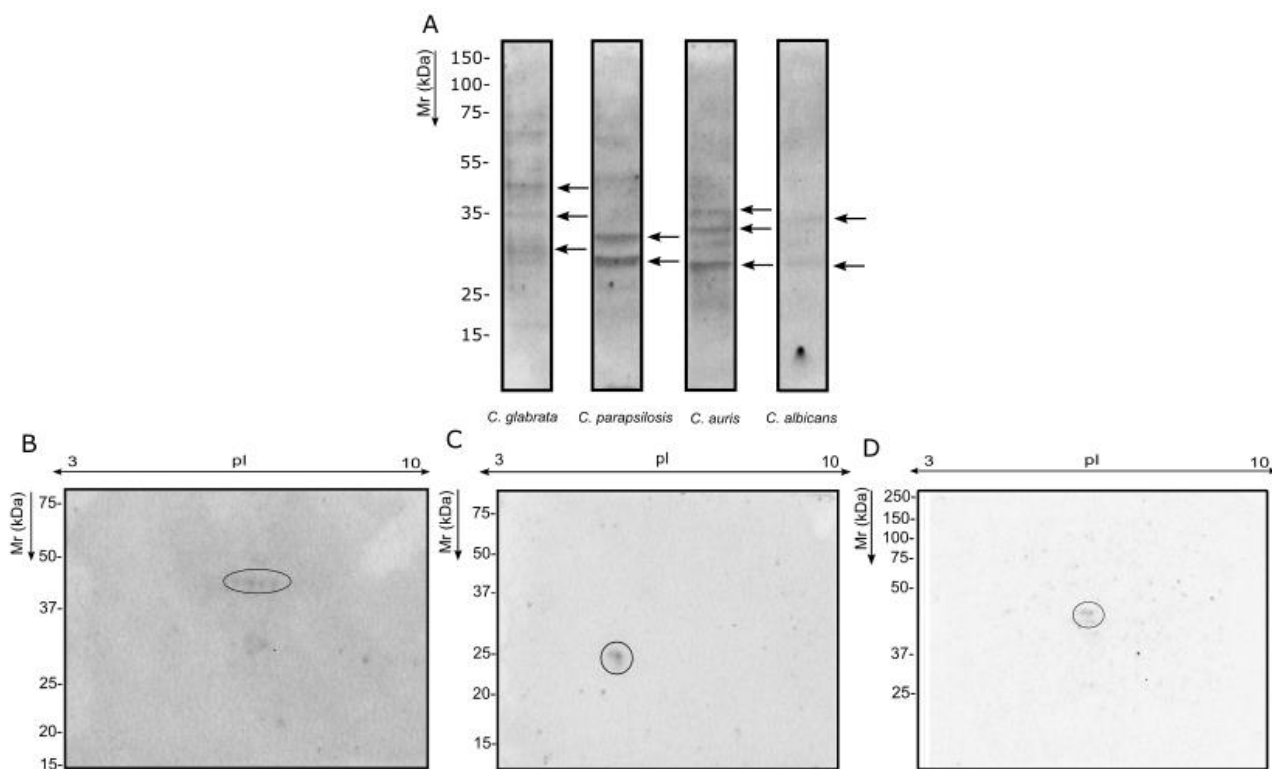
## **3.8 Analisi estatistikoa**

Esperimentu bakoitzaren 3 saiakera independente gauzatu ziren, *G. mellonella* larben esperimenduetan izan ezik, non esperimenduak gutxienez bi aldiz errepikatu ziren ( $n > 32$ ). Grafikoetako datu guztiak batezbesteko  $\pm$  errore estandar gisa adierazita daude. Analisi estatistikoak egiteko IBM SPSS statistics 22 (Professional Statistic, Chicago, IL, USA) erabili zen. Datuen normaltasuna Shapiro Wilks testa erabilita frogatu zen eta bariantzen homogeneotasuna Levene testa eginda. Datu normalak T-student testaren bitartez aztertu ziren, bi talde zeuden kasuetan. *G. mellonella*ren biziraupen kurben arteko konparaketa egiteko analisi estatistikoak GraphPad programaren 6 bertsioaren bidez egin ziren, MantelCox testa erabilita. Konparaketa guztien kasuan, esangarritasunaren irizpidea  $p \leq 0,05$ -ean ezarri zen.

## 4. EMAITZAK

### 4.1 Ca37 antigorputz monoklonalaren espezifizitatea *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*ren zelula-paretako Adh proteinarekiko

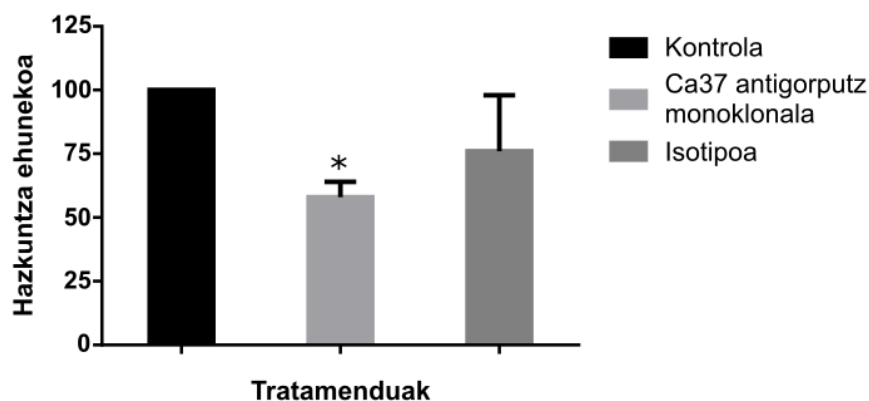
Antigorputzak ezagutzen dituen proteinak detektatzeko, SDS-PAGE elektroforesiaren Western Blota egin zen *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. auris* eta *C. albicans*en espezieekin. Antigorputzak *C. parapsilosis* zein *C. albicans*en proteina 2 banda ezagutu zituen, 37 eta 25 kDa tartekoak. *C. glabrata* eta *C. auris*en, aldiz, 3 banda ezagutu zituen antigorputz monoklonalak: 2 banda 37 eta 25 kDa artekoak eta azkena 50 eta 37 kDa tartekoa (2. A irudia). Ondoren, *C. albicans*en 2-D elektroforesia eta bere Western Blota eginda eta argitaratura zegoenez (Antoran *et al.*, 2020) eta *C. auris*ena iazko GrALean egin zenez, beste bi espezieekin egin zen, hau da, *C. glabrata* eta *C. parapsilosis*ekin, proteinak puntu isoelektriko eta tamainaren arabera banatuz. 2. B irudian ikusten den bezala, *C. glabrata* espeziarekin egindako Western Blotean pisu molekular berdineko (43 kDa) eta puntu isoelektriko desberdineko 4 puntu ezagutu ziren 5,47; 5,71; 5,95 eta 6,19 puntu isoelektrikoa zutenak, hurrenez hurren. *C. parapsilosis*en, aldiz, 25 kDa pisuko 2 puntu ezagutu zituen antigorputzak, 4,6 eta 4,72 puntu isoelektrikodunak, eta 22,5 kDa eta 4,77 puntu isoelektrikodun beste puntu bat (2. C irudia). Azkenik, pasadan urteko GrALean, antigorputzak *C. auris*en 4 puntu detektatu zituen: 1 eta 2. puntuak 47,6 kDa-eko pisua eta 5,2-5,3 puntu isoelektrikoa zuten, 3. puntuak 43,8 kDa-eko pisua eta 5,25 puntu isoelektriko eta 4. puntuak 44,2 kDa eta 5,4 puntu isoelektrikoa izan zuen, 2. D irudian beha daitekeen bezala.



**2. irudia. *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 22019 eta *C. auris* CJ-197 onddoen zelula-paretari loturiko proteinen detekzioa Ca37 antigorputzaren bidez.** (A) *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. auris* eta *C. albicans*en SDS-PAGEren WB, hurrenez hurren. Antigorputzak ezagututako bandak geziekin adierazita daude. (B) *C. glabrata*ren (C), *C. parapsilosis*en (D), eta *C. auris*en (iazko Gradu Amaierako Lanean lortutako emaitza) 2-D elektroforesiaren WB. Antigorputzak ezagututako puntuak inguratuta daude

#### **4.2 Ca37 antigorputz monoklonalaren efektu terapeutikoa *in vitro* *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*ren hazkuntzan**

Antigorputzaren efektua bi espezieetan frogatu arren, soilik *C. parapsilosis*ekin lotu ziren emaitzak, *C. glabrata* hazteko zailtasunak egon baitziren 18 orduko inkubazio ostean. Legamia dentsitatea doitu osteko ereintzaren (0 ordua) arabera erabilitako legamia dentsitatea zuzena izan arren, kontrolean 18 orduko inkubazio osteko ereintzetan ez zen ia hazkuntzarik behatu, espezie honetan esperimendu hau aurrera eraman ez zelarik. *C. parapsilosis*en, aldiz, Ca37 antigorputz monoklonalak inhibizio-efektua aurkeztu zuen. Antigorputzak, kontrolarekin alderatuz, % 42ko hazkuntza-inhibizioa eragin zuen bitartean, isotipoak % 24koa eragin zuen, 3. irudian ikusten den bezala. Kontrolarekiko desberdintasun estatistiko adierazgarria eragin zuen tratamendu bakarra antigorputz monoklonala izan zen.

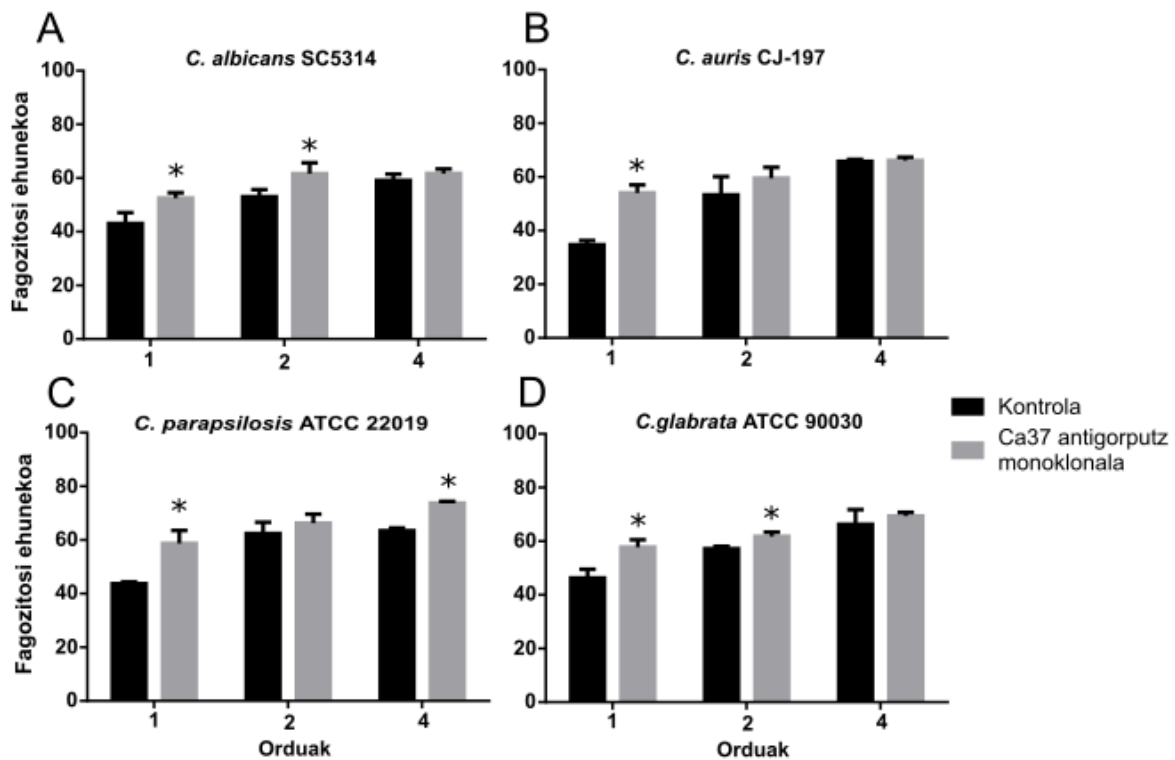


### 3. irudia. Ca37 antigorputz monoklonalaren efektua *C. parapsilosis* ATCC 22019 onddoan.

Antigorputzaren eta isotipoaren 10 µg/mL-ko kontzentrazioa erabili zen. Emaitzak hazkuntza ehuneko gisa adierazi dira kontrolarekin konparatuz. Kontrolarekin (antigorputz gabe) alderatuta est atistikoki esangarriak diren desberdintasunak (\* $p \leq 0.05$ ).

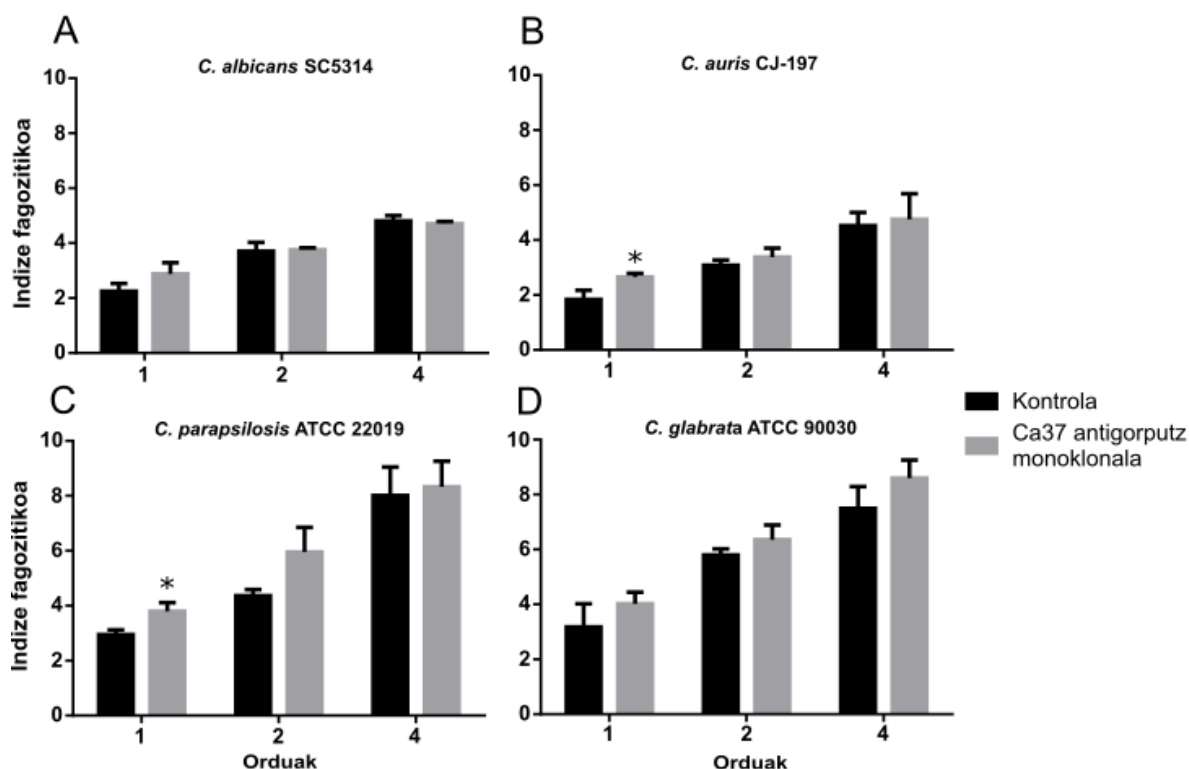
### 4.3 Antigorputzak *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* eta *C. albicans* onddoen fagozitosian duen efektuaren ikerketa RAW 264.7 makrofagoak erabilita

Antigorputzak *Candida* generoko 4 espezie horien fagozitosian zuen efektua aztertzeko, fagozitosi ehuneko zein indize fagozitikoa kalkulatu zen ko-inkubazio osteko lehen, bigarren eta laugarren orduetan, RAW 264.7 arratoi makrofagoak erabiliz. Fagozitosi ehunekoari dagokionez, makrofago fagozitikoak zati makrofago totalak, aztergai diren espezie guztietan handitu zen ko-inkubazio orduak aurrera egin ahala, antigorputzarekin inkubatutako legamiak fagozitosi ehuneko handiagoa erakutsiz (4. irudia). Lehenengo ordua izan zen antigorputzaren presentzian fagozitosi ehuneko emendio maximoa erakutsi zuena espezie guztietan, kasu guztietan kontrolarekin alderatuz desberdintasun adierazgarria erakutsi zituelarik. Lehen ordu horretan, *C. albicans*, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*ren kasuan % 22, % 35 eta % 24ko handipena eman zen, hurrenez hurren (4. A, 4. C eta 4. D irudiak). Baina fagozitosiaren emendiorik handiena *C. auris*en eman zen, % 55ko handipenarekin, 4. B irudian ikusten den bezala. Lehenengo orduaz gain, bigarren orduan % 16 eta % 8ko handipenarekin *C. albicans* eta *C. glabrata* fagozitosian desberdintasun esangarria eman zen baita, hurrenez hurren. Azkenik, laugarren orduan *C. parapsilosis*en ere desberdintasun adierazgarria behatu zen, fagozitosiaren emendioa % 16koa izanik.



4. irudia. Ca37 antigorputz monoklonalaren efektua *C. albicans* SC5314, *C. auris* CJ-197, *C. parapsilosis* ATCC 22019 eta *C. glabrata* ATCC 90030 onddoen fagozitosi ehunekoan. Antigorputzaren 10 µg/mL-ko kontzentrazioa erabili zen. (A) *C. albicans*, (B) *C. auris*, (C) *C. parapsilosis* eta (D) *C. glabrata* onddoen emaitzak fagozitosi ehuneko gisa adierazita daude ((fagozitatzen ari diren makrofagoak / makrofago totalak) x 100), infekzioaren 1, 2 eta 4 ordu ostean. Kontrolarekin (antigorputz gabe) alderatuta estatistikoki esangarriak diren desberdintasunak (\*p ≤ 0.05).

5. irudian behatu daitekeen bezala, indize fagozitikoa, hau da, fagozitatzen ari diren makrofagoek batez beste zenbat legamia barneratu dituzten, ere orduak aurrera egin ahala handitu zen espezie guztietan, antigorputz tratamenduarekin handitu zelarik. Fagozitosi ehunekoan bezala, antigorputzaren presentzia handipen maximoa lehenengo orduan eman zen espezie gehienetan, *C. parapsilosis* izan ezik, non bigarren orduan eman zen % 36ko handipenarekin (5. C irudia). Hala ere, 5. A eta 5. D irudietan beha daitekeen bezala, *C. albicans* zein *C. glabrata* ez zen desberdintasun adierazgarririk ikusi aztergai diren hiru ordu desberdinetan. Ordea, *C. auris* eta *C. parapsilosis* 1. orduan behatu zen desberdintasun adierazgarria, antigorputzak % 48 eta % 29 handituz, hurrenez hurren (5. B eta 5. C irudiak). Azkenik, *C. albicans* espeziean ia ez zen desberdintasunik hauteman kontrolaren eta tratamenduaren artean bigarren eta laugarren orduetan. Aipatzekoa da, *C. parapsilosis* eta atzetik *C. glabrata* espezieak izan zirela indize fagozitiko handiena izan zutenak 4. orduan.



5. irudia. Ca37 antigorputz monoklonalaren efektua *C. albicans* SC5314, *C. auris* CJ-197, *C. parapsilosis* ATCC 22019 eta *C. glabrata* ATCC 90030 onddoen indize fagozitikoan. Antigorputzaren 10 µg/mL-ko kontzentrazioa erabili zen. (A) *C. albicans*, (B) *C. auris*, (C) *C. parapsilosis* eta (D) *C. glabrata* onddoen emaitzak indize fagozitiko (fagozitatutako legamia kopurua / makrofago fagozitikoak) gisa adierazita daude, infekzioaren 1, 2 eta 4 ordu ostean. Kontrolarekin (antigorputz gabe) alderatuta estatistikoki esangarriak diren desberdintasunak (\* $p \leq 0.05$ ).

Bestetik, 4 espezieen artean RAW 264.7 makrofagoek tratamendurik gabe gutxien fagozitu zuten espeziea, indize fagozitiko zein fagozitosi ehuneko txikienarekin, *C. auris* izan zen, batez ere lehenengo orduan.

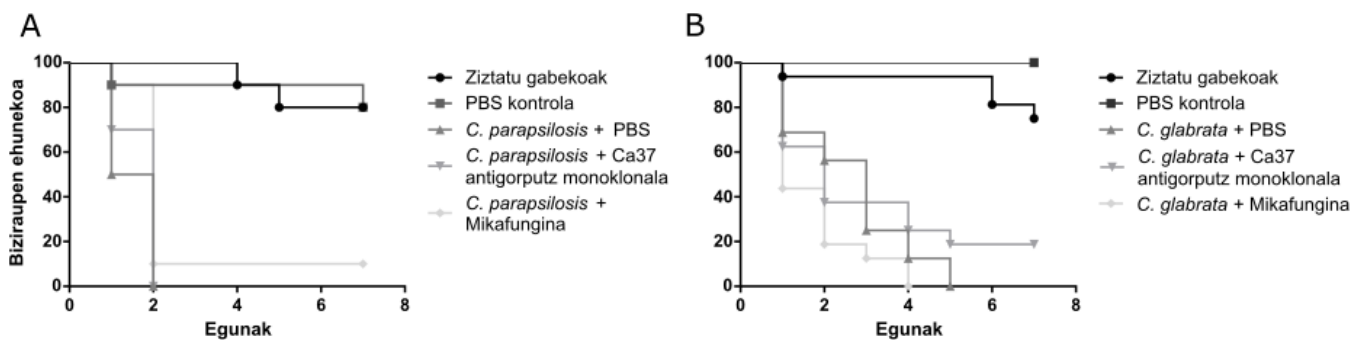
#### 4.4 Ca37 antigorputz monoklonalaren efektu terapeutikoa *in vivo* *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddoetan

Esperimentu hau *C. albicans*ekin publikatuta eta *C. auris*ekin pasadan urteko GrALean jada eginda dagoenez falta diren espezieekin egin zen. *C. parapsilosis* zein *C. glabrata*ren infekzioaren aurrean Ca37 antigorputzaren efektua ikertu zen *G. mellonella* animalia-ereduan, espezie horien aurka tratamendu gisa erabilgarria ote den frogatzeko. Horretarako, lehenik eta behin, larbetan inokulatu beharreko legamia dentsitatea aukeratu zen espezie bakoitzerako dosi hilkorraren frogan. Larbetan  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$  eta  $5 \times 10^6$  bi espezieen zelulak inokulatu ziren 10 µL-ko bolumenean. Kasu guztietan inokuluaren efektua dosiaren menpekota izan zen. *C. parapsilosis* espeziean  $5 \times 10^6$  dosia aukeratu zen, hilgarriena zelarik baina larbak azkarregi hil gabe. Hala ere, hurrengo frogetan heriotza-tasa



altuegiak behatu ziren, antigorputzaren efektua kuantifikatu ezin zelarik. Hortaz, dentsitatea erdira murriztu zen:  $2,5 \times 10^6$  zelula/larba dentsitateara. *C. glabrata*ren kasuan, dentsitate hiru horiek heriotza-tasa baxua eragin zuten, beste dentsitate handiago bat frogatu behar izan zelarik.  $10^7$  zelula/larba dentsitatea frogatu zen, heriotza-tasa aproposa eragin zuena, beraz, hori erabili zen hurrengo frogetan.

Antigorputzaren efektua frogatzeko esperimentuan, aztergai diren espezieak inokulatu bezain laster PBSa edo tratamendu batekin,  $10 \mu\text{g/mL}$  antigorputz edo  $5 \text{ mg/kg}$  mikafungina, inokulatu zen larba. Alde batetik, 6. A irudian ikusten den bezala, *C. parapsilosis*ekin inokulatutako larben artean bigarren ziztadan PBSa jaso zutenek batez besteko biziraupen txikiena izan zuten, 1,5 eguneko hain zuzen ere, antigorputza edo mikafungina jaso zutenek batez beste 2 egun biziraun zutelarik. Hala ere, *C. parapsilosis* kontrolarekin alderatuz soilik mikafunginadun taldeak adierazi zuen desberdintasun estatistikoki adierazgarria ( $p=0,0413$ ). Hala eta guztiz ere, antigorputzaren eta mikafunginaren efektua ez zen oso desberdina izan, biziraupenean desberdintasun adierazgarririk antzeman ez zelarik. Beste aldetik, *C. glabrata*ekin inokulatutako taldeetan, antigorputza bigarren ziztada gisa jasotako taldeak 7 egun baino gehiago biziraun zuten larbak dituen talde bakarra izan arren, haien batez besteko biziraupena 2 egun izan zen. PBSa eta antifungikoa jaso zutenek, batez beste, egun bat gehiago eta egun bat gutxiago biziraun zuten, hurrenez hurren (6. B irudia). Bigarren ziztada gisa PBSa jasotako taldeak ez zuten antigorputzarekin ezta mikafunginarekin ziztatutako taldeekin desberdintasun adierazgarririk erakutsi. Kasu honetan, antigorputza jasotako taldeak biziraupen handiagoa erakutsi zuen antifungikoarekin tratatuak baino, haien artean desberdintasun adierazgarria erakutsiz ( $p=0,0469$ ).



**6. irudia. Ca37 antigorputz monoklonalaren efektua *C. parapsilosis* ATCC 22019 eta *C. glabrata* ATCC 90030 onddoen gain *in vivo*.** *Galleria mellonella* animalia-ereduaren biziraupen kurbak (A) *C. parapsilosis*en  $2,5 \times 10^6$  zelula/larba jaso zuten larbak ( $n=16$ ) eta (B) *C. glabrata*ren  $10^7$  zelula/larba jaso zuten larbak ( $n=16$ ). Jarraian PBS-a edo tratamendua (antigorputza ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) edo mikafungina ( $5 \text{ mg/kg}$ )) jaso zuten. Larbak 7 egunetan zehar  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -tan mantendu ziren. Kasu bakoitzean gutxienez bi saiakera independente egin ziren ( $n \geq 32$ ), irudian entsegu adierazgarrienak soilik erakusten direlarik.

## 5. EZTABAIDA

*Candida* generoko espeziek eragindako infekzioen aurka antifungikoak erabili arren, kandidemien heriotza-tasak handiak dira oraindik, % 45era hel daitezkeelarik (Pristov eta Ghannoum, 2019). Hori generoan behatzen den erresistentzia handiarekin erlazionatu daiteke, bereziki *C. albicans* ez diren espezieen kasuan. Izan ere, *C. albicans* infekzio gehienen agente etiologikoa bada ere, beste *Candida* espezieen intzidentzia; hala nola *C. parapsilosis*, *C. glabrata* eta *C. auris*ena, azken hamarkadetan asko handitu da, antifungikoen erresistentzia handiagoarekin erlazionatu dena (Quindós, 2018; Pfaller *et al.*, 2019). Alde batetik, *C. parapsilosis* zein *C. glabrata* leku geografikoaren zein pazienteen arrisku-faktoreen arabera kandidemien bigarren edo hirugarren kausa nagusiak dira. Bestetik, *C. auris* patogeno multierresistente emergentea da, CDCk osasun alerta globala sortzea eragin duena.

*Candida* generoko onddoek eragindako infekzioak tratatzerako orduan antifungikoen eskasia, toxikotasuna eta gero eta handiagoa den erresistentzia arazo larriak dira. Horri aurre egiteko, antigorputz monoklonalak tratamendu gisa baliabide eraginkorrak izan daitezkeen aztertzea garrantzitsua da. Hori kontuan izanda, lan hau burutu den ikerketa taldean *C. albicans*en Adh1 proteinarekiko espezifikoa den Ca37 antigorputz monoklonala sortu zen, *in vitro* zein *in vivo* onddo horren aurka emaitza positiboak erakutsi dituenak (Antoran *et al.*, 2020). Iaz burututako GrALean antigorputzak *C. auris*en duen efektu ikertu zen, *C. albicans*ekin lortutako antzeko emaitzak lortuz. *C. albicans*en Adh proteinak *Candida* generoko beste espezieen proteina berdinarekin duen homologia handia dela eta (% 73-84 artean), lan honen helburua Ca37 antigorputz monoklonalak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*, espezieek eragiten dituzten infekzioei aurre egiteko tratamendu terapeutiko potentziala izan daitekeen aztertzea izan da, eta *C. auris* eta *C. albicans*ekin lortutako emaitzekin alderatzea. Bestalde, *C. albicans* eta *C. auris* espezieen kasuan antigorputzak fagozitosian duen eragina ezezaguna da, beraz, esperimendu hori burutzerakoan bi onddo horiek ere erabili dira.

Hasteko, antigorputz monoklonalak legamien zelula-paretari loturiko proteinen artean Adha ezagutzen zuen aztertu zen. Lortutako emaitzetan, SDS-PAGE dimentsio bakarreko Western Blotean antigorputzak banda bat baino gehiago ezagutu zituen aztergai diren *C. auris*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* eta *C. glabrata* espezieetan. Hortaz, antigorputzak espezie horien pareta-zelularreko proteinaren bat ezagutzeko gai da. Ondorioz, espezie bakoitzeko 2-D WB bat burutu zen, konkretuki zein puntu ezagutzen ziren jakiteko. Ca37 antigorputzak 4 puntu ezagutu zituen *C. glabrata* eta 3 puntu *C. parapsilosis*en. *C.*

*glabrata* 4 puntuak 42 kDa pisu molekularrekoak ziren, 1-D WBean detektaturiko banda batekin bat datorrena, puntu isoelektriko desberdinekin, 5,57 – 6,19 tartekoak. *C. parapsilosisen* detektaturiko puntuak, aldiz, pisu molekular zein puntu isoelektriko txikiagoak zituzten: 25 kDa pisu molekular dun 2 puntu, 4,6 eta 4,72 puntu isoelektrikoekin, eta 22,5 kDa eta 4,77 puntu isoelektrikodun beste bat. Pisu molekular hori ere 1-D WBean detektaturiko banda batekin bat dator. Azkenik, Ca37 antigorputzak 4 puntu ezagutu zituen *C. aurisen*, haien puntu isoelektrikoak 5,2-5,39 tartekoak eta pisu molekularrak 43,9-47,6 kDa-ekoak zirelarik. Antoran eta taldekideek 2020an detektatu zuten *C. albicans* onddoaren Adh1 proteinak 45kDa eta 5,1-eko pisu molekularra eta puntu isoelektrikoa zuen, hurrenez hurren. Proteina hori beste espezieetan detektaturiko puntuen antzekoa da, batez ere *C. auris* eta *C. glabrata*ren kasuan. *C. glabrata*ren Adh proteinaren pisu molekular eta puntu isoelektriko teorikoak 37,5 kDa eta 6,01, hurrenez hurren, direla kontuan izanda, detektaturiko proteina Adh izan daiteke. *C. albicans*ekin konparatuz *C. parapsilosisen* detektaturiko proteinen puntu isoelektrikoak oso desberdinak ez izan arren, pisu molekularren desberdintasuna nabaria da. Hala ere, *C. parapsilosisen* Adh purifikazioaren bitartez 30 kDa pisu molekularra duela behatu da (Nie *et al.*, 2007), bere pisu teorikoa 30,1 kDa izanda. Era berean, bere puntu isoelektriko teorikoa 5,66 da. Hortaz, detektaturiko proteina Adh izateko aukera dago baita.

Emaitza horiek Ca37 antigorputz monoklonalak *Candida* espezie hiru horien Adh izan daitekeen proteina batzuk ezagutu zituela adierazi dezakete. Hortaz, badirudi *C. albicans*en aurka diseinaturiko Ca37 antigorputzak espezie ituaz gain *C. auris*, *C. glabrata* eta *C. parapsilosisen* zelula-pareari loturiko proteinaren bat, Adh izan daitezkenak, ezagutzen dituela. Hala ere, puntu horiek Adh proteinari dagozkion ziurtatzeko espezie bakoitzaren puntuen masa-espektrometriaren bidezko identifikazioa burutu beharko litzateke, *C. albicans*ekin egin zen bezala.

Espezie desberdinen WBak behatuta ikus daiteke ez direla markatzaile berdinak ageri kasu guztietan. Aurretik aipatu bezala, *C. auris* dagokion WB iazko GrAL garapenean lortu zen. Iazko gelak egiteko erabilitako akrilamida zein bufferak eta aurten erabilitakoak desberdinak izan dira. Hortaz, kasu bietan akrilamida % 10eko gelak egiten saiatu den arren, emaitzak ikusita badirudi hau ez dela guztiz lortu, proteinen migrazioa aldatuz. Hala eta guztiz ere, proteinen pI eta pisu molekularren emaitzak konpara daitezke.

Antigorputzak hazkuntzaren inhibizioan duen efektua aztertzerakoan, 10 µg/mL-ko kontzentrazioa erabili zen, *C. albicans*en (Antoran *et al.*, 2020) zein *C. auris*en efektu

handiena izan zuen kontzentrazioa delarik. Beraz, *C. parapsilosis* zein *C. glabrata* kontzentrazio hori erabiltzea erabaki zen baita. Antigorputzak *C. glabrata* hazkuntza-inhibizio eragiten zuen aztertzean, ez zen lortu mikroorganismoa kontrol baldintzan haztea, antigorputza zuen baldintzarekin alderaketa egitea eragotziz. Horren arrazoia ezjakina den arren, gainazal plastikoen atxikipenarekin erlazio izan dezake. Hortaz, kristalezko gainazalak erabili ziren, eta hazkuntza emendio txiki bat behatu arren, ez zen nahikoa izan esperimendua aurrera eraman ahal izateko. *C. glabrata*k, *C. albicans*en aldean, gainazal zelularraren hidrofobizitate erlatibo eta hortzetako gainazal akrilikoekiko atxikimendu handiagoa du, batez ere 37 °C-tan (Luo eta Samaranayake, 2002), esperimendu honetan erabilitako inkubazio tenperatura dena. Hidrofobizitate hori gainazal abiotikoen atxikipenarekin korrelazionatzen da. Hala ere, eta anduien arteko desberdintasun handia kontuan hartu behar den arren, *C. parapsilosis*ek bi espezie horiek baino atxikipen zein hidrofobizitate handiagoa duela dirudi (Silva-Dias *et al.*, 2015) eta, *C. auris* zein *C. albicans* bezala, ez zuen zailtasunik izan plastiko hodietan PBSarekin inkubatu ostean medio solidoan hazteko. Hori kontuan izanda, hazkuntza eza azaltzeko beste aukera bat *C. glabrata*ren kasuan PBSan bizirauteko gaitasun eza izan daiteke. MALa burutzeko denbora mugatua dela eta, ezin izan da arazo honetan gehiago sakondu, baina etorkizunean aztertu beharreko alderdia da. *In vitro* *C. glabrata*ren hazkuntza-inhibizioa kalkulatu ezin izan zen arren, antigorputzak beste *Candida* espezieetan erakutsi duen efektua kontuan hartuta, fagozitosian zein *in vivo* *G. mellonella* espezie hori frogatzea erabaki zen.

Bestalde, Ca37 mAb erabiliz *C. parapsilosis* isolamenduan behatutako hazkuntza-inhibizioa % 42koa izan zen batez beste, kontrolarekin desberdintasun adierazgarria izan zuelarik. Kontrol gisa erabilitako isotipoak, aldiz, ez zuen *C. parapsilosis* soilik zuen kontrolarekiko desberdintasun estatistikoki adierazgarrikerik adierazi. Ca37 antigorputz monoklonalak *in vitro* *C. auris*, *C. albicans* eta *C. parapsilosis* espezieetan izan zuen efektua desberdina izan zen. *C. albicans*en eragin zuen hazkuntza-inhibiziorik handiena (% 70-90; Antoran *et al.*, 2020). Ondoren, *C. auris* 5 isolamenduetan % 29-71ko inhibizioa eragin zuen (GrALean lortutako emaitza), *C. parapsilosis*en % 42koa izan zelarik. Desberdintasun hori, antigorputzak *C. albicans* ez diren beste *Candida* espezieen Adh proteinekiko duen espezifitate baxuagoarekin erlaziona daiteke. Izan ere, antigorputza *C. albicans* Adh1 proteinarekiko espezifikoki diseinatu zen eta beste espezieen Adh proteinaren homologia oso handia den arren, ez da totala. Hala ere, *C. auris*en, batez beste, inhibizio handiagoa behatu zen *C. parapsilosis*ekin konparatuta, nahiz eta azken honek Adharen homologia zerbait handiagoa izan. Beste ikerketa batzuetan, *C. albicans* aurkako beste antigorputz monoklonalak erabiliz,

*C. parapsilosis*en zuen efektua ere ikertu zen, Ca37 antigorputz monoklonalak eragindako inhibizioaren erdia sorraraziz, lan honetan erabilitako 5 aldiz kontzentrazio handiagoarekin (Kavishwar eta Shukla, 2006). Kontuan hartuta antigorputzen ekoizpen eta produkzioarako behar den denbora eta kostu handia, dosi baxuago bat erabili ahal izatea abantailatsua da.

Beste aldetik, *C. albicans* eta *C. auris* espezieetan 10 µg/mL-ko kontzentrazioa optimoena izanda ere, beste espezieetan froga egitea interesgarria izango litzateke. Izan ere, beste ikerketa batzuetan, *C. albicans* aurkako mAb-aren efektua kontzentrazioaren menpekota izan zen, zenbat eta kontzentrazio handiagoarekin efektua areagotuz (Moragues *et al.*, 2003).

Antigorputzek, jarduera fungizidez gain beste efektu batzuk izan ditzakete, opsonizazio bidezko fagozitosiaren sendotzea barne. RAW 264.7 arratoi makrofagoak erabilita, fagozitosia aztertzeko erabili ohi direnak, fagozitosiaren gaineko antigorputzaren efektua aztertu zen *Candida* generoko 4 espezieetan: *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*n. Orokorrean, antigorputzaren efektu maximoa lehenengo orduan behatu zen, hasierako ezagupenean lagunduz. Aztergai diren 4 espezieetatik *C. auris* izan zen fagozitosi txikiena jasan zuena lehenengo orduan, fagozitosi ehuneko zein indize fagozitikoaren aldetik. *C. auris*, *Candida* genereko beste espezieekin konparatuta, ez da hain immunoinflamatorioa. Ziurrenik, hori zelula-hormako kanpo-geruzaren estruktura desberdinaren ondorio da. Alde batetik, manosilatutako glukoproteina kantitate handiagoa du *C. albicans*ekin konparatuta (Wang *et al.*, 2022), barne geruzetako β-glukanoa gehiago babesten duena, berezko zelula immuneen, hala nola makrofagoen, ezagutza murriztuz (Wang *et al.*, 2022). Bestetik, zenbait isolamenduek horma-zelularrean fosfomanano kantitate txikiagoa dutela behatu da baita, ezagupen txikiago batekin lotu dena (Wang *et al.*, 2022). Hortaz, antigorputzaren efektu opsonizatzailea espezie honetan berezko garrantzia du. Hain zuzen ere, fagozitosi emendioan Ca37 antigorputzak efektu handiena *C. auris*en izan zuen, lehenengo orduan fagozitosiaren ehunekoa % 55 handituz.

*C. albicans* espeziean fagozitosi ehunekoa bigarren ordura arte handitu zen arren, ordu horretatik aurrera ia ez zen desberdintasunik behatu. Hori, hifak garatzeko ahalmenarekin erlazioa daiteke. Izan ere, hifek fagozitosiarekiko erresistentzia handiagoa erakusten dute legamia askeekin konparatuz, birulentzia-faktoretzat hartzen delarik (Gow *et al.*, 2002). Koinkubazio orduak aurrera egin ahala, hifen kopurua eta tamaina handitu zela behatu zen, fagozitosia zailduz. Horrekin erlazioa daiteke tratamenduaren eta kontrolaren artean indize fagozitikoaren desberdintasun adierazgarri eza, zein bigarren eta laugarren orduen arteko

desberdintasun minimoa. Antzeko emaitzak behatu zituzten Tóth eta kolaboratzaileek (2014), 3. ordutik aurrera fagozitosi gertaera minimoak behatu zituztelarik *C. albicans*ekin. Hortaz, antigorputzaren efektu opsonizatzaileak fagozitosi ehunekoa handitu arren lehen bi orduetan, ez du fagozitatutako legamia kantitatea handitzen, antigorputzaren efektuak hifen garapena gainditzen ez duelarik.

*C. parapsilosis*en, aldiz, pseudohifen garapena behatu zen arren, antigorputzaren efektua handiagoa izan zen, fagozitosi ehunekoan lehen eta laugarren orduan zein lehenengo orduko indize fagozitikoan desberdintasun estatistikoki adierazgarriak behatu zirelarik. *C. albicans*en kontrara, espezie horren forma haritsuak ez du fagozitosian erresistentzia bat suposatzen, baina fagozitoen barruko biziraupenean eragin positiboa du (Tóth *et al.*, 2019). Frogatuta dago *C. parapsilosis* modu eraginkorrean fagozitatzen dela eta hanturazko erantzuna eragiten duela, bere indize fagozitiko handia azal dezakeena (Tóth *et al.*, 2014). Gainera, arratoi zein giza makrofagoek, *in vitro*, migrazio abiadura handiena *C. parapsilosis* aurrean erakutsi zuten, *C. albicans* eta *C. glabrata*ekin konparatuz (Tóth *et al.*, 2014). Ikerketa berdinean behatu zen *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* espezieek indize fagozitiko antzekoak eta *C. albicans*enak baino handiagoak zituztela, lan honetan lortutako emaitzen antzera. Era berean, bi espezie horien fagozitosia ez zen eten ikertutako inkubazio denboran zehar, *C. albicans*en ez bezala, beste ikerketetan berdina behatu delarik (Tóth *et al.*, 2014). Hala ere, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* artean antigorputzaren efektua desberdina izan zen. Nahiz eta antigorputzak bi espezieetan eragindako fagozitosi emendioa adierazgarria izan bi ordu tartetean, *C. parapsilosis*ek handipen handiagoa jasan zuen. Makrofagoek *C. parapsilosis* legamia gehiago fagozitu zituzten baita antigorputzaren presentzian. Desberdintasun hori, lehen aipatu den bezala, Adharen homologia desberdinarekin erlazioa daiteke, *C. parapsilosis*ek handiena izanez.

Hortaz, fagozitosiaren emendioa antigorputzak eragindako opsonizazioarekin erlazioa daiteke, *C. albicans*en aurka erabilitako antigorputz monoklonal desberdinetan ikusi den bezala (Sevilla *et al.*, 2006; Palliyil *et al.*, 2022). Sevilla eta taldekideek (2006), C7 antigorputz monoklonalaren presentzian, legamien fagozitosia % 75 handitu zela behatu zuten, 90 minutu osteko inkubazioarekin eta lan honetan erabilitako kontzentrazio 5 aldiz handiagorekin. Hala ere, kasu horretan, esperimentu honetan ez bezala, konplementudun seruma erabili zen, opsonizazio efektua antigorputzaren eta konplementuaren sinergiaren ondorio izan zelarik. Izan ere, deskonplementutako seruma erabilia ez zuten desberdintasun adierazgarririk hauteman (Sevilla *et al.*, 2006).

Ca37 antigorputza *G. mellonella* larbetan erabili aurretik, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddoen dosi hilgarrienak aztertu ziren. *C. glabrata*k  $10^7$  zelulako inokulua behar izan zuen larbetan hilgarria izateko, *C. parapsilosis* baino dentsitate 4 aldiz handiagoa. *C. albicans* eta *C. auris*en, aldiz, dosi hilgarrienak  $10^6$  (Antoran *et al.*, 2020) eta  $5 \times 10^6$  zelula izan ziren, hurrenez hurren. Beraz, gure emaitzen arabera *G. mellonella* espezie birulentoena *C. albicans* da, *C. parapsilosis* eta *C. auris* jarraian doaz eta *C. glabrata*k erakusti du birulentzia baxuena. *C. albicans* birulentzia-faktore gehien adierazten dituen espeziea izateaz gain (Jayatilake *et al.*, 2006), arratoi zein *G. mellonella* egindako hainbat esperimenduetan birulentzia handiena adierazi du (Fakhim *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018), lortutako emaitzekin bat datorrena. Borman eta kolaboratzaileek (2016) *G. mellonella* *C. auris*en birulentzia *C. parapsilosis* zein *C. glabrata*arena baino handiagoa zela adierazi zuten. Lortutako emaitzen arabera, aldiz, *C. parapsilosis* *C. auris* baino birulentoagoa da. Hala ere, kontuan hartu behar da lehenengo frogetan *C. parapsilosis*en dosi hilkorrena *C. auris*en berdina zela, baina antigorputzarekin frogatzean jaitsi egin behar izan zela larbetan ikusi zen heriotza-tasa altuegiaren ondorioz. Hortaz, desberdintasun hori larben egoerarekin erlaziona daiteke baita. Dena dela, lortutako emaitzek *C. glabrata* birulentzia txikiena duen espezia dela adierazten dute aztergai direnen artean, beste ikerketetan ikusi den bezala (Borman *et al.*, 2016). Hori forma haritsuak garatzeko eta proteasak jariatzeko ezgaitasunarekin erlaziona daiteke (Rodrigues *et al.*, 2014).

Ca37 antigorputza tratamendu terapeutiko bezala frogatzerako orduan, larbak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* legamiekin inokulatu ostean, PBSa, aztergai den antigorputza ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) edo mikafungina ( $5 \text{ mg/kg}$ ) inokulatu zitzaie, azken hori kontrol positibo gisa jokatuz. lazko lanean, hasieran,  $2 \text{ mg/kg}$  dosia erabili zen *C. auris*en aurka, CDCk gomendutako dosia baita gizakiotan (CDC, 2017). Hala ere, egindako bi saiakeretan ez zuen larben biziraupena luzatu, *C. auris* eta PBSa jaso zutenekin desberdintasun adierazgarririk adierazi gabe. Hortaz, dosia igo zen, Hager eta bere taldeak (2018) arratoietan *C. auris* infekzioen aurka erabilitako dosia erabiliz,  $5 \text{ mg/kg}$ . Dosi hori ere, lehen azaldu den bezala, *G. mellonella* larbetan frogatu izan da, immunitate-sistema pizten duela adieraziz (Fuchs *et al.*, 2016). Gainera,  $2 \text{ mg/kg}$  kontzentrazioak *C. parapsilosis*en % 90eko inhibizioa eragiten du batez beste (MIC 90), dosi handiagoak behar direlarik inhibizio totala lortzeko (Tóth *et al.*, 2019).

*C. parapsilosis*ekin inokulatutako larben artean antigorputza eta antifungikoa jaso zutenek, batez beste, egun erdi gehiago biziraun zuten kontrolarekin konparatuz, bi tratamenduek antzeko efektua izanez. Hala ere, onddoaren kontrolarekin alderatuz soilik mikafunginadun

taldeak adierazi zuen desberdintasun adierazgarria. Beste aldetik, *C. glabrata*ekin inokulatutako taldean, antigorputzak, batez beste, ez zuen larben biziraupena handitu kontrolarekin konparatuz. Izan ere, erabilitako estatistikoak biziraupen batez bestekoa kalkulatzeko populazioaren % 50 baino gehiago hiltzen den eguna hartzen du. Kasu honetan, antigorputza jasotako taldearen erdia bigarren egunean hil zen arren, ondorengo egunetako heriotza-tasa txikitu zen, kontrolaren kontrara, larbak 7 egun baino gehiago biziraun zuten kasu bakarria izanik. Hala ere, antifungikoa jasotako taldeak heriotza-tasa oso handia pairatu zuen, *C. glabrata* kontrolarena baino handiagoa, arrazoia ezezaguna delarik. Onddoaren antifungikoarekiko erresistentzia baztertu daiteke, *C. glabrata* andui horren mikafunginarekiko MIC balioa 0,03 mg/L-koa baita (Bizerra *et al.*, 2014).

GrALean *C. auris* CJ-197 isolamendua aztertu zenean, kontrara, antigorputzarekin tratatutako larbek onddoa eta PBSarekin tratatutako larbekin desberdintasun adierazgarria aurkeztu zuten, larben biziraupena egun batez luzatu zelarik antigorputz tratamenduaren kasuan. Gainera, antigorputzak eta gaur egun onddo honen infekzioen aurka erabiltzen den mikafungina antifungikoak antzeko efektu terapeutikoa izan zuten, azken horrek antigorputzarekin konparatuz larben biziraupena egun bat gehiago luzatuz. Hortaz, Ca37 antigorputzak *C. auris* onddoaren gain izan zuen efektua *C. albicans* izandakoaren antzekoa izan zen. Izan ere, antigorputzak *C. albicans* onddoarekin infektatutako larben biziraupena 1-1,5 egun handitu zuen (Antoran *et al.*, 2020).

*In vitro*, *C. auris*en isolamenduen artean, CJ-197 isolamenduak pairatu zuen hazkuntza-inhibizio handiena, hain zuzen ere % 71koa. *C. albicans*en kasuan, *in vitro* inhibizioa %90koa izan zen (Antoran *et al.*, 2020). Beraz, antigorputzak biziraupen emendio handiagoa *C. albicans* zein *C. auris*ekin infektatu larbetan eragitea, aztergai diren *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*ekin konparatuz, *in vitro* ikusitako hazkuntza-inhibizio desberdintasunarekin erlazioa daiteke. Hala ere, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* espezieek eragindako heriotza-tasa handiek larben egoera hoberena ez zela aditzera eman dezakete ere. Gainera, kontrol negatiboen biziraupena, ziztatu gabekoak zein soilik PBSarekin ziztatutakoak, % 80koa da *C. parapsilosis*ekin egindako esperimentuan, *C. glabrata*ren antzera, pasadan urtean lortutako biziraupenak baino baxuagoak. Hori guztia, ingurumen tenperaturak *G. mellonella* larben gainean duen efektuarekin erlazioa daiteke, tenperatura altuak estresagarriak direlarik intsektu horientzat (Mowlds eta Kavanagh, 2008). Kontuan hartzekoa da esperimendu hauek ekaina eta uztailean egin zirela, tartean bi bero-bolada jasanez. Hortaz, tenperaturak larbetan eragina izanda, legamiekin tratatzean heriotza-tasa handiagoak behatu ziren. Eraitza esangarriak lortzeko tenperatura fluktuazioak



minimizatzen saiatu zen arren, tenperatura altuen eragina ezin da baztertu, batez ere larben garraioan. Azkenik, esperimentua egin den bitartean larben hornikuntza bitan eten da, larben egoerarekin erlazioa izan dezakeena ere bai. Izan ere, gaur egun *G. mellonella* larbekin lan egiteko arazo nagusia hornitzaile on bat lortzea da. Hala eta guztiz ere, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* espezieekin emaitza adierazgarririk ikusten ez den arren, antigorputzak larben biziraupena handitu dezakeen joera bat ikus daiteke. Hori frogatzeko esperimentuak errepikatu behar dira, ahal bada ingurumen tenperatura epelagoak diren sasietan, uda eta neguko hilabete bero eta hotzenak saihestuz, emaitza adierazgarriak lortzeko asmoz.

Beste ikerketa batzuetan frogatu da *C. albicansen* zelula-paretako gainazaleko proteina baten aurkako antigorputzak antifungiko batekin (anfoterizina B) bateratzea eraginkorra dela saguen biziraupena handitzeko. Horrek antifungikoen dosia murriztea ahalbidetu dezake (Han, 2010). Beraz, aztergai den antigorputzak efektu terapeutikoa izan dezakeela jakinda, antifungikoekin konbinatzeko aukera egon daiteke, era sakonagoan aztertu behar delarik.

Lortutako emaitza guztiak kontuan hartuta, etorkizunean Ca37 antigorputz monoklonalaren erabilera *Candida* espezieen infekzioen aurkako tresna garrantzitsua izan daitekeela ondorioztatu daiteke, bakarrik edota antifungikoekin erabiliz, froga gehiago egin behar diren arren. Hala ere, Ca37 antigorputzak Adh1 proteinaren zein epitopo ezagutzen duen jakitea garrantzitsua izan daiteke, beste espezieetan sekuentzia hori kontserbatzen den jakiteko, tratamenduaren eraginkortasunarekin lotuta egon daitekeelarik. Aipatutako esperimentuez gain, antigorputz honek beste prozesu batzuetan izan dezakeen efektua ezezaguna da, hala nola, atxikipenean edota biogeruzen sorreran. *C. albicansen* Adh proteinak adhesina funtzioa duela kontuan izanda, Ca37 antigorputzak legamiaren atxikipena txikitzei aukera du. Era berean, atxikipena biogeruzen eraketarako ezinbestekoa den prozesua da. Azkenik, aipatu beharra dago erabilitako animalia ornogabeak ez duela ugaztun-eredua ordezkatzeko, bertan ere Ca37 antigorputzaren eraginkortasuna zein segurtasuna frogatu behar delarik gizakiraino heldu baino lehen.

## 6. ONDORIOAK

1. Ca37 antigorputz monoklonalak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* onddoen zelula-paretako bi eta hiru banda (4 eta 3 puntu 2-D elektroforesian, hurrenez hurren) ezagutzen ditu, espezie horien Adh proteinaren puntu isoelektrikoa eta masa molekular teoriko antzekoak dituztenak. Hala ere, detektatutako puntuak Adh direla ziurtatzeko masa espektrometriaren bidezko identifikazioa burutu beharko da.
2. Ca37 antigorputzak *C. parapsilosis* onddoaren hazkuntza murrizteko gaitasuna du *in vitro*, % 42ko batez besteko hazkuntza-inhibizioa eraginez.
3. Ca37 antigorputzak RAW 264.7 makrofagoen fagozitosian eragina du, opsonizazioarekin erlaziona daitekeena. *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* eta *C. glabrata* espezieen fagozitosi ehunekoa era esangarrian handitzen duen bitartean, *C. auris* eta *C. parapsilosis*en indize fagozitikoa ere handitzen du. Efektua batez ere *C. auris*en da nabaria, zeinetan berezko fagozitosia txikiena den.
4. *G. mellonella* animalia-ereduan Ca37 antigorputz monoklonalak *C. parapsilosis* eta *C. glabrata*rekin inokulatutako larben biziraupena luzatzen duela dirudien arren, ez dira emaitza adierazgarriak lortu, esperimentera errepikatzeko beharra dagoelarik.

## 7. ERREFERENTZIAK

- Antoran, A., Aparicio-Fernandez, L., Pellon, A., Buldain, I., Martin-Souto, L., Rementeria, A., *et al.* (2020). The monoclonal antibody Ca37, developed against *Candida albicans* alcohol dehydrogenase, inhibits the yeast *in vitro* and *in vivo*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65859-4>
- Bizerra, F. C., Jimenez-Ortigosa, C., Souza, A. C. R., Breda, G. L., Queiroz-Telles, F., Perlin, D. S., & Colombo, A. L. (2014). Breakthrough candidemia due to multidrug-resistant *Candida glabrata* during prophylaxis with a low dose of micafungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2438–2440. <https://doi.org/10.1128/AAC.02189-13>
- Boniche, C., Rossi, S. A., Kischkel, B., Barbalho, F. V., Moura, Á. N. D., Nosanchuk, J. D., *et al.* (2020). Immunotherapy against systemic fungal infections based on monoclonal antibodies. *Journal of Fungi*, 6(1), 1–28. <https://doi.org/10.3390/jof6010031>
- Borman, A. M., Szekely, A., & Johnson, E. M. (2016). Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *MSphere*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/msphere.00189-16>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Recommendations for treatment of *Candida auris* infections, 2017, <https://www.cdc.gov/fungal/Candida-auris/c-auris-treatment.html>, 2022eko maiatzaren 4an.
- Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martínez, J. P. (1998). Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 130–180. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.1.130-180.1998>
- Chowdhary, A., Prakash, A., Sharma, C., Kordalewska, M., Kumar, A., Sarma, S., *et al.* (2018). A multicentre

- study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: Role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(4), 891–899. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx480>
- Cutler, J.E., Deepe, G.E., and Klein, B. S. (2008). Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nature Microbiology Reviews*, 5(1), 13–28.
- Diez-Orejas, R., Feito, M. J., Cicuéndez, M., Rojo, J. M., & Portolés, M. T. (2018). Differential effects of graphene oxide nanosheets on *Candida albicans* phagocytosis by murine peritoneal macrophages. *Journal of Colloid and Interface Science*, 512, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.104>
- Du, H., Bing, J., Hu, T., Ennis, C. L., Nobile, C. J., & Huang, G. (2020). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathogens*, 16(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008921>
- Fakhim, H., Vaezi, A., Dannaoui, E., Chowdhary, A., Nasiry, D., Faeli, L., *et al.* (2018). Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. *Mycoses*, 61(6), 377–382. <https://doi.org/10.1111/myc.12754>
- Fuchs, B. B., Li, Y., Li, D., Johnston, T., Hendricks, G., Li, G., *et al.* (2016). Micafungin Elicits an Immunomodulatory Effect in *Galleria mellonella* and Mice. *Mycopathologia*, 181(1–2), 17–25. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9940-z>
- Fuchs, B. B., O'Brien, E., Khoury, J. B. E., & Mylonakis, E. (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*, 1(6), 475–482. <https://doi.org/10.4161/viru.1.6.12985>
- Gil-Bona, A., Amador-García, A., Gil, C., & Monteoliva, L. (2018). The external face of *Candida albicans*: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. *Journal of Proteomics*, 180(May 2017), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.002>
- Glöckner, A., & Cornely, O. A. (2015). *Candida glabrata* - unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. *Mycoses*, 58(8), 445–450. <https://doi.org/10.1111/myc.12348>
- Gow, Neil A. R., Browin, Alistar J.P. and Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 366–371.
- Gulati, M. and Nobile, C. J. (2017). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Hager, C. L., Larkin, E. L., Long, L. A., & Ghannoum, M. A. (2018). Evaluation of the efficacy of rezafungin, a novel echinocandin, in the treatment of disseminated *Candida auris* infection using an immunocompromised mouse model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2085–2088. <https://doi.org/10.1093/jac/dky153>
- Han, Y. (2010). Efficacy of combination immunotherapy of IgM MAb B6.1 and amphotericin B against disseminated candidiasis. *International Immunopharmacology*, 10(12), 1526–1531. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.027>
- Hernández-Castro, R., Arroyo-Escalante, S., Carrillo-Casas, E. M., Moncada-Barrón, D., Álvarez-Verona, E., Hernández-Delgado, L., *et al.* (2010). Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *European Journal of Pediatrics*, 169, 783–787. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1109-7>
- Jackson, B. R., Chow, N., Forsberg, K., Litvintseva, A. P., Lockhart, S. R., Welsh, R., *et al.* (2019). On the Origins of a Species: What Might Explain the Rise of *Candida auris*? *Journal of Fungi*, 5(3).

<https://doi.org/10.3390/jof5030058>

- Jayatilake, J. A. M. S., Samaranayake, Y. H., Cheung, L. K., & Samaranayake, L. P. (2006). Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 35(8), 484–491. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00435.x>
- Jeffery-Smith, A., Taori, S. K., Schelenz, S., Jeffery, K., Johnson, E. M., Borman, A., et al. (2018). *Candida auris*: A review of the literature. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), 1–18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-17>
- Johnson, C. J. Davis, J. M. Huttenlocher, A. Kernien, J. F. Nett, J. E. (2018). Emerging Fungal Pathogen *Candida auris* Evades Neutrophil Attack. *MBio*, 9(4), 1–9.
- Kavishwar, A., & Shukla, P. K. (2006). Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 44(2), 159–167. <https://doi.org/10.1080/13693780500266038>
- Kenters, N., Kiernan, M., Chowdhary, A., Denning, D. W., Pemán, J., Saris, K., et al. (2019). Control of *Candida auris* in healthcare institutions: Outcome of an International Society for Antimicrobial Chemotherapy expert meeting. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54(4), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.013>
- Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive candidiasis. *The New England Journal of Medicine*, 373(15), 1445–1456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Lamoth, F., Lockhart, S. R., Berkow, E. L., & Calandra, T. (2018). Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(1), 4–13. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx444>
- Liu, Y., Ou, Y., Sun, L., Li, W., Yang, J., Zhang, X., & Hu, Y. (2019). Alcohol dehydrogenase of *Candida albicans* triggers differentiation of THP-1 cells into macrophages. *Journal of Advanced Research*, 18, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.02.005>
- Lockhart, S. R. (2019). *Candida auris* and multidrug resistance: Defining the new normal. *Fungal Genetics and Biology*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103243>
- Luo, G., & Samaranayake, L. P. (2002). *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *Apmis*, 110(9), 601–610. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.1100902.x>
- Magliani, W., Conti, S., Bernardis, F. D., Gerloni, M., Bertolotti, D., Mozzoni, P., et al. (1997). Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nature Biotechnology*, 15(2), 155–158. doi:10.1038/nbt0297-155
- Medina, N., Soto-Debrán, J. C., Seidel, D., Akyar, I., Badali, H., Barac, A., et al. (2021). Mixinyeast: A multicenter study on mixed yeast infections. *Journal of Fungi*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jof7010013>
- Mor, V., Rella, A., Farnou, A. M., Singh, A., Munshi, M., Bryan, A., et al. (2015). Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of fungal sphingolipids. *MBio*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00647-15>
- Moragues, M. D., Omaetxebarria, M. J., Elguezabal, N., Sevilla, M. J., Conti, S., Polonelli, L., & Pontón, J. (2003). A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* Activities. *Infection and Immunity*, 71(9), 5273–5279.

<https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5273-5279.2003>

- Mowlds, P., & Kavanagh, K. (2008). Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 165(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9069-9>
- Navarro-Arias, M. J., Hernández-Chávez, M. J., García-Carnero, L. C., Amezcua-Hernández, D. G., Lozoya-Pérez, N. E., Estrada-Mata, E., *et al.* (2019). Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. *Dove Medical Press Journal: Infection and Drug Resistance*, 12, 783–794.
- Nie, Y., Xu, Y., Xiao, Q. M., Hai, Y. W., Yang, M., & Xiao, R. (2007). Purification, characterization, gene cloning, and expression of a novel alcohol dehydrogenase with anti-prelog stereospecificity from *Candida parapsilosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3759–3764. <https://doi.org/10.1128/AEM.02185-06>
- Palliyil, S., Mawer, M., Alawfi, S. A., Fogg, L., Tan, T. H., De Cesare, G. B., *et al.* (2022). Monoclonal Antibodies Targeting Surface-Exposed Epitopes of *Candida albicans* Cell Wall Proteins Confer *In vivo* Protection in an Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(4), 1–21. <https://doi.org/10.1128/aac.01957-21>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019). Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(1), 79–94. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>
- Pitarch, A., Sánchez, M., Nombela, C., & Gil, C. (2002). Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 1(12), 967–982. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200062-MCP200>
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
- Ramirez-Garcia, A., Gallot, N., Abad, A., Mendoza, L., Rementeria, A., & Hernando, F. L. (2011). Molecular fractionation and characterization of a *Candida albicans* fraction that increases tumor cell adhesion to hepatic endothelium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 133–145. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3540-8>
- Ramirez-Garcia, A., Rementeria, A., Aguirre-Urizar, J. M., Moragues, M. D., Antoran, A., Pellon, A., *et al.* (2016). *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? *Critical Reviews in Microbiology*, 42(2), 181–193. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.913004>
- Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(5), 673–688. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2009-3>
- Rossato, L., & Colombo, A. L. (2018). *Candida auris*: What have we learned about its mechanisms of pathogenicity? *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03081>
- Sanglard, D. (2016). Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in Medicine*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2016.00011>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>

- Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*, 53, 41–44. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x>
- Schelenz, S., Hagen, F., Rhodes, J. L., Abdolrasouli, A., Chowdhary, A., Hall, A., *et al.* (2016). First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0132-5>
- Sevilla, M. J., Robledo, B., Rementeria, A., Moragues, M. D., & Pontón, J. (2006). A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis. *Infection and Immunity*, 74(5), 3042–3045. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.3042-3045.2006>
- Sherry, L., Ramage, G., Kean, R., Borman, A., Johnson, E. M., & Richardson, M. D. (2017). Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. *Emerging Infectious Diseases*, 23(2), 328–331.
- Silva-Dias, A., Miranda, I. M., Branco, J., Monteiro-Soares, M., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. G. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00205>
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., *et al.* (2019). *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), 1–38. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
- Tóth, R., Tóth, A., Papp, C., Jankovics, F., Vágvölgyi, C., Alonso, M. F., *et al.* (2014). Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00633>
- Uppuluri, P., Khan, A., & Edwards, J. E. (2017). Current trends in candidiasis. In R. Prasad (Ed.), *Candida albicans: Cellular and molecular biology* (pp. 5-23). Cham, Suiza: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-50409-4
- Wang, X., Bing, J., Zheng, Q., Zhang, F., Liu, J., Yue, H., *et al.* (2018). The first isolate of *Candida auris* in China: Clinical and biological aspects article. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 0–8. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0095-0>
- Wang, Y., Zou, Y., Chen, X., Li, H., Yin, Z., Zhang, B., *et al.* (2022). Innate immune responses against the fungal pathogen *Candida auris*. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31201-x>
- Welsh, R. M., Bentz, M. L., Shams, A., Houston, H., Lyons, A., Rose, L. J., & Litvintseva, P. (2017). Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *Journal of clinical microbiology*, 55(10), 2996–3005.
- Yue, H., Bing, J., Zheng, Q., Zhang, Y., Hu, T., Du, H., *et al.* (2018). Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0187-x>