

## CONFERENCIA INAUGURAL.

<b>Título: "MILESTONES" EN LA MICOLOGÍA MÉDICA DE LOS SIGLOS PASADOS Y SU IMPACTO EN EI SIGLO XXI</b>
---

<b>Autores:</b> ANA ESPINEL-INGROFF
-------------------------------------

<b>Centro:</b> : VCU Medical Center, Richmond, VA-USA
---

### **Resumen**

En nuestros días de frenética actividad es frecuente olvidar cual ha sido la herencia científica que nos ha traído a los adelantos contemporáneos. Sin embargo, es importante recordar y reconocer las contribuciones y eventos que avanzaron el desarrollo de la micología médica como disciplina científica. Como no es posible recordar toda nuestra herencia científica en unos minutos, el foco de la ponencia se centrará en el incremento de la incidencia de las micosis sistémicas, así como los cambios de agentes causales de infección que motivaron el descubrimiento de los distintos antifúngicos. No hay duda que nuestra ciencia nació, y ha seguido avanzando, con el descubrimiento, descripción y/o evolución de las enfermedades causadas por hongos. Los hongos ya eran conocidos en los tiempos antiguos pero no fueron asociados con enfermedades humanas hasta 1837-1841 cuando se describió el origen fúngico de las tiñas, no asociándose a enfermedad invasora hasta finales del siglo XIX y comienzos del XX. Durante ese periodo se iniciaron las descripciones de las infecciones causadas por *Cryptococcus neoformans* en Europa y por los hongos dimórficos en las Américas, así como los trabajos de Pasteur y otros investigadores con los dermatofitos. La segunda época importante en nuestra ciencia fue la introducción de los tratamientos inmunosupresores y el inicio de la pandemia del SIDA. Estos acontecimientos crearon una población de pacientes con alto riesgo de adquirir micosis graves y diseminadas y las infecciones de *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* adquirieron un lugar prominente como causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeprimidos. La respuesta a este nuevo problema fue el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos y la ciencia evolucionó de la anfotericina B en los 1950s al descubrimiento de los azoles entre 1970s y 1990s. La percepción de la emergencia de la resistencia antifúngica, la aparición de nuevos agentes causales (otras especies de *Candida* y *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, y mas recientemente los zigomicetos) y el continuo incremento de la enfermedad fúngica diseminada asociada a alta tasas de mortalidad creó la necesidad de desarrollar azoles más potentes (voriconazol y posaconazol) y otra clase de antifúngicos, las equinocandinas al principio del siglo XXI. A pesar de todos estos adelantos y como en otras disciplinas científicas, la percepción actual es que no tenemos todavía el tratamiento ideal para las distintas micosis. Sin embargo estrategias como la profilaxis, el tratamiento anticipado o empírico y el dirigido se han diseñado para mejorar el tratamiento de micosis graves, y muchas veces mortales, sobretodo en el huésped inmunodeprimido.

**Palabras Clave:** herencia científica de la micología médica; perspectiva histórica de la micología médica

## CONFERENCIA PREMIO FLEMING SEM

**Título:** *Múltiples modos de regulación de la ruta de MAP quinasa de integridad celular en Schizosaccharomyces pombe*

**Autores:** José Cansado, Mariano Gacto, Teresa Soto, Jero Vicente, Andrés Núñez y Marisa Madrid

**Centro:** Grupo de Fisiología de Levaduras. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad de Murcia

### **Resumen:**

El estudio de los mecanismos responsables de la detección de señales ambientales, las rutas de señalización y transmisión de dichas señales a la célula, y los cambios compensatorios que se producen a nivel transcripcional y traduccional, resulta esencial para comprender cómo las células se adaptan y sobreviven frente a condiciones sub-óptimas de crecimiento. En células eucariotas, las rutas de señalización mediadas por MAP quinasa, ampliamente conservadas a lo largo de la evolución, se encuentran implicadas en la regulación de muchos de estos procesos. Los módulos de MAPK constan de tres componentes que se regulan por medio de una cascada de fosforilaciones. La primera quinasa, una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), fosforila residuos de serina o treonina del siguiente componente del módulo, la MAPK quinasa (MAPKK). Las MAPKKs son quinasa que reconocen y fosforilan los residuos de treonina y tirosina en la secuencia T-X-Y del motivo de activación de la MAPK, que es el último componente del módulo. Una vez fosforiladas, las MAPK activan a sustratos a nivel citoplasmático (p. ej. proteína quinasa activada por MAPK), o se traslocan al núcleo celular, donde fosforilan y activan factores de transcripción específicos. En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* la ruta de mantenimiento de la integridad celular, cuyo elemento central es la MAP quinasa Pmk1, homóloga a la ruta ERK de mamíferos, regula procesos tales como la morfogénesis, la construcción de la pared celular, la citoquinesis o la homeostasis iónica, activándose durante la separación celular y en respuesta a estrés. Los resultados obtenidos durante los últimos años han puesto de manifiesto la existencia de un complejo entramado molecular que regula la activación de Pmk1 dependiendo del estímulo activador, y permitido identificar a los principales elementos que regulan positiva o negativamente su actividad biológica, entre los que destacan la GTPasa pequeña Rho2 y Pck2, un ortólogo a PKC. Así, mientras la activación de Pmk1 inducida por estrés hipo- o hipertónico depende totalmente de la señalización mediada por Rho2-Pck2, su activación en respuesta a otros estímulos es parcial o totalmente independiente de ambas proteínas. Existen por tanto diversas rutas que regulan la activación de Pmk1 dependiendo de la naturaleza del estímulo activador. También hemos puesto de manifiesto la existencia de un sutil mecanismo de interacción (*crosstalk*) entre Pmk1 y la ruta de MAP quinasa activable por estrés, cuyo efector es la MAP quinasa Sty1, y en el que participan el factor transcripcional Atf1 y distintas fosfatasa que inactivan ambas MAP quinasa. Por último, Pmk1 está localizada en el núcleo y citoplasma, así como en el huso mitótico, el corpúsculo polar del huso (SPB) y el septo durante la división celular. Sorprendentemente, y al contrario del modelo descrito para ERK1/2 en mamíferos, la localización subcelular de Pmk1 no se ve afectada por su estado de activación ni en respuesta a estrés, lo que sugiere que tanto la forma activa como inactiva de la MAPK son capaces de entrar en el núcleo. Mediante el empleo de mutantes que expresan una versión de Pmk1 anclada establemente en la membrana plasmática, hemos confirmado que, contrariamente al modelo establecido, la localización nuclear de Pmk1 no es especialmente relevante para el desarrollo de su actividad biológica. En conjunto, los resultados obtenidos utilizando *S. pombe* como modelo plantean interesantes cuestiones sobre la organización y funcionalidad de unas rutas de señalización fuertemente conservadas en eucariotas superiores.

**Palabras Clave:** *Levadura; Schizosaccharomyces pombe; MAP quinasa; Estrés; Pmk1*

## MESA REDONDA I. AEM1

### PONENCIA 1

<b>Título</b> Actualización en el diagnóstico de las Invasiones Fúngicas Invasoras: UTILIDAD CLÍNICA DE LOS MÉTODOS CONVENCIONALES.
---

<b>Autores</b> MARÍA JOSÉ LINARES SICILIA
---

<b>Centro</b> Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba
---

#### Resumen

El diagnóstico microbiológico convencional de las infecciones fúngicas invasoras se basa en el aislamiento e identificación de un posible agente etiológico, empleando para ello los medios de cultivo idóneos que permitan aislar el/los posible/s agente/s causal/es de la micosis, proceder a su identificación y estudiar –si es conveniente - su sensibilidad a los antifúngicos.

Para ello es fundamental la recogida correcta de una **muestra clínica** adecuada y representativa del proceso infeccioso, así como su correcta manipulación, conservación y transporte al laboratorio, debiendo mantenerse la viabilidad del hongo y evitar las posibles contaminaciones. La única particularidad del diagnóstico micológico, puede radicar en el volumen de muestra necesario para asegurar la recuperación de algunos hongos, pues, en determinadas circunstancias, es preciso concentrar las muestras o sembrar un mayor volumen de las mismas. Siendo preferible evitar el empleo de hisopos y siempre aconsejable la aspiración con jeringa o mejor, en caso de que los criterios riesgo/beneficio así lo aconsejen, la toma de biopsias. El transporte de las muestras al laboratorio debe hacerse en contenedores estériles y a prueba de vertidos, y debe hacerse lo más rápido posible. Como en cualquier otro proceso infeccioso, la mejor muestra clínica es aquella que procede directamente de una zona activa de la infección. Entre las más recomendables y de mayor uso: hemocultivo, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, peritoneal, pericárdico ó sinovial y si hay evidencia de infección de uno o varios órganos profundos, debe plantearse siempre la idoneidad de realizar una biopsia del tejido afectado para su diagnóstico microbiológico.

La **observación microscópica** de las muestras puede, en ocasiones, mostrar la presencia de elementos fúngicos suficientemente característicos como para diagnosticar una infección fúngica y, en determinadas situaciones, orientar hacia un posible agente etiológico. Pero uno de los principales inconvenientes del examen microscópico directo es su baja sensibilidad. Las técnicas más empleadas son: tinción de Gram, tinción con blanco calcofluor, tinción de la tinta china.

Al igual que en otros procesos infecciosos, el **cultivo** es un paso esencial y necesario en el diagnóstico de las infecciones fúngicas. Su sensibilidad, salvo excepciones y siempre que se disponga de la muestra adecuada y el procesamiento de la misma sea correcto, acostumbra a ser más alta que la de cualquier otra técnica diagnóstica. Los hongos no son especialmente exigentes y crecen bien en cualquier medio de cultivo, existiendo una gran cantidad de medios útiles para la siembra de las diferentes muestras clínicas, y algunos especialmente diseñados para el aislamiento primario de hongos potencialmente patógenos, las necesidades reales suelen cubrirse con un número relativamente limitado de **medios de cultivo selectivos** generalmente derivados del agar glucosado de Sabouraud, y habitualmente suplementados con antibióticos, como el cloranfenicol, la gentamicina o la amicacina, para impedir el crecimiento de la flora bacteriana. Sin embargo, siempre es aconsejable sembrar más de un medio de cultivo, y en ciertas situaciones puede estar indicada la utilización de medios especializados para el aislamiento de determinados hongos, como en el caso del género *Malassezia*, *Cryptococcus* u hongos dimórficos patógenos primarios, o **medios de cultivo diferenciales** que, merced a la adición de determinados componentes, permiten la identificación de los hongos basándose en la apariencia de las colonias de estos en dichos medios. Muchos de los hongos causantes de infecciones oportunistas y de un modo especial los hongos dimórficos patógenos primarios, tienen un crecimiento lento, por ello los cultivos micológicos se incuban un mínimo de 4 a 6 semanas, antes de considerarse negativos. Los criterios microbiológicos por sí solos, no suelen ser suficientes para establecer el diagnóstico de infección fúngica invasora siendo indispensable asociarlos a un contexto clínico determinado.

La **identificación de los hongos** se basa esencialmente en la morfología macroscópica de las colonias, las características bioquímicas y la morfología microscópica, aunque una vez aislado un hongo, los procedimientos de identificación dependerán de si es una levadura, un hongo filamentoso o un hongo dimórfico.

La **identificación de los hongos levaduriformes** se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos.

- Los criterios morfológicos pueden ser, a su vez, macro o microscópicos. Los criterios macroscópicos tienen en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de Microbiología tales como Sabouraud dextrosa Agar (SDA), con o sin antibióticos añadidos, Agar sangre, Agar chocolate, Agar Cled, etc.

- Entre los criterios bioquímicos o enzimáticos podemos destacar : a) Aquellos que utilizan medios cromogénicos. Estos medios están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24 a 48 horas. El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Uno de las principales ventajas de estos medios es que permiten diferenciar fácilmente los cultivos mixtos. Entre estos medios podemos destacar CHROMagar Candida (CHROMagar Company). Cromogen Albicans (BIOMEDICS), Candida ID (bioMérieux-Vitek), Albicans ID2 (bioMérieux-Vitek) CandiSelect (BIO-RAD), Agar Fluoroplate Candida (Merck), agar SDCA-MUAG (Biolife). b) En el mercado existen varios sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. En todos ellos se detecta una o dos enzimas ( $\beta$ - galactosidasa y L-prolina aminopeptidasa), sólo presentes en *C. albicans*. Para la detección de estas enzimas, los sistemas comerciales pueden utilizar sustratos fluorogénicos (BactiCard Candida, Albicans-Sure, Albistrip, RapID Albicans, método MSPQC-PLS) o cromogénicos (Candi Albicans Screen, Murex *C. albicans* CA50). c) *Cryptococcus neoformans* también puede ser identificado por métodos enzimáticos como la detección de ureasa, detección de la enzima nitrato-reductasa o prueba de la fenol-oxidasa. d) Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes (auxonograma). Se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en presencia de los nutrientes necesarios para su desarrollo. Existen varios comercializados: Auxacolor (Bio-Rad), sistema Uni-Yeast Tek (Remel), sistemas semiautomáticos [API 20 C AUX (bioMérieux), API ID32C (bioMérieux), sistema Vitek (bioMérieux), Micronaut-Candida System], ó sistemas automáticos [Vitek 2 (bioMérieux), Biolog YT MicroPlate (Biolog), Rapid Yeast Identification Panel MicroScan (Dade Behring)]. e) Identificación rápida (4 horas) de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas como el RapID Yeast Plus System (Innovative Diagnostic Systems) y Fungiscreen 4H (BIO-RAD). GLABRATA RTT (Foumouze Diagnostics) es un método sencillo comercializado que en solo 20 minutos permite la identificación de *Candida glabrata*.

- La identificación mediante criterios inmunológicos se basan en un método para la identificación rápida de aislamientos de *C. albicans* [Bichro-latex albicans (Fumouze)], *C. krusei* [Krusei-color (Fumouze)], o *C. dubliniensis* [Bichro-Dubli® (Fumouze), por aglutinación de partículas látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de *C. albicans*, *C. krusei* o *C. dubliniensis* respectivamente.

La **identificación de los hongos filamentosos** se hace fundamentalmente por la morfología del micelio y en particular de las esporas y de las estructuras en las que se forman, así como su forma y disposición, que suelen ser características. Pero debe tenerse presente que el desarrollo de conidios puede no tener lugar hasta varios días o semanas después del crecimiento inicial del hongo y que las características metabólicas solo en ciertas ocasiones pueden ayudar a la identificación.

Para la **identificación de los hongos dimórficos** es deseable demostrar tanto la fase levaduriforme como la filamentosa, y en algunos casos se han desarrollado técnicas alternativas para demostrar mediante anticuerpos específicos la producción de exoantígenos solubles.

**Palabras Clave:** Métodos diagnósticos convencionales.

## PONENCIA 2

<b>Título</b>	<b>ACTUALIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS INVASORAS: MÉTODOS AUTOMATIZADOS.</b>
<b>Autores</b>	SÁNCHEZ-REUS, Ferran
<b>Centro</b>	Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

### **Resumen:**

Ya hace años que los sistemas automatizados están presentes en los laboratorios de los Servicios de Microbiología Clínica, facilitando la detección serológica de una respuesta inmune o ayudando al aislamiento, detección precoz y/o caracterización de los microorganismos y sus productos en muestras clínicas y/o ambientales. Pero el grado de integración es muy variable según el área diagnóstica de la que se trate, siendo prácticamente completa en las dedicadas al diagnóstico serológico y muy escasa en las otras, como es el caso de la micología.

Hasta estos últimos años, su incorporación estaba siendo paulatina, aunque lenta. Pero el desarrollo de la biología molecular, la aparición de métodos diagnósticos completamente automatizados basados en la PCR a tiempo real o en los microarrays, la introducción de la espectrometría de masas para la identificación rápida de los microorganismos, o la incorporación de la pirosecuenciación, han supuesto un gran empuje para el avance de la automatización en los laboratorios de microbiología, avance que abarca a todas las áreas y también afectará a la de micología.

La automatización permite asegurar la trazabilidad de todo el proceso diagnóstico en las fases pre, peri y postanalíticas, mejorando el manejo de las muestras e incorporando controles de calidad que buscan el minimizar errores ya desde el momento en que se realiza la petición hasta el de la emisión del informe. La gestión informática de las peticiones simplifica el trabajo administrativo y evita errores de transcripción, lo que junto al empleo de códigos de barras para el rotulado de muestras y a la existencia de sistemas capaces de la lectura e impresión "in situ" de los mismos, evita las trasposiciones, duplicados y pruebas innecesarias.

La automatización incrementa la eficacia y elimina las variaciones individuales, reduciendo la subjetividad y evitando el error humano. Además incrementa la precisión y reduce el tiempo de respuesta, lo que se traduce en una mayor precocidad diagnóstica, con reducción en el tiempo de estancia hospitalaria y un menor índice de tratamientos inadecuados.

La automatización también minimiza las prácticas analíticas potencialmente peligrosas y reduce los procesos manuales repetitivos, liberando a los técnicos para tareas más complejas y específicas e incrementado la disponibilidad del microbiólogo para la interpretación, comunicación y valoración de los resultados.

Por último, la automatización exige de sistemas informáticos específicos, que van a permitir la explotación de datos y van a proporcionar al microbiólogo una información valiosísima para el control de las infecciones y la vigilancia epidemiológica de las mismas.

La automatización en los Servicios de Microbiología Clínica es una realidad que se está imponiendo, si bien primero fue la automatización del diagnóstico serológico, en estos momentos le toca el turno a la bacteriología. La Micología va a remolque de esta última y se aprovecha de los avances que con ella se logran, pero en la actualidad no existen procesos automatizados que podamos considerar realmente propios del área de Micología.

En la presentación se repasarán algunos de los procesos analíticos automatizados disponibles en la actualidad y se comentará el modo en que pueden incorporarse al proceso diagnóstico de las infecciones fúngicas invasivas.

**Palabras Clave:** Diagnóstico en micología, técnicas automatizadas.

## PONENCIA 3

**Título:** MARCADORES SÉRICOS. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS, ANTICUERPOS Y METABOLITOS

**Autores:** AMALIA DEL PALACIO

**Centro:** Microbiología Clínica. Unidad de Micología Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

### Resumen:

En estos últimos años se han producido avances en el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora (EFI) con el desarrollo de detección de antígenos: galactomanano (GM) para el diagnóstico de aspergilosis invasora (AI), betaglucano (BG) marcador panfúngico y anticuerpos.

1) En el paciente crítico no neutropénico los principales patógenos son *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, y *Pneumocystis jirovecii*. La *Candida* es el agente más prevalente de EFI, apareciendo candidemias en el 2% de población no seleccionada. La candidiasis invasora (CI) en esta población aparece en pacientes con intervenciones abdominales (con dehiscencias de suturas), pancreatitis aguda hemorrágica y en receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) aparecen abscesos abdominales y peritonitis candidiásicas.

Un reciente estudio basado en necropsias demuestra que en el paciente crítico no neutropénico los cultivos positivos de *Candida* del árbol respiratorio no implican la existencia de neumonía (Meersseman: Intensive Care Med 2009;35:1526). La utilización de BG en esta población es útil para diagnosticar la neumonía fúngica debida a *Aspergillus*, *P. jirovecii*, *Scedosporium* y *Fusarium* (Cúetara: Clin Vaccine Immunol 2009;16:43; Odabasi: Clin Infect Dis 2004;44: 267; Ostrosky Clin Infect Dis 2005;41:654).

La detección de GM en LBA tiene mayor sensibilidad que la aportada por la detección GM en sangre. (Meersseman : Am J Respir Crit Care Med 2008;177:27). La limitación mayor de BG en esta población es la falsa reactividad en la primera semana después de la intervención por el uso de gasas y esponjas quirúrgicas, así como el tratamiento con algunos antibióticos.

En un reciente estudio prospectivo en pacientes críticos no neutropénicos con ventilación mecánica hemos estudiado en nuestro hospital el rendimiento diagnóstico de GM en LBA y sangre para el diagnóstico de AI. En nuestra cohorte hemos seleccionado como puntos de corte ( $\geq 0.4$ ) en sangre y ( $\geq 1.0$ ) en LBA por asociarse con mayor eficacia diagnóstica (83% y 94%) y valor predictivo negativo (89% y 95%) respectivamente. Hemos constatado que con la comparación de las curvas ROC el área bajo la curva (ABC) es significativamente mayor para el GM en LBA ( $p=0.019$ ), de 0.98 (IC95%:0.95-1.00) y 0.83 (IC 95%:0.71-0.96) en sangre respectivamente. La utilización de BG (sangre) en esta cohorte mostró un ABC de 0.85 (IC 95%:0.74-0.96) en el diagnóstico de AI. Cuando se incluyeron todas las EFI (4 casos de neumonía por *P. jirovecii*) el ABC de BG fue de 0.87(IC95%:0.75-0.99).

2) En población pediátrica la utilización de GM en suero parece ser prometedora (Steinbach Pediatr Infect Dis 2007;26:558). En neonatos los niveles de BG son muy elevados (debido a translocación) y no resulta útil en el diagnóstico de CI. Un estudio realizado en población pediátrica con BG en niños sanos ha puesto de manifiesto la frecuente presencia de resultados falsos positivos. (Smith. Clin Vaccine Immunol 2007;14:924)

3) En pacientes oncohematológicos adultos con riesgo de EFI, el GM (utilizado como técnica de cribado en sangre o como prueba diagnóstica confirmatoria especialmente en LBA) es de utilidad, especialmente si se utiliza conjuntamente con el BG para mejorar los resultados (Maertens: Clin Infect Dis 2009;49:1688; Pazos: J Clin Microbiol 2005;43:299. Senn: Clin Infect Dis 2008;46:878), incluso hay autores que mantienen que las terapias adelantadas basadas en la utilización del GM en cribado es cara y demanda tiempo, por lo que han hecho un estudio en enfermos neutropénicos con fiebre en esta población omitiendo la realización del GM (o reduciéndola a 3 días) basándose exclusivamente en estudios radiológicos con scanner, cultivos de vigilancia, la realización de hemocultivos y cultivos microbiológicos tradicionales. (Girmania. J Clin Oncol 2009;28:667)

La detección conjunta de mananos de *Candida* y anticuerpos, así como con BG en sangre optimizan el diagnóstico de CI (Pazos: Rev Iberoam Micol 2006;23:209; Verduin Lunel: Clin

Microbiol Infect 2009;15:380; Diag Microbiol Infect Dis 2009;64:408), observándose que los anticuerpos aparecen significativamente más en enfermos con varios episodios de neutropenia.

\*Los estudios de la autora han sido financiados con Becas del Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, PI070107 (a A.d.P y con becas de investigación de Pfizer España (a A.d.P.) y Gilead España (a A.d.P.)

**Palabras Clave:** Galactomanano, neumonía fúngica, betaglucano, diagnóstico, Lavado broncoalveolar.

## **MESA REDONDA I. SEM1**

### **PONENCIA 1**

<b>Título:</b> Regulación de la Esporulación de <i>Aspergillus nidulans</i>
<b>Autores:</b> Unai Ugalde
<b>Centro:</b> Facultad de Química, UPV/EHU

#### **Resumen:**

El hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* ha servido como modelo para el estudio de multitud de procesos, entre los que se incluye la conidiación. Numerosos estudios a lo largo de los últimos 50 años han permitido identificar los genes implicados en la regulación de este proceso.

La activación del gen *brlA* (que codifica un factor de transcripción tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) es el primer paso de la ruta central de la conidiación. Ello requiere la participación de otros factores que se expresan en las hifas vegetativas. Entre ellos, FlbB (bZip), FlbD (cMyb) y FlbC (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) son factores de transcripción cuyo modo de acción no ha sido precisada. Estudios recientes indican que estos factores no solo activan *brlA*, sino que cumplen varias funciones a lo largo del desarrollo (Garzia *et al.*, 2010). Por ejemplo, FlbB se encuentra en el *Spitzenkörper*, asociado a la proteína apical FlbE, formando un complejo que posiblemente ejerce una función sensora. Una vez transportado al núcleo, FlbB activa la expresión de *flbD*, y ambos factores conjuntamente actúan sobre el promotor de *brlA* para activar su transcripción.

En esta presentación, se explicará en detalle la función de FlbB y FlbD en el núcleo, y se presentará un modelo de acción para estos dos factores, así como su integración en el modelo general de regulación de la esporulación.

## PONENCIA 2

**Título:** Inducción por luz de la esporulación en *Aspergillus*

**Autores:** David Cánovas, Carmen Ruger-Herreros, Raúl Fernández-Barranco, Luis M. Corrochano

**Centro:** Depto. de Genética, Universidad de Sevilla

### **Resumen:**

Los hongos ascomicetos del género *Aspergillus* tienen una enorme importancia para el hombre, tanto desde un punto de vista clínico (aspergilosis) como biotecnológico. Estirpes de *Aspergillus* son los hongos patógenos humanos más abundantes en el aire, habiendo 1-100 esporas / m<sup>3</sup> de aire. Las esporas se forman durante los procesos de desarrollo asexual o conidiación en respuesta a una serie de estímulos. Uno de estos estímulos es la luz. El genoma de *A. nidulans* contiene un gen para un fitocromo (*fphA*), dos genes homólogos a *wc-1* y *wc-2* de *Neurospora crassa*, *lreA* y *lreB* y un gen *veA*. Se ha demostrado que podría existir una interacción física entre el fotorreceptor de luz azul (LreA), luz roja (FphA) y VeA. La conidiación en *A. nidulans* está controlada por un regulador principal, el producto del gen *brlA*. Varios reguladores, los productos de los genes “fluffy” *fluG*, *flbA*, *flbB* y *flbC*, actúan permitiendo la síntesis de compuestos químicos y/o la transducción de señales ambientales y desencadenan la activación de la transcripción de *brlA* y la conidiación. Hemos demostrado que la expresión de varios genes implicados en la conidiación, como son *brlA*, *fluG*, *flbA*, *flbB* y *flbC*, está activada por la luz. Esta activación es rápida, tras 5 minutos de luz se detecta ARNm de estos genes. La delección de los genes de los fotorreceptores, *fphA*, *lreA* y *lreB* y de los genes “fluffy” apoyaran un modelo sencillo en el que la activación de la conidiación por la luz ocurriría a través de la activación por luz de la transcripción de estos genes.

### PONENCIA 3

<b>Título</b>	<b>PAPEL DE LAS POLIAMINAS EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LOS HONGOS</b>
<b>Autores</b>	JOSÉ RUIZ HERRERA <sup>1*</sup> LAURA VALDÉS SANTIAGO <sup>1</sup> Y ÁNGEL DOMÍNGUEZ <sup>2</sup>
<b>Centro</b>	<sup>1</sup> CINVESTAV DEL IPN Y <sup>2</sup> UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

#### **Resumen:**

Las poliaminas son micromoléculas de carácter catiónico, requeridas obligatoriamente por todos los organismos vivos. En la mayoría de los organismos estudiados, tres son las poliaminas presentes: putrescina, espermidina y espermina. Entre las funciones generales que se conocen de las poliaminas están la estimulación de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y la diferenciación celular, aunque su modo preciso de acción es todavía desconocido y sujeto a discusión.

La síntesis de poliaminas se inicia por la descarboxilación de la ornitina, mediante la acción de la ornitina descarboxilasa (Odc) para producir putrescina, la cual se transforma en espermidina por acción de la espermidina sintasa (Spe) y ésta en espermina por la espermina sintasa (Sne). En éstas dos últimas reacciones interviene la SAM descarboxilasa (Samdc) que provee del otro sustrato (radical aminopropilo) necesario para la síntesis de las correspondientes poliaminas.

Nuestro grupo de investigación ha publicado evidencias sobre la relación existente entre la concentración celular de las poliaminas y distintos fenómenos diferenciativos de varios hongos: germinación de esporas, esporoforogénesis, esporulación y dimorfismo. Para ello hemos hecho uso de inhibidores específicos de la Odc, fundamentalmente la diaminobutanona (DAB), y de mutantes en el gen que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC).

Dado que uno de los problemas más importantes es el papel específico que tiene cada una de las poliaminas, recientemente hemos procedido a utilizar como modelo de estudio al basidiomicota fitopatógeno *Ustilago maydis* (el agente causal del carbón común del maíz), aprovechando que solamente posee putrescina y espermidina, pero no espermina. Al igual que en otros sistemas, usando mutantes *odc* se pudo demostrar que las poliaminas eran esenciales para la germinación de las teliosporas, la virulencia y el dimorfismo del hongo, pero sin poder determinar cuál de las dos, o ambas poliaminas eran esenciales en estos fenómenos. El análisis fenotípico de mutantes dobles en la *odc* y en el gen *SPE* (un gen quimérico que codifica además de la espermina sintasa, la sacaropina deshidrogenasa (Sdh, involucrada en la síntesis de lisina), llevó a sugerir que la espermidina, y no la putrescina, era la poliamina esencial. Sin embargo, dado que la putrescina puede ser sintetizada también por la degradación de la espermidina mediante la acción de la poliamina trans-acetilasa y la poliamina oxidasa (Pao), se demostró que las dobles mutantes poseían putrescina sintetizada por esa vía. Para solucionar este problema se procedió a obtener mutantes dobles *odc/pao*, carentes totalmente de putrescina que eran viables y en las que se observó que ésta poliamina solo tenía un modesto papel en algunas funciones secundarias. Esto demuestra que la poliamina esencial para *U. maydis*, y probablemente para la mayoría de los hongos, es la espermidina.

En relación con el modo de acción de las poliaminas, nuestros diversos estudios, que han involucrado: el análisis del efecto de la 5 aza-citidina en la inhibición por DAB de diversos fenómenos diferenciativos de varios hongos, el uso de nuestra modificación del procedimiento de AFLP para el análisis de la metilación del DNA y el estudio de la metilación del DNA *in vitro*, sugieren que las poliaminas alteran el estado de metilación de genes específicos, modificando sus niveles de expresión. Esta hipótesis está actualmente siendo analizada con mayor profundidad mediante el análisis del efecto de las poliaminas en la expresión génica diferencial de genes involucrados en el dimorfismo de *U. maydis* por medio de micromatrices y el estudio de los niveles de metilación *in vivo* de algunos genes.

**Palabras Clave** Poliaminas, diferenciación, hongos, *Ustilago maydis*

## PONENCIA 4

<b>Título</b>	<b>EL FOTOTROPISMO EN <i>PHYCOMYCES</i>: DE LOS ESTUDIOS INICIALES DE FISIOLOGÍA A LAS BASES MOLECULARES DE LA FOTORRECEPCIÓN.</b>
<b>Autores</b>	ARTURO P. ESLAVA
<b>Centro</b>	Área de Genética. Dpto. Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca

### Resumen:

La luz es una de las señales ambientales que regula diversos aspectos de la biología de los hongos. La reacción de *Phycomyces* a la luz fue descrita por primera vez por Hoffmeister en 1867 y el estudio cuantitativo del fototropismo empezó hacia 1888 cuando el belga Jean Massart demostró que la reacción a la luz de *Phycomyces* obedece a la ley de Weber. Aunque *Phycomyces* fue probablemente el primer hongo en el cual el efecto de la luz ha sido analizado, el estudio del uso de la luz por las plantas data de mucho antes, incluso anterior a los estudios de los Darwins en 1881. Estudios pioneros durante la primera mitad del siglo XX fueron realizados por Blaauw en Holanda, Buder en Alemania y Castle en USA. Ellos describieron el patrón de crecimiento, la óptica de los esporangióforos y la relación entre la respuesta de crecimiento a la luz y el fototropismo. Posteriormente Delbrück y su escuela se concentraron en el estudio de *Phycomyces* ...”motivados por un interés común en el estudio de la transducción de señales exhibidas por los órganos sensoriales de todos los organismos”... (Bergman et. al. 1969). Los clásicos espectros de acción para el fototropismo y la respuesta de crecimiento a la luz sugieren la presencia de flavina como cromóforo en el fotorreceptor. Toda una gama de experimentos basados fundamentalmente en la espectrofotometría y la fisiología fueron realizados hasta los años 1980 sin que se llegara a conocer la naturaleza del o los pigmento/s receptor/es de la luz.

Una aproximación genética basada en la obtención y estudio de mutantes fue liderada por Cerdá-Olmedo y sus discípulos a partir de los años 1970. Se obtuvieron, estudiaron y clasificaron fenotípicamente mutantes alterados en sus respuestas a la luz (*mad*) y se elaboró un esquema de árbol de integración sensorial en *Phycomyces* que fue el primero descrito en organismos eucarióticos. Actualmente se conocen 10 genes *mad* (A-J); mutantes en los genes *madA* y *madB* están alterados en todas las diferentes respuestas a la luz, sugiriendo que juegan un papel fundamental en la fotobiología de *Phycomyces*. Recientemente, con la disponibilidad del genoma de *Phycomyces bakesleeanus* y de otros cigomicetos como *Mucor circinelloides* y *Rhizopus oryzae*, y el estudio comparativo con el genoma de otros hongos, se ha descubierto la naturaleza de los genes *madA* y *madB* que es similar a los genes *wc-1* y *wc-2* de *Neurospora crassa*. El gen *madA* codifica una proteína similar al fotorreceptor de luz azul con dedo de zinc de *Neurospora* (WC-1) y el gen *madB* codifica una proteína similar a la proteína WC-2, también con dedo de zinc, de *Neurospora*. Tanto MADA como WC-1 contienen un dominio LOV de unión a la flavina. En el hongo *Phycomyces* existen tres genes similares a *wc-1* de *Neurospora* (*madA*, *wcoA* y *wcoB*) y cuatro similares a *wc-2* (*madB*, *wctB*, *wctC* y *wctD*).

Las proteínas MADA y MADB interactúan para formar un complejo (MAD) como se demuestra por el ensayo de dos híbridos y también por la coexpresión en *Escherichia coli*. No se han observado interacciones adicionales entre el resto de las proteínas WC de *Phycomyces* en los ensayos de dos híbridos, con lo que puede deducirse que el complejo MAD es el principal complejo fotorreceptor en este hongo aunque la presencia de varios genes *wc* podría indicar la existencia de otros fotorreceptores, todavía no descubiertos, que pueden estar implicados en la percepción de diferentes rangos de intensidad y/o en la formación de fotorreceptores específicos para fotorrespuestas particulares como ocurre en *Mucor circinelloides*. La identificación molecular del resto de los genes *mad* nos ayudará en la comprensión de los mecanismos para la recepción y transducción de las señales luminosas del medio en este hongo y así mismo nos servirá para ampliar y profundizar en el conocimiento de la evolución de la visión.

**Palabras Clave:** *Phycomyces*, Fotobiología, Fotorreceptores, Transducción de señales.

## MESA REDONDA I I. AEM2

### PONENCIA 1A

<b>Título:</b> EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LOS MÉTODOS DE REFERENCIA: CLSI
--

<b>Autores:</b> ANA ESPINEL-INGROFF
-------------------------------------

<b>Centro</b> VCU Medical Center, USA
---------------------------------------

#### Resumen:

La agencia americana Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) inició el desarrollo de los métodos estandarizados para determinar la actividad in vitro de los antifúngicos en los 1980. De una manera progresiva fueron surgiendo los distintos documentos. El proceso requiere estudios multicéntricos para evaluar la reproducibilidad y relevancia clínica de los parámetros de cada método. Para el desarrollo de los puntos de corte es necesario entre otras cosas tener datos adquiridos en ensayos clínicos. Actualmente hay siete documentos del CLSI. Para las pruebas de sensibilidad de las levaduras del género *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans* a varios antifúngicos tenemos: (i) M27-A3 (describe los métodos de dilución en caldo); (ii) M27-S3 (contiene tablas, p.j, puntos de corte); (iii) M44-A2 (describe los métodos de difusión en disco); y (iv) M44-S3 (contiene las tablas). Para las pruebas de sensibilidad de los hongos filamentosos tenemos: (i) M38-A2 (describe los métodos de dilución en caldo y contiene las tablas); M51-A (describe los métodos de difusión en disco); y (iii) el M51-S1 (contiene las tablas). Lo más importante ha sido la definición muy recientemente de los puntos de corte epidemiológicos (ECVs) para el fluconazole y las equinocandinas versus las *Candida* spp. y para los *Aspergillus* spp. versus los triazoles. También los puntos de corte clínicos del fluconazol y de las equinocandinas han sido ajustados y son ahora especies-específicos. A medida que estos nuevos desarrollos son aprobados por el Subcomité del CLSI, encargado del desarrollo de los métodos para los antifúngicos, se incluyen en las nuevas ediciones del correspondiente documento. Estos desarrollos y su relevancia clínica serán discutidos durante la charla.

### PONENCIA 1B

<b>Título:</b> Evolución histórica y situación actual de los métodos de referencia. EUCAST.
---

<b>Autores:</b> Dr. Juan Luis Rodríguez Tudela.
---

<b>Centro:</b> Instituto Nacional de Microbiología. Carlos III.
---

El aumento de la incidencia de las infecciones fúngicas, el creciente número de antifúngicos y la aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria ha hecho que las técnicas de sensibilidad a los antifúngicos y los correspondientes puntos de corte sean cada vez más importantes en el entorno médico. El subcomité de antifúngicos del "European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST)" ha desarrollado estándares para la detección de la resistencia en levaduras que fermentan la glucosa y para hongos filamentosos así como puntos de corte de fluconazol y voriconazol para *Candida*. Durante este año se aprobarán los puntos de corte para posaconazol y las equinocandinas. El proceso que el EUCAST ha desarrollado para la obtención de puntos de corte se puede resumir en los siguientes aspectos: (i) Información sobre la dosis más común utilizada en Europa; (ii) la definición de población salvaje de cada uno de los hongos diana con su correspondiente puntos de corte epidemiológico; (iii) la farmacocinética del antifúngico; (iv) la farmacodinamia incluyendo simulaciones de Monte Carlo; y (v) la correlación de las CMIs con la evolución del paciente incluyendo análisis de minería de datos. Sin embargo, cuando los datos son insuficientes (ej. No hay un número suficiente de cepas con CMIs elevadas y ausencia de respuesta clínica), se recomiendan los puntos de corte epidemiológicos mas que los puntos de corte clínico hasta que estén disponibles mas estudios que permitan establecer los susodichos puntos de corte clínicos.

## PONENCIA 2

**Título: MÉTODOS ALTERNATIVOS. UTILIDAD CLÍNICA.**

**Autores: DRA. CARMEN CASTRO MÉNDEZ**

**Centro: UGC Microbiología. Sevilla.**

Las infecciones fúngicas han ido experimentando una progresiva mejoría de sus posibilidades terapéuticas, aunque siguen presentando una alta morbi-mortalidad debido a los múltiples factores que influyen en su tratamiento. El escaso número de antifúngicos disponibles condiciona un interés añadido al estudio de sensibilidad, desarrollándose distintos métodos para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los distintos antifúngicos, los que han demostrado ser reproducibles y fiables inter e intra laboratorio, además de tener cierta capacidad para detectar la resistencia *in vitro*.

La determinación de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) por técnicas de dilución en caldo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) y la variante europea EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) no son métodos aplicables para laboratorios clínicos ya que se trata de una técnica lenta y laboriosa, y dichos laboratorios deben hacer estudios de sensibilidad a diario y necesitan emitir una información rápida.

Para solucionar estos inconvenientes se han desarrollado métodos comerciales y algunas técnicas de difusión en agar (CLSI, M44-A para estudio de levaduras y M51-P para estudiar filamentosos), que presentan gran correlación con los procedimientos de referencia y son una alternativa rápida, práctica y barata para realizar estudios de sensibilidad a los distintos antifúngicos.

Entre los métodos comerciales que presentan una buena correlación con el método de referencia basados en microdilución se encuentran Sensititre YeastOne<sup>®</sup> (TREK Diagnostic Systems Ltd.) y Vitek 2 System<sup>®</sup> (BioMérieux) los cuales han demostrado en numerosos estudios buena correlación con el método de referencia, detectando la resistencia que presentan distintas especies a azoles y anfotericina B. Otras técnicas comerciales, basadas en métodos de difusión, son las tabletas Neosensitab<sup>®</sup> (Rosco Diagnostica) con el cual determinamos halos de inhibición y las tiras de E-test<sup>®</sup> (AB Biodisk) que nos proporcionan un valor de CMI (elipse de inhibición). El método de difusión en agar Neosensitab presentan como limitación una baja correlación la Anfotericina B. Otros métodos comerciales menos estudiados son el Fungitest (Bio-Rad), el ATB Fungus 2 (bioMérieux), ASTY (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co), el Mycostandard (Institut Pasteur, Paris, France), el Mycototal (Behring Diagnostic), el Candifast (International Microbiol) y el Integral System Yeasts (Liofilchem Diagnostics), todas estas técnicas muy poco utilizadas en laboratorios clínicos como técnica de rutina.

Para finalizar resaltar que todos los métodos descritos anteriormente han sido desarrollados para simplificar la complejidad y laboriosidad técnica que presenta el método de referencia, facilitando la emisión de un informe de sensibilidad rápido, fiable y abordable en la mayoría de laboratorios de microbiología clínica. También hay que destacar la necesidad de llegar a un consenso para establecer cuando está indicado realizar técnicas de sensibilidad a las muestras clínicas que se trabajan en un laboratorio clínico asistencial.

## PONENCIA 3

**Título:** Asociación antifúngicos: Métodos para determinar la actividad in vitro y aplicación clínica

**Autores:** E. Cantón

**Centro:** Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia

El tratamiento de las micosis sistémicas resulta complejo, sobretodo en pacientes inmunodeprimidos, donde se presentan con mayor frecuencia, debido entre otras causas al escaso numero de opciones terapéuticas, a los graves efectos adversos de algunos antifúngicos y a la aparición de resistencias. Aunque la mayoría de las infecciones fúngicas responden a la monoterapia, hay circunstancias en las que una combinación de antifúngicos puede resultar ventajosa como son las causadas por especies multirresistentes o aquellas que no responden al tratamiento estándar. Las razones para la asociación de antifúngicos son: ampliar el espectro de acción y potenciación de la actividad antifúngica, conseguir un efecto antifúngico más rápido, bajar las dosis con el fin de bajar la toxicidad, reducir el tiempo de tratamiento y disminuir el riesgo de seleccionar resistencias. Lo ideal es que los antifúngicos de la combinación tengan propiedades farmacológicas distintas o complementarias, diferente modo de acción o diferente diana y espectro de acción complementario. La combinación de dos o más antifúngicos puede producir interacciones que pueden ser sinérgicas cuando la mejora conseguida con la combinación es mayor a la suma de los antifúngicos individualizados. Antagónica cuando la actividad es menor que la obtenida con el antifúngico menos activo de la combinación e indiferente cuando el efecto obtenido es igual al del antifúngico más activo de la combinación.

La primera evidencia que confirma la actividad de una combinación de antifúngicos nos la proporciona los estudios in vitro, posteriormente esta eficacia se confirma con los estudios in vivo en modelos animales de infección fúngica y finalmente en pacientes. Los resultados de los estudios de la actividad in vitro de las combinaciones antifúngicas depende, entre otros factores, de los antifúngicos combinados y concentración de los mismos y de la metodología utilizada. Hasta el momento, no se dispone de un método estándar para su estudio. Los métodos disponibles para determinar la actividad in vitro de una combinación antifúngica son: Tablero de ajedrez, curvas de mortalidad, difusión en disco y Etest.

Tablero de ajedrez se basa en medir la CMI de un antifúngico A en presencia de otro antifúngico B. Los resultados de la asociación se pueden calcular numéricamente mediante la suma del índice de fracción de concentraciones (IFC) de cada antifúngico.  $IFC_A = CMI_A$  en presencia de B/ $CMI_A$  solo.  $IFC_B = CMI_B$  en presencia de A/ $CMI_B$  solo.  $\Sigma IFC = IFC_A + IFC_B$ . Interpretación: si  $\Sigma IFC < 0,5$  se define como sinergismo, (IFC( 0,5 - (4, indiferencia y si (IFC >4 antagonismo.

Curvas de mortalidad tiempo, consiste en determinar el numero de células viables a lo largo del tiempo obtenidos con los antifúngicos combinados y compararlo con el número de células viables obtenidos con los antifúngicos individualmente. Interpretación: sinergismo aumento de la mortalidad (2 log con respecto al antifúngico más activo; antagonismo, disminución de la mortalidad en (2 log con respecto al antifúngico menos activo de la combinación.

Difusión en disco en el que se mide el halo de inhibición producido por una combinación de antifúngicos depositada sobre un disco y comparalo con el producido por los antifúngicos individualmente.

Método de Etest (superposición de tiras). El efecto de la asociación se determina aplicando una tira de Etest de uno de los antifúngicos de la combinación sobre la superficie de la placa de medio de cultivo inoculada, dejar difundir el antifúngico, retirar la tira y sobre su huella situar la tira de Etest del otro antifúngico de la combinación. Interpretación es la misma que la del tablero de ajedrez.

Ninguno de los métodos mencionados esta estandarizado. El método de curvas de mortalidad es el que se utiliza como referencia, tiene el inconveniente de que es muy laborioso. Este método así como el de tablero de ajedrez son los recomendados para estudios de

investigación. El método de Etest puede ser idóneo para dar una respuesta rápida al clínico y también para hacer un escrutinio de las combinaciones.

En cuanto a los estudios in vivo en animales, se han utilizado diferentes criterios para valorar la efectividad de la combinación como son porcentaje de supervivencia, reducción de la carga fúngica en el órgano diana (riñón, cerebro, hígado, pulmón, etc.) así como diferentes animales coballa, rata, ratón, conejos y modelos de infección fúngica. Según los conocimientos actuales, una misma combinación de antifúngicos puede comportarse de manera sinérgica, antagónica o indiferente dependiendo de la especie, de la cepa, concentración absoluta y relativa de los antifúngicos combinados, del lugar y tipo de infección, del método y definiciones utilizadas.

En la actualidad, se dispone de pocos estudios prospectivos o retrospectivos en pacientes que prueben la eficacia de los tratamientos con una combinación de antifúngicos, la mayoría son experiencias clínicas o casos aislados o trabajos con muy pocos pacientes y en la mayoría no se incluyen los resultados in vitro. Analizando los resultados publicados de las interacciones antifúngicas se observa que in vitro el porcentaje de interacciones sinérgicas para *Aspergillus* spp. son del 36%, frente a un 14% in vivo; indiferentes 52% frente a un 71% in vivo y antagónicas 11% frente a un 14%.

En la presentación se discutirán las ventajas e inconvenientes y problemas de interpretación de cada método así como los resultados obtenidos in vivo.

## PONENCIA 4

**Título de la Ponencia:** “NUEVAS OPCIONES TERAPEÚTICAS EN LAS IFI”

**Autor:** Miguel Salavert Lletí

**Centro:** Unidad de Enfermedades Infecciosas; Hospital Univ. La Fe, Valencia.

### **Resumen de la ponencia:**

Las infecciones fúngicas invasoras (IFI) siguen siendo una importante causa de morbimortalidad, siendo la tasa de fallecimientos para la candidiasis invasora y candidemia del 25-50%, y de la aspergilosis invasora entre el 40-90%, dependiendo de la localización de la infección, del tipo de huésped (grado y estado neto de inmunosupresión) y de otros factores secundarios. Otros hongos “emergentes”, menos habituales, aún se caracterizan por tasas de mortalidad más altas, debido generalmente a su multirresistencia. En cualquier caso, de sobrevivir a una de estas IFI, las secuelas funcionales y orgánicas que quedan son también importantes y el retraso que generan en la prosecución de tratamientos ulteriores (quimioterapias, trasplantes, etc.) puede condicionar el pronóstico del enfermo. Aparte de la sospecha clínica más acelerada y acertada, de los métodos diagnósticos más precoces y precisos, y del mejor conocimiento patogénico, de la virulencia y determinantes de resistencia de estos hongos oportunistas e invasores, ¿qué más podemos hacer hoy, especialmente con el manejo terapéutico de estos pacientes con micosis invasoras?, ¿y qué podremos llevar a cabo en un futuro no muy lejano?. El tratamiento de cualquier IFI, especialmente en un enfermo crítico y/o inmunodeprimido, debe entenderse como una estrategia bélica completa e integral, en el sentido más amplio de una táctica estudiada y programada con aspectos complementarios y armónicamente articulados en cuanto a tiempo, momento y lugar. De entrada, no es sólo el tratamiento antifúngico “farmacológico” o “médico”, de entre cuyos agentes antimicóticos disponemos afortunadamente de más y mejores (en eficacia y seguridad) en la última década, sino de un plan de ataque o de contrarrestación basado en otras medidas terapéuticas adicionales y complementarias, como: la cirugía, los procedimientos instrumentales, las instilaciones locales, las nebulizaciones por vía inhalatoria, las inmunoterapias, la inmunofarmacología, la inmunomodulación de la inmunosupresión del huésped, los tratamientos combinados, la optimización PK/PD y el empleo de dosis altas de antifúngicos, y, ¿porqué no?, las vacunaciones en un futuro próximo con el fin de prevenir las infecciones.

Es esperado que sigamos disponiendo de nuevas moléculas antifúngicas y que varias de las familias tradicionales (polienos, azoles), así como de otras más recientes (candinas) podrán seguir ampliándose con productos novedosos y mejorados en cuanto a eficacia y perfil de seguridad. De manera definitiva, tendrán que confirmarse (o descartarse) en la práctica clínica agentes como isavuconazol, ravuconazol, albaconazol y otros triazoles, así como aminocandina (un lipopéptido emparentado con las equinocandinas). Aparte de estos y otros muchos en el pipeline, merece interés el desarrollo y conocimiento de nuevas dianas farmacológicas de interés terapéutico evidente, como pueden ser entre otras: *PRP8*: inteína Prp8, *PMA1*: ATPasa-H<sup>+</sup> membrana plasmática, *CDC68*: Factor de elongación de la transcripción, *VRG4*: transportador GDPmanosa aparato de Golgi, *CHS1*: sintetasa 1 de quitina, *NMT*: N-miristoiltransferasa, y *TFIIB*: factor de transcripción IIB de levaduras, *BOT1*: subunidad ribosoma mitocondrial, *CNA1/CNB1*: calcineurina A o B, *TOP1*: DNA topoisomerasa I, *RAM1*: homólogo subunidad βfarnesiltransferasa, *CGT1*: mRNA 5'guaniltransferasa; si bien las más importantes en el momento actual son la Inositol f-ceramidasintetasa, la 2,3 oxidoescualeno-l-ciclasa, la 1,3 B-glucano-sintetasa y el Factor elongación 2. Por tanto, será el momento de saber si finalmente podemos contar con familias de antifúngicos como las sordarinas, pradimicinas, dicationes aromáticos, nikomicina y la nistatina liposomal, de casi más de una década en fase de evaluación y ensayos, pero nunca bendecidas para dar el salto a la arena clínica. Por otro lado, será necesario recordar otros viejos antifúngicos, tal vez algo abandonados y que podrán tener, sobre todo en regímenes de combinación un *revival* merecido y justificado, como es el caso de la terbinafina y la 5-fluocitosina.

Especial consideración deberíamos tener con los pequeños péptidos antifúngicos catiónicos, tan ubicuitarios en el reino vegetal y animal, los cuales puede tener dianas específicas o ser

multifuncionales en su mecanismo de acción. Gracias a los recientes avances en ingeniería de proteínas y síntesis en fase sólida, se están realizando estudios sobre la utilidad potencial de péptidos seleccionados como antifúngicos eficaces con perfil de toxicidad asumible.

Gran relevancia cobrarán también los denominados tratamientos adyuvantes de las IFI con el fin de incrementar la respuesta inmunitaria específica, entre los que se incluirán citoquinas como el G-CSF/GM-CSF, el efungumab (Mycograb<sup>®</sup>) o molécula anti-HSP, la pentraxina 3 (una proteína de fase aguda de interés en aspergilosis), los agentes quelantes del hierro más modernos (como deferaxirox, de gran valor en zigomicosis), la lactoferrina (una proteína fijadora de hierro con actividad frente a *Candida Aspergillus*), el omiganan (de interés en biofilms y catéteres) y las estatinas con propiedades inhibitoras del crecimiento fúngico. Aunque ninguno de estos agentes está aprobado todavía para el tratamiento actual de las IFI, algunos puede que lleguen a ver la luz futura como opciones de tratamiento antimicótico en combinación con los antifúngicos oficiales y establecidos.

**Palabras Clave:** IFI, antifúngicos, azoles, candinas, polienos, inmunoterapia

## **MESA REDONDA I I. SEM2**

### **PONENCIA 1**

**Título:** BIOQUÍMICA DEL SEXO EN *PHYCOMYCES*

**Autores:** ENRIQUE CERDÁ OLMEDO

**Centro:** Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

El nombre de los cigomicetos alude a su vida sexual, descubierta hace más de cien años en experimentos con *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Mucor* y otros hongos del orden Mucorales (ahora subfilo Mucormicotina). En estos hongos hay dos sexos y entre individuos de distinto sexo, antes de llegar a tocarse, se dan dos interacciones principales: la formación de cigóforos, estructuras iniciales del ciclo sexual, y el aumento de la producción de caroteno, que es el fundamento de una industria biotecnológica. Las investigaciones que siguieron dieron lugar a algunos conceptos generales de la Genética, pero los procesos citológicos y genéticos y la naturaleza de sus productos han seguido siendo misteriosos. Las mucormicosis, usualmente asociada a inmunodepresión, son producidas por algunos de estos hongos capaces de crecer a 37°.

Las investigaciones recientes de nuestro grupo de Sevilla han perseguido tres objetivos: la mejora genética de la producción de caroteno y su aplicación industrial; el conocimiento de los procesos genéticos que dan lugar a la recombinación; y, con ayuda del Prof. Fernández Barrero, catedrático de Química Orgánica en Granada, y sus colaboradores, la identificación de las señales que intercambian los micelios durante la interacción a distancia.

Los tres aspectos serán presentados y discutidos brevemente en el curso de la conferencia

## PONENCIA 2

**Título:** REGULACIÓN DE XILANASAS Y OTRAS HIDROLASAS FÚNGICAS

**Autores:** MARGARITA OREJAS

**Centro:** Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Los hongos filamentosos son capaces de utilizar materia orgánica vegetal en descomposición, que con frecuencia es la fuente de carbono de mayor disponibilidad. La mayor parte de este material vegetal consiste en paredes celulares de plantas, que se componen principalmente de los polisacáridos celulosa, hemicelulosa (p.e. xilanos) y pectina (p.e. ramnogalacturonanos), además de cantidades variables de proteína y lignina. Dado que éstos no pueden ser asimilados directamente por dichos microorganismos, los polisacáridos son degradados en el medio extracelular por medio de complejos enzimáticos cuya composición se ajusta a la naturaleza de los mismos; de manera que la utilización de estas fuentes de carbono está estrictamente regulada por mecanismos que operan fundamentalmente a nivel transcripcional. Así, los genes codificantes de dichas actividades enzimáticas se activan en presencia de estos polímeros o de azúcares monoméricos (p.e. xilosa y ramnosa) derivados de los mismos, y se reprimen en las condiciones en las que las enzimas que codifican no son necesarias. En esta regulación intervienen tanto factores transcripcionales de amplio dominio como reguladores específicos.

La degradación del xilano tiene un interés considerable en varias aplicaciones biotecnológicas, principalmente en la industria del papel, y también en las industrias alimentaria y de producción de piensos. Muchos hongos filamentosos, fundamentalmente pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, se utilizan para la producción de enzimas xilanolíticas, y algunos de los correspondientes genes codificantes han sido caracterizados. El sistema xilanolítico de *Aspergillus nidulans* consta de al menos tres xilanasas y una beta-xilosidasa, codificadas respectivamente por los genes *xlnA*, *xlnB*, *xlnC* y *xlnD*. La actividad de estos genes está controlada, a nivel transcripcional, por al menos tres proteínas reguladoras: (i) CreA, que reprime su expresión en presencia de glucosa, (ii) XlnR, que activa específicamente su expresión cuando xilano o xilosa son la fuente de carbono; y (iii) PacC, que los regula de manera diferente en función del pH ambiental; mientras que la expresión del gen *xlnA* es mayor a pH alcalino y más aún en fondos genéticos mutantes *pacC<sup>c</sup>* (mimetizan las condiciones de crecimiento a ese pH), la expresión de *xlnB* es mayor en medios ácidos y más aún en fondos genéticos mutantes *pacC<sup>+/-</sup>* o *pal* (mimetizan el crecimiento a pH ácido). Éstos y otros resultados indican que los promotores de los genes *xlnA* y *xlnB* pueden ser una buena alternativa para la expresión de genes heterólogos y además muestran distintas estrategias encaminadas a la mejora genética de cepas para la sobreproducción de enzimas. Además, se han estudiado los perfiles de proteínas de distintas cepas de *A. nidulans* crecidas en xilano o xilosa y a distintos pHs para identificar nuevas enzimas implicadas en la degradación del xilano.

## PONENCIA 3

**Título: PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE MICELIO DEL HONGO *MUCOR CIRCINELLOIDES***

**Autores:** VICTORIANO GARRE

**Centro:** Dpto. Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia

### **Resumen:**

**Introducción.** La disminución de reservas de petróleo y el previsible incremento de su consumo en el futuro hacen necesario el desarrollo de estrategias para la producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables. Entre los biocombustibles que se han considerado destacan el bioetanol y el biodiésel. No obstante, el biodiésel ofrece una serie de ventajas frente al bioetanol, siendo las más importantes su mayor estabilidad durante el transporte y almacenamiento, su mayor contenido energético y el hecho de que pueda ser utilizado por los motores actuales. Actualmente, el biodiésel, ésteres metílicos derivados de los ácidos grasos, se obtiene principalmente a partir de aceites vegetales. Aunque ésta representa una fuente adecuada, sobre todo por el reciclaje de aceites usados, no parece la más idónea para la producción de biodiésel a gran escala, por la limitación en la cantidad de aceite disponible para su transformación en biodiésel. Una fuente alternativa de lípidos susceptibles de ser transformados en biodiésel son los microorganismos, concretamente, aquéllos que muestran una importante capacidad de acumular estos lípidos y que, además, pueden manipularse genéticamente para mejorar u optimizar su acumulación. Partiendo de esta idea, el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE) ha secuenciado genomas de organismos que pudieran ser importantes en la producción de biocarburantes, entre los que se encuentra el hongo *Mucor circinelloides*. Las estirpes silvestres de laboratorio de este hongo acumulan entorno a un 25% de lípidos, la mayor parte de ellos convertibles en biodiésel. No obstante la viabilidad de la utilización de la biomasa de *Mucor* como materia prima en la producción de biodiésel pasa por demostrar que sus lípidos son transformados en biodiésel de alta calidad mediante procedimientos aplicables a nivel industrial, así como por incrementar la acumulación de lípidos. El primer aspecto está siendo estudiado por el grupo de la Dra. Gemma Vicente (Universidad Rey Juan Carlos). Este grupo ha desarrollado un procedimiento basado en catálisis ácida, que permite transformar directamente los lípidos de *Mucor* en biodiésel, sin necesidad de purificación previa de los mismos, lo que debe redundar en una reducción en los costes de producción. El biodiésel obtenido a partir del micelio de *Mucor* cumple la mayor parte de las especificaciones de la normativa europea sobre biocarburantes (EN 14213 y 14214), sugiriendo que podría ser utilizado como tal.

**Resultados y conclusiones.** El trabajo realizado en nuestro laboratorio está encaminado a generar estirpes de *Mucor* mediante ingeniería genética que acumulen elevados niveles de lípidos convertibles en biodiésel. El primer problema que se ha resuelto ha sido la acumulación de carotenos, ya que estos acaban contaminando el biodiésel. Así, se han generado estirpes que no acumula carotenos y que presenta niveles ligeramente más altos de lípidos (entorno al 28%) que la estirpe silvestre, siendo más del 98% de los lípidos convertibles en biodiesel. Con el objetivo de incrementar aún más los niveles de lípidos, se han generado estirpes que no producen carotenos y que sobreexpresan el gen *malA* (enzima málico) de *Mucor*, que se considera un paso limitante en la acumulación de lípidos. Para la generación de estas estirpes se ha integrado una copia del gen *malA*, bajo el control de un promotor constitutivo, en el gen carotenogénico *carRP*. A pesar de los elevados niveles de actividad de la enzima málico en estos transformantes, no se observa un incremento en la acumulación de lípidos, sugiriendo que debe existir otro paso limitante. Uno de los factores que se cree que controlan la acumulación de lípidos totales en *Mucor* es la acumulación de un ácido graso concreto, el ácido gamma-linolénico, ya que elevados niveles de este ácido graso correlacionan con bajos niveles de lípidos totales. De acuerdo con esta hipótesis, se están generando estirpes que acumulen bajos niveles de ácido gamma-linolénico mediante la interrupción dirigida del gen que lleva a cabo el último paso de su síntesis (delta-6-desaturasa). Los datos concretos sobre la acumulación de lípidos de estas estirpes se presentarán en esta ponencia.

**Palabras Clave** Enzima málico, lípidos, integración génica, interrupción génica.

## PONENCIA 4

**Título: REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS FÚNGICOS**

**Autores:** JUAN-FRANCISCO MARTÍN\*, KATARINA KOLSAKOVÁ, RAMÓN OVIDIO GARCÍA-RICO, FRANCISCO FIERRO AND CARLOS GARCÍA-ESTRADA

**Centro:** Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC)

### Resumen

Regulatory mechanisms that control the biosynthesis of secondary metabolites in fungi are of utmost interest. Heterotrimeric G binding proteins (G proteins) are key elements of signal transduction pathways in eukaryotes. G proteins are composed of three subunits:  $\alpha$  and  $\beta$ , which remain inactive in the heterotrimeric state bound to a G protein-coupled receptor (GPCR), with a GDP molecule bound to the  $\alpha$  subunit. The  $\alpha$  subunit exchanges GDP by GTP and dissociates from the  $\beta\gamma$  dimer upon signal-mediated activation of the GPCR. Both the  $\alpha$  subunit and the  $\beta\gamma$  dimer become then active and will independently interact with downstream effectors.

We cloned the G $\alpha$ -encoding gene (*pga 1*) of *P. chrysogenum*. The dominant activating *pga1*<sup>G42R</sup> mutation caused an increase in the production of the three secondary metabolites: penicillin, the yellow pigment chrysogenin and the mycotoxin roquefortine, whereas the dominant inactivating *pga1*<sup>G203R</sup> allele and the deletion of the *pga1* gene resulted in a decrease of the amount of penicillin and roquefortine produced. Production of the yellow pigment Chrysogenin is clearly enhanced by the presence of the dominant activating *pga1*<sup>G42R</sup> allele. Roquefortine is produced associated to mycelium during the first three days in submerged cultures, and is released to the medium afterwards. Dominant activating and inactivating *pga1* mutations result in upregulation and downregulation of roquefortine biosynthesis respectively. Pga1 regulates penicillin biosynthesis by controlling expression of the three penicillin biosynthetic genes *pcbAB*, *pcbC* and *penDE*. Elevated transcript levels in transformants expressing the *pga1*<sup>G42R</sup> allele, whereas in transformants with the inactivating *pga1*<sup>G203R</sup> allele and in the *pga1*-deleted mutant their transcript levels were lower than those in the parental strains. In summary, the dominant activating *pga1*<sup>G42R</sup> allele upregulates to a different extent the biosynthesis of three secondary metabolites in *Penicillium chrysogenum*.

Another important control is exerted by regulators of heterochromatin organization. The three genes (*pcbAB*, *pcbC*, *penDE*) encoding enzymes of the penicillin pathway in *Penicillium chrysogenum* are clustered, but no penicillin pathway-specific regulators have been found in the penicillin gene cluster. The biosynthesis of this  $\beta$ -lactam is controlled by global regulators of secondary metabolism rather than by a pathway specific regulator. We have identified the gene encoding the secondary metabolism global regulator LaeA in *P. chrysogenum* (PcLaeA), a nuclear protein with a methyltransferase domain. The *PcLaeA* gene is present as a single copy in the genome of low and high penicillin producing strains and is not located in the 56.8-kb amplified region occurring in high penicillin producing strains. Overexpression of the *PcLaeA* gene gave rise to a 25 % increase in penicillin production. *PcLaeA* knock-down mutants exhibited drastically reduced levels of penicillin gene expression and antibiotic production and showed pigmentation and sporulation defects, but the levels of roquefortine C produced and the expression of the *rpt* gene involved in roquefortine biosynthesis remained similar to those observed in the wild-type parental strain. The lack of effect on the synthesis of roquefortine is probably related to the chromatin arrangement in the low expression roquefortine promoters as compared to the bidirectional *pcbAB-pcbC* promoter region involved in penicillin biosynthesis. These results evidence that PcLaeA not only controls some secondary metabolism gene clusters, but also asexual differentiation in *P. chrysogenum*.

- García-Rico, R.O., Fierro, F., Mauriz, E., Gómez, A., Fernández-Bodega, M.A., Martín, J. F. (2008). Microbiology 154: 3567-3578.

- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R. V., Godio, R. P., Feltrer, R., Teijeira, F., Mauriz, E., Martín, J. F. (2009). *Biochimie* 91: 214-225.

***Palabras Clave:* Fungi, secondary metabolites, biosynthesis, regulation,  $\beta$ -lactams**

## **MESA REDONDA III. AEM3**

### **PONENCIA 1**

**Título:** *Infecciones fúngicas endémicas: situación actual en España*

**Autores:** *María José Buitrago.*

**Centro:** *Servicio de Micología. ISCIII. Madrid*

Las micosis endémicas (histoplasmosis y paracoccidioidomicosis) han aumentado en Europa en los últimos años debido fundamentalmente al aumento de la población procedente de regiones endémicas así como al aumento de los viajes a dichas regiones. En concreto, en España, la población inmigrante procedente de Sudamérica representa el 38% del total de inmigrantes y, además, un millón de españoles visitan áreas tropicales y ecuatoriales cada año. En regiones no endémicas, el diagnóstico de ambas enfermedades puede retrasarse debido a la falta de experiencia, a los largos periodos de latencia y a que los síntomas pueden imitar a otras enfermedades como tuberculosis o sarcoidosis. La histoplasmosis es la más frecuente en Europa y también en España. En viajeros, inmunocompetentes, esta enfermedad suele aparecer en grupos de individuos que han estado expuestos a una fuente común de infección asociada con alguna actividad al aire libre, visitas a cuevas, tareas de reconstrucción etc... En población inmigrante, los casos más frecuentes corresponden a histoplasmosis diseminada en pacientes HIV+. Respecto a la paracoccidioidomicosis (PCM), muy poco frecuente en Europa, también ha empezado a aparecer en los últimos años en nuestro país, asociada a inmigración procedente de Sudamérica.

En concreto, en los últimos cinco años en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología (Madrid) se analizaron 52 casos de histoplasmosis importada y seis casos de PCM. Entre los casos de histoplasmosis, nueve se clasificaron como de histoplasmosis probable y correspondían a viajeros. Los 43 casos restantes eran inmigrantes de los cuales 41 se clasificaron como histoplasmosis probada. Los casos de PCM se clasificaron todos como probados aunque el diagnóstico clínico inicial en la mayoría de ellos fue erróneo debido a la falta de sospecha. El diagnóstico microbiológico se realizó mediante métodos clásicos y moleculares, empleando una PCR en Tiempo Real específica para cada microorganismo. En conclusión, estas micosis importadas son vez más frecuentes en España y su diagnóstico es difícil debido a la falta de experiencia del personal sanitario y también a la falta de sospecha de estas enfermedades en áreas no endémicas.

## PONENCIA 2

**Título: NUEVOS ASPECTOS DE LA DERMATOFITOSIS.**

**Autores** M<sup>a</sup> Soledad Cuétara<sup>1</sup>

**Centro** <sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganes, Madrid

### **Resumen:**

Las dermatofitosis o tiñas son infecciones superficiales de piel, pelos y uñas causadas por dermatofitos (especies queratinofílicas procedentes de los géneros *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*) y que pueden clasificarse según localización anatómica en *tinea capitis*, *tinea faciei*, *tinea barbae*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea pedis*, *tinea manuum* y *tinea unguium*.

Los hongos dermatofitos son ubicuos y no hay ninguna zona geográfica ni ninguna población que no esté expuesta a ellos, aunque algunas especies tienen distribución geográfica limitada. El aumento de la inmigración en los últimos 20 años ha llevado consigo la aparición de cambios epidemiológicos ligados a este hecho, que se circunscriben especialmente a algunas dermatofitosis, como la *tinea capitis*. Resurgen especies que estaban erradicadas en nuestro país desde hace 50 años tales como *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum* y *Microsporum audouinii*, observándose en población inmigrante procedente del Caribe, América del Sur y especialmente de África y además como consecuencia directa del contacto estrecho con esta población inmigrante, han emergido en población autóctona.

La dermatofitosis es una enfermedad antigua y aunque los primeros casos descritos en la literatura datan de 1800, continua siendo una de las infecciones fúngicas más comunes en el mundo, que afecta a millones de individuos al año y contribuye a un enorme coste económico (no solo en antifúngicos sino en el tiempo empleado en visitas al médico y en el absentismo laboral y escolar).

La prevalencia de las dermatofitosis en la población general, no es bien conocida, ya que aunque se trata de dermatitis infectocontagiosas no es de declaración obligatoria en la gran mayoría de los países, aunque existen excepciones como la zona de Europa Central, donde las dermatofitosis debidas a *Microsporum canis* son de declaración obligatoria. También es cierto que dicha prevalencia varía en función del país, del tiempo y de distintos factores como: la ecología de las especies, el clima, el nivel sociocultural, la nutrición, los hábitos de higiene e incluso la inmunidad. La mayor parte de los estudios sobre prevalencia están hechos en poblaciones seleccionadas que acuden al médico o dermatólogo por su sintomatología. Se estima que de un 10 a un 20% de la población mundial está infectada por hongos dermatofitos. En nuestro país disponemos de escasos estudios epidemiológicos realizados en población de riesgo de *tinea capitis* y *tinea unguium*.

La infección se adquiere tras contacto con partículas infectivas de forma directa (de hombre o animal, enfermo o portador asintomático) o indirectamente por fomites (peines, sombreros, toallas, muebles y enseres domésticos). En condiciones adversas (calor y desecación) los artroconidios, pueden persistir durante años sobre todo si el ambiente es húmedo como duchas, piscinas etc y especialmente si se encuentran en material descamado y pelos. Los artroconidios tienen mayor capacidad de adherencia a los corneocitos.

La transmisión de especies antropófilas está bien documentada, por ejemplo en las minas de carbón hasta el 65% de los trabajadores se encuentran habitualmente infectados en los pies por la utilización de baños comunes, situación que también sucede en colegios, cuarteles y usuarios de piscinas. Es frecuente que el reservorio de especies antropófilas sean portadores asintomáticos, citándose clásicamente los espacios interdigitales de los pies y el cuero cabelludo de niños y de adultos en estrecho contacto con casos índice de *tinea capitis*.

El estado de portador asintomático de especies zoófilas, constituye un reservorio infectivo importante en el periodo postratamiento tras la curación clínica. Sin embargo, estos portadores asintomáticos aunque resultan ser un reservorio de infección, en general, si son seguidos micológicamente alcanzan generalmente la curación micológica.

Quizas la principal tarea del clínico es establecer un diagnóstico preciso y determinar el patógeno, con lo que el diagnóstico micológico debería ser siempre empleado antes de la instauración de un tratamiento antifúngico, especialmente en aquellos casos donde es obligado el tratamiento oral (tinea capitis, tinea unguium, formas crónicas, extensas o rebeldes de afectación de la piel glabra).

El éxito del diagnóstico de laboratorio parte sin lugar a dudas de una adecuada toma de muestras, un examen directo y un cultivo. El examen directo nos permite el diagnóstico de presunción y un tratamiento precoz, mientras que el cultivo nos permite el diagnóstico de confirmación y la identificación a nivel de especie. Esto último nos llevará a establecer no solo la fuente de contacto sino a la elección del tratamiento antifúngico. Una gran parte de fracasos terapéuticos se debe a un diagnóstico incorrecto y por consiguiente a un tratamiento no indicado.

Las dermatofitosis no tienen curación espontánea y por consiguiente es necesario establecer un tratamiento específico así como medidas preventivas para evitar la transmisión y recaídas.

Sin lugar a dudas, el descubrimiento en 1959 de la griseofulvina y su uso en países desarrollados, supuso un avance en el tratamiento de esta enfermedad (concretamente de la *tinea capitis* y afectación de piel glabra); sin embargo, continua siendo un importante problema de salud en países en desarrollo, donde la *tinea capitis* es endémica. En la actualidad en países como el nuestro, las dermatofitosis que continúan siendo un reto, tanto para el clínico como para el micólogo, son la *tinea unguium* y la *tinea pedis crónica* pues pese a la incorporación de triazoles (itraconazol y fluconazol) y de las alilaminas (terbinafina) con un excelente perfil de seguridad, mejores tasas de curación y la posibilidad de empleo de pautas cortas que permiten no solo reducir el coste sino facilitar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente, la respuesta al tratamiento de ambas formas clínicas sigue siendo insatisfactoria (menos del 50% de las tineas unguium responden).

Todavía no está disponible el antifúngico ideal para el tratamiento de las dermatofitosis. Teóricamente el antifúngico ideal debería ser: fungicida, muy queratinofílico y lipofílico permaneciendo prolongadamente en el estrato córneo de la piel, uñas y pelo y eficaz en bajas concentraciones tisulares. Debería utilizarse con pautas de tratamiento cortas, puesto que el cumplimiento es mayor y esta disponible en solución para facilitar el tratamiento de niños e inmunosuprimidos. Además debería tener un bajo porcentaje de recaídas postratamiento, bajo coste, buena tolerancia y baja incidencia de efectos adversos e interacciones.

**Palabras Clave:** Dermatofitosis, tineas, prevalencia, cambios etiológicos, opciones terapéuticas, fracasos terapéuticos

## PONENCIA 3

**Título:** Otras infecciones fúngicas emergentes

**Autores:** Carmen Rubio

**Centro:** Serv. Microbiología. Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" Zaragoza

### Resumen:

Se describen agentes etiológicos de micosis cuya frecuencia de aislamiento es cada vez mayor, por lo que se consideran "emergentes". Son patógenos oportunistas que han "aprovechado" diversas circunstancias que pueden resumirse en 2 apartados:

1.-Existe mayor número de huéspedes susceptibles para que puedan desarrollarse.

Huéspedes "adecuados" son aquellos que sobreviven debido a los avances de la Medicina en general y la Cirugía en particular, existencia de UCIs, donde se recuperan pacientes que antes fallecían, avances en la terapia antibacteriana así como en la quimioterapia oncológica y oncohematológica que permite la curación de pacientes que antes no tenían solución. Esto ha dado lugar a una mayor supervivencia de individuos, pero se ha creado una población de pacientes susceptibles a especies fúngicas que, una vez han colonizado, pueden causar lesiones graves. Son patógenos porque aprovechan la "oportunidad" que les brinda el fallo en la respuesta inmune. A ese grupo de pacientes hay que añadir los con SIDA o VIH+, cuya característica es, precisamente, el fallo en la respuesta inmune por la acción de un retrovirus.

2.-Los intensos tratamientos con antifúngicos han seleccionado cepas, especies, géneros u otro nivel taxonómico, resistentes. Estos han sustituido a los sensibles, al llenar el vacío ecológico creado por la presión selectiva de esas moléculas. Algunos ejemplos: *Candida lusitanae* R a Anfotericina B, *Candida krusei* R a Fluconazol, *Candida glabrata* R a los azoles, *Aspergillus spp* R a Fluconazol, *Aspergillus terreus* a Anfotericina B, *Scedosporium prolificans* R a Anfotericina B y *Mucorales*, resistentes a azoles, (Excepto Posaconazol) y Echinocandinas

Las micosis más frecuentes en nuestro medio son las Candidosis (42%) y Aspergilosis (29%), entre transplantados de órgano sólido y oncohematológicos (L Kauffman CID, 42 Sppl 1 2006). La fuente de infección más frecuente de la candidemia es el tracto gastrointestinal, según Nucci y Anaissie (CID, 2000), basado en experimentos, en sanos, administrando  $10^{12}$ /ml, lev, vía oral. Estos desarrollan elevado % de candidemia y candiduria comprobando, mediante tipado molecular (RFLP y REA), son la misma cepa. La segunda puerta de entrada sería la piel y no mencionan la localización vaginal.

La adquisición de aspergilosis, a nivel hospitalario, además de la conocida transmisión aérea: propágulas/conidias.  $10-10^4$  ufc/m<sup>3</sup>, puede producirse por el agua hospitalaria (Hospital water system) que puede llegar a tener 2,9 ufc/m<sup>3</sup> y, por tipado molecular, comprueban son idénticas a las aisladas en los pacientes (E Anaissie, Rex, Walsh, et al CID 2002).

Entre las especies de Mucorales más frecuentes causantes de patología humana tenemos: *Rhizopus arrhizus (oryzae)* el más frecuente productor de mucormicosis, 60% de las totales y 90% de la rinocerebral, seguido de: *Rhizopus microsporus var rhizopodiformis*, *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Mucor circinelloides*, *Rhizomucor pusillus*, *Saksenaia vasiformis*, *Syncephalastrum racemosum*

De los dematiaceos : *Alternaria alternata*, *Cladosporium spp* y otros, forman parte de la lista de causantes de feohifomicosis en cuanto a los hialohifomicetos hay que destacar los que desarrollan forma tisular unicelular : *Acremonium falciforme*, *A. kiliense*, *A. strictum*, *Fusarium moniliforme*, *F oxysporum*, *F solani*, *Paecilomyces lilacinus*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*.,pues tienen más facilidad para pasar a sangre y su aislamiento es posible que de *Aspergillus spp*

**Palabras Clave:** Candosis, Aspergilosis, Inmunodeprimidos, Hongos oportunistas emergentes

## MESA REDONDA III. SEM3

### PONENCIA 1

**Título:** MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN EL HONGO *Botrytis cinerea* A TRAVÉS DEL ESTUDIO DE SU PROTEOMA Y SECRETOMA

**Autores:** F. J. FERNÁNDEZ-ACERO, C. GARRIDO, M. CARBÚ, V.E. GONZÁLEZ, J. M. CANTORAL\*

**Centro:** Laboratorio de Microbiología. CASEM. Universidad de Cádiz.

#### **Resumen:**

La proteómica se ha revelado como una importante tecnología emergente, no obstante, aun son escasas las aportaciones de estas técnicas a la biología de los hongos fitopatógenos. Entre estos organismos cabe destacar *Botrytis cinerea*, patógeno responsable de la podredumbre gris en el cultivo de vid. Nuestro grupo viene desarrollando distintas aproximaciones proteómicas para dilucidar las proteínas implicadas en el ciclo infectivo de *B. cinerea*. Se ha determinado el proteoma en distintas condiciones de inducción de patogenicidad, así como su secretoma. Estos estudios han aportado pruebas de la validez de la proteómica para determinar nuevos factores de patogenicidad. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la utilidad de esta técnica para estudiar la biología básica del hongo, así como determinar los mecanismos de patogenicidad empleados por estos organismos para causar enfermedades en los cultivos.

#### **INTRODUCCIÓN:**

Nuestro grupo de investigación ha venido realizando distintas aproximaciones al proteoma de *B. cinerea*. Este hongo es capaz de infectar más de 200 plantas distintas, entre las que se incluyen, el tomate, la fresa y la vid, cultivos de una gran importancia económica en nuestra comunidad andaluza. En el año 2006 realizamos la primera aproximación al proteoma del hongo mediante la aplicación de la electroforesis bidimensional (Fernández-Acero *et al.*, 2006), dicho estudio se ha continuado con el estudio diferencial entre proteomas de cepas de *B. cinerea* con distinta virulencia (Fernández-Acero *et al.*, 2007a) y la realización del primer estudio en profundidad que permitiera el establecimiento del primer mapa proteómico de *B. cinerea*, con la identificación de más de 300 proteínas (Fernández-Acero *et al.*, 2009).

*B. cinerea* utiliza un amplio arsenal para completar su ciclo infectivo. Entre los recursos de los que dispone el hongo se incluyen la producción de toxinas, las cuales parecen modular la distinta virulencia entre cepas; y la producción de especies activas de oxígeno. Pero el principal mecanismo de infección utilizado por el hongo consiste en la producción y secreción de un complejo conjunto de proteínas (secretoma) capaz de transformar la biomasa vegetal en biomasa fúngica, jugando un papel crucial durante la penetración y maceración de los tejidos vegetales.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

##### **- Cultivo y extracción de proteínas de *B. cinerea*. Electroforesis bidimensional (2-DE)**

La cepa *B. cinerea* 2100 fue obtenida de la Colección Española De Cultivos Tipo ([www.cect.org](http://www.cect.org)). El procedimiento de cultivo se realizó según Fernández-Acero *et al.* (2009). Se preparó medio mínimo salino (MSM) que fue suplementado con 1% de la fuente de carbono a ensayar glucosa, pectina, almidón, celulosa (CMC) y paredes celulares de tomate (TCW) desproteinizadas, en tres replicas independientes. Después de 5 días de cultivo (22°C, 180 rpm), el caldo fue filtrado y centrifugado para retirar el micelio. El extracto proteico fue obtenido mediante un método mejorado de precipitación con TCA/DOC, seguido de otra precipitación con fenol. La separación mediante 2-DE se realizó según Fernández-Acero *et al.* (2009).

##### **- Análisis e identificación de las proteínas**

Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con SYPRO Ruby (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) y fueron visualizados mediante un Fuji FLA 3000 Fluorescence Laser Scanner (Fuji, Photofilm Co. Ltd., Tokyo, Japan). Los spots de interés fueron digeridos e identificados según Fernández-Acero *et al.* 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Desde el año 2004 el grupo de Microbiología de la Universidad de Cádiz ha venido realizando aportaciones en el campo de la proteómica fúngica, trabajando con *B. cinerea*. Se realizó y publicó la primera descripción del proteoma de *B. cinerea*. La naturaleza inédita del trabajo hizo necesaria la optimización de todo el proceso, desde la extracción de las proteínas hasta la identificación de las mismas (Fernández-Acero *et al.*, 2006). Poco tiempo después, se realizó el primer estudio de proteómica diferencial con *B. cinerea* (Fernández-Acero *et al.*, 2007b). En dicho estudio se planteó la comparación de los proteomas de dos cepas de *B. cinerea* con distinta virulencia, una de ellas muy virulenta y productora de toxinas (botridial y dihidrobotridial), mientras que la otra presentaba una menor virulencia, así como una nula producción de dichas toxinas. De esta primera comparación entre ambos proteomas, se seleccionaron aquellas proteínas específicamente representadas en cada una de las cepas candidatas así como aquellas sobreexpresadas en la cepa de mayor virulencia.

Recientemente, en colaboración con el grupo de proteómica (MS Group) del Instituto Max Planck “for plant breeding research” (MPIZ) de Colonia, Alemania se desarrolló el primer mapa proteómico de *B. cinerea* durante la degradación de la celulosa. Se identificaron por primera vez un número significativo de proteínas, realizándose la clasificación funcional (PANTHER: Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; [www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)) de las mismas utilizando dos criterios, el proceso biológico y su función molecular. Debido a que la celulosa es uno de los principales componentes de la pared celular de las plantas, muchas de las proteínas identificadas juegan un papel crucial durante la patogénesis del hongo (Fernández-Acero *et al.*, 2009). Además, también en colaboración con el Instituto Max Planck (MPIZ) de Colonia, se ha desarrollado el análisis del secretoma de *B. cinerea*. Se optimizó la inducción de la patogenicidad fúngica mediante la adición de distintos elicitores vegetales. Esta inducción varió entre la treintena de spots proteicos detectados en estado de reposo (usando glucosa) hasta el centenar en estado de patogenicidad inducida (utilizando extractos vegetales). En este estudio se identificaron más de 70 proteínas, describiéndose la mayoría de las actividades que para este tipo de proteínas están descritas en la base de datos de factores de virulencia y patogenicidad “phi-pathogen”. A partir de este trabajo se han identificado aquellas proteínas implicadas en los estadios iniciales del ciclo infectivo, las cuales están siendo estudiadas para comprobar su uso como herramienta de diagnóstico.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la utilidad de esta técnica para estudiar la biología básica del hongo, así como, determinar los mecanismos de patogenicidad empleados por estos organismos para causar las enfermedades en los cultivos. Un estudio sistemático del proteoma de aquellos hongos fitopatógenos que más duramente afecten a la agricultura (*B. cinerea*, *Colletotrichum* spp., etc.), aparte de aclarar su funcionamiento vegetativo, nos permitirá conocer con detalle las proteínas causantes de los síntomas de la enfermedad, conocidas como factores de patogenicidad/virulencia. Aprovechando la experiencia previa del grupo, esta información será de utilidad para diseñar nuevas estrategias de control que permitan la inhibición selectiva de estos factores, impidiendo el desarrollo de la enfermedad. Además, también será de aplicabilidad para el diseño y posterior patente de nuevas estrategias de diagnóstico, que permitan un control exhaustivo del material vegetal utilizado, así como un correcto estudio de la epidemiología, origen y fuentes de inóculo en estos patógenos.

## BIBLIOGRAFÍA

Fernández-Acero *et al.* 2006. *Proteomics* 6, S88-S96.

Fernández-Acero *et al.* 2007a. *Archives of Microbiology* 187, 207–215.

Fernández-Acero *et al.* 2007b. *Current Proteomics* 4, 79-88.

Fernández-Acero *et al.* 2009. *Proteomics* 9, 2892-2902.

**Palabras Clave:** *Botrytis cinerea*, hongos fitopatógenos, proteómica , virulencia, secretoma

## PONENCIA 2

**Título:** REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN *FUSARIUM*

**Autores:** JAVIER AVALOS\*, M. CARMEN LIMÓN, ALEJANDRO F. ESTRADA, ROBERTO RODRÍGUEZ-ORTIZ, VIOLETA DÍAZ-SÁNCHEZ, JORGE GARCÍA-FERNÁNDEZ Y MARTA CASTRILLO

**Centro:** Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

### Resumen:

Las especies del género *Fusarium* poseen gran importancia en las áreas de la fitopatología y el metabolismo secundario. En este último campo destacan por la diversidad de metabolitos producidos, algunos de interés biotecnológico por sus aplicaciones y otros de interés sanitario por sus efectos perniciosos para la salud. Una especie de particular interés es *Fusarium fujikuroi*, anteriormente conocida como grupo de cruzamiento C del complejo *Gibberella fujikuroi*. Esta especie destaca por su capacidad de producir giberelinas (1), hormonas vegetales estimuladoras del crecimiento. Los hongos del género *Fusarium* producen también carotenoides (1), como la neurosporaxantina y el toruleno, que comparten con las giberelinas su origen en la ruta de los terpenoides. Además, *F. fujikuroi* produce otros metabolitos de la familia de los policétidos, como las bicaverinas (1, 2), pigmentos con actividad antibiótica frente a protozoos y otros organismos, y las fusarinas (1), micotoxinas con propiedades mutagénicas. Esta comunicación revisa los resultados alcanzados en la regulación de las síntesis de estos compuestos en este hongo, así como sus posibles interconexiones.

La principal señal reguladora del metabolismo secundario en *F. fujikuroi* es la disponibilidad de nitrógeno. Nuestros experimentos de transferencia de cultivos muestran que la desaparición brusca del nitrógeno del medio produce la estimulación de la síntesis de giberelinas, bicaverinas y, en menor medida, de carotenoides. La regulación tiene lugar probablemente a nivel de transcripción, como sugieren el correspondiente aumento en los niveles de ARNm de genes para enzimas clave de las tres rutas. La estimulación es duradera en el caso de la síntesis de giberelinas, y transitoria en el caso de las síntesis de bicaverinas y carotenoides, lo que indica diferencias en los mecanismos de regulación. Por el contrario, resultados recientes muestran que la presencia de nitrógeno en el medio es necesaria para la síntesis de fusarinas, y que esta ruta muestra una regulación opuesta a las de las giberelinas y bicaverinas.

El metabolismo secundario de *F. fujikuroi* es modulado también por otras señales, aunque la sensibilidad a éstas difiere entre distintas rutas. Así, por ejemplo, la síntesis de bicaverinas requiere pH ácido y es estimulada por escasez de otros elementos (fósforo y azufre) de forma sinérgica con la escasez de nitrógeno (2). Por otra parte, la luz (3) induce la síntesis de carotenoides, mientras que ejerce menor influencia sobre las síntesis de giberelinas y bicaverinas y afecta negativamente a la producción de fusarinas. Queda por dilucidar si éste último efecto es regulatorio o se debe a fotosensibilidad de estos policétidos.

Nuestros resultados más recientes han permitido identificar nuevos genes implicados en la regulación de la síntesis de estos metabolitos, que se unen a otros previamente conocidos, entre las que destaca *areA* en la regulación por nitrógeno. La mutación del gen de la ciclasa de adenilato, *acyA*, produce una estimulación de la síntesis de bicaverinas, y un fenotipo similar es mostrado por las mutaciones en el gen *wcoA*, ortólogo de *white collar-1* y del gen *cryA*, que determina uno de los dos criptocromos de los proteomas de *Fusarium*. Las mutaciones en estos genes afectan también en diferente medida a la síntesis de giberelinas, fusarinas, y carotenoides, y en algunos casos también a otros aspectos de su biología, como la morfología de sus colonias o la conidiación. Por su color rojizo, destacan los cambios en la síntesis de bicaverinas, que se producen solo en la luz en el caso del mutante *cryA<sup>-</sup>* pero independientemente de la luz en el mutante *wcoA<sup>-</sup>*, a pesar de que ambos genes codifican fotorreceptores. Globalmente, los resultados obtenidos apuntan a la participación del AMPc y de las fotoproteínas WcoA y CryA en la compleja red de regulación que controla el metabolismo secundario de *F. fujikuroi*, engrosando así su creciente lista de componentes.

(1) Avalos et al. (2007) Gibberellins and other metabolites of *Fusarium fujikuroi* and related fungi. Curr. Org. Chem. 11: 721-737.

(2) Limón et al. (2010) Bicaferin production and applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 21-29.

(3) Avalos y Estrada (2010) Regulation by light in *Fusarium*. Fungal Genet. Biol. En prensa.

**Palabras Clave:** giberelinas, bicaverinas, fusarinas, carotenoides, nitrógeno, luz, fotorreceptores.

### PONENCIA 3

<b>Título</b>	<b>Peroxidasas ligninolíticas en basidiomicetos: Importancia medioambiental y potencial biotecnológico</b>
<b>Autores</b>	A.T. Martínez y F.J. Ruiz-Dueñas
<b>Centro</b>	Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

La mayor parte del carbono fijado por fotosíntesis en los ecosistemas terrestres se acumula en tres polímeros vegetales, celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina desempeña una función protectora de los anteriores polisacáridos frente al ataque microbiano. Debido a su presencia, los materiales lignocelulósicos son altamente recalcitrantes y sólo algunos hongos del grupo de los basidiomicetos son capaces de iniciar su biodegradación, dejando los polisacáridos accesibles a otros microorganismos. La eliminación de la lignina presenta pues gran importancia medioambiental, al ser el paso clave para el reciclado del carbono en nuestro planeta. Al mismo tiempo constituye un aspecto central en diferentes usos industriales de la biomasa vegetal (p.ej. en la fabricación de papel o en la producción de bioetanol). Los hongos ligninolíticos secretan un tipo único de hemoperoxidasas, caracterizadas por su elevado potencial redox que les permite degradar la lignina. Estas enzimas actúan sinérgicamente con flavooxidasas que les aportan el sustrato oxidante, peróxido de hidrógeno. En éstas, y otras peroxidasas de plantas y animales, el cofactor (grupo hemo) en el que reside el poder oxidante ocupa una cavidad central en la estructura molecular de la enzima que se comunica con el solvente por uno o varios canales por los que puede difundir el peróxido (responsable de la semirreacción de oxidación que conduce a la activación de la enzima) o pequeños sustratos reductores pero no el voluminoso polímero de lignina. Nuestro grupo ha sido el primero en detectar en forma directa (mediante resonancia paramagnética electrónica) la existencia de un radical de la proteína - Trp164 de la peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii* - en las dos formas transitorias (compuestos I y II, con una deficiencia de dos y un electrón respectivamente) del ciclo catalítico de una de estas peroxidasas.<sup>1</sup> Dicho radical está expuesto al solvente y desempeña un papel catalítico en la oxidación de la lignina, siendo el inicio de una ruta de transferencia electrónica desde la superficie hasta el grupo hemo. La existencia de dichas rutas de transferencia electrónica, junto con su elevado potencial redox, constituyen las características más relevantes de estas enzimas que les permiten desempeñar su importante papel en la naturaleza, al mismo tiempo que ser la base para biocatalizadores industriales con propiedades únicas.<sup>2</sup> El desarrollo de aplicaciones biotecnológicas de las peroxidasas ligninolíticas se ve favorecido en la actualidad por la información y herramientas proporcionadas por las diferentes "ómicas", incluyendo la disponibilidad de numerosos genomas de basidiomicetos que está permitiendo establecer inventarios completos de enzimas ligninolíticas en diferentes organismos, y poniendo de manifiesto la amplia distribución de ciertas peroxidasas que anteriormente eran prácticamente desconocidas.<sup>3</sup> La anteriormente mencionada peroxidasa versátil de *Pleurotus*, *Bjerkandera* y otros hongos presenta varias importantes ventajas biotecnológicas frente a enzimas relacionadas - como la lignina peroxidasa o la manganoso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* - relacionadas con su versatilidad catalítica (incluyendo su capacidad de oxidar compuestos aromáticos fenólicos y no-fenólicos, manganoso y diferentes tipos de colorantes) y su capacidad de actuar directamente sobre compuestos recalcitrantes (incluido el polímero de lignina) que las otras enzimas sólo atacan en presencia de mediadores redox.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ruiz-Dueñas et al. (2009) Protein radicals in fungal versatile peroxidase: Catalytic tryptophan radical in both Compound I and Compound II and studies on W164Y, W164H and W164S variants. *J. Biol. Chem.* 284:7986-7994

<sup>2</sup> Ruiz-Dueñas and Martínez (2009) Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnol.* 2:164-177

<sup>3</sup> Martínez et al. (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:348-357

<sup>4</sup> Martínez (2007) High redox potential peroxidases. In: *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, edited by J. Polaina and A. P. MacCabe, Springer, Berlin, pp. 475-486

**Palabras Clave** Hemoperoxidasas, lignina, biocatalizadores industriales, tecnologías limpias

## PONENCIA 4

**Título** LA REGULACIÓN GÉNICA DE LA PATOGÉNESIS EN *FUSARIUM OXYSPORUM*

**Autores:** M. ISABEL G. RONCERO, YOLANDA PAREJA JAIME, EDUARDO ESPESO Y CARMEN RUÍZ-ROLDÁN

**Centro** Departamento de Genética, Universidad de Córdoba

### Resumen

**Introducción.** Los hongos patógenos producen daños devastadores en la agricultura y la salud humana. El género *Fusarium* representa el grupo más relevante entre los fitopatógenos, ya que ataca prácticamente a todas las plantas cultivadas. *Fusarium oxysporum* es la especie con mayor distribución dentro del género. Este hongo produce marchitez vascular en más de 100 especies vegetales y es un patógeno oportunista de humanos, causando infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos. *F. oxysporum* causa marchitez vascular en una gran variedad de cultivos, aunque actualmente se desconocen los aspectos moleculares de las primeras etapas de infección que son cruciales para el desarrollo de la enfermedad. Nuestro grupo utiliza *F. oxysporum* como modelo para el estudio de los mecanismos que definen la patogénesis en hongos filamentosos. Nos centramos principalmente en los aspectos básicos de la virulencia que están conservados en todos los hongos patógenos, sea cual sea la especie hospedadora. Los factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo morfológico son esenciales para el proceso de infección de los hongos patógenos. Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción Con7p es un regulador central de la morfogénesis relacionada con la infección en el patógeno de arroz *Magnaporthe grisea*. El gen *con7* parece estar presente en el genoma de todos los hongos filamentosos euascomicetos, y curiosamente, está ausente en las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Candida*.

**Objetivos.** (1) Desarrollar un método eficaz para el estudio en tiempo real de los procesos de desarrollo e infección en el hongo patógeno *F. oxysporum* mediante marcaje fluorescente de proteínas.

(2) Estudiar la regulación, mediada por factores de transcripción, de la expresión de factores de virulencia tales como enzimas líticas de la pared vegetal, otras detoxificantes de metabolitos vegetales, de determinantes de la polaridad o reguladores morfogenéticos. Se ha caracterizado un factor de transcripción implicado en la regulación del desarrollo morfológico de *F. oxysporum* y esencial para el proceso de infección.

**Métodos.** Para conseguir el objetivo (1) se ha puesto a punto un método para el marcaje directo, mediante fluorescencia, de proteínas nucleares en *F. oxysporum*. La aplicación de esta técnica al marcaje de la histona H1 nos ha permitido, por primera vez en la especie, la visualización a tiempo real de procesos clave del desarrollo tales como la germinación de las esporas, la mitosis, el crecimiento apical y la ramificación del micelio, la formación de microconidios y la fusión vegetativa de hifas. Dicha técnica se podrá aplicar al estudio de la infección de *F. oxysporum* en raíces de tomate. Se ha utilizado un protocolo basado en la PCR de fusión, para el marcaje fluorescente de la histona H1 de *F. oxysporum* (FoH1) en su extremo C-terminal, utilizando como marcador de selección la resistencia a higromicina. De la misma forma se ha realizado el marcaje con la variante Cherry red (ChFP) de la proteína fluorescente roja. Ambas construcciones se utilizaron para transformar protoplastos de *F. oxysporum* f.sp *lycopersici*. Los transformantes portadores de la versión marcada con GFP o ChFP se analizaron bajo luz fluorescente utilizando combinaciones de filtros para GFP o ChFP. Las imágenes obtenidas se procesaron utilizando los programas Photoshop 7.0 e ImageJ. (2) Para determinar el papel de los genes *con7* en la patogénesis de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizaron ensayos de infección en plántulas de tomate con mutantes obtenidos mediante reemplazamiento génico, tras transformación y recombinación homóloga, de los alelos silvestres por alelos interrumpidos ( $\Delta con7-1$  y dobles  $\Delta con7-2\Delta con7-3$ ).

**Palabras Clave** *Fusarium*, hidrofobinas, pared celular, factores de transcripción,

## MESA REDONDA IV. AEM4

### PONENCIA 1

<b>Título</b> <i>Candida</i> score: nuevas aproximaciones al paciente crítico con infección candidiásica
--

<b>Autores</b> Cristóbal León
-------------------------------

<b>Centro</b> Servicio de Cuidados Críticos y Urgencias. Hospital Universitario de Valme. Sevilla
---

#### Resumen

Las infecciones por *Candida* en pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI) continúan siendo un desafío desde el punto de vista clínico por diversos motivos, incluyendo el aumento de la prevalencia de especies no-albicans, la ausencia de signos y síntomas específicos sugestivos de infección fúngica, la complejidad de las patologías subyacentes de los pacientes ingresados, la presentación insidiosa en la mayoría de los casos y la alta mortalidad asociada, especialmente cuando se retrasa la instauración de un tratamiento antifúngico adecuado. Además, resulta difícil distinguir entre colonización e infección invasora por especies del género *Candida*. Por otra parte, son muchos los pacientes colonizados por especies del género *Candida* que no reciben antifúngicos aún habiendo desarrollado candidemia/candidiasis invasiva (C/CI). Mientras que numerosos pacientes críticos no-neutropénicos reciben tratamiento empírico con antifúngicos sin un diagnóstico de certeza de infección candidiásica documentada, lo cual aumenta sustancialmente el uso de antifúngicos, el coste del tratamiento y el riesgo de aparición de cepas resistentes.

Algunos grupos de pacientes tiene un alto riesgo para el desarrollo de C/CI, y entre ello se incluyen, los pacientes críticos médico-quirúrgicos, neonatos de bajo peso, pacientes con procesos hematológicos malignos y los receptores de trasplante de órganos sólidos. De todos ellos, un tratamiento adecuado anti fúngico empírico solo es recibido por un cuarto de los pacientes con infección invasiva por *Candida* documentada, habiéndose demostrado que una terapia anti fúngica no adecuada implica una mayor mortalidad. El conocimiento de los factores de riesgo para desarrollar una C/CI puede ser útil a la hora de identificar a aquellos pacientes susceptibles de padecerla y aquellos a los que habría que administrar tratamiento antifúngico precoz.

En los últimos años, en pacientes adultos críticos no neutropénicos, se han publicado modelos predictivos que permiten estratificar y seleccionar pacientes con alto riesgo para el desarrollo de C/CI, y que pueden beneficiarse una terapia antifúngica profiláctica, preventiva/empírica. Con esta idea se han propuesto recientemente diversas estrategias de evaluación basándose en la combinación de dos o más factores de riesgo encontrados con mayor frecuencia. Estos sistemas de clasificación de riesgos, basados mayoritariamente en los datos de estudios retrospectivos, examinan la asociación entre duración de estancia en la UCI, colonización previa por *Candida* spp. y variables relacionadas con el huésped. A pesar de la existencia de elementos predictores de C/CI, la mayoría conllevan un trabajo excesivo, son tediosos de cumplimentar y no se han llevado a cabo estudios prospectivos para validarlos. Por otra parte no hay estudios que demuestren que la administración de una terapia preventiva/empírica para C/CI (referida aquí como terapia precoz), conlleve que una mejora significativa del pronóstico y reducir los costes. Si las modelos predictivos están validados estos podrían ser usado como base de futuros estudios clínicos donde se pueda demostrar que la terapia antifúngica administrada en tiempo y manera adecuada, tiene influencia en el pronóstico de los pacientes, y en sus tiempos de estancia hospitalaria.

Dada la heterogeneidad de los pacientes, estos modelos predictivos deben ser readaptados a grupos específicos. En esta línea, nuestro grupo de investigación ha desarrollado el "*Candida* score" (CS), utilizando la base de datos del proyecto EPCAN (*Estudio de Prevalencia de CANDidiasis*), según el cual un CS  $\geq 3$  establece con gran precisión qué pacientes han de considerarse de alto riesgo para el desarrollo de una C/CI. El modelo CS utiliza un sistema de puntuación que es ligeramente inclinada hacia los pacientes con sepsis grave, asignando una puntuación de 1 para la cirugía (OR = 2,71, IC 95% 1,45-5,06), la colonización multifocal (OR = 3,04, IC 95% 1.45- 6,39), y la NPT (OR = 2,48, IC 95% 1.16 a 5.31), y una puntuación de 2 para la sepsis grave (OR = 7,68, IC 95% 4.14 a 14.22). Este sistema de puntuación es sencillo y puede servir de gran ayuda al médico para diferenciar entre colonización por especies del

género *Candida* e infección fúngica invasora oculta, al considerar la instauración temprana de tratamiento antifúngico en pacientes críticos.

Este score fue validado posteriormente mediante otro estudio (Proyecto CAVA), en pacientes adultos críticos no neutropénicos, demostrando que la incidencia de la C / CI con CS  $\geq 3$ , fue de 13,8% frente al 2,3% en pacientes con CS  $< 3$ . Por otra parte, en

pacientes con CS  $\geq 3$ , la presencia de una cirugía abdominal aumentó significativamente el riesgo de C / CI del 30,3% (95% IC 19,2-41,4), en comparación con el 11,5% (95% CI 5.1-17.8) para los no-abdominales cirugía (P = 0,003). Estos resultados sugieren que la terapia antifúngica temprana puede ser dirigida específicamente a los pacientes con colonización por *Candida* asociada con un CS  $\geq 3$ , en particular las que se sometieron a cirugía abdominal. Aunque el CS puede predecir los pacientes con riesgo de C/CI, pero se necesitan más estudios para evaluar los beneficios de la terapia antifúngica rápidas basadas en este punto.

Recientemente se han incorporado en el diagnóstico de C/CI, en este grupo de pacientes, la determinación de biomarcadores entre los que se incluyen el (1-3)- $\beta$ -D-glucano y los anticuerpos antimicelios (anticuerpos dirigidos contra los antígenos de la pared celular de las *Candidas*). A través de los estudios que hemos practicado recientemente, hemos constatado que pueden ser bastante útiles, dado los resultados obtenidos, pero debemos esperar a tener más estudios, antes de aconsejar su uso en la práctica clínica habitual, aunque los resultados preliminares son bastantes esperanzadores.

**Palabras Clave** *Candida*, score, predicción, Candidiasis invasora

## **PONENCIA 2**

**Título:** DIAGNOSTICO DE LA IFIs EN UCI

**Autores:** Carmen Castro

**Centro:** UGC Microbiología. H.U.Valme. Sevilla

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante. El aumento significativo de las infecciones profundas por hongos en el paciente crítico es debido, entre otras causas a las medidas de soporte vital, el aumento del uso de antibióticos de amplio espectro, la implantación de material protésico, implantes de órganos, la corticoterapia y, en general, cualquier tipo de inmunosupresión (terapéutica o adquirida).

Sin el tratamiento adecuado, la mortalidad de las Infecciones Fúngicas Invasoras supera el 90%, lo que unido a los costos de hospitalización que este tipo de infecciones genera, las convierten en entidades de gran trascendencia en la práctica diaria en el medio hospitalario.

A pesar de ser el cultivo el "Gold Standard" del diagnóstico microbiológico, ya que permite la identificación del agente etiológico y la realización del estudio de sensibilidad, presenta inconvenientes entre los que podemos destacar: la necesidad de obtener muestras invasivas que pueden estar contraindicadas en el paciente crítico debido a la enfermedad debilitante que presentan, incapacidad de diferenciar entre infección y colonización, presentar baja sensibilidad y tratarse de un método lento para realizar el diagnóstico.

El hemocultivo es, sin lugar a duda, un buen método diagnóstico de las micosis sistémicas. A pesar de ello presenta una serie de inconvenientes: como ser un método lento y la baja sensibilidad global de este (se sitúa por debajo del 50%) debido al gran tamaño de las formas fúngicas circulantes.

Para solucionar todos los inconvenientes expuestos anteriormente, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas independientes del cultivo con la intención de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para realizar el diagnóstico. Las principales técnicas incluyen métodos inmunológicos (detección de antígenos y anticuerpos) y la detección de componentes no antigénicos estructurales o metabólicos como el ADN, el B-(1-3)-D-glucano y el D-arabinitol.

Con el desarrollo de estos nuevos biomarcadores se ha producido un gran avance en el diagnóstico de la Candidiasis Invasora (B-(1-3)-D-glucano, Antígeno manano, Anticuerpo antimanano, Anticuerpo antimicelio) y para la Aspergilosis Invasora (B-(1-3)-D-glucano y Antígeno galactomanano), aportando un camino esperanzador para el manejo de la IFI en el paciente crítico y la instauración de un adecuado tratamiento antifúngico anticipado.

## **SESION PLENARIA AEM / SEM**

### **PONENCIA 1**

**Título:** Últimos avances de la Microbiología Molecular en el diagnóstico de las IFIs.

**Autores:** M. Cuenca- Estrella.

**Centro:** Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. ISCIII. Majadahonda, Madrid.

#### **PONENCIA 1**

Las micosis sistémicas tienen mal pronóstico si no reciben el tratamiento adecuado de forma precoz. La detección precoz de estas micosis es difícil ya que las técnicas diagnósticas convencionales, como el examen microscópico y el cultivo, tienen una sensibilidad limitada, por lo que suelen detectar la infección cuando está muy avanzada. Por todo ello, se han desarrollado las llamadas técnicas alternativas al cultivo, que se basan en la detección de componentes o moléculas fúngicas como antígenos o ácidos nucleicos.

En los años 70 del siglo XX, se desarrolló la detección del antígeno capsular de *Cryptococcus*, que es uno de los métodos alternativos al cultivo que ha demostrado una mayor utilidad en el diagnóstico de una infección oportunista. Sin embargo, en el caso de otras micosis no se ha conseguido desarrollar métodos de detección de antígenos tan eficaces hasta la fecha. Aunque sí debe señalarse que se han producido avances muy significativos en los últimos años, como las técnicas de detección de galactomanano (GM) y de beta-D-glucano (BG). Estas dos técnicas están demostrando su utilidad en algunos grupos de enfermos. En el caso del GM es útil para detectar la aspergilosis en neutropénicos y trasplantados alogénicos de precursores hematopoyéticos. El BG también ayuda a diagnosticar algunas micosis, como la candidiasis en enfermos críticos.

La detección de ácidos nucleicos de los hongos en muestras clínicas siempre se ha considerado como una alternativa de gran potencial, sobre todo las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación de cantidades muy pequeñas de ADN. Sin embargo, la elevada sensibilidad teórica de las técnicas basadas en la PCR no se ha visto confirmada hasta la fecha en la práctica clínica, aunque cada vez existen más datos que parecen apoyar la utilización de estas técnicas en el diagnóstico de las micosis. Las técnicas de PCR tienen utilidad en el diagnóstico de la aspergilosis, aunque en los últimos consensos de la EORTC/MSG y de la ECIL, no se ha incluido todavía como criterio diagnóstico de la infección. Puede considerarse como una técnica complementaria en fase de desarrollo, que se utiliza en algunos laboratorios de referencia.

Respecto a otros avances en el campo de la microbiología molecular, la detección de mecanismos de resistencia mediante métodos moleculares o la identificación de especies fúngicas por secuenciación de sus ácidos nucleicos se están empezando a emplear en centros de referencia. Sus ventajas teóricas son notables, pero habrá que esperar para saber si el coste justifica su inclusión en los laboratorios asistenciales.

## PONENCIA 2

<b>Título</b>	Inestabilidad genómica en hongos
<b>Autores</b>	Germán Larriba
<b>Centro</b>	Área de Microbiología, F. Ciencias, Universidad de Extremadura

### PONENCIA 1

El análisis de los cariotipos y polimorfismos de un nucleótido (SNPs) de cepas de laboratorio y aislados clínicos de *Candida albicans*, así como la hibridación genómica comparada (CGH) han revelado una alta plasticidad genómica que incluye cambios en la naturaleza y número de polimorfismos (niveles de heterozigosis) y diversas aneuploidías. *C. albicans* es un diploide obligado con más de 55.000 SNPs. En la cepa SC5314, unas 2800 ORFs (de 6100) contienen SNPs no-sinónimos. Por tanto, existen dos versiones que difieren en uno o unos pocos aminoácidos para cada una de casi la mitad de las proteínas. En un organismo altamente heterocigótico, genes o segmentos cromosómicos pueden hacerse homocigóticos mediante recombinación homóloga. Estos procesos, conocidos como pérdida de heterocigosis (LOH), ocurren espontáneamente con una frecuencia entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ . Teóricamente, LOH tiene un efecto decisivo en la adaptación de poblaciones diploides, ya que la aparición de una mutación beneficiosa en un ambiente determinado va seguida de inmediato de la producción de un mutante homocigótico. En la práctica, se han identificado procesos de LOH en mutantes a azoles, en los que la proteína codificada por la versión homocigótica del gen correspondiente está implicada en la resistencia. Por otra parte, el hecho de que los diferentes aislados comparten sólo un pequeño número de SNPs, sugiere que LOH es contrarrestada por una elevada tasa de mutación puntual que regenera heterocigosis y contribuye, por tanto, a la inestabilidad genética.

Un tercer marcador de inestabilidad genética son las aneuploidías, las cuales modifican el número de copias de ciertos genes y son bien toleradas por *C. albicans*. El crecimiento en sorbosa resulta en la selección de cepas monosómicas para el cromosoma 5 (Chr5), en cuyo brazo derecho se han localizado reguladores negativos del gen *SOU1*, necesario para el crecimiento en sorbosa. Las aneuploidías son frecuentes en células de *C. albicans* resistentes a fluconazol (50% frente a 10% en las sensibles). Un 20% de los resistentes contienen un extra-isocromosoma formado por dos brazos izquierdos del cromosoma 5, i(5L), que flanquean el centrómero. En células adaptadas a crecer en fluconazol se han identificado aneuploidías adicionales que incluyen cromosomas quiméricos [ej., i(5L)<sub>2</sub>-3R], y trisomías de Chr3, Chr4, Chr6, y Chr7, que generalmente incrementan el número de copias de genes implicados en la resistencia a la droga.

La inestabilidad genómica no se restringe a *C. albicans* sino que ocurre también en cepas de laboratorio de *Saccharomyces cerevisiae* y puede ser común en hongos, especialmente si son diploides y no han sido severamente domesticados.

**Palabras Clave** : Inestabilidad genética, mutación, pérdida de heterocigosis, aneuploidías