

P1

Desarrollo de chips microbianos y sus aplicaciones en el diagnóstico, tratamiento y estudio de la patogenicidad de la candidiasis

Anand Srinivasan¹, Daniel Montelongo², Anand K. Ramasubramanian¹ y Jose L. Lopez-Ribot²

¹Departamento de Ingeniería Biomédica y ²Departamento de Biología, The University of Texas at San Antonio, San Antonio, Texas, EEUU. E-mail: jose.lopezribot@utsa.edu

Las técnicas clásicas de cultivo microbiológico han cambiado relativamente poco en los dos últimos siglos desde los tiempos de Petri y Pasteur. A pesar del pequeño tamaño de los microorganismos, las dimensiones de cultivo en unidades volumétricas se han mantenido típicamente en el rango de mililitros a litros. Estos métodos de cultivo tradicionales son fundamentalmente incompatibles con las técnicas más modernas de rastreo de alto rendimiento utilizadas en el desarrollo de fármacos, incluyendo antibióticos. Para eliminar este impedimento, nuestro grupo ha desarrollado tecnologías robóticas y automatizadas para la fabricación de "chips microbianos" en la superficie de portaobjetos de microscopio. Cada chip consta de aproximadamente 2000 cultivos independientes y equivalentes entre sí, cada uno de ellos entre 30-50 nanolitros en volumen, y que a pesar de su tamaño en la nanoescala exhiben características fenotípicas similares a los cultivos tradicionales. Debido a su mayor automatización, rapidez y rendimiento, la utilización de estos chips conlleva un abaratamiento significativo de la mano de obra y materiales. Si bien el prototipo inicial utiliza *Candida albicans* como organismo modelo, hemos expandido estas técnicas al cultivo de bacterias y también a cultivos polimicrobianos. Las aplicaciones de estos chips microbianos son muy diversas, incluyendo en el diagnóstico un rastreo de alto rendimiento y técnicas de sensibilidad a los antibióticos, así como el estudio de la patogenicidad de las enfermedades infecciosas.

P2

Aplicación de la genotipificación al estudio de brotes nosocomiales y resistencia antifúngica en *Aspergillus* y *Candida*

Jesús Vicente Guinea Ortega

Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas-VIH, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España. E-mail: jguineaortega@yahoo.es

Las micosis invasoras son infecciones caracterizadas por causar una elevada mortalidad a los pacientes que las sufren. En ocasiones, las micosis invasoras hospitalarias aparecen en forma de brotes en los que se afectan diferentes pacientes ingresados en unidades hospitalarias. Estos brotes suelen ser difíciles de controlar y requieren de una intervención multidisciplinar en la que cooperen microbiólogos, infectólogos, preventivistas y, en general, todo profesional sanitario involucrado en el control de la infección hospitalaria. Los patógenos fúngicos que con mayor frecuencia causan brotes nosocomiales son *Candida*, *Aspergillus* y los hongos mucorales. Los brotes hospitalarios de micosis se detectan generalmente como consecuencia de un aumento anormal de los casos que afectan a los pacientes ingresados en una unidad específica. En este sentido, la trazabilidad del brote requiere un estudio epidemiológico exhaustivo para poder detectar el origen y, por tanto, erradicarlo con el objetivo de evitar futuros casos. Los brotes causados por *Candida* tienen su origen fundamentalmente en el personal sanitario, que actúa como reservorio y trasmisor de las cepas infectantes. Por el contrario, los brotes causados por hongos filamentosos como *Aspergillus* o los mucorales son consecuencia de la contaminación del aire hospitalario con esporas de estos hongos, capaces de infectar a los pacientes susceptibles. En ambos casos, los estudios de epidemiología molecular tienen un papel fundamental a la hora de esclarecer el origen de la infección, ilustrar los brotes nosocomiales, detectar los servicios hospitalarios con transmisión activa y, consecuentemente, mejorar su prevención. Diversas técnicas de tipado molecular han sido empleadas para el estudio genotípico de aislamientos de *Candida* y *Aspergillus*. Las técnicas basadas en microsatélites son reproducibles y presentan un alto poder de discriminación, lo que las convierte en opciones atractivas para el estudio de brotes de candidemia o aspergilosis invasora. La mayor parte de los brotes han sido descritos en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, fundamentalmente en neonatos, y en pacientes ingresados en unidades de hematología. En la presentación se discutirá el papel de la caracterización genotípica de aislamientos de *Candida* y *Aspergillus* como herramienta para el estudio de brotes hospitalarios, así como la descripción de las poblaciones más frecuentemente afectadas en este tipo de situaciones.

P3

Métodos avanzados de microscopía para el estudio de la localización de proteínas y su dinámica celular en hongos filamentosos

Eduardo A. Espeso

Departamento de Biología Molecular y Celular, Centro Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España. E-mail: eespeso@cib.csic.es

Desde el descubrimiento de las proteínas que emiten luz en respuesta a una estimulación previa, se han generado hasta la fecha numerosas herramientas y técnicas de observación de estos fluoróforos. Mediante diferentes técnicas moleculares es posible etiquetar las proteínas de nuestro interés con diferentes proteínas o compuestos fluorescentes. Puesto que la mayoría de las proteínas no permanecen en una localización concreta en la célula, las técnicas iniciales de captura de imágenes estáticas rápidamente fueron adaptadas para analizar en el tiempo, la cuarta dimensión, la proteína objeto de estudio. La necesidad de estudiar más de una proteína conjuntamente promovió la aparición de nuevas generaciones de proteínas que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda, así como el perfeccionamiento del instrumental para la detección simultánea e inequívoca de estas. Las técnicas de observación se están enfocando hacia la obtención de imágenes de moléculas simples para una mejor determinación de su localización y su relación con otras adyacentes. Todas estas técnicas instrumentales permiten a aquellos que trabajamos con microorganismos enfrentarnos a la resolución de cuestiones más complejas usando la microscopía, donde la nitidez y la rapidez en la captura de imágenes nos pueden permitir establecer con mayor precisión la localización, distribución, la dinámica y la asociación de las proteínas u otras macromoléculas bajo estudio en células cuyo tamaño o diámetro no supera las 3 micras, como es el caso de algunos hongos filamentosos. En esta ponencia se expondrá una visión general de la utilización de la microscopía de epifluorescencia y de las nuevas técnicas de observación aplicadas al estudio de diferentes procesos celulares en el hongo modelo *Aspergillus nidulans*.

P4

El programa traduccional de la meiosis y la esporulación en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*

Juan Mata

Departamento de Bioquímica, Universidad de Cambridge, Reino Unido.

E-mail: jm593@cam.ac.uk

La diferenciación sexual en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* culmina en la meiosis y la formación de esporas. El desarrollo de este proceso requiere un complejo programa de expresión génica, en el que los niveles de cientos de RNAs están controlados de forma dinámica. Esta regulación se lleva a cabo por la acción coordinada de factores de transcripción y proteínas de unión a RNA que controlan, respectivamente, la síntesis y la degradación de RNAs mensajeros.

Hemos empleado el método conocido como *ribosome profiling* para investigar la regulación a nivel de traducción de este proceso. Esta técnica se basa en la secuenciación de fragmentos de RNA mensajeros protegidos por los ribosomas que los traducen. Usando este método hemos descubierto 46 nuevos genes traducidos, incluyendo 19 casos en los que ambas cadenas de DNA codifican secuencias que se traducen. Además, hemos encontrado que el 24% de los genes anotados como no-codificantes se traducen de forma activa. Por último, hemos descubierto que la diferenciación sexual en *S. pombe* está acompañada de un complejo programa a nivel de traducción, en el que la eficiencia de la traducción de gran número de RNAs se regula de forma temporal.

Referencia

Caia Duncan & Juan Mata, 2014. The transcriptional landscape of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nature Structural and Molecular Biology*, en prensa.

P5

Micosis en América Latina

Víctor Silva

Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Mayor, Santiago, Chile.

E-mail: victor.silva@umayor.cl

Debido a los avances en la Medicina, que ha facilitado y mejorado la supervivencia de pacientes con enfermedades crónicas y graves, así como al aumento progresivo de pacientes portadores de inmunodeficiencias congénitas, adquiridas e inducidas, se ha observado la presencia y aumento de enfermedades fúngicas invasoras (EFI) en América Latina desde el establecimiento de programas de vigilancia epidemiológica en algunos países de la región desde finales de 1990.

Las EFI prevalentes son en especial las del torrente sanguíneo debidas a especies del género *Candida*, principalmente en pacientes prematuros, inmunodeprimidos y pacientes internados en unidades de enfermos críticos bajo instrumentación invasiva y antibioticoterapia de amplio espectro. Estas infecciones, excepto en los prematuros, son mayoritariamente de origen nosocomial endógeno, siendo responsables los agentes que se aíslan concomitantemente desde la microbiota del propio paciente. Estas levaduras son cosmopolitas y algunas especies del género *Candida* viven colonizando principalmente mucosas del tracto intestinal, así como cavidad oral, vaginal y, en menor proporción, la piel. Sin embargo, la colonización de manos aumenta significativamente en los trabajadores del área de la salud. En cambio, las infecciones por *Cryptococcus* y por hongos filamentosos se adquieren principalmente por vía inhalatoria, siendo en su gran mayoría de origen exógeno. A pesar de los esfuerzos en América Latina (AL) se ha detectado una alta incidencia de candidemia (1,19 casos por cada 1.000 admisiones), encabezada por Argentina (1,95 casos cada 1.000 admisiones), y seguida por Venezuela y Brasil, siendo aparentemente menor en Chile (0,33 casos por cada 1.000 admisiones). Aunque la incidencia de candidemia es similar en ambos sexos, en los niños (un tercio en Chile y 44,2% en AL) es superior a la reportada en USA y Europa.

El cambio en la prevalencia de especies es dinámico, siendo particular entre regiones y países, así como en un mismo país dependiendo de la temporalidad de los años vigilados. Actualmente, *Candida albicans* sigue siendo el agente responsable de la mayoría de las candidemias en AL, con un porcentaje inferior al 50%; las especies más prevalentes que la siguen son *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. En AL, *C. parapsilosis* se distribuye homogéneamente entre adultos y niños, mientras que *C. glabrata* prevalece en adultos y, además, en Chile se aísla con mayor frecuencia en mujeres. La resistencia antifúngica en la región es baja, con el fluconazol como el antifúngico ante el que se observan la mayoría de las resistencias.

En Chile, se aíslan en EFI más hongos levaduriformes que filamentosos (90% frente a 10%). La gran mayoría de los pacientes presenta poli-colonización por la misma cepa aislada en sangre, y el serotipo A de *C. albicans* prevalece en adultos (95%), mientras que la distribución del serotipo A (48%) y B (52%) es homogénea en niños.

Tabla. Distribución porcentual de especies de *Candida* aisladas de hemocultivo a inicios y fines de la década pasada, en países con programa de vigilancia más el consolidado de AL.

Especie de <i>Candida</i>	Argentina		Brasil		Chile		AL
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Final
<i>C. albicans</i>	51	43	43	41	50	57	37,6
<i>C. guilliermondii</i>	/	6	/	3	/	2	6,5
<i>C. glabrata</i>	2	6	4	10	4	10	6,3
<i>C. krusei</i>	3	2	1	5	1	3	2,7
<i>C. parapsilosis</i>	20	24	20	26	22	14	26,5
<i>C. tropicalis</i>	23	17	23	13	15	11	17,6
Otras especies	1	2	9	2	8	3	2,8

Las especies de *Cryptococcus* siguen siendo agentes frecuentes de EFI en AL, principalmente en pacientes con sida; los aislamientos se obtienen de hemocultivos y LCR, entre otras muestras.

La EFI por hongos filamentosos es principalmente de tipo pulmonar, seguida por diseminación cutánea y cerebral, entre otras. Afecta mayoritariamente a pacientes oncohematológicos y trasplantados, sobre todo de médula ósea, y tienen especial relevancia las especies del género *Aspergillus*, en especial *Aspergillus* sección *fumigati*, así como especies de *Fusarium* y *Rhizopus*.

En los últimos años se han reportado brotes de hongos emergentes asociados a EFI en AL, despertando la necesidad de establecer una vigilancia más activa y fortalecer la colaboración entre los equipos médicos, de laboratorio y centros de referencia de cada país.

En resumen, la candidemia sobresale entre las EFI con una incidencia variable entre países de AL, está asociada a una baja resistencia antifúngica, afecta tanto a niños como a adultos, y tiene una distribución de especies particular según población y país.

P6

Mucormicosis en América Latina

Alexandro Bonifaz

Hospital General de México/Servicio de Dermatología y Departamento de Micología, México
D.F., México. E-mail: a_bonifaz@yahoo.com.mx

La mucormicosis es una infección fúngica invasiva, oportunista y con una alta mortalidad, causada por hongos filamentosos del subphylum Mucormycotina, orden Mucorales. Los principales géneros involucrados son *Rhizopus*, *Mucor* y *Lichtheimia*; *Rhizopus arrhizus* (antes *R. oryzae*) es la especie más frecuentemente aislada. Los mucorales son hongos sideróforos, termotolerantes, que crecen óptimamente en pH ácido, asimilan la glucosa y poseen un sistema enzimático activo de cetona-reductasa. La vía de infección más frecuente es mediante la inhalación de esporas. Otras vías menos frecuentes incluyen la ingestión y la inoculación directa de esporas (esta última principalmente a través de traumatismos). La fagocitosis, los neutrófilos y los niveles séricos de hierro son los factores principales en la patogenia de esta enfermedad; ello es debido a que niveles séricos de hierro elevados (como ocurre en la cetoacidosis diabética) favorecen el crecimiento del hongo, mientras que las alteraciones en la fagocitosis y en los neutrófilos impiden la destrucción del mismo. La mucormicosis se presenta con frecuencia en pacientes con *diabetes mellitus* tipo 2 descompensada que cursan con cetoacidosis diabética, así como en pacientes hematológicos o bajo terapia inmunosupresora, como los pacientes inmunosuprimidos con predominio de neutropenia (leucemia, linfoma, postrasplantados, pacientes con corticoterapia). No obstante, se han reportado casos en pacientes sin factores de riesgo conocidos. La mucormicosis se caracteriza por la presencia de una placa necrótico-ulcerada, rodeada por edema y eritema, que se extiende y profundiza rápidamente con destrucción de los tejidos, y que se acompaña de afección del estado general del paciente. Existen diversas formas de presentación clínica, entre las que se incluyen las formas rino-órbito-cerebral, pulmonar, gastrointestinal, diseminada y cutánea primaria; la primera de ellas es la forma más común. La mortalidad es del 30-50% si la afectación es local, y aumenta en pacientes con infección diseminada.

El diagnóstico se hace generalmente mediante estudios micológicos, con exámenes directos (KOH y solución salina) y cultivos en agar de Sabouraud dextrosa. La identificación de las especies se hace mediante la macro y la micromorfología de las colonias, por sus formas de reproducción, características bioquímicas y crecimiento a determinadas temperaturas. Actualmente, mediante técnicas de extracción de DNA y secuenciación, se alcanza una identificación más precisa de las especies, como la técnica de amplificación de la región ITS del rDNA nuclear, con cebadores de regiones ITS5 e ITS4.

El tratamiento antifúngico sigue siendo la anfotericina B, en especial con las nuevas formulaciones (lipídica, dispersión coloidal); su asociación con azoles, como el posaconazol, da mejores resultados. Sin embargo, es la compensación del paciente y el control de los factores predisponentes lo que determina una mejor evolución.

No se conoce con exactitud la prevalencia de la mucormicosis en Latinoamérica, si bien se sabe que tiende a aumentar, como en la mayoría de comunicaciones actuales. A diferencia de las estadísticas de Estados Unidos y Europa, existe en nuestra geografía una mayor asociación con la *diabetes mellitus* descompensada (hasta un 85% de los casos), y con la inmunosupresión (neutropenia) en siguiente lugar. Esto está asociado a las dietas muy ricas en carbohidratos en nuestras poblaciones y a una alta predisposición genética para el desarrollo de diabetes, en especial la de tipo dos. La serie de episodios que se presentará es una de las más grandes en Latinoamérica. En nuestro hospital, es la micosis más agresiva y se presenta con más frecuencia que la aspergilosis; esto podría deberse a un incremento en las últimas décadas del número de casos de diabetes, a la facilidad con que estos pacientes se descompensan por la poca educación médica, y a un discreto incremento en los casos de leucemias agudas.

P7

Diagnóstico de laboratorio de las micosis invasoras: una visión latinoamericana

Alicia Arechavala

Unidad Micología, Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz Buenos Aires, Argentina.

E-mail: aliciaarechavala@yahoo.es

Las micosis fúngicas invasoras son un problema creciente en el mundo. En Latinoamérica se presentan tanto las micosis sistémicas endémicas como aquellas ocasionadas por hongos de distribución universal que afectan a pacientes con distintos tipos de inmunosupresión.

Los recursos con los que cuentan los laboratorios de diagnóstico son muy variables, y muchas de las tecnologías accesibles en los países centrales no están disponibles en América Latina o solamente están al alcance de algunos laboratorios de referencia. Las principales herramientas de diagnóstico se basan en los exámenes directos, los cultivos, pruebas serológicas para la detección de anticuerpos de varias de estas micosis, la detección de antígeno de *Cryptococcus*, o de galactomanano de *Aspergillus*, pero la mayoría de los laboratorios aún no cuenta con equipos de detección de galactomanano de *Histoplasma*, ni de β -1-3 glucano.

Las pruebas moleculares aún no son de mucha utilidad como herramientas de diagnóstico clínico, aunque cada vez se emplean más para la identificación de complejos de especies. Últimamente los equipos MALDI-TOF, que permiten una identificación rápida de levaduras y hongos filamentosos, se van incorporando en varios laboratorios.

Como ejemplo, en 2012 se diagnosticaron en nuestro laboratorio 72 criptococosis, 39 neumocistosis, 36 histoplasmosis, 11 paracoccidiodomicosis, 28 aspergilosis (crónicas/invasoras), 3 mucormicosis, 3 hialohifomicosis y 1 candidemia. Los datos de Argentina en 2010 son los siguientes: 263 micosis sistémicas endémicas, 246 candidiasis, 152 neumocistosis, 499 criptococosis, 343 aspergilosis crónicas y 38 invasoras, 52 hialo/feohifomicosis y 22 mucormicosis. Destacamos la gran utilidad de los hemocultivos automatizados para el diagnóstico de las candidemias, por lisis-centrifugación para detectar hongos dimorfos o filamentosos, y el gran valor del citodiagnóstico en lesiones cutáneo-mucosas.

P8

Situación de las resistencias a los antifúngicos en Latinoamérica

Gustavo Giusiano

Departamento Micología, Instituto de Medicina Regional, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Argentina. E-mail: gustavogiusiano@yahoo.com.ar

Resulta difícil hacer una afirmación concluyente sobre cuál es el estado de la sensibilidad a los antifúngicos de los hongos responsables de infecciones fúngicas invasivas en Latinoamérica. La variabilidad geográfica es uno de los puntos clave en este análisis. La epidemiología cambia de un país a otro, como así también dentro de un mismo país. Esta diferente epidemiología va acompañada de diferentes perfiles de sensibilidad, según los agentes que se presenten con mayor prevalencia.

En Latinoamérica los recursos asignados para el control y reducción de la resistencia a los fármacos antimicóticos son limitados y pocos países realizan vigilancia. Existen diferencias significativas en cuanto a la información. Además, muchos de los datos existentes son limitados a informes de determinados centros, que pueden ser resultados sesgados hacia determinadas poblaciones de pacientes y, por lo tanto, no reflejan la situación de una población, menos aún de un país.

También es clave en este análisis considerar que los métodos de estudio de la sensibilidad a los antifúngicos han cambiado con el tiempo, en especial los puntos de corte de los métodos considerados como referentes internacionales, lo que dificulta las comparaciones. En la mayoría de los países latinoamericanos de recursos limitados no se realizan pruebas de sensibilidad antifúngica, por lo que la resistencia en este contexto es desconocida.

Evaluar qué antifúngicos vamos a considerar en este análisis también debe ser puesto en consideración. Actualmente hay disponibles para tratar las infecciones graves debidas a hongos tres grupos de agentes antifúngicos: los azoles, las equinocandinas y los polienos. Las realidades socio-económicas de los países latinoamericanos influyen directamente sobre los perfiles de sensibilidad que se observan en los estudios disponibles. Las formulaciones de anfotericina B están disponibles en muchos países y, aunque este agente tiene mayor toxicidad que los azoles y las equinocandinas, su uso es muy amplio en Latinoamérica. En algunos países en vías de desarrollo solamente están disponibles dos tipos de antimicóticos (anfotericina B y fluconazol) y, en ciertos casos, solamente una clase, por lo que si se desarrolla resistencia, no hay otras opciones de tratamiento. El fluconazol es el antifúngico de elección en Latinoamérica, pero su uso es menor en el tratamiento empírico.

La candidiasis es la infección fúngica más común de todas las infecciones del torrente sanguíneo en todo el mundo, con altas tasas de morbilidad y mortalidad. El 80% de las candidemias en Latinoamérica son producidas por *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y, en tercer lugar, *Candida tropicalis*. La frecuencia de *Candida glabrata* es menor que en Estados Unidos y Europa. *C. parapsilosis* es frecuente a cualquier

edad, y *C. glabrata* se aísla en bajos porcentajes y con mayor frecuencia en Brasil, pero únicamente en pacientes añosos.

Analizando estudios multicéntricos recientes y el informe 2014 de la organización Mundial de la Salud (*Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance*), se observan valores bajos de resistencia a los antimicóticos en Latinoamérica. La resistencia general observada en todos los países latinoamericanos que emiten informes es menor que la observada en Europa y en Estados Unidos. Esto puede tener varias explicaciones, entre ellas que la epidemiología latinoamericana muestra una mayor prevalencia de especies sensibles y que la disponibilidad de fármacos es limitada por la situación socio-económica de muchos países. Así, por ejemplo, poco se sabe sobre la resistencia a las equinocandinas, ya que el coste de las mismas hace que esta última generación de antifúngicos aún sea de poco uso en Latinoamérica. Actualmente se considera que las equinocandinas, cuando estén disponibles, son el tratamiento empírico de elección, y en el mundo desarrollado han reemplazado al fluconazol como terapia. En Latinoamérica, el fluconazol sigue siendo de muy amplio uso y el tratamiento empírico no es ampliamente aplicado, lo que puede ser otra razón para la baja resistencia que se observa a este azol.

P9

Micosis importadas en España

Rogelio López Vélez

Unidad de Medicina Tropical, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España. E-mail: rogelio.lopezvelez@salud.madrid.org

El aumento de los viajes internacionales, los flujos migratorios y el comercio internacional contribuyen a la emergencia global de determinados agentes infecciosos que pueden ser importados a zonas no endémicas. En las últimas décadas, la patología importada ha adquirido protagonismo paulatinamente acorde con el fenómeno de la globalización.

Son varias las micosis tropicales que pueden producir enfermedad en viajeros e inmigrantes, a destacar la histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*), coccidioidomicosis (*Coccidioides immitis*), paracoccidioidomicosis (*Paracoccidioides brasiliensis*) y peniciliosis (*Penicillium marneffeii*).

Los viajeros pueden adquirir estas infecciones como resultado de exposiciones derivadas de actividades recreacionales o de trabajo. *H. capsulatum* se multiplica generalmente en suelos enriquecidos con acumulaciones de excrementos de murciélago o pájaro. La infección en el ser humano se produce comúnmente después de la inhalación de polvo generado de la perturbación de estas colecciones en el suelo. Las exposiciones pueden ocurrir durante actividades como la construcción, renovación, demolición, excavación del suelo, espeleología o limpieza de lugares que albergan al hongo.

El espectro de la enfermedad es amplio. Aunque la infección asintomática es muy común entre las personas que residen habitualmente en zonas endémicas, en los viajeros se puede presentar como una enfermedad gripal caracterizada por fiebre alta, escalofríos, dolor de cabeza, tos no productiva, dolor torácico pleurítico y fatiga. La radiografía de tórax a menudo revela un patrón reticulonodular difuso con linfadenopatía mediastínica. Estos síntomas ocurren típicamente en 1-3 semanas después de la exposición, y la mayoría de las personas se recuperan espontáneamente en el plazo de 3 semanas, aunque la fatiga puede persistir más tiempo. Sin embargo, en la mayoría de las infecciones relacionadas con la migración, la enfermedad puede permanecer en silencio hasta meses o años después.

La histoplasmosis es la micosis endémica más común en los trópicos y ha surgido como una infección oportunista importante entre los inmigrantes infectados por el VIH que viven en zonas no endémicas. Se suele manifestar como una infección diseminada con muchas analogías con la tuberculosis. Se trata de una reactivación de foco latente que suele ocurrir cuando el recuento de los CD4 está por debajo de 200 células/ μ l (85% de los casos con $CD4 < 100/\mu$ l). La forma clínica diseminada progresiva es la más frecuente y se manifiesta como un cuadro subagudo de fiebre y pérdida de peso, y en el 50% de los casos aparece tos, disnea, diarrea, vómitos y dolor abdominal. Se acompaña de hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, trombopenia y adenopatías. En el 15-25% de los casos aparecen lesiones cutáneas

umbilicadas rojo-violáceas y en menos del 20% úlceras faríngeas. Raramente aparecen masas de colon, úlceras perianales, coriorretinitis, meningitis, encefalitis, manifestaciones reumatológicas, mediastinitis, pericarditis, sepsis u otros signos. En la radiografía de tórax se observan nódulos pulmonares bilaterales o un patrón retículo-nodular difuso, pero hasta en un 30% puede ser normal

Con el aumento de la globalización las micosis con restricción geográfica han traspasado las fronteras y aparecen fuera de sus áreas endémicas. Es esencial aconsejar a los viajeros inmunodeficientes a valorar los riesgos de contraer tales enfermedades y de las medidas que pueden tomarse para minimizar el riesgo de infección. Es muy importante que los médicos estén al tanto de estas micosis y conozcan las características, las pruebas de diagnóstico y el tratamiento de estas enfermedades.

P10

Conocimiento actual de los genomas de los hongos

Ángel Domínguez

Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Plaza de los Dres. de la Reina s/n 37007 Salamanca, España. E-mail: ado@usal.es

La aplicación de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido obtener las secuencias completas de un gran número de especies fúngicas. La utilización de técnicas de comparación de genomas completos y de análisis de secuencias ha conducido a una extraordinaria clarificación en la clasificación de especies, en su identificación, incluyendo estudios de poliploidía, y en las relaciones que ocurren entre microorganismos. El conocimiento de los genomas ha permitido diseñar herramientas como análisis de transcriptomas, entre otros. Las construcciones de modelos metabólicos a escala genómica une el análisis *top-down* con el escrutinio *bottom-up* de la biología de sistemas. Dichos conocimientos son de extraordinaria importancia para todas las áreas de conocimiento, como la medicina, la agricultura o la biotecnología. En los aspectos básicos, el conocimiento de los genomas completos contribuye, por ejemplo, a clarificar aspectos de la ubicación de levaduras dimórficas y a definir mejor su diversidad filogenética. Hoy en día se analizan familias génicas, la regulación del metabolismo secundario de los hongos, los fenómenos de hipoxia, etc. En sus aspectos aplicados contribuye a su utilización como factorías celulares para la producción de, por ejemplo, fármacos, enzimas, antibióticos o aditivos alimentarios. Hoy en día se continúa con la utilización de las secuencias de los dominios 1 y 2 (D1/D2) de la subunidad grande del rRNA y del espaciador interno (ITS), que son muy fáciles de obtener para identificar especies de forma más exacta. Ello ha permitido doblar el número de especies de levaduras y redefinir casi la totalidad de géneros. En la actualidad se estima que existen secuenciados con una calidad razonable alrededor de 275 genomas de hongos (MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes Grygoriev et al. Nucl. Acids Res. Nucleic Acids Res. 42(1):D699-704, (2014) (<http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>) y (http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi?page_requested=Complete+Genome+Projects&subset_request ed=EUKARYAL))

Sin embargo, se debe advertir que no todas las secuencias están bien anotadas. En esta ponencia describiremos nuestra experiencia personal y los problemas existentes. También estamos analizando la ruta de glicosilación y otros aspectos en 75 especies de hongos incluyendo las divisiones Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota. Nuestros resultados indican que las enzimas implicadas en procesos de N-glicosilación se encuentran bastante conservadas en el retículo endoplásmico, mientras que existe una mayor heterogeneidad en el aparato de Golgi.

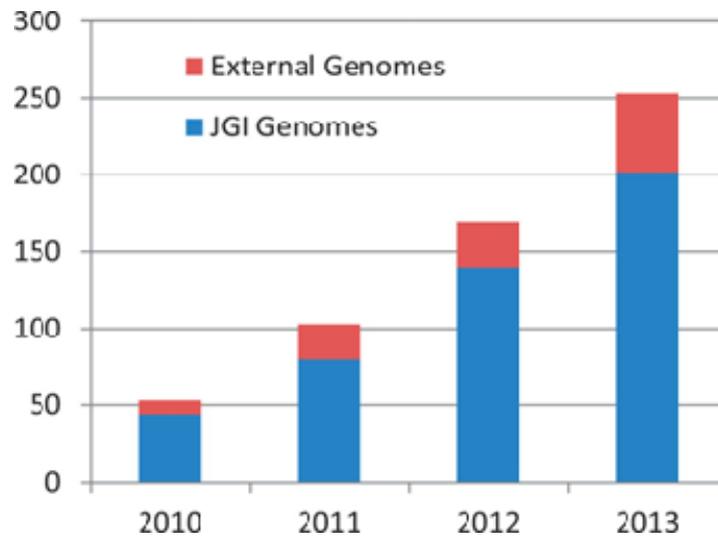


Figura. Genomas que aparecen en MycoCosm

P11

Taxonomía: el *barcoding* y más allá

Ana Alastruey Izquierdo

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km. 2. 28220, Majadahonda, Madrid, España.

E-mail: anaalastruey@isciii.es

Las herramientas clásicas de identificación en micología ya no son suficientes para la correcta clasificación de las especies patógenas y, por tanto, se están aplicando de manera rutinaria las herramientas moleculares. Esto ha permitido el abordaje de estudios filogenéticos robustos que están produciendo grandes cambios en la taxonomía de los hongos, incluyendo el reconocimiento de la polifilia del origen de los hongos. La región ITS (espaciadores internos transcritos) del ADN que codifica para el ARN ribosómico se ha designado como el *barcoding* para la identificación molecular de hongos. Unido a esto hay que destacar los cambios recientes en las reglas de nomenclatura de hongos que se iniciaron con la declaración de Ámsterdam en 2011, en la que se llegó al consenso de utilizar un único nombre para cada especie de hongo. Bajo el lema *One fungus, one name* diversos comités de expertos trabajan desde entonces en la adaptación de estas nuevas reglas a la práctica micológica.

P12

Micotoxinas y secuenciación rápida de genomas fúngicos

F. Javier Cabañes, M. Rosa Bragulat y Gemma Castellá

Grupo de Micología Veterinaria, Departamento de Sanidad y Anatomía Animales, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

E-mail: Javier.Cabanes@uab.es

Dos de las micotoxinas que siguen recibiendo una creciente atención en temas de seguridad alimentaria y de investigación son las aflatoxinas y la ocratoxina A. Las aflatoxinas (AFs) siguen siendo responsables en la actualidad de brotes agudos esporádicos en Asia y África que presentan elevada mortalidad. Existen países, como el caso de Kenia, donde la exposición humana a esta micotoxina es un problema de salud pública ligada al consumo de maíz (Yard et al. *Food Addit Contam A*. 2013). Su consumo se relaciona con casos de cáncer de hígado en el hombre y en diferentes especies animales, y siguen siendo de interés actualmente, entre otros, los posibles efectos sinérgicos que presentan estas micotoxinas, con el virus de la hepatitis B en el desarrollo del hepatocarcinoma celular. La especie más importante responsable de esta contaminación es *Aspergillus flavus*.

Por el contrario, la intoxicación por ocratoxina A (OTA) se relaciona en Europa y otros países desarrollados con distintos procesos de afectación renal en el hombre y en los animales, y puede ser detectada en el suero, tanto del hombre como de animales sanos. Su presencia se detecta no sólo en cereales como el maíz, el trigo y la cebada, sino también en bajas concentraciones en productos de amplio consumo como la cerveza, el vino o el café. En esta contaminación participan diferentes especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Cabañes et al. *Toxins*. 2010). Otro contraste entre estos dos grupos de micotoxinas es que para las AFs la ruta biosintética está bien caracterizada y muchos de los genes que participan en esta vía han sido definidos en algunas especies productoras, como es el caso de *A. flavus* (Ehrlich. *Front Microbiol*. 2014). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los genes que están implicados en la biosíntesis de OTA, y su ruta biosintética no está del todo establecida. Hasta la fecha, se han relacionado, en algunas especies, tan sólo algunos genes que codifican policétido sintetasas (*pks*) que participan en los estadios iniciales de la ruta biosintética y una sintetasa de péptidos no ribosomales (Gallo et al. *Appl Environ Microbiol*. 2012). Actualmente disponemos de información sobre los genomas de algunas especies productoras de micotoxinas del género *Aspergillus* (p.e. *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus*, *Aspergillus niger*). Parece ser que la presencia de grupos de genes que codifican metabolitos secundarios es altamente variable incluso en una misma especie. Por otra parte, aunque se conoce muy poco sobre la producción de metabolitos secundarios, los datos disponibles sugieren que la variaciones intraespecíficas observadas y entre diferentes especies de *Aspergillus*, van más allá de las diferencias que se determinan en las secuencias de los genomas (Gibbons & Rokas. *Trends Microbiol*. 2013). Un ejemplo es el caso del distinto perfil de metabolitos que presentan *A. flavus* y la especie domesticada *A. oryzae*, a pesar de las pocas diferencias observadas en los genomas de estas especies (99,5% de

identidad). Para algunos autores *A. oryzae* no es una especie distinta sino un ejemplo más de las muchas cepas no productoras de AFs existentes en *A. flavus* (Ehrlich 2014). No obstante la publicación de los genomas de estas especies productoras de micotoxinas ha permitido descubrir nuevas capacidades de producir micotoxinas en especies no esperadas, como es el caso de las fumonisinas en *A. niger* (Frisvad et al. *J Agric Food Chem.* 2007) o desarrollar técnicas para diferenciar cepas productoras de OTA de las no productoras en esta misma especie (Castellá & Cabañes. *Food Control.* 2011).

En nuestro laboratorio, hemos aislado y caracterizado recientemente cepas de *A. carbonarius* no productoras de OTA (Cabañes et al. *Food Microbiol.* 2013). Esta especie es la principal fuente de OTA en el vino o las uvas pasas producidos en las principales regiones vitivinícolas de todo el mundo. Por otra parte, la producción de esta micotoxina es una propiedad muy consistente en esta especie, hecho por el cual no se encuentran cepas atoxígenas de *A. carbonarius* en la naturaleza. En total estudiamos más de 1.300 cepas de esta especie procedentes de distintas localizaciones y regiones climatológicas de distintos países. Utilizando la secuencia del genoma disponible de una cepa de *A. carbonarius* productora de OTA, hemos iniciado los primeros estudios de la resecuencia del genoma de una de las cepas atoxígenas estudiadas y se están realizando análisis bioinformáticos con el fin principal de encontrar genes involucrados en la síntesis de OTA. La identificación de genes no presentes en las cepas atoxígenas podría ayudar a la predicción de la ruta biosintética de esta micotoxina.

Financiación: Proyecto AGL2010-22182-C04-02. Ministerio de Ciencia e Innovación.

P13

Un alegato a favor de la taxonomía molecular: las especies crípticas en hongos

María P. Martín, Margarita Dueñas y M. Teresa Tellería

Departamento de Micología, Real Jardín Botánico, RJB-CSIC, Madrid, España.

E-mail: maripaz@rjb.csic.es, mdueñas@rjb.csic.es

Taxónomos e investigadores de la biodiversidad estudian y documentan todas las formas de vida en la Tierra. Durante décadas, la identificación y delimitación de las especies se ha basado en el concepto operativo de especie morfológica (MSR), en el que se analizan caracteres fenotípicos (macroscópicos y microscópicos), así como las reacciones químicas. Según los grupos de organismos, estos datos se complementan con información sobre el hábitat, incluyendo el sustrato u hospedante donde se desarrollan. En algunos hongos, como los corticiáceos, el concepto biológico de especie (BSR), basado en el aislamiento reproductivo, ha sido muy utilizado por algunos autores para la delimitación de las especies. Sin embargo, tanto bajo los conceptos de especie morfológica como de especie biológica no siempre pueden establecerse los límites entre las especies, ya que la especiación no siempre va acompañada por cambios morfológicos o fisiológicos.

La existencia de especies crípticas en animales (dos o más especies que han sido erróneamente clasificadas como una única especie) se conoce desde hace unos 300 años. En la actualidad, tras la incorporación de las técnicas moleculares en los estudios sistemáticos, en la mayoría de los grupos se utiliza el concepto operativo de especie filogenética (PSM) basado en la concordancia de las genealogías de varios genes, para delimitar las especies.

En esta comunicación se comentarán algunos ejemplos de especies crípticas descritas en la división Basidiomycota tras la secuenciación y el análisis de distintas regiones del ADN, en particular la región ITS del ADN ribosómico nuclear. Tanto los estudios publicados por otros autores como los de nuestra propia investigación, principalmente en hongos gasteroides y corticiáceos (proyecto actual CGL2012-359), ha permitido corroborar el gran número de especies que se esconden tras algunas especies de amplia distribución.

P14

Localización subcelular de potasio y sodio en levaduras

Rito Herrera, María C. Alvarez, Samuel Gelis y José Ramos

Departamento de Microbiología, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, Córdoba, España. E-mail: mi1raruj@uco.es

La mayor parte de las células vivas acumulan grandes cantidades de potasio para cumplir diversas funciones fisiológicas y, al mismo tiempo, tratan de mantener niveles bajos de sodio, ya que este catión puede ser tóxico si alcanza ciertas concentraciones internas. Por tanto, una distribución intracelular de potasio y sodio correcta es fundamental en la homeostasis de cationes y en el funcionamiento celular. En el caso de las levaduras es sorprendente el hecho de que no han existido protocolos suficientemente fiables para estudiar estos procesos y los pocos estudios que han tratado de determinar la localización subcelular de cationes han resultado ser, en general, demasiado simplistas ya que asumían *de facto* que el 100% de los cationes intracelulares pertenecían a la vacuola o al citoplasma (Okorokov et al 1980). Nuestro grupo ha puesto a punto recientemente un procedimiento en el que tras aislar los principales orgánulos de la levadura, se analiza su contenido en potasio y sodio. Se ha realizado en una cepa silvestre y en diversos mutantes vacuolares. Hemos concluido que, en todos los casos, los núcleos retienen cantidades importantes de potasio y sodio (aproximadamente un 25-35% del total) y que el contenido de potasio del citosol, aunque relativamente bajo, está altamente regulado y se mantiene aceptablemente constante cuando los niveles del catión en el medio son limitantes. Por otra parte, los mutantes vacuolares mostraron una distribución intracelular de cationes alterada con cantidades mayores de potasio y sodio en citosol y menores en vacuola, probable consecuencia de los diversos defectos que presentan en este orgánulo. Finalmente, todas las cepas contenían un porcentaje pequeño pero significativo de cationes en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias (Herrera et al 2013).

Actualmente estamos ampliando nuestro estudio a otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y a nuevas levaduras que, por sus peculiaridades ecológicas y fisiológicas, puedan resultar de interés. De esta manera, hemos determinado la localización subcelular de potasio en mutantes (*trk1,2*) carentes del principal transportador del catión de la membrana plasmática y lo hemos realizado en dos condiciones distintas: utilizando células que crecieron en altas concentraciones del catión (50 mM KCl, condiciones en las que crecen de manera similar a la cepa silvestre) y utilizando células creciendo en condiciones limitantes para el doble mutante *trk* (5 mM KCl). Los resultados, que se mostrarán durante la presentación oral indican que en presencia de altas concentraciones de potasio las dos cepas acumularon cantidades totales de potasio similares y que no hubo grandes diferencias en su compartimentación, aunque se midieron valores algo más bajos en el núcleo y la vacuola, y valores algo más altos en la fracción citoplasmática del mutante. Las diferencias fueron mucho más importantes cuando las dos cepas crecieron en 5 mM de KCl. En estas condiciones la cepa control crece sin problemas pero el mutante

presenta un crecimiento defectivo debido a sus problemas para transportar potasio al interior celular. De esta manera, el potasio intracelular total del mutante sólo alcanzó poco más de la mitad del valor medido en la cepa control. Estas diferencias se vieron reflejadas en todos los orgánulos con disminuciones importantes en el contenido de potasio. Es reseñable que la fracción citoplasmática fue la que, en proporción, mantuvo valores más cercanos a los de la cepa silvestre, lo que confirma la importancia del mantenimiento de cantidades de potasio citosólico lo más constantes posible frente a situaciones de cambio en el exterior.

Por último cabe mencionar que, como se ha indicado anteriormente, estamos interesados en el estudio de otras levaduras de las denominadas no-convencionales. En este sentido, pretendemos analizar el caso de *Debaryomyces hansenii*, una levadura de ambientes salinos e incluso de sodio (Ramos et al 2011).

Habitualmente se ha aceptado que un posible determinante de halotolerancia en este organismo podría residir en una muy eficiente capacidad de secuestrar el sodio en ciertos orgánulos manteniendo un citoplasma prácticamente libre del catión, pero una hipótesis alternativa es que esta levadura se haya adaptado a utilizar sodio en las diversas funciones fisiológicas para las que se usa habitualmente solo potasio y, de esta manera, no sería intoxicada por el catión. Actualmente trabajamos en la adaptación de nuestro protocolo a las peculiaridades de *D. hansenii* (menor tamaño, tipo y cantidad de solutos compatibles o pared celular más resistente) con el fin de poder dar respuesta a las hipótesis alternativas y no mutuamente excluyentes, que se han planteado.

Referencias

- Okorokov et al (1980) J. Bacteriol. 144: 661-665
Herrera et al (2013) Biochemical J. 454: 525-532
Ramos et al (2011) FEMS Microbiol. Lett. 317: 1-8

P15

Injerencias del ciclo celular en la virulencia de un hongo

José Pérez-Martín

Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC), Salamanca. E-mail: jose.perez@csic.es

Durante el proceso infeccioso, el hongo responsable del carbón del maíz, *Ustilago maydis*, produce una estructura específica llamada «filamento infeccioso» que consiste en un hifa dicariótica que se requiere para penetrar en el tejido de la planta. A pesar de ser capaz de crecer, en este filamento el ciclo celular está detenido durante el periodo en que se encuentra en la superficie de la planta, y se activa cuando el filamento invade el tejido vegetal. Las razones y los mecanismos de esta detención del ciclo celular son desconocidos. En nuestro laboratorio hemos estudiado los mecanismos y razones para dicha parada del ciclo celular. Tres conclusiones se pueden extraer de estos estudios. En primer lugar, la detención del ciclo celular asociada con la producción del filamento infeccioso en *U. maydis* es el resultado de la cooperación de, al menos, dos mecanismos distintos capaces de retrasar individualmente el ciclo celular durante la fase G2: un mecanismo implica la activación de la cascada de respuesta al daño del ADN, mientras que el otro se basa en la represión transcripcional de una quinasa, Hsl1, que modula la transición G2/M en este hongo. En segundo lugar, una detención del ciclo celular sostenida durante la etapa de filamento infeccioso es necesaria para la virulencia en *U. maydis*. Una cepa incapaz de detener el ciclo celular está afectada en su capacidad de infectar las plantas de maíz. Por último, hemos encontrado que la producción del apresorio, una estructura requerida para la penetración en la planta, es incompatible con un ciclo celular activo y que la incapacidad para infectar plantas por cepas defectuosas en la detención del ciclo celular parece ser causada por la incapacidad para inducir el proceso de formación del apresorio. Estos resultados revelan conexiones claras entre la regulación del ciclo celular y el proceso de infección, y es probable que se puedan utilizar en el conocimiento de los procesos de virulencia de otras especies fúngicas.

P16

Toxicidad y señalización mediada por H₂O₂ en la levadura de fisión

Elena Hidalgo

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España. E-mail: elena.hidalgo@upf.edu

Las especies reactivas derivadas del oxígeno son productos secundarios no deseados del metabolismo oxidativo; el estrés oxidativo aparece cuando se generan desequilibrios entre la síntesis y la degradación de dichas especies. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) puede inducir daño a todo tipo de biomoléculas, con la generación específica en las proteínas de carbonilaciones irreversibles o de tioles oxidados, entre otras modificaciones. De todas formas, las fluctuaciones del H₂O₂ también pueden participar en eventos de señalización. Así, las rutas de Pap1 y de Sty1 en *Schizosaccharomyces pombe* se inducen por peróxidos con el objetivo de activar defensas antioxidantes para reducir el estrés y reparar los daños. La toxicidad y la señalización por H₂O₂ comparten la reactividad asociada a cada tipo de ROS. En base a la capacidad del H₂O₂ de oxidar grupos tioles (-SH) de forma reversible, las células utilizan proteínas sensoras con residuos de cisteína expuestos, cuya oxidación reversible a un sulfénico (-SOH) o a un disulfuro (-S-S-) pueda inducir una ganancia de función y una activación de una ruta antioxidante.

Los principales temas de esta charla serán: (i) estudiar las consecuencias tóxicas de un exceso de H₂O₂ en proteínas, analizando a nivel del proteoma la formación de disulfuros (modificación reversible) y de grupos carbonilo (modificación irreversible), para entender mejor la reactividad de peróxidos; (ii) integrar estos conocimientos sobre la reactividad del H₂O₂ con la activación de rutas de señalización que respondan a H₂O₂, estudiando la ruta de Pap1; y (iii) determinar la participación del sistema de tiorredoxina tanto en la formación general de disulfuros como en la activación del sensor Pap1.

P17

Genome and transcriptome analyses on the basidiomycete *Pleurotus ostreatus* reveal a novel allelic imbalance pattern

Francisco Santoyo and Lucía Ramírez

Genetics and Microbiology Research Group, Department of Agrarian Production, Public University of Navarre, 31006 Pamplona, Spain. Francisco. E-mail: santoyo@unavarra.es

Basidiomycete fungi are an attractive model system for the study of basic questions in genetics and genomics. During most of their life cycle, sexually competent basidiomycetes grow as dikaryons instead of the diploid nuclear structure found in most other organisms. The dikaryotic configuration maintains the two parental nuclei independent in the cytoplasm providing, at the same time, haploid and diploid properties to the organism. This offers a unique possibility for the functional study of the two cell genomes as separate nuclei and forming a dikaryon.

Pleurotus ostreatus is an industrially-produced edible basidiomycete popularly known as oyster mushroom. Besides its use as a food-oriented agriculture product, it is also an efficient producer of ligninolytic enzymes. Lignin is a major constituent of plant cell walls where it cements and protects the cellulose molecules. Lignin is recalcitrant to biodegradation and there are a limited number of organisms able to produce enzymes able to degrade it. Being among these organisms, *P. ostreatus* can be classified as a white rot basidiomycete that degrades lignin using extracellular peroxidases (manganese and versatile peroxidases) and laccases to gain access to the cellulose. This enzyme portfolio differentiates the degrading strategy followed by *P. ostreatus* from that of the deeply studied white rot model basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, which lacks laccases but contains lignin peroxidases. Beyond these different strategies, white rot fungi differ from the other type of lignin degraders (brown rot) by the fact that these last ones attack the cellulose with only a minor alteration of the lignin.

Supported by their industrial interest, with the aim of addressing questions about functional genomics in dikaryons and to better understand the strategies used by white rot fungi to degrade lignin, we sequenced independently the two genomes (PC9 and PC15) present in a dikaryotic (N001) strain of *P. ostreatus* using a combination of classical and new sequencing technologies, and we have complemented this sequencing effort with several transcriptomics and proteomics studies.

The two haploid *P. ostreatus* genomes are formed by 35.6 (PC9) 34.3 (PC15) Mbp, and include 12,206 and 12,330 genes, respectively. The two genomes share 10,618 genes that are allelic and have 1,588 (13%) and 1,712 (14%) that are specific for PC9 and PC15, respectively. These genomes are organized in 11 chromosomes ranging in size from 4.7 to 1.4 Mbp (as determined by CHEF and supported by the sequence data). The two genomes present several chromosome polymorphisms, mainly in the form of inversions that break down synteny and form supergenes within which genetic recombination is suppressed.

The transcriptome analyses carried out have permitted to refine the genome annotation and have revealed that most of the genome (>10,000 genes, >80% of the genes) is being transcribed in every tested condition, and a high prevalence of alternative splicing events in both genomes.

As individual alleles, the two haploid genomes present in the dikaryon N0012 can be sorted out on the basis of their SNPs, it is possible to determine the individual contribution of each of the two alleles to the combined expression level of each of the genes in the genome. We have addressed this problem by a combination of transcriptomics analyses of cultures performed under different conditions and bioinformatics approaches using different dikaryotic strains, and we have found a novel allelic imbalance pattern in which imbalanced genes are found clustered amid most of the genes in which both alleles are equally transcribed.

P18

Nuevos retos de una epidemiología cambiante de las micosis

Benito Almirante

Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España.

E-mail: balmirante@vhebron.net

La epidemiología de las infecciones fúngicas invasoras, tanto en los pacientes inmunodeprimidos como en el resto de la población, está sometida a cambios constantes. En los últimos años, la frecuencia de las infecciones sistémicas producidas por hongos filamentosos ha disminuido de manera considerable. Sin embargo, la incidencia en nuestro medio de la candidiasis invasora y de la candidemia ha aumentado ostensiblemente, alcanzando cifras superiores a 8 episodios por 100.000 habitantes y año. Este incremento de la candidemia puede estar condicionado por múltiples factores dependientes del huésped susceptible, de las actividades diagnósticas o terapéuticas practicadas a los pacientes de alto riesgo o a la utilización frecuente de antibióticos de amplio espectro o antifúngicos con actividad sistémica. Además de la mayor frecuencia de la candidiasis invasora, en años recientes se ha documentado una clara modificación en el espectro de las especies causantes de la candidemia, con un predominio de las especies diferentes a *C. albicans*, en especial *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, y un aumento de las tasas de resistencia a los azoles. La introducción de nuevos y más activos fármacos con actividad antifúngica, la mejora en la metodología diagnóstica y la elevada sospecha de la enfermedad en determinados pacientes, con la consiguiente indicación de la aplicación precoz de medidas terapéuticas adecuadas, han contribuido a una reducción significativa de la mortalidad. El reconocimiento de estos cambios epidemiológicos es crítico para el cuidado de los pacientes. Los elementos clave para la selección del tratamiento antifúngico óptimo son el tipo de paciente, el foco de origen de la infección, la gravedad de la enfermedad de base, la historia previa de exposición a antifúngicos y el conocimiento del género, especie y sensibilidad antifúngica del patógeno infectante.

P19

Nuevos retos diagnósticos en el laboratorio de microbiología

Julio García Rodríguez

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

E-mail: jgarcia.hulp@salud.madrid.org

En los últimos quince años, han surgido nuevos test diagnósticos (1-4) y nuevas moléculas antifúngicas (5) que han generado grandes esperanzas en el manejo y el pronóstico de los pacientes con infecciones fúngicas invasoras (IFI). Sin embargo, todavía los episodios de candidiasis, aspergilosis y otras IFI siguen teniendo una alta morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados (6). Y es que a pesar de la alta eficacia de los nuevos antifúngicos, el principal reto se encuentra en el desarrollo de tests diagnósticos que cumplan los siguientes requisitos:

- i) *Seguros*. En términos de alta sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo.
- ii) *Precoces*. Que permitan diagnosticar con anticipación aquellos pacientes que están desarrollando una IFI.
- iii) *Orientación terapéutica*. Si fuera posible, que tengan valor pronóstico sobre el episodio y que guíen al médico en cuanto a la respuesta al tratamiento.
- iv) *Comerciales*. Existen numerosos tests diagnósticos de IFI desarrollados en cada laboratorio de microbiología: *in house*. Aunque la mayor parte de las veces ofrecen buenos resultados, generalmente suelen tener problemas de reproducibilidad a la hora de exportar dicho rendimiento a otros centros. La utilización de tests comerciales garantiza la estandarización y la comparación entre diferentes laboratorios.
- v) *Económicos*. La cada vez mayor limitación de recursos económicos exige que los nuevos tests diagnósticos incorporados en el laboratorio de microbiología tengan un coste razonable. Esto garantizará su mayor implantación en los centros;
- vi) *Automatizables*. La automatización es un requisito imprescindible para la introducción de nuevas tecnologías diagnósticas en un laboratorio de microbiología clínica. Aporta seguridad y estandarización en el desarrollo de la técnica. En definitiva calidad en el resultado diagnóstico.
- vii) *Rápidos*. La mayoría de las IFI ocurren en población muy inmunodeprimida de alto riesgo. Se necesitan por tanto unos métodos diagnósticos que proporcionen buenos resultados en el menor tiempo para adoptar las medidas adecuadas de forma urgente.

Retos en el diagnóstico de la candidiasis

El diagnóstico de las candidiasis ha cambiado poco en los últimos años. El hemocultivo, a pesar de su reconocida baja sensibilidad, sigue siendo el método de referencia para las candidemias (7,8). Existe, por tanto, una clara necesidad de mejorar el diagnóstico y por eso se han desarrollado recientemente diversas estrategias basadas en la detección de biomarcadores (9), detección de ácidos nucleicos circulantes mediante PCR (10) o escalas clínico-microbiológicas que combinan diferentes parámetros para predecir aquellos pacientes de más riesgo de

padecer una candidemia (11). Todos estos sistemas, debido a su baja sensibilidad o valor predictivo negativo, no se han mostrado lo suficientemente buenos como para sustituir al hemocultivo como técnica de referencia y los diferentes autores proponen estrategias de uso combinado para incrementar el valor predictivo positivo y así instaurar precozmente un tratamiento adecuado (10) o para aumentar el valor predictivo negativo y poder retirar con seguridad un tratamiento antifúngico empírico (12).

Retos en el diagnóstico de la aspergilosis

La aspergilosis invasora presenta tasas de mortalidad del 40-90% dependiendo del momento en que se inicia el tratamiento (6). Esta situación parecía haber cambiado con la aparición a finales de los 90 del test de galactomanano que, de manera no invasiva, ayuda al diagnóstico de la aspergilosis invasora de una forma precoz (13). Sin embargo, sus problemas de especificidad con numerosas reacciones cruzadas (14,15) así como de sensibilidad en pacientes sometidos a tratamiento o profilaxis con antifúngicos (16) ha impulsado a la investigación de nuevos métodos diagnósticos basados en técnicas moleculares (17). Recientemente se han descrito nuevos tests basados en técnicas de inmunocromatografía (18) o en la detección electrónica de sustancias volátiles exhaladas en la respiración (19) que podrían mejorar los problemas de sensibilidad y especificidad de las técnicas actuales y, sobre todo, aportarían rapidez diagnóstica, algo fundamental en estos enfermos de alto riesgo.

Retos en otras micosis sistémicas

Los retos que se plantean para el diagnóstico de otras micosis menos frecuentes son aún mayores ya que hay una absoluta carencia de tests comerciales basados en biomarcadores, salvo alguna experiencia con galactomanano para el diagnóstico precoz de la fusariosis (20). Actualmente, todavía el cultivo y el examen directo de la muestra es el método principal en la mayor parte de los laboratorios de micología. Aunque hay numerosas experiencias con técnicas de PCR específicas para algunos grupos de patógenos (21,22), e incluso con PCR panfúngicas (23), no hay hasta el momento un formato comercial que permita introducir esta tecnología más allá de los centros de referencia o de laboratorios de micología más avanzados. En conclusión, los retos a los que se enfrenta el micólogo actual consisten en incrementar la rapidez y seguridad así como en el desarrollo de tecnologías aplicables al diagnóstico de otras micosis más allá de la candidiasis y la aspergilosis.

Referencias

1. Xavier MO, Pasqualotto AC, Aquino VR, Sukiennik TCT, Severo LC. Galactomannan detection from piperacillin-tazobactam brands available in the Brazilian market. *Braz J Infect Dis*. 2009;13:353-5.
2. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1→3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995;345:17-20.
3. Hope W, Walsh T, Denning D. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005;5:609-22.
4. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2181-7.
5. Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin Infect Dis* 2006;43:1060-8.
6. Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin* 2013;29(S4):3-11.

7. Cantón E, García-Rodríguez J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Guinea J. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin SEGO*; 2013 Mar 14:1–5.
8. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 39:e1–15.
9. Pontón J. Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2009;26:8–14.
10. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: How non-culture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013.
11. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the “Candida score” for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2009;37:1624–33.
12. Martínez M, Muñoz P, Guinea J, Valerio M, Alonso P, Escribano M, et al. Role of serologic markers to exclude candidemia. 53th ICAAC. Denver, CO; 2013. pp. 1–1.
13. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, van Eldere J. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. *Mycoses* 2007; 50 Supl 1:2–17.
14. Hage CA, Reynolds JM, Durkin M, Wheat LJ, Knox KS. Plasmalyte as a cause of false-positive results for *Aspergillus* galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2006; 45: 676–7.
15. Lim Z, Ho A, Devereux S, Mufti G, Pagliuca A, Wade J, et al. False positive results of galactomannan ELISA assay in haemato-oncology patients: A single centre experience. *J Infection* 2007; 55: 201–2.
16. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1762–9.
17. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 89–96.
18. Held J, Schmidt T, Thornton CR, Kotter E, Bertz H. Comparison of a novel *Aspergillus* lateral-flow device and the Platelia® galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation. *Infection* 2013; 41: 1163–9.
19. De Heer K, van der Schee MP, Zwiderman K, van den Berk IA, Visser CE, van Oers R, et al. Electronic nose technology for detection of invasive pulmonary aspergillosis in prolonged chemotherapy-induced neutropenia -- a proof of principle study. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1490–5.
20. Nucci M, Carlesse F, Cappellano P, Varon AG, Seber A, Garnica M, et al. Earlier diagnosis of invasive fusariosis with *Aspergillus* serum galactomannan testing. *Andes DR*, editor. *PLoS ONE* 2014;9:e87784.
21. Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Beveridge MG, et al. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3690–702.
22. Castelli MV, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3412–6.
23. Babouee B, Goldenberger D, Elzi L, Lardinois D, Sadowski-Cron C, Bubendorf L, et al. Prospective study of a panfungal PCR assay followed by sequencing, for the detection of fungal DNA in normally sterile specimens in a clinical setting: a complementary tool in the diagnosis of invasive fungal disease? *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: E354–7.

P20

Nuevas dianas antifúngicas

Lourdes Villa-Tanaca¹, Dulce Andrade-Pavón¹, Blanca Rosales-Acosta¹, Eugenia Sánchez-Sandoval¹, Antonio Ibarra-García¹, Félix Tamay-Cach³ y Joaquín Tamariz-Mascarúa²

¹Depto. De Microbiología; ²Depto. de Química Orgánica/Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,

³Depto. de Bioquímica/Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional, México D.F. México. E-mail: mvillat@ipn.mx

Las infecciones fúngicas invasivas en el ser humano son críticas y en las últimas décadas han aumentado en pacientes inmunodeficientes. Desafortunadamente, la colección de compuestos antifúngicos es limitada, en comparación con los antibacterianos existentes. Estudios recientes sugieren que los antimicóticos convencionales se han vuelto ineficientes debido a la selección de nuevas formas resistentes de hongos. Como una alternativa, se ha sugerido la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en los hongos que puedan permitir variación en los esquemas terapéuticos.

En nuestro grupo de investigación se han estudiado tres dianas antifúngicas alternativas: a) La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (Hmgr), clave en la síntesis de mevalonato, compuesto precursor de la síntesis del ergosterol; b) Las aspartil proteasas consideradas factores de virulencia y codificadas por los genes *SAP's* y *YPS's*; y c) Las proteasas vacuolares de *Candida glabrata*, participantes en el proceso de autofagia y supervivencia de la levadura. Con respecto a la enzima Hmgr, se diseñaron y sintetizaron compuestos derivados de fibratos y estatinas, capaces de inhibir la actividad enzimática.

Los criterios para el diseño de los compuestos consideraron inhibidores más efectivos que las estatinas comerciales y fibratos conocidos o por lo menos que presentaran baja toxicidad o efectos secundarios. Se estudió la inhibición de las enzimas Hmgr de *C. glabrata* y *Candida albicans*; además de ser especies filogenéticamente alejadas, *C. glabrata* puede presentar resistencia natural a los azoles. Los compuestos diseñados fueron capaces de inhibir la viabilidad de las levaduras, la síntesis de esteroides (principalmente la del ergosterol), así como de generar mutantes *petite* a una frecuencia menor que las estatinas. Se ha reportado una relación entre la pérdida de DNA mitocondrial de las mutantes *petite* y la resistencia a los azoles en *C. glabrata* al utilizar simvastatina; es por este motivo que los compuestos diseñados en este trabajo presentarían ventajas sobre las estatinas conocidas. El análisis de modelado molecular o *docking* sugiere la fuerte unión de los inhibidores al sitio activo de la enzima. La inhibición de la enzima Hmgr-Cg se confirmó en la enzima recombinante soluble, expresada en el sistema heterólogo de *Pichia pastoris* (rec-HmgrCg-Pp).

Se observó por análisis bioinformático que el sitio activo de las enzimas Hmgr de diferentes hongos y levaduras se encuentra altamente conservado (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, etc.), incluyendo el de las proteínas de hongos como *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, así como el de hongos

fitopatógenos como *Ustilago maydis*. Se propone la enzima Hmgr como una diana antifúngica alternativa, cuyos inhibidores podrían contribuir a aumentar el limitado número de compuestos antimicóticos con los que se cuenta actualmente.
(CONACyT 133695; SIP20141333)

P21

Nuevos retos terapéuticos y nuevas terapias antifúngicas

Antonio Rezusta¹ y Yolanda Gilaberte²

¹Microbiología Hospital Universitario Miguel Servet, Universidad de Zaragoza, IIS Aragón;

²Dermatología Hospital San Jorge de Huesca. IIS Aragón. E-mail: arezusta@salud.aragon.es

Aunque el objeto de salud fundamental del sistema sanitario es el ser humano, este no se puede alcanzar sin un adecuado sistema de salud animal y vegetal. Este aspecto es especialmente importante en aquellos procesos cuyo agente causal puede estar presente en cualquiera de estos hábitats, como ocurre con los hongos. Por ello, un reto muy importante para la micología del siglo XXI es su consideración global, *one health*, ya que procurar salud al ser humano no depende sólo de una correcta atención médica, sino también de mantener un ecosistema saludable y una economía al servicio de la salud planetaria. En este contexto, surge la pregunta de qué se puede hacer para mantener la salud o, en caso de estar alterada, para recuperarla. Para ello nos planteamos varios retos:

Diagnóstico: Realizar un diagnóstico más adecuado comienza por ser emitido con rapidez. Para ello, la observación microscópica continúa siendo fundamental y debe ser realizada por expertos; esto también conlleva una estrecha colaboración del micólogo con el patólogo. El diagnóstico molecular supone una mejora importante, especialmente utilizando amplificaciones panfúngicas. Sin embargo, no está aprobado por instituciones como la EORTC/MSG para el diagnóstico de la infección invasiva probada, ya que necesita una validación adecuada.

El cultivo, estrategia que se ve inadecuada, especialmente en muestras respiratorias, también puede ser mejorable. De hecho, cuando se aumenta la cantidad de muestra sembrada o la modificación del procedimiento la rentabilidad se incrementa considerablemente.

Guías clínicas: La realización de guías terapéuticas que complementen a las ya confeccionadas por la IDSA y el ESMID es un paso importante para el manejo de las micosis basado en evidencias. Estas han supuesto un acuerdo importante, facilitando las decisiones y estableciendo criterios para la realización de metaanálisis. Sin embargo, es fundamental que la elaboración de estas guías se haga de forma independiente de las grandes multinacionales.

Nuevos tratamientos: En los últimos años están apareciendo nuevos antifúngicos, generalmente tópicos, que son variantes de los ya existentes y que por tanto aportan pocos beneficios sobre los ya existentes, siendo generalmente más caros. Pensamos que es necesario buscar nuevas estrategias terapéuticas.

Una de estas estrategias puede ser el uso de la luz, ya sea sola, como por ejemplo los láseres, o asociada a fotosensibilizantes, es lo que se denomina terapia fotodinámica (TFD). La llamada TFD antimicrobiana ofrece resultados esperanzadores en lesiones cutáneas y subcutáneas, así como en infecciones ungueales, si bien se ha utilizado de forma esporádica, especialmente en pacientes sin respuesta a tratamientos convencionales.

Los láseres se están utilizando con buenos resultados en el tratamiento de las onicomicosis. La mayoría de los estudios realizados han utilizado láser Nd:YAG y algunos, láseres de diodo. Al parecer el mecanismo de muerte del hongo es mediante la inducción de reacciones fotoquímicas que produzcan la muerte selectiva de los hongos, aunque está poco estudiado. Según las diferentes series, los resultados oscilan entre un 79% y el 93,5% de mejoría.

Otra de las estrategias más novedosas es la utilización de probióticos, tanto en la prevención de micosis, como parece demostrado en el recién nacido de bajo peso, o en la detoxificación de alimentos que contienen micotoxinas.

Otros fármacos que actúan como inmunomodulares también pueden ser de ayuda como, por ejemplo la lactoferrina, especialmente útil en los nacidos pretérmino de muy bajo peso para la prevención de candidemia.

Por otro lado, es muy importante buscar nuevas formas de tratamiento de los vegetales como forma de evitar resistencias, especialmente en especies de *Aspergillus*, como son la utilización de bioprotectores, o microorganismos como biocontroladores.

Como conclusión podemos decir que en el tratamiento de la infección humana, la mejora en el diagnóstico es una herramienta fundamental, que los consensos o guías favorecen el mejor manejo del paciente, y que la necesidad de buscar nuevos tratamientos viene justificada por la existencia de infecciones que no responden a los tratamientos actuales, por el riesgo de aparición de cepas o especies resistentes, y para evitar los riesgos alimentarios tanto para personas como para animales.

P22

Levaduras humanizadas con la ruta de señalización PI3K-Akt: simplificando la investigación oncológica

Victor J. Cid¹, Isabel Rodríguez-Escudero¹, Teresa Fernández-Acero¹, Maria Dolors Oliver¹, Ignacio Bravo¹, María Molina¹ y Rafael Pulido²

¹Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid; ²BioCruces Health Research Institute, Barakaldo; e Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao, Euskadi.

E-mail: vicjid@ucm.es

Saccharomyces cerevisiae constituye un modelo celular básico para investigación en Biomedicina, gracias a la conservación estructural y funcional de procesos fisiológicos esenciales a nivel molecular, incluida la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Sin embargo, esta levadura carece de actividad fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de clase I y, por tanto, de señalización celular mediada por el fosfoinosítido PtdIns(3,4,5)-P₃, que desempeña un papel clave en múltiples procesos regulatorios en eucariotas superiores, y cuya desregulación es común en procesos oncogénicos y otras patologías.

Hemos reconstituido mediante expresión heteróloga en *S. cerevisiae* el módulo de señalización constituido por las subunidades reguladora y catalítica de PI3K (p85 y p110), su regulador negativo (la fosfoinosítido fosfatasa PTEN) y su principal efector, la proteína quinasa Akt. La expresión de estos genes causa efectos de sencilla monitorización en la célula de la levadura, lo que permite utilizar este microorganismo “humanizado” para realizar estudios funcionales y farmacológicos de forma rápida y sencilla, dada la versatilidad genética del sistema.

En concreto, hemos utilizado este sistema para definir la contribución individual de diversos dominios de las subunidades de PI3K a la función, reproduciendo la ganancia funcional de mutaciones oncogénicas tanto en p85 como en p110, así como en Akt1. Las mutaciones en el supresor de tumores PTEN están asociadas a múltiples carcinomas, tanto de línea germinal como somáticos. Hemos realizado análisis mutagénicos exhaustivos tanto al azar como de manera dirigida por Ala-scanning que han permitido relacionar los diversos dominios de PTEN con su función *in vivo*. Además, hemos adaptado la levadura humanizada a un bioensayo para la búsqueda y evaluación de inhibidores de PI3K utilizable a escala de alto rendimiento (HTS) con potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales.

P23

***Mucor circinelloides* como modelo de estudio de hongos basales**

Victoriano Garre

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, España. E-mail: vgarre@um.es

La mayoría de los modelos de estudio del reino de los hongos pertenecen al subreino Dykaria, mientras que existen pocos modelos dentro del subreino llamado de los "hongos basales". Este segundo subreino incluye especies que son patógenos oportunistas, cuyo estudio se ve dificultado por la ausencia, en la inmensa mayoría de los casos, de herramientas moleculares adecuadas. Una excepción destacada es *Mucor circinelloides*, que posee una batería de herramientas moleculares para la manipulación de su genoma comparable a las disponibles en hongos dicarióticos, convirtiéndolo, probablemente, en el mejor modelo de estudio de hongos basales. Esto ha hecho que se utilice como modelo en la caracterización a nivel molecular de las respuestas a la luz, el dimorfismo y, más recientemente, el silenciamiento génico (RNAi) y la patogénesis (mucormicosis). El mecanismo de RNAi, en el que se generan RNAs de pequeño tamaño (siRNAs) que dirigen la degradación de los mRNAs diana, es considerado clásicamente como un mecanismo de defensa del genoma contra la invasión de elementos genéticos móviles o DNA exógeno. Sin embargo, la identificación en plantas y animales de siRNAs endógenos (esRNAs) con funciones reguladoras ha puesto de manifiesto que el mecanismo de RNAi tiene también un papel en el control de la expresión génica. Nuestro grupo ha identificado varias clases de esRNAs en *Mucor* que regulan la expresión de los genes que los producen. Estos esRNAs juegan un papel importante en la fisiología del hongo, ya que mutantes en algunos genes clave de la maquinaria de RNAi, que presentan niveles más bajos de muchos esRNAs, muestran defectos en el crecimiento y morfología de las hifas, reducida producción de esporas asexuales y zigosporas, autólisis acelerada y mayor virulencia. Además, el análisis bioinformático de los esRNAs identificados en *Mucor* ha proporcionado un listado de genes candidatos a participar en procesos importantes del hongo, como las respuestas a la luz y la patogénesis.

Investigación financiada por el MINECO (BFU2012-32246) con cofinanciación FEDER.

P24

Los puntos cardinales de la investigación orientada al mercado

Unai Ugalde

Universidad del País Vasco, Departamento de Química Aplicada, Facultad de Ciencias Químicas, Donostia-San Sebastián. E-mail: unaiona.ugalde@ehu.es

El progresivo descenso de los fondos públicos destinados a la investigación durante los últimos años en España ha propiciado una mayor atención por parte de los investigadores hacia proyectos empresariales. Sin embargo, la experiencia en este ámbito es habitualmente escasa, la cultura de las relaciones público-privadas es históricamente pobre y los medios e instrumentos dirigidos a dar apoyo ese ámbito son todavía insuficientes. En consecuencia, el salto al ámbito empresarial conlleva necesariamente un proceso de adaptación al nuevo medio, y un cambio de perspectiva.

Cada proyecto empresarial tiene su complejidad y características específicas, por lo que no es posible establecer claves de aplicación general. Sin embargo, cualquier proyecto orientado al mercado debe sostenerse sobre una base sólida en cada una de las siguientes áreas:

- 1) Estrategia de Mercado
- 2) Conocimiento sobre la Regulación Legal que atañe al producto o servicio
- 3) Novedad e Importancia del Conocimiento
- 4) Protección y Transferencia de Propiedad Intelectual
- 5) Gestión de la Fabricación, Almacenamiento, Caducidad y Distribución
- 6) Gestión Económica

En esta presentación, se explicará con ejemplos aquellos aspectos (algunos, no son evidentes) que aconsejan el abordaje de la investigación orientada al mercado como un proyecto de equipo, con la participación o el apoyo de expertos en cada una de las áreas que lo conforman.

P25

La respuesta al frío en *Saccharomyces cerevisiae*: un modelo para el estudio del control del metabolismo lipídico

Francisca Randez-Gil, Jose A. Prieto e Isaac Córcoles-Sáez

Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, Valencia, España. E-mail: randez@iata.csic.es

El estudio de los mecanismos de respuesta y adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* al frío, nos ha llevado a fijarnos en la membrana plasmática como una diana tanto del daño, como de la percepción de los cambios ambientales. Hemos centrado nuestra atención en los lípidos, no sólo como moléculas de la arquitectura de la membrana, sino también como moléculas señalizadoras que pueden afectar a procesos tan importantes como la propia biosíntesis de lípidos.

Nuestros resultados nos permiten proponer un modelo en el que la exposición al frío reduce la fluidez de los lípidos de membrana y estimula el metabolismo de PtdIns(4,5)P₂ por Plc1p. La hidrólisis del fosfoinosítido incrementa la abundancia de sus derivados polifosfato, particularmente de la molécula 1(3)-InsP₇, y probablemente de 5-InsP₇, que regulan la abundancia y actividad de Pah1p y quizás la de otros efectores. Estos cambios permiten modular a diferentes niveles la biosíntesis de clases y sub-clases de lípidos y establecer un mecanismo de homeostasis de la fluidez de membrana.

En este sentido, cabe destacar el importante déficit lipídico detectado en el mutante *inp51Δ* o en el sobre-expresante de *PLC1*, en especial de TAG. Por contra, la ausencia de *HOG1* promueve la acumulación de lípidos en la célula, algo que concuerda con la función inhibitoria previamente descrita para su homólogo p38 en lipogénesis hepática (1). Recientemente, se han descrito también en *Drosophila melanogaster* una homeostasis lipídica alterada en mutantes defectivos en el receptor de InsP₃, que da lugar a obesidad (2). Por tanto, dado que PtdIns(4,5)P₂ aparece como un importante modulador de la biosíntesis de lípidos, la inhibición de la actividad fosfatasa de Inp51p o la activación de Plc1p podrían ser dianas terapéuticas para el diseño de drogas en el tratamiento de desórdenes lipídicos.

Referencias

1. Xiong Y. y col. (2007) J Biol Chem **282** (7): 4975-82.
2. Subramanian M. y col. (2013) BMC Neurosci **14**: 157.

P26

Infecciones por *Cryptococcus gattii*

M^a Francisca Colom

Dpto. de Prod. Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández. Sant Joan D'Alacant, España. E-mail: colom@umh.es

La criptococosis es una enfermedad que resulta de la inhalación de propágulos infecciosos de criptococos del medio ambiente. La infección primaria pulmonar puede resolverse rápidamente, progresar a infección fulminante o persistir asintomática durante largos periodos de tiempo. Esta situación de latencia puede cambiar en un determinado momento, con la diseminación de criptococos por vía sanguínea hasta el cerebro, causando síntomas neurológicos, meningoencefalitis y, finalmente, la muerte si no se trata. La criptococosis está producida por levaduras del complejo de especies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.

C. gattii (antes *C. neoformans* var. *gattii*) fue elevada a la categoría de especie debido a importantes diferencias con *C. neoformans* tanto en la morfología, como en el perfil bioquímico y secuencias moleculares. Se considera que esta especie divergió de *C. neoformans* hace unos 37,5 millones de años. Ambas son responsables de producir enfermedad en casi un millón de individuos al año, con unas 620.000 muertes atribuibles, siendo responsables de un tercio de las muertes asociadas a VIH/sida. La virulencia y la epidemiología de ambas especies son distintas, siendo *C. neoformans* cosmopolita y la que causa con mayor frecuencia patología en individuos inmunodeficientes. *C. gattii* afecta a personas inmunocompetentes, es endémica en muchas regiones tropicales y sub-tropicales, y se asocia con brotes de enfermedad en el ser humano y los animales en zonas no cálidas del mundo, lo que lo convierte en un patógeno de interés global en salud pública.

Los estudios epidemiológicos realizados en la última década, sugieren que *C. gattii* es un patógeno fúngico emergente, con un ámbito geográfico en expansión.

Originalmente, se consideró restringido al trópico y subtropico, pero desde el inicio del siglo XXI estamos acumulando evidencias de una amplia expansión en Asia, África, Europa, Australia y Sudamérica, con importantes brotes en zonas del norte de América de las que no se había sospechado nunca que pudieran albergar este patógeno.

C. gattii se considera clínicamente más virulento que *C. neoformans* ya que causa múltiples lesiones en el pulmón y el cerebro de los pacientes afectados. Se comporta de forma similar a otros hongos patógenos primarios, y causa infección diseminada en piel y lesiones pulmonares que pueden ser confundidas con tumores malignos. Las infecciones de cerebro (meningoencefalitis) causadas por *C. gattii* muestran una respuesta lenta a la terapia estandarizada y requieren un mayor seguimiento diagnóstico que las debidas a *C. neoformans*.

Dentro de la especie, *C. gattii* puede ser subdividido en dos serotipos (B and C) y cuatro tipos moleculares o genotipos, denominados VGI, VGII, VGIII, y VGIV. Además, se han descrito algunos híbridos de VGI con *C. neoformans*. La discriminación de los tipos moleculares es de gran importancia clínica y epidemiológica ya que los

genotipos VGI y VGII son los que se han asociado mayoritariamente a los casos de criptococosis en pacientes previamente sanos. Son los responsables de los brotes descritos en la región americana de la costa norte del Pacífico, en los aborígenes del Territorio del Norte en Australia, los de la provincia central de Papúa Nueva Guinea y los registrados hasta ahora en la Europa mediterránea. Por otro lado, los genotipos VGIII y VGIV parece que normalmente producen enfermedad en individuos inmunodeprimidos, incluyendo los VIH/sida, con un comportamiento clínico similar a *C. neoformans*. La gravedad de las infecciones producidas por los genotipos más virulentos de *C. gattii* se debe a una defectiva inducción de la respuesta inmune del hospedador, lo que resulta en concentraciones bajas de citoquinas proinflamatorias, que son cruciales para controlar la diseminación del hongo en el organismo.

P27

Enfermedades asociadas con *Pneumocystis jirovecii*

Enrique Calderón

CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. E-mail: sandube@cica.es

Pneumocystis carinii fue considerado durante mucho tiempo una única especie que infectaba a toda clase de mamíferos. Sin embargo, actualmente se reconocen numerosas especies dentro del género *Pneumocystis*, con *Pneumocystis jirovecii* como la única que infecta al ser humano y quedando claro que la neumocistosis no es una zoonosis. Aunque la primera enfermedad que se relacionó en el hombre con *Pneumocystis* fue la neumonía intersticial de células plasmáticas, proceso que afectaba a niños prematuros o malnutridos, y que adquirió proporciones epidémicas en Centroeuropa a mediados del siglo XX, no sería hasta la pandemia del sida que la neumonía causada por *Pneumocystis* (PcP) adquiriera notoriedad al convertirse en la primera causa definitiva de sida y en un auténtico problema de salud pública. Sin embargo, con la introducción de la quimioprofilaxis en los noventa y después con las combinaciones de antirretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH, la incidencia de PcP en estos pacientes disminuyó significativamente en los países desarrollados, pasando en Europa de 4,9 a 0,3 casos por 100 personas/año. Pero, en contraste con esto, la incidencia de PcP se ha incrementado en sujetos inmunodeprimidos sin infección por el VIH, probablemente debido al cada vez mayor número de pacientes que reciben tratamientos inmunosupresores para evitar el rechazo de trasplantes o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En este sentido, los nuevos tratamientos biológicos con acción anti-TNF han mostrado ser un factor de riesgo para PcP. Por otra parte, los tratamientos cada vez más agresivos para el control de las neoplasias también constituyen un riesgo para sufrir PcP. Datos recientes del Reino Unido han puesto en evidencia un incremento medio anual del 7% en los casos confirmados de PcP en la última década y cómo este incremento corresponde a pacientes sin infección por el VIH, no sólo trasplantados o pacientes con neoplasias, sino también sujetos con enfermedades pulmonares de base. Clásicamente, atendiendo a la edad de los pacientes y a la enfermedad de base responsable de la inmunodepresión, se han diferenciado cuatro formas clínicas de infección por *Pneumocystis*: i) asintomática, ii) infantil o neumonía intersticial de células plasmáticas, iii) neumonitis esporádica niño-adulto de pacientes inmunodeprimidos y iv) infección extrapulmonar. En la actualidad, en relación sobre todo con el uso combinado de potentes antirretrovirales frente a la infección por el VIH, habría que añadir la PcP asociada al síndrome de reconstitución inmune. Hoy día el interés por este microorganismo trasciende a los sujetos inmunodeprimidos y cada vez más datos apuntan a que vemos sólo la punta del iceberg de las manifestaciones que la infección por *Pneumocystis* puede producir en el hombre. Estudios seroepidemiológicos han demostrado que el 80% de la población infantil ha tenido contacto con este microorganismo, cuya primoinfección en los niños pequeños puede manifestarse como una infección respiratoria aguda.

Además, algunos estudios han asociado la presencia de *Pneumocystis* con el síndrome de muerte súbita del lactante aunque esta relación ha sido cuestionada recientemente.

Por otra parte, se ha podido establecer la alta prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas como la fibrosis quística, las neumopatías intersticiales o la EPOC, donde numerosas evidencias obtenidas en los últimos años vinculan la colonización por *Pneumocystis* con la fisiopatología de este proceso.

Finalmente, y de manera reciente, se ha podido demostrar por primera vez y sin lugar a dudas, la capacidad de *P. jirovecii* de transmitirse por vía transplacentaria, al constatarse mediante técnicas moleculares su presencia en el tejido pulmonar de un 35% de fetos muertos antes de nacer que, al no haber llegado a respirar, no habían podido adquirir la infección por la vía aérea, además de encontrarse el microorganismo también en el 5% de las placentas, lo que indicaba que constituían la vía de paso de la infección, abriendo una importante línea de investigación sobre las implicaciones que la infección intrauterina pueda tener como causa de abortos o partos prematuros en la especie humana.

P28

Micosis en animales exóticos

María Lourdes Abarca, Gemma Castellá y Francisco Javier Cabañes

Grupo de Micología Veterinaria. Departamento de Sanidad y Anatomía Animales, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

E-mail: Lourdes.Abarca@uab.es

Desde hace algunos años se han popularizado en nuestros hogares un importante número de especies de animales exóticos. Dada la importancia que está adquiriendo este grupo cada vez más numeroso de mascotas no habituales en la clínica de pequeños animales, se conocen también como “Nuevos Animales de Compañía” (NAC). Los NAC son un grupo muy amplio en el que se incluyen una gran variedad de especies de aves, pequeños mamíferos, reptiles, anfibios, peces e invertebrados que necesitan normalmente unos cuidados muy específicos.

En el Servicio Veterinario de Bacteriología y Micología, del que es responsable el Grupo de Micología Veterinaria, hemos podido comprobar que el aumento en el número y variedad de estas nuevas mascotas ha incrementado las consultas para prevenir la aparición de distintas enfermedades, que en el caso de algunas micosis constituyen importantes zoonosis.

Mientras que en las especies de aves exóticas la micosis más frecuente es la aspergilosis, en la mayoría de pequeños mamíferos (conejo, cobaya, hámster, chinchilla, etc.) la micosis más común es la dermatofitosis. Prácticamente en todas las muestras procesadas en nuestro laboratorio, el dermatofito aislado pertenece al complejo *Trichophyton mentagrophytes* (actualmente cepas zoófilas de *Trichophyton interdigitale* y *Trichophyton* anamorfo de *Arthroderma benhamiae*).

Dentro de este grupo de pequeños mamíferos, los erizos de tierra también están adquiriendo en los últimos años una gran popularidad como mascotas, siendo la dermatofitosis producida por *Trichophyton erinacei* la micosis más frecuente. Esta especie zoófila se transmite con frecuencia a las personas que los manipulan, pero en muchas ocasiones la infección en estos animales es asintomática, lo que aumenta el riesgo de contagio. Con el fin de conocer la prevalencia de *T. erinacei* en los erizos mascota en nuestro país, se analizaron muestras de púas de los animales procedentes del Hospital Clínico Veterinario de nuestra universidad, así como de otras clínicas veterinarias de España. Se estudiaron muestras de 39 animales (34 erizos africanos, 2 erizos europeos y 3 erizos egipcios) y se obtuvieron cultivos positivos en 9 muestras de erizos africanos, uno de ellos asintomático, y en una muestra de erizo egipcio. Todos los aislamientos fueron morfológicamente identificados como *T. erinacei*.

Las dermatomicosis en reptiles, aunque documentadas en todo el mundo, están probablemente infradiagnosticadas debido a que las lesiones a menudo son indistinguibles de las provocadas por una infección bacteriana. En los últimos años se han descrito diversos casos de dermatomicosis atribuidas a *Chrysosporium* anamorfo de *Nannizziopsis vriesii* (CANV). Esta especie se ha asociado con dermatitis, a menudo contagiosas y fatales, en múltiples especies de reptiles terrestres,

semiacuáticos y acuáticos en Norteamérica, Europa y Australia. Este hongo se ha aislado sólo ocasionalmente de la piel sana de estos animales, y en condiciones experimentales se ha demostrado su capacidad de comportarse como patógeno primario en camaleones. En nuestro laboratorio describimos por primera vez el aislamiento de *Chrysosporium* sp en dos casos de dermatomicosis en iguanas (*Iguana iguana*) (*Med Mycol* 2008, 46:349-354). El aislamiento del hongo en cultivo puro, junto con la presencia de elementos fúngicos en las secciones histológicas de los tejidos afectados, confirmaron su papel como agente etiológico de la infección. El estudio molecular de las cepas demostró su estrecha relación con *N. vriesii* pero únicamente con un 81% de similitud. El estudio fenotípico y molecular de estos aislamientos y de otros tres que posteriormente se obtuvieron también de procesos de dermatomicosis en iguanas nos permitió proponer la nueva especie *Chrysosporium guarroi* (*Med Mycol* 2010, 48:365-372). Desde su descripción, hemos aislado *C. guarroi* en nuestro laboratorio a partir de siete nuevos casos en iguanas y en uno en un dragón barbudo (*Pogona vitticeps*). En otro caso de dermatomicosis, aislamos una cepa de *Chrysosporium* sp en un dragón barbudo que mostró un porcentaje de identidad del 81% con *N. vriesii* y un 94% con *C. guarroi* (*Vet Dermatol* 2009, 20:295-299). En un estudio fenotípico y filogenético en el que se incluyeron principalmente aislamientos clínicos de reptiles morfológicamente similares a *N. vriesii*, se propuso esta cepa como la nueva especie *N. draconi* y *C. guarroi* quedó incluido en el género *Nannizziopsis* (*Persoonia* 2013, 31:86-100). Los resultados de este estudio y los aportados posteriormente por otros autores (*J Clin Microbiol* 2013, 51:3338-3357) revelan cómo los aislamientos que en su mayoría se habían identificado como CANV, representan ahora nuevas especies del género *Nannizziopsis* o de los nuevos géneros *Paranannizziopsis* y *Ophydiomyces*. En el futuro, siguiendo las nuevas clasificaciones de géneros y especies propuestas recientemente, será posible identificar con mayor precisión las principales especies fúngicas asociadas con las dermatomicosis en reptiles, determinar su prevalencia en el medio ambiente, y desarrollar estrategias para la prevención y tratamiento de estas micosis.

P29

Megabacteriosis

Jose L. Blanco

*Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Avda Puerta de Hierro s/n.
Universidad Complutense. 28040 Madrid. E-mail: jlblanco@ucm.es*

El término «megabacterias» se utilizó para denominar lo que se creía eran unas bacterias de gran tamaño, con morfología bacilar y tinción de Gram positiva. Con la utilización de métodos filogenéticos, se incluyeron en 2003 en el Reino Fungi y se reclasificaron como levaduras ascomicéticas, lo que dio lugar a un nuevo género y especie que se denominó *Macrorhobdus ornitogaster*. A pesar del hecho indudable de su clasificación como hongos, el término de megabacterias para referirse a estos microorganismos sigue fuertemente asentado entre los profesionales, tanto clínicos como de laboratorio.

Esta levadura se ha aislado en muy variados tipos de aves, incluyendo passeriformes, psitácidas y ráticas. Aparece tanto en aves de producción como en aquellas de compañía.

Por el momento permanece sin elucidar su papel exacto como patógeno, pues su descripción en animales sanos deja claro que su presencia no siempre provoca enfermedad. Las megabacterias se alojan en el tracto digestivo y, principalmente, en el istmo, que es la zona que se encuentra entre la parte glandular de la molleja (proventrículo) y la parte muscular (ventrículo). Cuando estos hongos proliferan hace que aparezca gran cantidad de moco en el lugar en el que están creciendo, dificultando con ello la digestión de la comida. En los casos más graves, invaden las paredes donde se encuentran, con lo que dilatan el proventrículo, llegando a provocar úlceras. En algunos casos se ha llegado incluso a describir enteritis, que parece darse solo en casos extremos. Mediante estudios histopatológicos se ha comprobado que las megabacterias son muy poco invasivas, lo que implica que son factores como el estrés, la muda, la malnutrición u otras enfermedades lo que puede ayudar a que este hongo proliferare y el animal manifieste síntomas. Estos síntomas, en casos agudos, consisten en vómitos, diarrea y dificultad respiratoria. Pero lo normal es que la enfermedad curse de forma crónica, llegando a provocar úlceras que finalmente conducen a una mala absorción de los alimentos que hacen que el ave quiera comer pero no trague la comida, siendo el síntoma más frecuente la delgadez extrema unida a una gran ansia por comer. En la jaula se encuentra el animal junto al comedero rodeado de semillas abiertas, pero que no ha tragado. Esto unido al hecho del plumaje esponjado (típico de la enfermedad) puede llevar a la confusión de que el animal se encuentra bien.

El diagnóstico se realiza por una preparación en fresco de las heces, observándose al microscopio las típicas formas de esta levadura. Se puede hacer una toma de muestras de la zona proventricular con un lavado a través de un sondaje o una citología de buche. Estas pruebas siguen dando un número excesivo de falsos negativos.

El diagnóstico definitivo se realiza en la necropsia de los animales, apreciándose un proventrículo inflamado y dilatado, con comida sin digerir. Si se toma una muestra de esa zona, se observará al microscopio una gran cantidad de megabacterias. Se puede intentar la siembra en un medio de cultivo líquido selectivo, con resultados no excesivamente satisfactorios.

El tratamiento exitoso se puede conseguir mediante la instauración de nistatina, ketoconazol y anfotericina B (ésta de uso únicamente en clínica humana en España). En conclusión, este hongo adquiere importancia por diversos factores: i) es un patógeno de aves; ii) es posible que se encuentre presente en otro tipo de animales, como los mamíferos; iii) supone un reto conocer su papel dentro del nicho que habita y el papel que juega dentro de la biodiversidad; y iv) la elucidación de su papel en la naturaleza se imbricaría en el concepto “Un mundo, una salud”, con la interacción del hombre, los animales y el medio ambiente en el más amplio sentido. Como principal reto para el futuro se encuentran los estudios de biología molecular aplicados a este hongo, que ayudarían a desentrañar su papel como patógeno o como hongo benefactor para las aves que lo portan.

P30

Caracterización de nuevas esterasas fúngicas con interés biotecnológico: del ordenador al laboratorio

Jorge Barriuso, María Eugenia Vaquero y María Jesús Martínez

Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España. E-mail: jbarriuso@cib.csic.es; mjmartinez@cib.csic.es

Las esterasas y las lipasas son enzimas ampliamente utilizadas en la industria. Son capaces de llevar a cabo reacciones tanto de hidrólisis como de síntesis sobre ésteres de esteroles y de triglicéridos [1]. Algunas esterasas y lipasas han demostrado una amplia especificidad de sustrato y versatilidad. Este es el caso de las esterasas secretadas por *Ophiostoma piceae* [2], y de las diferentes lipasas secretadas por *Candida rugosa* [3]. La enzima de *O. piceae* se está estudiando por su potencial para reducir los problemas de depósitos durante la producción de pasta de papel (*pitch*) [4] o de papel reciclado (*stickies*) [5], y para la síntesis de ésteres de esteroles como aditivos en alimentos [6]. La comparación de esta enzima con otras lipasas y esterasas comerciales mostró que es más eficaz en reacciones de hidrólisis [2].

Dadas las peculiaridades de esta enzima y sus posibles aplicaciones, se realizó una búsqueda *in silico* de nuevas esterasas/lipasas en los genomas de más de 200 hongos aislados de muestras ambientales (<http://jgi.doe.gov/>). Para ello, se buscaron dos motivos conservados presentes en las proteínas de esta familia, que forman el agujero oxianiónico (GGGF) y el codo que contiene la Ser de la triada catalítica (GESAG) [7]. Los candidatos seleccionados se sometieron a un análisis filogenético, análisis de la secuencia primaria y un modelado tridimensional para evaluar las posibles características de las proteínas seleccionadas [8]. Con el fin de corroborar las predicciones llevadas a cabo *in silico*, algunos de los candidatos seleccionados se expresaron en la levadura *Komagataella pastoris* y se estudiaron las propiedades catalíticas de estas enzimas. Los resultados ponen de manifiesto que la estrategia diseñada para la búsqueda de estas enzimas es útil, como alternativa a los *screening* clásicos, obteniéndose proteínas con amplia especificidad de sustrato e interés biotecnológico.

Referencias

1. Reetz, M.T. 2002. *Curr Opin Chem Biol.* 6:145-150.
2. Calero-Rueda, O., et al. 2009. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794:1099-1106.
3. Akoh, C.C., et al. 2004. *Lipids.* 39(6):513-26.
4. Calero-Rueda, O., et al. 2002. International Patent.WO 02/075045 A1.
5. Barba-Cedillo, V., et al. 2013. *Bioengineered.* 4:249-253.
6. Barba-Cedillo, V., et al. 2013. International Patent. PCT/ ES 2395582 B1.
7. Pleiss, J., et al. 2000. *J Mol Catal B: Enzym.* 10:491-508.
8. Barriuso, J., et al. 2013. *BMC Genomics.* 14:712.

P31

El metabolismo del nitrógeno en las levaduras vínicas durante la fermentación alcohólica

José M. Guillamón Navarro

Departamento de Biotecnología de los alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC), Avda. Agustín Escardino, 7, 46980. Paterna, Valencia.

E-mail: guillamon@iata.csic.es

La transformación de la uva en vino es un proceso biotecnológico donde los microorganismos presentes, fundamentalmente las levaduras, utilizan los nutrientes del mosto para su crecimiento, produciendo toda una gama de metabolitos que convierten un líquido azucarado en una solución hidroalcohólica de sabor y aroma agradable. La principal reacción bioquímica durante la fermentación alcohólica es la conversión de los azúcares en etanol. Sin embargo, no es la única. Un pequeño porcentaje de los azúcares van destinados a la síntesis de metabolitos secundarios (glicerol, succínico, láctico, acético, alcoholes superiores, ésteres, etc.), de menor concentración que el etanol pero que son los determinantes de la calidad del vino. También hay una pequeña parte de los azúcares del mosto que va destinada a la síntesis de componentes celulares, es decir, a la síntesis de biomasa. En esta síntesis de biomasa no solo intervienen los azúcares, sino que es imprescindible el componente nitrogenado. El contenido en nitrógeno condiciona la realización de la fermentación alcohólica, tanto en su velocidad como en su culminación. Pero, además, la mayoría de las fuentes nitrogenadas del mosto (amonio y aminoácidos) son a su vez precursores aromáticos, determinando igualmente la calidad aromática del vino.

El nitrógeno en el mosto puede estar presente en dos formas claramente diferenciadas: la inorgánica, básicamente como amonio, y la orgánica, formada por aminoácidos, péptidos y proteínas. La presencia de nitrógeno en cualquiera de estas formas químicas es fuertemente variable, dependiendo de diversos factores, entre ellos la variedad de uva, su grado de maduración, características edafo-climáticas y diversos aspectos tecnológicos (tipo de vinificación, prensado, etc.). En el actual contexto del cambio climático, la excesiva maduración de la uva tiene dos consecuencias muy directas en la composición del mosto: el aumento de los azúcares a fermentar y la disminución del contenido nitrogenado. Esto dificulta todavía más si cabe la tarea fermentativa de la levadura y hace muy necesario el conocimiento sobre las necesidades de nitrógeno de las diferentes levaduras vínicas utilizadas en la industria enológica.

P32

Utilización de especies de levaduras no-*Saccharomyces* para la reducción del grado alcohólico del vino. El papel de la respiración

Pilar Morales¹, Virginia Rojas^{1,2}, Manuel Quirós^{1,3} y Ramón González¹

¹Departamento de Enología, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Logroño, España;

²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; ³Evolva Biotech A/S, Copenhagen, Dinamarca. E-mail: pilar.morales@icvv.es

Los efectos del cambio climático se perciben también en el vino. El incremento en la temperatura ha supuesto un adelanto de la madurez de la baya en cuanto al contenido en azúcares mayor que el adelanto en la madurez fenólica. Puesto que el mercado demanda vinos bien estructurados, con una buena madurez fenólica, el contenido en azúcares de las bayas en el momento de la vendimia es más alto que hace unos años y, por tanto, el contenido en alcohol del vino resultante es mayor que hace unas décadas. Y puesto que estamos en el proceso de cambio, es previsible que el problema se agrave en años venideros, con las implicaciones negativas tanto comerciales como sanitarias que supone. Por eso se están buscando soluciones por parte de profesionales e investigadores especializados en cada una de las etapas del proceso productivo, desde la viña a la botella. En este trabajo se trata de reducir el rendimiento alcohólico durante el proceso fermentativo.

Nuestra propuesta para disminuir el grado alcohólico consiste en que los azúcares en exceso sean respirados en lugar de fermentados (1). En la respiración, los azúcares son convertidos en CO₂ y agua. Para ello se necesita, en primer lugar, proporcionar aire al sistema durante el tiempo que se quiera tener a las células respirando, y en segundo lugar, utilizar la cepa de levadura adecuada. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo Crabtree positivo, es decir, que en presencia de altas concentraciones de azúcar, aunque haya oxígeno en exceso, va a fermentar la mayor parte de los azúcares que consume. Por ello, hemos buscado especies alternativas. Por otra parte, todos los experimentos se han realizado en condiciones de oxigenación muy controlada para tratar de evitar la oxidación del vino.

Los géneros de levaduras más frecuentes en el mosto son *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspota* y *Candida*, mientras que *S. cerevisiae* es minoritaria. Esta última se impone rápidamente por ser la mejor adaptada a ese medio y es la responsable del proceso de fermentación alcohólica. De hecho, los inóculos comerciales para este proceso son normalmente de cepas de *S. cerevisiae*. En los últimos años, han aparecido también en el mercado cultivos iniciadores de especies de levaduras no-*Saccharomyces*, que han sido seleccionadas por su perfil aromático. Pero hasta ahora no se había explorado el potencial de estas levaduras con el objetivo de respirar los azúcares.

En primer lugar llevamos a cabo una caracterización de unas 60 cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, casi todas de origen enológico, en las que se midió su cociente respiratorio como parámetro indicativo de su capacidad para respirar en presencia de altas concentraciones de azúcares. También se determinó la cantidad de azúcares

que son capaces de utilizar en un tiempo determinado. Así se identificaron cuatro o cinco cepas con propiedades fisiológicas interesantes para el objetivo propuesto (2). Con este trabajo se observó que casi todas las levaduras pueden respirar una fracción significativa del azúcar del mosto cuando se proporciona suficiente oxígeno. Por ejemplo, *S. cerevisiae* respira el 25% de los azúcares consumidos en nuestras condiciones de aireación. Pero también se observó un incremento de la acidez volátil como consecuencia de la oxigenación. Por ello, también este parámetro ha sido crucial en la selección de cepas potencialmente útiles para esta aplicación. Finalmente, se ha realizado una puesta a punto de un proceso controlado con una combinación de *S. cerevisiae* y una cepa seleccionada, para desarrollar un procedimiento de fermentación con oxigenación controlada durante las primeras 48 horas. Se optimizaron parámetros como el grado de oxigenación o la proporción de las cepas en el inóculo. De esta manera se consiguió fomentar el crecimiento y la respiración por parte de la levadura no-*Saccharomyces*, dando lugar a reducciones de hasta tres grados alcohólicos respecto al procedimiento convencional, y un casi nulo incremento en la acidez volátil. Además, conseguimos mantener la concentración de oxígeno disuelto en valores nulos o prácticamente nulos durante casi todo el tiempo de fermentación, minimizando potenciales oxidaciones de los componentes del mosto.

Referencias

1. Gonzalez *et al.* (2013) Trends Food Sci Technol **29**: 55-61
2. Quirós *et al.* (2014) Int J Food Microbiol **181**: 85-91

P33

Técnicas biómicas en levaduras enológicas

E. Muñoz-Bernal, F.J. Fernández-Acero, M. E. Rodríguez, M.C. Bernal y J.M. Cantoral
*Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Laboratorio de Microbiología
Enológica. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. CAIV. Campus de excelencia
Internacional agroalimentario ceiA3. Universidad de Cádiz. E-mail:
jesusmanuel.cantoral@uca.es*

El sector enológico tiene una gran importancia en nuestro país, debido a la extensión del viñedo y al volumen de vino de gran calidad que se elabora en las distintas Denominaciones de Origen. Pese a la crisis general actual, y en particular la del sector vitivinícola de las últimas décadas, este sector ha sabido modernizarse incorporando no solo personal altamente cualificado, en parte debido a la formación adquirida con la nueva licenciatura, grado y máster relacionados con la Enología, sino también, junto a la plantación de nuevas variedades de vides, la incorporación y modernización de instalaciones, maquinaria, fermentadores, así como un exhaustivo control de todo el proceso de elaboración del vino, entre ellos, las nuevas técnicas moleculares, dando como resultado una gran calidad y variedad de vinos, muchos de ellos lanzados a un competitivo mercado internacional. Un buen ejemplo de todo ello son los vinos biodinámicos, que son vinos ecológicos cuya elaboración es sumamente cuidada; así, en las viñas no se utilizan fertilizantes químicos ni pesticidas, utilizando abonos orgánicos o compost obtenidos de manera natural por descomposición aeróbica de residuos orgánicos y restos vegetales. Además, las fermentaciones alcohólicas de los mostos son normalmente espontáneas para no interferir en la microbiota natural presente en ellos, cuyas levaduras están totalmente adaptadas a las peculiaridades y originalidad del vino resultante. En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo una caracterización molecular de las levaduras implicadas en las fermentaciones espontáneas de los vinos tintos biodinámicos en una bodega de Ribera del Duero (Quintanilla de Onésimo, Valladolid), que ha sabido conservar las buenas prácticas enológicas y a la vez incorporar las más modernas técnicas actuales, consiguiendo unos vinos equilibrados que hacen gala de un gran valor y prestigio internacional. Aplicando la técnica molecular de electroforesis en campo pulsante se obtiene el cariotipo electroforético que permite discriminar entre las especies de levaduras implicadas en un determinado momento de la vinificación, así como hacer su seguimiento de dinámica poblacional. En el estudio, analizamos la diversidad de cepas de un total de siete depósitos en tres estados de la fermentación, inicio, mitad y final. Los resultados pusieron de manifiesto la existencia de tres grupos o poblaciones de levaduras. La primera población estuvo formada mayoritariamente por los géneros *Metschnikowia*, *Zygosaccharomyces* y *Hanseniaspora*, siendo dominantes en la primera fase de las siete fermentaciones. La segunda población la formaron cepas de levaduras de la especie *Saccharomyces bayanus* var *uvarum* (*S. uvarum*), y la tercera estuvo formada por *Saccharomyces cerevisiae*. En general, la población de *S. uvarum* fue mayoritaria a mitad de las fermentaciones, siendo desplazada esta especie por

cepas de levaduras de *S. cerevisiae* al finalizar los procesos. La importancia enológica de la especie *Saccharomyces bayanus* var *uvarum* se basa en su capacidad para fermentar la uva a baja temperatura presentando un perfil de fermentación en mosto que es claramente diferente de la de *S. cerevisiae*.

Basados en la experiencia que el grupo tiene en Proteómica, nos propusimos realizar un estudio mediante proteómica diferencial para dilucidar las proteínas implicadas en el proceso de criotolerancia mediante la comparación de los perfiles obtenidos por electroforesis bidimensional (DIGE-2DE) y espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF). Para ello se realizaron en paralelo fermentaciones con *S. bayanus* var *uvarum* a 13 °C y 25 °C. El proteoma de *S. bayanus* var *uvarum* está localizado entre pH 3-10 de *pI* y tiene un peso molecular entre los 116 y 14 kDa. De la comparación de los perfiles obtenidos se han seleccionado aquellas proteínas diferenciales de cada estadio fisiológico que están siendo identificadas mediante MALDI TOF/TOF. Mediante el estudio detallado de estas diferencias podremos dilucidar el papel que cada una ellas tienen durante la fermentación, comparándolo además con el perfil aromático del vino resultante, lo que podría constituir un nuevo criterio de selección de cepas para su uso en Enología.

P34

Micosis orales cosmopolitas

José Manuel Aguirre

Departamento de Estomatología II. UFI 11/25. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/EHU, Bilbao. E-mail: josemanuel.aguirre@ehu.es

El término «cosmopolita» que se ha dado al título de mi exposición sobre las micosis orales es difícil de explicar y aplicar ya que, por lo general, entendemos como tal a “aquella persona que ha vivido en muchos países y que conoce sus costumbres”. No obstante, sí podríamos aplicar otra definición que se utiliza para esta palabra, la de “aquello que es común a todos o a la mayoría de los países”. Esta consideración sí es aplicable a las micosis orales, que afectan a todos los países, especialmente las candidiasis o candidosis orales.

La candidiasis oral es la micosis oral más frecuente y debe ser considerada “la enfermedad del paciente enfermo”, ya que siempre está asociada a alteraciones locales o generales que alteran la microbiota oral y promueven la infección. La especie más frecuente en las candidiasis orales es *Candida albicans*, aunque otras como *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* no son infrecuentes. En los pacientes que han recibido tratamientos previos con antifúngicos pueden aislarse especies que son menos sensibles a los antifúngicos. Algunas especies particulares, como *Candida dubliniensis*, se han asociado al sida y a episodios repetidos de candidiasis oral. Clásicamente las candidiasis orales se han clasificado en agudas (pseudomembranosa y eritematosa), crónicas (pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica) y aquellas con lesiones asociadas como la queilitis angular, la estomatitis protética y la glositis rómbica.

La candidiasis pseudomembranosa o muguet es la forma clínica más característica y es típica en los niños y ancianos, así como en pacientes inmunodeprimidos. La candidiasis eritematosa es actualmente la forma más común en nuestro medio y suele estar favorecida por problemas locales o sistémicos, como la infección por el VIH y algunos tratamientos farmacológicos. Las localizaciones más comunes son el dorso de la lengua y el paladar, dando lugar a una imagen en espejo. La candidiasis hiperplásica o leucoplasia candidiásica es una forma infrecuente y controvertida, estrechamente relacionada con las leucoplasias no homogéneas, y asociada a dos factores facilitadores comunes: el tabaco y la queratosis mucosa. Este tipo de leucoplasia asociada a *Candida* es común en las zonas retrocomisurales y, con frecuencia, presenta displasia epitelial.

La queilitis angular (*perleche* o boqueras) tiene una etiopatogenia multifactorial asociada a anomalías relacionadas con el envejecimiento y la aparición de arrugas, la humedad en las comisuras labiales, los defectos protéticos, déficits vitamínicos o de hierro, etc. En muchas ocasiones se trata de una infección mixta por estafilococos y *Candida*, sobre todo en gente joven. La glositis rómbica es una lesión crónica no dolorosa, depapilada y romboidal en el dorso lingual, cuya etiopatogenia es controvertida. Este proceso es más común entre los varones adultos, fumadores y diabéticos. La estomatitis protética es la lesión oral asociada más común, y se

caracteriza por la presencia de inflamación y enrojecimiento en el área de soporte de una prótesis removible. La etiopatogenia de la estomatitis protética es múltiple, interviniendo factores locales, protéticos, higiénicos, microbiológicos, dietéticos y sistémicos.

En el tratamiento de las candidiasis orales es fundamental eliminar o atenuar lo más posible las enfermedades y los factores facilitadores presentes en el paciente. Además, debemos realizar un correcto tratamiento antifúngico preferentemente tópico. En la mayor parte de los casos es suficiente si se realiza bien el tratamiento tópico, aunque en ocasiones, como en los pacientes infectados por el VIH, es necesario añadir un tratamiento sistémico. Dentro de los tratamientos tópicos, la nistatina y el miconazol son dos herramientas terapéuticas de gran utilidad. La nistatina tiene un efecto fungicida contra *Candida albicans* y otras especies, como *Candida krusei* y *Candida glabrata*. Afortunadamente hasta este momento no se han detectado resistencias orales a los antifúngicos tópicos.

En otras latitudes, además de las candidiasis orales tenemos otras micosis que pueden afectar a la cavidad oral, las denominadas “micosis profundas” como la paracoccidiomicosis o la histoplasmosis.

P35

Micosis orales y mucocutáneas endémicas

Gustavo Giusiano

Departamento Micología, Instituto de Medicina Regional, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Argentina. E-mail: gustavogiusiano@yahoo.com.ar

Bajo el nombre de micosis endémicas se agrupan una serie de infecciones fúngicas que son producidas por hongos patógenos primarios que comparten algunas características comunes, como la capacidad de producir infección en huéspedes sanos, la potencialidad del dimorfismo como uno de sus factores de virulencia y la ocupación de un nicho específico en el ecosistema. Así, las micosis sistémicas endémicas están restringidas a determinadas áreas geográficas.

Los hongos del complejo *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* son los agentes causales de la paracoccidioidomicosis y la histoplasmosis, respectivamente. Estas micosis son de comienzo respiratorio y afectan a la mayoría de los mamíferos. Los individuos susceptibles se infectan por inhalación de conidios o fragmentos de hifas que estos hongos desarrollan en la naturaleza. La infección puede ocurrir en cualquier momento de la vida, puede pasar desapercibida (formas subclínicas) o evolucionar a enfermedad grave y muerte. Reconocer las áreas endémicas para cada una de estas micosis es importante desde el punto de vista epidemiológico y sanitario. Actualmente el movimiento poblacional es amplio y una infección adquirida en el área endémica puede manifestarse meses, años o décadas después, pero en un área diferente, razón por la cual se les llama enfermedades infecciosas importadas.

Aunque pueden afectar a individuos inmunocompetentes, las infecciones en pacientes inmunodeprimidos son más frecuentes y graves. El diagnóstico se realiza por una combinación de métodos convencionales (histología, cultivos y serología) y no convencionales, como la detección de antígenos específicos en sangre y orina (histoplasmosis).

La paracoccidioidomicosis es una de las micosis sistémicas de mayor prevalencia en América Latina. Las formas clínicas van desde la infección subclínica hasta formas progresivas diseminadas graves y fatales con el compromiso de varios órganos. En la mayoría de los casos, tras la inhalación del hongo se presenta una infección asintomática que suele entrar en latencia. La paracoccidioidomicosis se inicia entonces como una infección pulmonar primaria que, generalmente, pasa inadvertida pero puede diseminarse por vía linfática o sanguínea. La forma crónica representa aproximadamente el 90% de todos los casos informados y se presenta con compromiso pulmonar primario y manifestaciones extrapulmonares secundarias. Es más frecuente en varones adultos mayores de 35 años de edad. Su evolución es de progresión lenta. El compromiso de mucosas, principalmente de la cavidad oral, se calcula en un 50% de todas las formas de presentación y en un 25% se presentan manifestaciones cutáneas. En todos los casos puede aparecer compromiso de ganglios linfáticos, del SNC y de las glándulas suprarrenales.

Las manifestaciones clínicas de la histoplasmosis pueden incluir fiebre, pérdida de peso, astenia, anorexia, hepato-esplenomegalia, adenomegalias múltiples –con frecuencia retroperitoneales y detectables por ecografía–, tos, catarro mucopurulento, disnea y dolor torácico. En América Latina, entre el 70 y el 80% de estos enfermos presenta lesiones mucocutáneas; las más frecuentes son las pápulas cutáneas ulceradas o de aspecto “moluscoide” y las ulceraciones de la mucosa oral. Este carácter clínico es distintivo de la histoplasmosis asociada al sida en esa región, dado que la frecuencia de lesiones cutáneas en los Estados Unidos es de sólo el 6%. El diagnóstico diferencial de estas micosis orales mucocutáneas es muy importante ya que otras enfermedades tropicales, como la leishmaniasis u otras patologías no infecciosas, pueden manifestarse con características semejantes.

P36

Micosis de la piel y sus anejos

Vicente Crespo Erchiga

Servicio de Dermatología, Hospital Regional Carlos Haya, Málaga, España.

E-mail: Vicente.crespo.erchiga@gmail.com

Las micosis superficiales, o dermatomicosis, constituyen un motivo de consulta muy frecuente, tanto para los médicos de atención primaria y pediatras como para los dermatólogos. Afectan por igual a ambos sexos y se dan en todas las edades, aunque algunas de ellas, como las tiñas del cuero cabelludo, son casi exclusivas de la infancia, mientras que las infecciones de las uñas se ven en adultos, y su incidencia aumenta a medida que avanza la edad.

Dentro de las micosis que afectan la piel y sus anejos podemos distinguir tres grandes grupos: la pitiriasis versicolor, las candidosis y las tiñas o dermatofitosis. Las dos primeras están ocasionadas por hongos levaduriformes, mientras que las tiñas están producidas por un grupo concreto de hongos filamentosos queratinofílicos que denominamos dermatofitos, cuyos anamorfos se encuentran en los géneros *Microsporium*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Los teleomorfos correspondientes a algunas de estas especies se incluyen en el género *Arthroderma*, entre los ascomicetos. Las levaduras que originan las enfermedades mencionadas en primer lugar (*Malassezia globosa* en el caso de la pitiriasis, y *Candida albicans* en la mayoría de las candidosis) están presentes de forma saprofita en la piel o en las mucosas, respectivamente, de gran parte de la población adulta sana, y su patogenicidad suele estar relacionada con la existencia de factores predisponentes de orden local o sistémico. Son pues, hongos oportunistas, y dan cuenta de un 10% y un 20% respectivamente, de las micosis que vemos en nuestras consultas hospitalarias de Dermatología.

Las tiñas representan aproximadamente el 70% restante. Los hongos que las ocasionan no se encuentran nunca en la piel sana, y su contagio puede producirse a partir del suelo, de animales infectados, o de otras personas. Hemos seguido personalmente la epidemiología de estas infecciones en nuestro laboratorio de Micología del Servicio de Dermatología del Hospital Carlos Haya de Málaga a lo largo de casi cuarenta años. De esta casuística, que se aproxima a los 11.000 enfermos, pueden extraerse algunos datos interesantes.

Así, las infecciones por especies zoofílicas, derivadas del contagio a través de animales, sobre todo, y muy especialmente, de gatos, perros y roedores (conejos, hámsteres) han predominado desde los años 60 hasta la década de los 90, habiendo sido sobrepasadas en las últimas décadas por las antropofílicas, contagiadas a través de otras personas. Sin embargo, siguen siendo muy comunes en la población infantil. Las tiñas características de ese grupo de edad, que en su mayoría obedecen a un contagio animal, afectan el cuero cabelludo y distintas localizaciones de la piel (cara, tronco o extremidades) pero prácticamente nunca los pies ni las uñas. En cambio, las infecciones más frecuentes en la población adulta se localizan en la ingle, los pies y

las uñas, y prácticamente todas son debidas a hongos que parasitan exclusivamente la piel humana.

Las infecciones cuyo origen está en el suelo o en animales son muy contagiosas a partir de la tierra o el animal enfermo, pero pierden rápidamente su virulencia al pasar de un humano a otro, por lo que la prevención debe centrarse en la localización y el tratamiento de los animales. Suelen tener una clínica muy evidente y a menudo producen lesiones inflamatorias. En cambio, las causadas por dermatofitos antropofílicos, parásitos exclusivos del hombre, suelen dar escasa sintomatología, pudiendo prologarse durante años. El contagio en estos casos parece depender en gran parte de características individuales. No hay duda de que existe un gran porcentaje de la población muy resistente o incluso inmune a estas infecciones. En el caso específico de las infecciones de los pies y de sus uñas, se ha sugerido que existe una predisposición a padecerlas, genéticamente condicionada, que se transmite de forma autosómica dominante. Esto explicaría que la infección se presente sólo en uno de los cónyuges (pese a su convivencia íntima durante años), y en la mitad de su descendencia. Es decir, el contagio se produce en el seno familiar, casi siempre durante la infancia, pero la infección arraiga solo en los individuos predispuestos. Dado que el proceso evoluciona muy lentamente, no suelen observarse sus manifestaciones en la planta o los dedos de los pies hasta después de la pubertad, y las uñas empiezan a afectarse una o dos décadas más tarde. A lo largo de esta presentación, se mostrarán ejemplos de la clínica de las distintas dermatomicosis, así como de los principales agentes etiológicos de las mismas, haciendo especial hincapié en las que requieren tratamiento sistémico: la *tinea capitis*, la *tinea unguium* y otras onicomicosis, las formas diseminadas y la tiña del vello.

En el diagnóstico de laboratorio de las micosis superficiales, se analizará la importancia del examen microscópico directo, una técnica simple y de enorme utilidad, a menudo obviada. Su práctica reviste especial interés en las formas clínicas más problemáticas, como las arriba mencionadas. El tratamiento tópico de las dermatomicosis se basa en los derivados azólicos y las piridonas. El sistémico, en la griseofulvina, la terbinafina y los triazoles, en particular el fluconazol y el itraconazol (éste en su nueva formulación SubaCaps).

P37

Nuevos antifúngicos para el tratamiento de las micosis de la piel y de las mucosas

Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz

Dpto. Microbiología-Micología, ACIAM, Barcelona, España. E-mail: acarrillo@aciam.es

Si bien las micosis que afectan a la piel, uñas, pelo y membranas mucosas responden bien en muchos casos a los tratamientos, determinadas situaciones constituyen un problema. En su mayoría se trata de infecciones producidas por levaduras del género *Candida* y del grupo de los denominados hongos dermatofitos. No obstante, otros géneros de hongos como *Malassezia* también aparecen involucrados. Unos y otros producen las llamadas micosis superficiales. También, en general, las infecciones fúngicas han visto incrementada su prevalencia, apareciendo nuevas formas clínicas de micosis. Además, debe considerarse el papel importante que desempeñan los patógenos emergentes. En lo que se refiere a los tratamientos, los cambios han llevado a una selección de estos hongos por la exposición a los antifúngicos, con la consiguiente reducción de la sensibilidad en algunos de ellos y la aparición de fenómenos de resistencia in vitro e in vivo.

Los antibióticos antifúngicos responden a una amplia variedad de familias químicas entre las que hay distintos mecanismos, espectros de acción y perfiles farmacológicos que no siempre se adaptan perfectamente al ataque más adecuado al tipo de agente etiológico involucrado, o al tipo y lugar en el que se produce la infección. Por ello, deben ser seleccionados teniendo en cuenta su posible acción fungicida o fungistática y conociendo su perfil de actividad antifúngica in vitro, entre otras características. En cualquier caso se pretende evitar el fracaso terapéutico que caracteriza a algunas de las infecciones superficiales.

Las líneas de investigación en antifúngicos existentes para el tratamiento de las infecciones superficiales por hongos no pasan únicamente por la búsqueda de nuevas moléculas más activas que sean capaces de desarrollar una acción fungicida y que puedan ser administradas por vía oral o tópica, sin producir efectos tóxicos, y activas frente a un amplio espectro de hongos. Otras estrategias también actualmente en desarrollo, suponen la utilización de nuevas formulaciones de antifúngicos ya en uso clínico que son probadamente efectivos en estas infecciones, de nuevos sistemas de liberación y de la terapia combinada, y del uso de sustancias cuyo perfil de tratamiento no incluía inicialmente las infecciones superficiales. Tan solo para la onicomicosis, se contabilizan hasta 18 moléculas en distintos estados de desarrollo, encontrándose algunas de ellas en fase clínica III.

De cualquier forma es indudable que la búsqueda del antifúngico ideal continua, y en los próximos años es posible que el número ellos que puedan utilizarse por vía oral o tópica sea mayor. Para algunos de ellos, los retos más importantes que deberán superar son los relativos a las limitaciones que imponen la necesidad de utilizar dosis elevadas, el uso de mecanismos de acción y dianas poco discriminantes respecto a las células de mamífero, la posible aparición de resistencias, el mantenimiento de concentraciones adecuadas en los tejidos, la aparición de efectos colaterales no

deseados, y los fenómenos de resistencia. Así continúa el trabajo de desarrollo con moléculas como el efinaconazol, pramiconazol, lanoconazol, luliconazol y otras que se encuentran en estados de investigación menos avanzados como son el NB-002 y NB-00X, NV-4222, aganocide, tavaborol, sylsens B. Por otro lado, no hay que descartar que puedan ser recomendadas nuevas indicaciones para otros antifúngicos como el albaconazol, el isavuconazol, el voriconazol, el posaconazol, el ravuconazol, y nuevas formulaciones para otros antifúngicos como el sertaconazol.

P38

Métodos diagnósticos no relacionados con el cultivo

Ferran Sánchez-Reus

*Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, y Departamento de Genética y Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), España.
E-mail: fsanchezr@santpau.cat*

En la infección fúngica invasiva (IFI) los métodos diagnósticos basados en el cultivo tienen múltiples limitaciones, lo que ha llevado al desarrollado de nuevas estrategias diagnósticas, basadas en métodos alternativos al cultivo, con las que poder detectar nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico más rápido, sensible y específico, de la IFI.

Algunas de estas estrategias ya están ampliamente introducidas en los laboratorios de diagnóstico clínico, pues existe suficiente evidencia científica que respalda el valor diagnóstico de algunos biomarcadores y que ha justificado el que sean incluidos en la mayoría de guías diagnósticas de la IFI, pero otras están todavía en fase de desarrollo y deben emplearse con cautela a la espera de estudios que evalúen su valor clínico real.

La detección del antígeno capsular de *Cryptococcus*, en suero o LCR, es uno de los primeros métodos alternativos desarrollado y uno de los más empleados. Su valor en el diagnóstico de la criptococosis diseminada o la meningitis criptocócica está debidamente demostrado y su sensibilidad es superior a la del cultivo, aunque es mayor en LCR que en suero, y en pacientes con sida que en no-sida. El galactomanano en suero ha demostrado ser de gran utilidad en los pacientes onco-hematológicos con alto riesgo de sufrir una aspergilosis invasiva, pero su sensibilidad varía según la extensión de la lesión, su prevalencia o el tratamiento antifúngico concomitante. La evidencia del valor diagnóstico de los otros 2 biomarcadores más ampliamente empleados, el (1-3)- β -D-glucano y los mananos/anti-mananos, es moderada y faltan estudios que definan los puntos de corte óptimos, si bien estos podrían variar según los géneros o especies fúngicas.

Las técnicas moleculares de fabricación casera son difíciles de evaluar por su falta de estandarización y los ensayos comerciales disponibles carecen de estudios suficientes para evaluar su utilidad clínica, por lo que todavía no están aceptadas como criterio diagnóstico de IFI. Los avances en el diagnóstico molecular de las bacteriemias, incorporando a la estrategia diagnóstica técnicas basadas en la hibridación, PCR múltiple, PCR combinadas con hibridación, secuenciación o espectrometría de masas, o la proteómica, también han supuesto un notable avance en el diagnóstico de las fungemias, aunque están en fase de evaluación.

P39

Identificación fúngica por métodos moleculares

Manuel A. Rodríguez-Iglesias

Unidad de Gestión de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Puerta del Mar, Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz, España. E-mail: manuel.rodriguez Iglesias@uca.es

Durante los últimos años, los métodos moleculares se han introducido de forma imparable en los laboratorios de Microbiología Clínica. El desarrollo de nuevas tecnologías moleculares ha supuesto una mejora en la fiabilidad y precisión de las técnicas, consiguiendo automatización y rapidez, tan esenciales para hacerlas compatibles con las limitaciones en los recursos y en las cargas de trabajo asistenciales, y que suponga un avance en el tiempo de respuesta al problema clínico, fundamental en el pronóstico del paciente. Estas premisas adquieren especial relevancia en el diagnóstico micológico debido al tiempo que se requiere mediante métodos convencionales y al incremento en la prevalencia de las infecciones fúngicas relacionado con una mayor población de pacientes con factores predisponentes. Las técnicas moleculares aportan soluciones al diagnóstico de las infecciones fúngicas en cuatro niveles: a) identificación de las especies de hongos mediante la detección e identificación de dianas que discriminan taxonómicamente, b) diagnóstico precoz de las infecciones fúngicas, especialmente aquellas de carácter invasor y con riesgo vital para el paciente, c) detección de mecanismos moleculares de resistencia a agente antifúngicos, y d) tipificación molecular y análisis comparativo de las cepas aisladas.

En un desarrollo paralelo a las técnicas genómicas, la identificación proteómica, mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF, llega a ser esencial en los laboratorios de Microbiología Clínica. El éxito de esta tecnología es atribuible a los bajos costes operativos, la universalidad y flexibilidad de la detección, así como a la especificidad y rapidez del análisis. Basado en las características del espectro de proteínas obtenido de células intactas, por medio de protocolos preanalíticos y analíticos simples, rápidos y reproducibles MALDI-TOF MS permite una identificación precisa de levaduras y hongos filamentosos a partir de las colonias del cultivo. Esta metodología muestra mayor precisión que los métodos bioquímicos y microscópicos convencionales. Su utilización para la identificación directa de levaduras en hemocultivos tiene la capacidad de acortar los tiempos de respuesta y mejorar el diagnóstico de laboratorio de las fungemias. Además, se puede conseguir la identificación de diferentes hongos filamentosos, incluyendo muchos dermatofitos y zigomicetos. Las especies crípticas aun deben ser estudiadas en profundidad e incorporadas a las bases de datos en sus sucesivas actualizaciones. Aun de forma menos estandarizada, y mejorable en sus protocolos, MALDI-TOF MS ha demostrado su potencial para la tipificación de cepas y para determinar la sensibilidad a determinados agentes antifúngicos. La tecnología de MALDI-TOF MS será, con seguridad, una potente herramienta de rutina en los laboratorios micológicos.

Una nueva tecnología, la PCR acoplada a espectrometría de masas (PCR-ESI-MS), combina la sensibilidad de las técnicas de amplificación genómica con la rapidez y especificidad de las técnicas proteómicas, permitiendo la detección directa de patógenos, hongos en este caso, sin precisar del crecimiento en cultivo. De este modo se pueden identificar, directamente de muestras clínicas y de forma semicuantitativa, la mayoría de los agentes fúngicos en menos de seis horas. Los nuevos métodos de identificación moleculares ofrecen la oportunidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico del cuadro clínico del paciente. Además, también permite un uso más racional de los agentes antifúngicos, incluyendo la interrupción o la modificación del tratamiento empírico. La posibilidad de combinar nuevos marcadores con otras técnicas más convencionales mejoran en sensibilidad, especificidad y consiguen un diagnóstico precoz cuando la infección fúngica aun mantiene cargas microbianas que permiten una mejor respuesta terapéutica.

P40

El papel de las pruebas de sensibilidad in vitro en la práctica clínica diaria

Manuel Cuenca-Estrella

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

E-mail: mcuenca-estrella@isciii.es

En las últimas décadas se han desarrollado varios métodos para realizar pruebas de sensibilidad in vitro a los antifúngicos, destacando los dos métodos de referencia disponibles (CLSI y EUCAST). Estos métodos tienen una buena reproducibilidad interlaboratorio y capacidad para detectar la resistencia in vitro a estos fármacos, por lo que se han podido establecer puntos de corte para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad. Con estos puntos de corte se pretende que estas técnicas tengan utilidad en la práctica clínica diaria, y las principales guías terapéuticas recomiendan su uso, principalmente, en cepas procedentes de infecciones profundas y en enfermos que han recibido tratamientos antifúngicos previos. Estas guías también aconsejan emplear técnicas comerciales validadas ya que son más prácticas que las técnicas de referencia para los laboratorios asistenciales.

No obstante, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos siguen presentando algunas limitaciones que reducen su utilidad real, según algunos autores. Estas limitaciones son las siguientes:

- Los puntos de corte sólo se han establecido para algunas especies de *Candida* y de *Aspergillus*, y se desconoce su aplicabilidad a otras especies fúngicas.
- Los resultados de los estudios de sensibilidad con equinocandinas presentan problemas de reproducibilidad para *Candida* y caspofungina, y para las tres equinocandinas y los hongos filamentosos.
- Las técnicas comerciales deben establecer sus propios puntos de corte y no basarse en los puntos de corte clínicos o epidemiológicos establecidos con los métodos de referencia.
- En ocasiones, no se encuentra correlación entre sus resultados y la evolución clínica de los enfermos.

P41

Modelos animales para el estudio del tratamiento antifúngico

Javier Capilla

Unitat de Microbiologia, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus, España. E-mail:

javier.capilla@urv.cat

Varios cientos de especies fúngicas han sido identificadas como causantes de infecciones superficiales, profundas y diseminadas en el ser humano. A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento de dichas infecciones, su morbilidad y mortalidad continúan siendo elevadas, principalmente debido a la presencia de enfermedades concomitantes, a la limitada eficacia de los agentes antifúngicos y a la aparición de resistencias a los antifúngicos usados en el tratamiento. A nivel clínico es altamente deseable el desarrollo de estrategias capaces de predecir el éxito o fracaso de un tratamiento frente a una especie o aislamiento concreto. Para aquellas especies con una elevada incidencia, tales como *Aspergillus fumigatus* o *Candida albicans*, se han definido puntos de corte clínicos (PCCs) como aproximación a tal predicción; sin embargo, para aquellas infecciones poco frecuentes no existe suficiente experiencia clínica para establecer dichos PCCs. El uso de modelos animales de infecciones fúngicas ha permitido el avance en el conocimiento de la patogénesis, respuesta inmunitaria, diagnóstico y tratamiento de dichas infecciones, aportando datos que en numerosas ocasiones equivalen a las observaciones realizadas en clínica humana. El uso de animales no mamíferos tales como *Drosophila*, *Galleria* o *Caenorhabditis*, entre otros, para modelar infecciones fúngicas sistémicas han mostrado ser una excelente herramienta para el cribado extensivo de antifúngicos, de cepas mutantes y para el estudio de las interrelaciones hospedador-patógeno. Dichos modelos presentan ventajas en comparación al uso de pequeños mamíferos ya que en general se reduce el tiempo experimental, permiten establecer grupos con numerosos individuos y su uso está sujeto a menores consideraciones éticas. Otros modelos alternativos de infecciones fúngicas serán discutidos, incluyendo infecciones localizadas en pequeños roedores.

P42

La infección por *Candida albicans* modula la hematopoyesis: implicaciones en la respuesta inmunitaria

M. Luisa Gil¹, Javier Megías¹, Victoria Maneu², Pedro Salvador¹ y Daniel Gozalbo¹

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Burjassot, España;

²Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía, Universidad de Alicante, Alicante, España.

E-mail: M.Luisa.Gil@uv.es

Los receptores tipo toll (TLRs), presentes en muchos tipos de células maduras del sistema inmunitario, tienen una función esencial en el reconocimiento de los microorganismos y en la consiguiente puesta en marcha de la respuesta inmunitaria. El descubrimiento de que las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) expresan los TLRs, sugiere que estos receptores podrían participar en la modulación de la hematopoyesis, especialmente durante una infección. Nuestro grupo ha descrito anteriormente (i) que las levaduras inactivadas de *Candida albicans* inducen la diferenciación *in vitro* de las HSPCs hacia el linaje mieloide [1-3], y (ii) que agonistas solubles de los TLRs inducen *in vivo* su diferenciación hacia macrófagos [4]. Más recientemente, utilizando un modelo de trasplante de HSPCs *in vivo*, hemos demostrado que *C. albicans* estimula la diferenciación de las HSPCs hacia macrófagos por una señalización dependiente de TLR2 [5]. Para ello, se purificaron células linaje negativo (Lin⁻) a partir de la médula ósea de ratones C57BL/6 (aloantígeno CD45.2) y se trasplantaron a ratones B6Ly5.1 (aloantígeno CD45.1), que luego fueron inyectados por vía intravenosa con levaduras de *C. albicans* viables (dosis subletal) o inactivadas. Las células trasplantadas se detectaron en el bazo y en la médula ósea de los ratones receptores, y se diferenciaron preferentemente a macrófagos, tanto en respuesta a las levaduras inactivadas, como en respuesta a la infección. La generación de los macrófagos es dependiente de TLR2, pero independiente de TLR4, ya que las células Lin⁻ trasplantadas de ratones TLR2^{-/-} no generaron macrófagos, mientras que las células Lin⁻ de ratones TLR4^{-/-} se diferenciaron hacia macrófagos de forma similar a las células control. Cabe destacar que la ausencia de TLR2, o en menor medida de TLR4, confiere a las células Lin⁻ una ventaja en los ensayos de trasplante, aumentando el porcentaje de recuperación de células trasplantadas. Estos resultados indican que el reconocimiento de *C. albicans* mediado por los TLRs de las HSPCs puede contribuir a reemplazar o aumentar las células que constituyen la primera línea de defensa frente al hongo, y sugieren que la señalización mediada por los TLRs puede participar en la reprogramación de las células progenitoras tempranas para un rápido reaprovisionamiento del sistema inmunitario innato y generar aquellas células maduras más necesarias para luchar contra el patógeno [5,6].

Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-18256).

Referencias

1. Yáñez, A., Murciano, C., O'Connor, J., Gozalbo, D. and Gil M.L. (2009). *Candida albicans* triggers proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells by a MyD88-dependent signaling. *Microbes and Infection*, 11: 531-535.

2. Yáñez, A., Flores, A., Murciano, O'Connor, J. E., Gozalbo, D. and Gil M.L. (2010). Signalling through TLR2/MyD88 induces differentiation of murine bone marrow stem and progenitor cells to functional phagocytes in response to *Candida albicans*. *Cellular Microbiology*, 12: 114-128.
3. Yáñez, A., Megías, J., O'Connor, J. E., Gozalbo, D. and Gil M.L. (2011). *Candida albicans* induces selective development of macrophages and monocyte derived dendritic cells by a TLR2 dependent signalling. *PLoS One*, 6: e24761.
4. Megías, J., Yáñez, A., Moriano, S., O'Connor, J. E., Gozalbo, D. and Gil M.L. (2012). Direct Toll-like receptor-mediated stimulation of hematopoietic stem and progenitor cells occurs in vivo and promotes differentiation toward macrophages. *Stem Cells*, 30: 1486-1495.
5. Megías, J., Maneu, V., Salvador, P., Gozalbo, D. and Gil M.L. (2012) *Candida albicans* stimulates in vivo differentiation of haematopoietic stem and progenitor cells towards macrophages by a TLR2-dependent signalling. *Cellular Microbiology*, 15: 1143-1153.
6. Yáñez, A., Goodridge, H. S., Gozalbo, D. and Gil, M. L. (2013) TLRs control hematopoiesis during infection. *European Journal of Immunology*, 43: 2526-2533.

P43

Uso de la bioinformática y la evolución molecular para comprender las bases de la patogenicidad en hongos fitopatógenos

Michael Thon

Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. E-mail: mthon@usal.es

Las enfermedades de nuestros cultivos son el factor limitante de mayor trascendencia para la producción mundial de alimentos. Informes de reciente publicación sitúan las pérdidas de cultivos por enfermedades en torno al 40%, siendo las pérdidas principalmente producidas por hongos. Para controlar las enfermedades en las plantas, debemos entender las bases genéticas de la patogenicidad, así como la manera en que evoluciona. La disponibilidad de secuencias completas de los genomas de hongos patógenos ha supuesto una revolución en el campo de la fitopatología molecular, y en los últimos años se ha experimentado una mejora muy señalada en nuestra capacidad de aprovechar la genómica comparativa para conocer más acerca de la función y la evolución de los genomas fúngicos. Para entender mejor los patrones de variación genética en *Colletotrichum graminicola*, patógeno del maíz, se secuenciaron los genomas de siete cepas recogidas en diferentes regiones del mundo y que muestran un rango variable de virulencia. Se analizaron las variaciones y los patrones de ganancia y pérdida de genes. También se realizó un análisis de selección natural en las regiones codificadoras de proteínas y el ADN no codificante. Se identificaron grupos de genes únicos en cada cepa, y se descubrió que estos están significativamente enriquecidos con genes que codifican para pequeñas proteínas secretadas (efectores putativos), lo que podría representar innovaciones evolutivas que participan directamente en la especificidad del huésped o en la adaptación al entorno. También se descubrieron evidencias de selección purificadora, de selección de equilibrio y de selección positiva que afectan tanto al ADN codificante como al ADN no codificante de genes relacionados con la patogenicidad. Los genes que codifican para las proteínas efectoras putativas y metabolitos secundarios (familias de genes con funciones importantes en las interacciones planta-patógeno) muestran evidencia de selección positiva que actúa en la secuencia codificante. Uno de estos genes bajo selección positiva, efector putativo y con función desconocida, fue seleccionado para estudios funcionales y demostramos su implicación en la patogénesis. Las variaciones genómicas, la selección natural y los patrones de ganancia o pérdida de genes proporcionan herramientas para la selección de genes candidatos a futuros análisis genéticos funcionales y de genética de poblaciones, dirigida a la identificación de genes implicados en el desarrollo de la antracnosis del maíz. Ello conlleva la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias para el control de las enfermedades fúngicas.

P44

Interactions of *Candida albicans* with the host: the pathogen perspective

Célia Pais

Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal. E-mail: cpais@bio.uminho.pt

Candida albicans is a common colonizer of the human gastrointestinal, respiratory and reproductive tracts. However, the interactions between host and colonizing microbiota that maintain the benign state of *C. albicans* colonization are not completely understood. As an opportunistic pathogen, if the host becomes immunocompromised, the yeast can cause life-threatening disease. It is one of the most important fungal pathogens, being responsible for both superficial and systemic infections. To become pathogenic, *C. albicans* must compete with the resident microbiota, overcome physical barriers, respond to the attack of the host immune cells, be able to uptake and metabolize the available nutrients, and adapt to different physiological conditions like variable oxygen and CO₂ levels, osmolarity and pH.

There are several known characteristics involved in the adaptation of *C. albicans* to the host that contribute to its virulence. *C. albicans* reversibly switches between yeast and hyphal morphologies, with hyphae being associated with invasive infection due to their capacity to secrete aspartic proteases, phospholipases and lipases. Metabolic flexibility and adaptation are other characteristics particularly important during infection of different host niches. Yeast cell wall is also considered an essential cellular structure for the osmotic stabilization, protection against mechanical damage, adhesion and invasive growth, and changes in cell wall surface are known to significantly alter fungus-host interactions. *RLM1* is one of the putative transcription factors involved in the cell wall integrity pathway, which plays an important role in the maintenance of the cell wall integrity. We investigated the involvement of *C. albicans RLM1* in the cell wall biogenesis and in its virulence. Newly constructed *C. albicans Δ/Δrlm1* mutants showed typical cell wall weakening phenotypes, such as hypersensitivity to Congo red, calcofluor white, and caspofungin (phenotype reverted in the presence of sorbitol), confirming the involvement of *RLM1* in the cell wall integrity. Additionally, the cell wall of *C. albicans Δ/Δrlm1* showed a significant increase in chitin (213%) and reduction in mannans (60%), in comparison with the wild-type, results that are consistent with cell wall remodelling. Microarray analysis in the absence of any stress showed that deletion of *RLM1* in *C. albicans* significantly down-regulated genes involved in carbohydrate catabolism such as *DAK2*, *GLK4*, *NHT1* and *TPS1*, up-regulated genes involved in the utilization of alternative carbon sources, like *AGP2*, *SOU1*, *SAP6*, *CIT1* or *GAL4*, and genes involved in cell adhesion like *ECE1*, *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* or *RBT1*. In agreement with the microarray results, adhesion assays showed an increased amount of adhering cells and total biomass in the mutant strain, in comparison with the wild-type. *C. albicans* mutant *Δ/Δrlm1* strain was also found to be less virulent than the wild-type and

complemented strains in the murine model of disseminated candidiasis. The studies performed showed that mice inoculated with the wild-type strain died after twenty days, while mice infected with the mutant strain present a percent survival superior to 80%, seventy days after infection. The mutant strain is equally less cytotoxic when incubated with murine macrophages and induces a very reduced TNF- α production when compared to the wild-type strain. Overall, we showed that in the absence of *RLM1* the modifications in the cell wall composition alter yeast interaction with the environment, with consequences in adhesion ability and virulence. The gene expression findings suggest that this gene participates in the cell wall biogenesis, with the mutant rearranging its metabolic pathways to allow the use of alternative carbon sources.

An overview of the virulence attributes and of the mechanisms used by the fungus to resist to the host immune system will be presented, focusing on the recent work developed by our research group.

P45

Candida, carcinogénesis y metástasis

Andoni Ramirez-Garcia, Aitor Rementeria y Fernando L. Hernando
*Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología,
Universidad del País Vasco UPV/EHU, Leioa, España. E-mail: andoni.ramirez@ehu.es*

El cáncer es uno de los problemas de salud más serios al que una persona puede hacer frente a lo largo de su vida. Con el avance de la biotecnología y la biomedicina se han desarrollado nuevas herramientas para la detección, control e, incluso la cura de la enfermedad dependiendo del tipo de cáncer y su estadio. A pesar de ello, esta enfermedad continúa estando asociada con sufrimiento y muerte, tal y como lo demuestran los aproximadamente 8,2 millones de fallecimientos en el mundo en 2012 debidos al cáncer, siendo la metástasis la principal causa.

Las infecciones microbianas han estado ligadas al cáncer desde hace muchos años porque las enfermedades infecciosas son una consecuencia probable de la inmunodeficiencia transitoria debida principalmente a los tratamientos quimioterapéuticos. Sin embargo, cada vez son más los artículos que demuestran que el proceso opuesto también es posible, es decir, que la presencia de microorganismos aumenta el riesgo de padecer cáncer. Hasta la fecha, se ha estudiado principalmente el papel de virus o bacterias, y son muy pocos los estudios que han sido realizados sobre el papel que los hongos pueden desempeñar en el inicio, progreso o establecimiento del cáncer. Sin embargo, algunos trabajos realizados principalmente con el hongo patógeno oportunista *Candida albicans* sustentan la idea de que este hongo podría favorecer un proceso tumoral por varios mecanismos distintos. Un mecanismo mediante el cual *C. albicans* podría favorecer la carcinogénesis es a través de la producción de carcinógenos tales como las nitrosaminas o el acetaldehído. Concretamente, la producción de acetaldehído derivado del metabolismo del etanol y de otros nutrientes ha sido relacionada con la higiene bucal deficiente y con la presencia de este hongo en pacientes con cáncer oral.

Otro mecanismo favorecedor del proceso tumoral es la inflamación producida en respuesta a *C. albicans*. A pesar de que la principal función de un proceso inflamatorio es evitar las infecciones, es bien conocido el efecto pro-tumoral que una inflamación crónica puede conllevar, manteniendo y promoviendo la progresión del cáncer, y favoreciendo un fenotipo celular maligno, así como la angiogénesis, o la adquisición y acumulación de alteraciones genéticas. El mecanismo estudiado en *C. albicans* consiste en que la respuesta inflamatoria que induce en células endoteliales hace que se expresen citocinas y moléculas de adhesión y, en consecuencia, favorece la adherencia de células tumorales a las mismas. Esto supone que en pacientes con cáncer la presencia de *C. albicans* o sus moléculas en sangre podría inducir una adhesión tumoral a órganos como el bazo o el hígado donde el hongo debería ser retenido y, por tanto, el establecimiento de un tumor secundario y metástasis.

El tercer mecanismo descrito está relacionado con la población de linfocitos TCD4 más importante frente a esta levadura, la Th17. Estos linfocitos producen IL-17 para reclutar neutrófilos, necesarios frente a *C. albicans*, pero cuya presencia en tejidos tumorales conlleva un peor pronóstico en ciertos tipos de cáncer. Además, también secretan IL-23, la cual promueve la angiogénesis, el crecimiento, y la incidencia del tumor, y además antagoniza en su efecto con IL-12 e IFN- γ , cruciales en la respuesta antitumoral Th1.

Finalmente existe otro mecanismo relacionado con el mimetismo molecular de la proteína relacionada con el receptor de complemento 3 (CR3-RP) de *C. albicans*. Esta proteína es antigénica y estructuralmente similar al receptor de complemento 3 (CR3 o Mac-1) humano, necesario para la adhesión y extravasación de leucocitos en el endotelio. Por tanto, anticuerpos desarrollados frente a CR3-RP podrían tener reacción cruzada con el CR3 de los leucocitos e inhibirse el efecto anti-*Candida*, pero también antitumoral de los mismos.

Dada la relevancia de *C. albicans* dentro de las infecciones nosocomiales, debería tenerse en cuenta la posibilidad de incluir conjuntamente con las terapias antitumorales algún fármaco que, además de controlar este tipo de infecciones, sea capaz de minimizar el riesgo que supondría la presencia de *C. albicans* para el cáncer, incluyendo los microambientes pro-tumorales. Sin embargo, para poder desarrollar tratamientos adecuados, será necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos por los que *C. albicans* puede promover el cáncer.

Referencia

Ramirez-Garcia A, et al. *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? Crit Rev Microbiol. 2014 en prensa.

P46

Identificación del enfermo con infección respiratoria fúngica invasiva. ¿En quién sospechamos? ¿Cuándo lo buscamos?

José Barberán

Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Montepíncipe, Madrid. Email: jbarberan@ceu.es

La aspergilosis pulmonar invasora es una infección característica de pacientes inmunodeprimidos por una enfermedad oncohematológica o de receptores de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, cada vez es más frecuente encontrarla en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En su desarrollo intervienen el deterioro de la actividad mucociliar, la disminución de la función de los macrófagos y neutrófilos por la acción de los esteroides y el uso de antibióticos de amplio espectro. Tanto los pacientes colonizados por *Aspergillus* como los que tienen aspergilosis pulmonar invasora son de edad avanzada, se hallan en estadios graves de EPOC y presentan un gran número de comorbilidades. La mortalidad de la API en estos pacientes es alta debido a la dificultad de obtener un diagnóstico definitivo que retrasa el inicio del tratamiento. El pronóstico de la aspergilosis pulmonar invasora en pacientes con EPOC mejoraría con un diagnóstico más precoz que permitiera la pronta instauración de un tratamiento apropiado. Algunas herramientas como las escalas y algoritmos basados en los factores de riesgo de aspergilosis pulmonar invasora podrían ser de utilidad en el reconocimiento temprano de esta complicación en la EPOC.

P47

Papel del microbiólogo en la identificación de pacientes críticos con infección fúngica respiratoria. ¿Qué pruebas, cuándo?

Jesús Vicente Guinea Ortega

Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas-VIH, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España. E-mail: jguineaortega@yahoo.es

La candidiasis invasora es la principal micosis que afecta al paciente ingresado en unidades de cuidados intensivos. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito un aumento en el número de casos de micosis invasoras causadas por hongos filamentosos en estos pacientes, fundamentalmente la aspergilosis invasora. La mejora del pronóstico del paciente que es admitido en las unidades de cuidados intensivos y la aparición de nuevos factores de riesgo explican por qué la aspergilosis pulmonar invasora no debe ser considerada ya como una infección restringida al paciente hematológico. Entre los factores de riesgo específicos que predisponen al paciente crítico al desarrollo de la aspergilosis invasora se encuentran la cirugía, la cirrosis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el consumo de corticoides. La baja sospecha clínica y las dificultades diagnósticas explican la alta mortalidad que presentan los pacientes con aspergilosis invasora ingresados en la UCI. Las herramientas microbiológicas disponibles para el diagnóstico de la aspergilosis invasora descansan en el cultivo de las muestras clínicas del tracto respiratorio inferior, así como la aplicación de métodos independientes del cultivo. El cultivo microbiológico es una técnica sencilla y barata pero se caracteriza por presentar una baja sensibilidad y especificidad. Los métodos basados en la detección de biomarcadores circulantes, como el galactomanano y el β -1,3-D-glucano, no han sido estudiados con suficiente detalle en el paciente crítico; los datos disponibles demuestran que la detección de estos biomarcadores tiene peor rendimiento en esta población que en los enfermos neutropénicos. La detección de ADN de *Aspergillus* en muestras clínicas es una técnica esperanzadora aunque la falta de estandarización y su heterogeneidad metodológica hacen que aún no pueda ser considerada como un criterio microbiológico para el diagnóstico de aspergilosis. Las técnicas radiológicas, de alta utilidad en los pacientes hematológicos, tienen un valor limitado en estos pacientes puesto que las imágenes características como el signo del halo o la media luna están ausentes con frecuencia en los pacientes sin neutropenia. El tratamiento antifúngico en los pacientes críticos con aspergilosis invasora sigue siendo un reto. Los datos publicados demuestran una alta mortalidad a pesar del uso de antifúngicos con demostrada actividad frente a *Aspergillus*. Además, el uso de voriconazol en estos pacientes supone una dificultad añadida por la presencia frecuente de interacciones medicamentosas a nivel hepático, así que la monitorización sérica de este fármaco es especialmente importante en estos pacientes. En la presentación se revisarán las principales características de la aspergilosis invasora en el paciente crítico, así como las principales estrategias diagnósticas que puede ofrecer el laboratorio de microbiología.

P48

Abordaje del tratamiento de la infección fúngica respiratoria en el paciente crítico

Pedro M. Olaechea Astigarraga

Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Galdakao-Usansolo, Galdakao, Vizcaya.

E-mail: Pedromaria.olaecheaastigarrag@osakidetza.net

La base del tratamiento de la infección fúngica respiratoria se sustenta en la elección del antifúngico más adecuado, de las posibilidades de utilización de tratamientos de rescate y de combinaciones de antifúngicos. Las probabilidades de supervivencia de los pacientes críticos con aspergilosis pulmonar invasiva son de antemano escasas, pero son casi nulas cuando la evolución es inadecuada y se deben implantar terapias de rescate.

Una parte del arsenal terapéutico antifúngico habitualmente empleado frente a levaduras no es eficaz en la erradicación de *Aspergillus* (por ejemplo, el fluconazol), y otra parte importante, como son las candidas, actúan intrínsecamente como fungistáticos frente a *Aspergillus*, por lo que no se deben utilizar en monoterapia y mucho menos en situaciones críticas. Las posibilidades terapéuticas de la aspergilosis pulmonar invasiva se centran en dos antifúngicos: el voriconazol y la anfotericina B liposómica. La elección de uno u otro antifúngico debe ser un proceso reflexivo, individualizado y constantemente reevaluado. Idealmente debe basarse en los siguientes apartados:

a) Actividad, espectro y resistencias

Aunque se han descrito resistencias de *Aspergillus* al voriconazol, estas son escasas en nuestro medio, por lo que debemos considerar que, en este apartado, ambos fármacos son similares.

b) Farmacocinética

Existen diferencias farmacocinéticas considerables entre ambos fármacos. Por un lado, la no existencia de formulación oral para la anfotericina B condiciona los tratamientos prolongados y, por otro, la formulación intravenosa va acompañada de sulfobutileter beta ciclodextrina sódica, que se acumula en casos de insuficiencia renal, lo que condiciona la administración prolongada de la formulación intravenosa en pacientes críticos con deterioro de la función renal.

Se han descrito importantes variaciones individuales en la farmacocinética del voriconazol que dependen de la edad (en pacientes jóvenes, concentraciones infraterapéuticas y, en ancianos, efectos tóxicos), el sexo, el peso o la vía de administración. Por ello se recomienda actualmente monitorizar las concentraciones del voriconazol en pacientes tratados con este fármaco.

c) Efectos adversos, interacciones y toxicidad

En este aspecto, ambos fármacos son bien diferentes, lo que constituye el principal motivo de elección de uno u otro. El voriconazol tiene como efectos adversos más frecuentes la fotofobia, la confusión y la elevación de las transaminasas, lo que lo convierte en relativamente contraindicado en pacientes con insuficiencia hepática severa (estadio Child C). Por el contrario, el efecto adverso más frecuente de la

anfotericina B liposómica es la insuficiencia renal, que aparece fundamentalmente en pacientes con otros factores de nefrotoxicidad.

Las interacciones son frecuentes con todos los azoles. En el caso del voriconazol hay interferencia con fármacos que se metabolizan por la misma vía del citocromo P450 (CYP3A4 y 2C9, entre otros), lo que modifica los niveles del fármaco o del concomitante. También tiene como efecto adverso la prolongación del QT lo que puede favorecer las arritmias cuando se utiliza concomitantemente con otros fármacos que tengan el mismo efecto.

Para ambos fármacos, no hay que hacer ajustes en pacientes con insuficiencia renal.

d) Coste de adquisición del fármaco

El coste del voriconazol es muy inferior al de la anfotericina B liposómica, por lo que es un aspecto más que debe ser tenido en cuenta.

e) Tratamientos combinados y de rescate

Debido a la alta mortalidad de la aspergilosis invasiva en pacientes con insuficiencia respiratoria severa, se ha probado el tratamiento combinado con las diferentes familias de antifúngicos, incluyendo la posibilidad de combinación de voriconazol con anfotericina B liposómica o cualquiera de estos con caspofungina o anidulafungina. Aunque se recomienda la biterapia en pacientes especialmente graves, las evidencias a favor de esta aproximación no son muy consistentes.

El tratamiento de rescate debe plantearse con caspofungina, otros azoles (posaconazol o itraconazol) o anfotericina B complejo lipídico probablemente en combinación con los fármacos de primera línea.

P49

Consecuencias de la aspergilosis invasora en el paciente crítico

Francisco Alvarez Lerma

Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario del Mar. Parc de Salut Mar. Barcelona.

Email: Falvarez@parcdesalutmar.cat

La presencia de una aspergilosis invasora en un paciente crítico ingresado en un Servicio o Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) se asocia con una elevada morbi-mortalidad, en especial en aquellos que precisan de ventilación mecánica para el tratamiento de la insuficiencia respiratoria acompañante (1-3). La mortalidad de los pacientes con insuficiencia respiratoria secundaria a aspergilosis pulmonar y necesidad de ventilación mecánica ha sido superior al 90% en algunas series (4-8) por lo que algunos autores han recomendado no ingresar en UCI dichos pacientes dado su mal pronóstico (9).

Aunque la mayoría de las situaciones clínicas etiquetadas como aspergilosis invasoras se identifican en pacientes inmunodeprimidos (trasplante de órgano sólido o de células hematopoyéticas, neutropenia, quimioterapia, VIH) o en pacientes con patología respiratoria crónica en tratamiento prolongado con corticoides, en ocasiones también se ha detectado la aparición de estas infecciones en el contexto de la asistencia hospitalaria (intervenciones quirúrgicas, ingresos prolongados, tratamientos con nebulizadores, manipulación de la vía aérea) en forma de brotes epidémicos. En muchos casos estos pacientes precisan ingresar en UCI para su tratamiento. Otros pacientes desarrollan esta infección durante su estancia en UCI o en unidades posquirúrgicas.

En España existe un registro de infecciones adquiridas en UCI desde el año 1994. El registro ENVIN-HELICS (Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial-Hospital in Europe Link for Infection Control through Surveillance) cuenta con la participación anual (por lo menos durante tres meses) de más de 150 UCI del país y acumula datos de infecciones respiratorias adquiridas en UCI, o fuera de UCI, de más de 150.000 pacientes (datos disponibles en la web: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/>). Aunque la etiología predominante en las infecciones respiratorias es de origen bacteriano, existe un pequeño grupo de pacientes en los que se identifican especies del género *Aspergillus* como responsables de dichas infecciones.

Entre los años 2006-2012 se han diagnosticado 267 pacientes en 79 de las 198 UCI participantes (2,46 casos por 1.000 pacientes ingresados en UCI y 3,23 episodios por 10.000 días de estancia en UCI). Las infecciones se clasificaron desde un punto de vista clínico como neumonía relacionada con ventilación mecánica en 93 (34,8%) casos, neumonía no relacionada con ventilación mecánica en 120 (44,9%) y traqueobronquitis en 54 (20,2%). Se trata de pacientes de edad avanzada (64,8 ± 17,1 años), con un elevado nivel de gravedad (APACHE II: 22,03 ± 7,7), con patología médica (64,8%), estancia prolongada en el hospital previa a la identificación de *Aspergillus* spp (mediana, 11 días), procedencia de salas de hospitalización (58,1%) y elevada mortalidad intra-UCI (57,3%) y hospitalaria (59,6%) con importantes diferencias dependiendo del tipo de infección. Los factores con riesgo independiente

de mortalidad fueron: ingreso previo en una unidad de hospitalización (OR 7,08; IC95% 3,18-15,76), antecedente de inmunosupresión (OR 2,52; IC95% 1,24-5,13) y presencia de sepsis grave o shock séptico (OR 8,91; IC 95% 4,24-18,76) (10). La presencia de los tres factores se asocia con una mortalidad superior al 97% por lo que el ingreso en UCI de estos pacientes podría ser cuestionado.

Referencias

1. Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmerman W, Colardyn F, et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care* 2006; 10: R31
2. Khasawneh F, Mohamad T, Moughrabieh MK, Lai Z, Ager J, Soubani AO. Isolation of *Aspergillus* in critically ill patients: a potential marker of poor outcome. *J Crit Care* 2006; 21:322-7
3. Shi Y, Liu HZ, Wang XT, Liu Y, Rui X, Tang B, et al. [The clinical significance of *Aspergillus* isolation from airway samples in critically ill patients]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2009; 32: 444-9.
4. Rello J, Esandi ME, Mariscal D, Gallego M, Domingo C, Valles J. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: report of eight cases and review. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1473–1475
5. Dimopoulos G, Piagnerelli M, Berré J, Eddafali B, Salmon I, Vincent JL. Disseminated aspergillosis in intensive care unit patients: an autopsy study. *J Chemother*. 2003; 15:71-5.
6. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 621-5
7. Vandewoude KH, Blot SI, Benoit D, Colardyn F, Vogelaers D. Invasive aspergillosis in critically ill patients: attributable mortality and excesses in length of ICU stay and ventilator dependence. *J Hosp Infect* 2004; 56:269-76.
8. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ortiz-Leyba C, Leon C, Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, et al. Isolation of *Aspergillus* spp from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. *Crit Care* 2005; 9:R191–R199
9. Bulpa PA, Dive AM, Garrino MG, Delos MA, Gonzalez MR, Evrard PA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease patients with invasive pulmonary aspergillosis: benefits of intensive care? *Intensive Care Med* 2001; 27:59-67
10. Alvarez Lerma F, Olaechea Astigarraga P, Palomar Martínez M, Rodríguez Carvajal M, Machado Casas JF, Jiménez Quintana MM, et al; Grupo de estudio ENVIN-HELICS. Respiratory infections caused by *Aspergillus* spp in critically ill patients admitted to the intensive care units. *Med Intensiva* 2014. doi: 10.1016/j.medin.2014.02.004.