

B1

Aumento de la proliferación y la adhesión de células de melanoma inducido por proteínas recombinantes de *Candida albicans*

Aitziber Antoran¹, Andoni Ramirez-García¹, Leire de-Campos-Mata¹, Aize Pellon¹, Nerea Arias-Jayo¹, Aitor Benedicto², Ana Abad-Díaz-de-Cerio¹, Aitor Rementería¹, Beatriz Arteta² y Fernando L. Hernando¹

¹Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Fac. Ciencia y Tecnología; ²Dpto. Biología Celular e Histología. Fac. Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, España. E-mail: aitziber.antorán@ehu.es

La levadura patógena oportunista *Candida albicans* es capaz, en ocasiones, de penetrar en el torrente circulatorio, de donde debe ser eliminada tras ser retenida en el endotelio de los vasos sanguíneos del bazo y del hígado, principalmente. Para ello, se activa una respuesta inflamatoria que recluta leucocitos gracias a la liberación de citocinas y expresión de moléculas de adhesión. Sin embargo, en el caso de los pacientes oncológicos, cuyo sistema inmunitario se encuentra debilitado, esta respuesta puede favorecer la adhesión de células tumorales circulantes en la sangre, en lugar de leucocitos, pudiendo generarse un tumor secundario y metástasis. Nuestro grupo de investigación, con un modelo *in vitro*, comprobó un incremento de adhesión del melanoma B16 al endotelio tras estimular las células endoteliales con *C. albicans* o sus manoproteínas. Con el objetivo de identificar las moléculas implicadas se obtuvieron fracciones proteicas y se identificó una fracción manoproteica como la responsable de este incremento de adhesión, caracterizándose sus principales componentes.

En el presente trabajo, las proteínas antigénicas identificadas en esta fracción han sido clonadas y expresadas individualmente en un modelo de *Escherichia coli* [Ubiquinol-citocromo C reductasa (QCR2), enolasa (ENO1), alcohol deshidrogenasa (ADH1), y cetoácido reductoisomerasa mitocondrial (ILV5)]. Además, se ha estudiado su efecto en la proliferación del melanoma, y en la estimulación de células endoteliales que favorece su posterior adhesión. Los resultados muestran que todas las proteínas indujeron un aumento de la adhesión y de la proliferación tumoral, siendo la ADH1 la que mayores incrementos indujo. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento de los mecanismos por los que *C. albicans* favorece un proceso tumoral, lo cual resulta fundamental para avanzar en el desarrollo de nuevos tratamientos que minimicen el efecto pro-tumoral de *C. albicans* en pacientes con cáncer.

B2

***Candida glabrata* y *Saccharomyces boulardii* inducen *in vitro* la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas de ratón hacia el linaje mielóide**

Daniel Gozalbo¹, María Luisa Gil¹, Javier Megías¹ y Victoria Maneu²

¹ Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Burjassot, España; ² Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía, Universidad de Alicante, Alicante, España.
E-mail: daniel.gozalbo@uv.es

Los receptores tipo Toll (TLRs), inicialmente descritos en las células inmunitarias maduras (donde actúan reconociendo ligandos microbianos muy conservados y tienen una función esencial en la respuesta innata), también se expresan en las células madre y progenitores hematopoyéticos (HPCs), lo que sugiere su participación en la hematopoyesis durante la infección. Nuestro grupo ha demostrado que *Candida albicans* interacciona *in vivo* e *in vitro* con las HPCs de ratón, causando su diferenciación hacia células mieloides, a través de la interacción con TLR2 y Dectina-1 [1]. El objetivo de este trabajo ha sido extender estos estudios *in vitro* a otras especies de levadura (*Candida glabrata* y *Saccharomyces boulardii*), así como a una especie bacteriana (*Staphylococcus aureus*). HPCs, purificadas de médula ósea, se co-cultivaron durante 7 días con las células microbianas inactivadas y, posteriormente, se determinó la diferenciación celular mediante análisis por citometría de flujo. En todos los casos se observó diferenciación hacia el linaje mielóide. *S. boulardii* y particularmente *C. glabrata* indujeron un menor grado de diferenciación, siendo los monocitos la población mayoritaria de células diferenciadas, mientras que *C. albicans* y *S. aureus* indujeron una mayor diferenciación, hasta células dendríticas derivadas de monocitos y macrófagos, respectivamente. El ligando puro de TLR2 (Pam3CSK4) dirigió la diferenciación de las HPCs casi exclusivamente hacia macrófagos. Estos resultados apoyan la idea de que durante la infección, la hematopoyesis puede estar modulada en respuesta a estímulos microbianos de modo específico (dependiente de los ligandos microbianos reconocidos por los receptores de las HPCs), para generar la producción de las poblaciones de células maduras de la inmunidad innata necesarias para la lucha frente al patógeno.

Referencias

[1] Yáñez A, Goodridge HS, Gozalbo D, and Gil ML (2013). TLRs control hematopoiesis during infection. *European Journal of Immunology*, 43: 2526-2533.

B3

Identificación proteómica de antígenos conidiales de *Scedosporium prolificans* reconocidos por IgG sérica humana

Aize Pellon, Idoia Buldain, Andoni Ramirez-Garcia, Aitziber Antoran, Lorea Orueta, Aitor Rementeria, Fernando L. Hernando

Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Fac. de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, España. E-mail: idoia_buldain@hotmail.com

Scedosporium prolificans es un ascomiceto filamentosos considerado patógeno emergente debido al aumento de casos clínicos en las últimas décadas. La infección manifiesta clínicamente de formas muy variadas, produciéndose las mayores complicaciones en individuos inmunodeprimidos. La ausencia de un tratamiento eficaz, debido a la alta y diversa resistencia a los antifúngicos, hace que estas infecciones sean muy difíciles de tratar. Con el objetivo final de desarrollar nuevas terapias frente a *S. prolificans*, en este trabajo se han identificado y caracterizado diversas proteínas antigénicas reconocidas por IgG sérica de individuos inmunocompetentes, además de estudiarse la variabilidad interindividual de su reconocimiento.

Tras la extracción de proteínas, el proteoma conidial de *S. prolificans* fue resuelto mediante electroforesis bidimensional (pH 3-10, 12% acrilamida), siendo las proteínas electrotransferidas a membrana. A continuación, se realizaron *western blots* para detectar las proteínas reconocidas por IgG presentes en suero de 10 donantes inmunocompetentes (comité ético de la UPV/EHU). Tras el análisis, se reconocieron 126 antígenos diferentes entre todos los sueros, de los cuales se identificaron mediante espectrometría de masas los reconocidos por el 70% o más de los mismos. Uno de estos antígenos fue reconocido por el 100% de los sueros utilizados.

El amplio y fuerte reconocimiento de las proteínas conidiales de *S. prolificans* mediado por IgG séricas nos permite concluir que existe una respuesta específica por parte del sistema inmunitario. Así, estos anticuerpos son presumiblemente protectores contra este tipo de infecciones, mucho menos frecuentes o graves en pacientes inmunocompetentes. Por tanto, proponemos las proteínas identificadas como interesantes dianas para nuevas terapias antifúngicas.

B4

Cell surface changes in *Candida albicans* $\Delta rlm1/\Delta rlm1$ cells are associated with reduced *in vitro* virulence towards innate immune cells

João Miguel-Pacheco, Catarina Carneiro, Célia Pais¹ and Paula Sampaio
Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, University of
Minho, Braga, Portugal. E-mail: jmopacheco@gmail.com

Candida albicans is capable of causing a range of infections, from superficial thrush to dangerous systemic candidiasis, making it the most prevalent fungal pathogen in humans.

The cell wall of *C. albicans* is an essential and dynamic structure that maintains cell morphology, providing protection from external pressure, aiding in colonization and pathogenesis of the human host, in immune-recognition and immune-avoidance. In a previous work, both copies of the *RLM1* gene of *C. albicans* were deleted and phenotypic analysis of $\Delta/\Delta rlm1$ mutants showed typical weakening phenotypes, such as hypersensitivity to Congo red, calcofluor white, and caspofungin. Additionally, cell wall of the mutant showed significant increase in chitin (213%) and reduction in mannans (60%), comparing with wild type (WT) strain. The objective of this work is to determine the role of *RLM1* in the *in vitro* virulence towards macrophage cells. Results show that, although no significant differences were observed in the phagocytosis rate, the mutant strain induced significantly lower macrophage cell damage than the WT and complemented strains ($P < 0.001$) by LDH assay. The pro-inflammatory response evaluated by the quantification of TNF- α showed that TNF- α levels produced by macrophages were significantly lower in response to $\Delta rlm1/\Delta rlm1$ cells than in comparison with the WT cells ($P = 0.0001$). These results showed that the cell wall changes observed in the mutant cells are critical for the interaction with phagocytic cells, resulting in an *in vitro* reduced ability of *Candida* cells to damage macrophages.

B5

Una novedosa asociación endosimbiótica entre un basidiomiceto fitopatógeno y un firmicutes que fija N₂

José Ruiz Herrera¹, Claudia León Ramírez¹, Alejandro Sánchez¹, Holjes Salgado¹, Antonio Vera² y Juan J. Peña Cabriales²

¹Departamento de Ingeniería Genética, ²Departamento de Biotecnología y Bioquímica Unidad Irapuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Gto., México. E-mail: jruiz@ira.cinvestav.mx

La reducción biológica de N₂ a amoníaco es un proceso que fue y es indispensable para el mantenimiento de la vida en la Tierra. Su complejidad se deduce del número de genes involucrados (17-18), y que solo los procariotas son capaces de llevarlo a cabo. La fijación de N₂ por los eucariotas solo ocurre cuando establecen asociaciones simbióticas con procariotas. En el caso de los hongos existen los líquenes, asociaciones de hongos con cianobacterias. Otras asociaciones son las micorrizas, formadas por hongos, plantas y bacterias, y las de las hormigas, hongos y bacterias. La más íntima está formada por especies relacionadas con *Burkholderia* asociadas intracelularmente con especies de *Gigaspora*.

Por ello nos causó sorpresa que el patógeno del maíz *Ustilago maydis* fuese capaz de crecer en ausencia de sales nitrogenadas. Un análisis *in silico* de su genoma mostró ausencia de homólogos de los genes *nifK*, *nifD* o *nifH* (nitrogenasa y nitrogenasa reductasa). Sin embargo, el análisis bioquímico de la nitrogenasa por reducción de acetileno dio un resultado positivo, al igual que la fijación de ¹⁵N₂. Por ello consideramos la posibilidad de la existencia de una bacteria endosimbionte en el hongo. Un análisis por PCR dio lugar a la amplificación de fragmentos de los genes bacterianos *16S rRNA* y *nifH* con una alta homología con *Bacillus pumilus*, una bacteria capaz de fijar N₂. Análisis microscópicos de *U. maydis* teñido con Syto 9 mostraron la presencia intracelular de bacterias, confirmada por tinción de Gram de protoplastos lisados y por microscopía electrónica. Estos datos revelan tres observaciones únicas de endosimbiosis: i) una novedosa asociación que fija N₂; ii) una simbiosis entre un basidiomiceto y una bacteria que fija N₂, y iii) la asociación de una especie del género *Bacillus* que fija N₂ con un hongo.

B6

Caracterización de la proteína Kre9 de *Candida albicans* como efector estimulante de una respuesta inflamatoria en células endoteliales que favorece la adhesión tumoral

Leire de-Campos-Mata¹, Andoni Ramirez-Garcia¹, Aitziber Antoran¹, Aize Pellon¹, Joana Marquez², Ana Abad-Diaz-de-Cerio¹, Aitor Rementeria¹, Beatriz Arteta² y Fernando L. Hernando¹

¹Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Fac. de Ciencia y Tecnología; ²Dpto. Biología Celular e Histología. Fac. Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, España. E-mail: ldecampos001@ikasle.ehu.es

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha descrito la capacidad de *Candida albicans* de estimular las células endoteliales hepáticas, produciendo citocinas y expresando moléculas de adhesión, lo cual favorece la posterior adhesión de células tumorales. Este proceso puede ser de vital importancia durante los tratamientos inmunosupresores de pacientes oncológicos ya que la presencia de esta levadura podría favorecer procesos metastáticos.

Aunque se ha demostrado que la fracción manoproteica de *C. albicans* y algunas de sus manoproteínas son los principales responsables, los mecanismos concretos de estimulación resultan aún desconocidos. Es por eso que el objetivo de este trabajo fue la caracterización de un efector de *C. albicans* capaz de estimular el endotelio, su posterior clonación, y el estudio de su efecto en la inflamación, adhesión y proliferación tumoral.

Con el objetivo de identificar las moléculas responsables de la estimulación se seleccionó la IL-1, una de las principales citocinas pro-inflamatorias, y se utilizó un anticuerpo anti IL-1 β para realizar un *western blot* bidimensional sobre la fracción manoproteica de *C. albicans*. De esta forma se identificó la proteína Kre9, y se expresó como proteína recombinante en *Escherichia coli*. La Kre9 purificada se utilizó para estimular células endoteliales y medir tanto la respuesta inflamatoria como la adhesión tumoral y el efecto en la proliferación de las mismas.

La Kre9 estimuló significativamente tanto la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-18, y TNF- α) como la adhesión y la proliferación tumoral. Por tanto, la Kre9 se postula como candidata a ser estudiada como diana terapéutica en el desarrollo de tratamientos para evitar el efecto pro-tumoral de *C. albicans*.

B7

Identificación de factores de virulencia en *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*

¹Loida López, ²Francisco E. Nicolás, ¹Marta Sanchis, ²Santiago Torres-Martínez,

¹Javier Capilla, ²Rosa M. Ruiz-Vázquez, ²Victoriano Garre y ¹Josep Guarro

¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona. ²Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia, Murcia. E-mail: loida.lopez@urv.cat

Antecedentes: *Mucor circinelloides* es un hongo oportunista que afecta preferentemente a individuos inmunodeprimidos, ocasionando una elevada mortalidad a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones fúngicas.

Objetivos: Se pretende realizar un estudio comparativo de los genomas de dos cepas silvestres de *M. circinelloides* (CBS277.49 y NRRL3631) que han demostrado ser virulentas y no virulentas, respectivamente, en modelos animales, para identificar genes implicados en la virulencia de esta especie. Asimismo, se generarán mutantes nulos de genes concretos en la cepa CBS277.49 para evaluar su posible papel en la virulencia en modelos animales.

Metodología: La secuenciación del genoma de la cepa NRRL3631 se realizó mediante la plataforma Illumina HiSeq200 (Macrogen, Korea). La generación de mutantes nulos se llevó a cabo mediante sustitución del gen de interés por los marcadores *pyrG* o *leuA*. La virulencia de las cepas silvestres, así como la de los mutantes obtenidos, se evaluó mediante estudios de supervivencia, carga fúngica e histopatología en ratones OF-1 inmunosuprimidos e infectados intravenosamente con 1×10^5 UFC/animal.

Resultados: La cepa CBS277.49 produjo una mortalidad del 100% en 9 días mientras que la NRRL3631 resultó ser no patógena. Ambas cepas presentaron un grado de invasión y tropismo tisular similar. De los 11 mutantes nulos ensayados, sólo uno, defectivo en un gen implicado en el control de respuestas a la luz, mostró virulencia atenuada. Por el contrario, mutantes afectados en genes de la ruta no canónica de silenciamiento génico implicada en la regulación de genes endógenos, y de la ruta de regulación relacionada con el gen *crgA*, resultaron más virulentos que la cepa silvestre.

Conclusiones: El distinto comportamiento patogénico de las cepas estudiadas indica la existencia de factores de virulencia. Se han detectado genes reguladores de la expresión génica que podrían tener un papel importante en la patogénesis. Un estudio más exhaustivo del genoma de las cepas patogénica y no patogénica permitirá identificar otros posibles factores de virulencia.

B8

Análisis del transcriptoma de *Aspergillus fumigatus* durante una infección diseminada en ratón mediante un *microarray* de expresión de genoma completo

Mónica Sueiro-Olivares¹, Jimena V. Fernandez-Molina¹, Ana Abad-Díaz-de-Cerio², Xabier Guruceaga¹, Andoni Ramirez-García¹, Javier Garaizar², Fernando L. Hernando¹, Javier Margareto³ y Aitor Rementería¹

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, ¹Facultad de Ciencia y Tecnología, ²Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, España; ³Tecnalia Research and Innovation Foundation, Derio, España.
E-mail: monica.sueiro@ehu.es

Aspergillus fumigatus es el patógeno fúngico de transmisión aérea más importante. Diversos estudios han demostrado que su virulencia es multifactorial, aunque ésta aún no se conoce completamente. Nuestro grupo de investigación desarrolló un *microarray* de expresión de genoma completo de *A. fumigatus* que fue ensayado con éxito en estudios del transcriptoma durante la germinación en cultivo. El uso del mismo en modelos de infección animal puede proporcionar un mayor conocimiento de la relación microorganismo-hospedador. Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la utilidad de este *microarray* de expresión en muestras de una infección experimental murina.

Se inmunosuprimieron hembras de ratones BALB/c con ciclofosfamida que fueron infectadas por vía intravenosa con 1×10^5 conidios de *A. fumigatus* Af-293. El primer día posinfección se extrajo el ARN total de los riñones, obteniéndose su ADNc, e hibridándose con el *microarray*. Los resultados se compararon con los del estudio previo de germinación a 37 °C.

De los 9.630 genes incluidos en el *microarray*, 5.852 presentaban diferencias significativas de expresión, siendo 2.645 los sobreexpresados en la infección y 3.207 en la germinación a 37 °C. Cuando se investigó la pertenencia de los mismos a grupos funcionales, se observó mayor presencia de los sobreexpresados en la germinación a 37 °C. Además, la mayoría de los sobreexpresados durante la infección (67,75%) codificaban proteínas no incluidas en ningún grupo funcional, o proteínas hipotéticas. Esto podría indicar la existencia de factores génicos no conocidos o factores de virulencia no detectados hasta este momento que explicarían el éxito de este hongo como patógeno. Cabe destacar que los genes sobreexpresados en la infección se localizan principalmente en regiones cromosómicas subteloméricas.

El *microarray* de expresión diseñado ha demostrado ser una herramienta rápida, efectiva y de confianza para llevar a cabo estudios de expresión de *A. fumigatus* durante la infección. De esta forma, su utilización puede permitir la ampliación del conocimiento sobre la patogénesis de este hongo durante el establecimiento de la aspergilosis invasora.

B9

Patogenicidad de *Candida* en modelos experimentales in vivo en *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*

Estibaliz Mateo¹, Marcelo Ortega-Riveros¹, Iker De la Pinta¹, Guillermo Ezpeleta², Juan Daniel Carton¹, Cristina Marcos-Arias¹, Elena Eraso¹ y Guillermo Quindós¹

¹Laboratorio de Micología Médica, UFI 11/25 "Microbios y Salud", Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, y ²Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao. E-mail: estibaliz.mateo@ehu.es

Los hospedadores invertebrados, como el helminto *Caenorhabditis elegans* y el lepidóptero *Galleria mellonella*, son una alternativa prometedora y ventajosa como modelos para el estudio de las interacciones hospedador-patógeno en las candidiasis invasoras. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la virulencia de diferentes especies del género *Candida* en dos modelos de infección en *C. elegans* y *G. mellonella*.

Material y Métodos: Se utilizaron siete especies de *Candida*: *Candida albicans* NCPF 3153, *Candida dubliniensis* NCPF 3949, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida metapsilosis* ATCC 96143, *Candida orthopsilosis* ATCC 96139 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019. En el modelo en *C. elegans*, se infectaron con cada especie de *Candida* grupos de nematodos de la cepa AU37 y se incubaron a 25 °C en medio M9. En el modelo en *G. mellonella*, se inocularon las larvas con cada especie y diferentes concentraciones, y se incubaron a 37 °C. Para ambos modelos se evaluó la supervivencia cada 24 h y las curvas se compararon con SPSS 15.0 a través de la prueba log-rank, con un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados: La especie *C. albicans* resultó la más virulenta en ambos modelos. En el nematodo *C. elegans* la supervivencia tras la infección con esta especie fue $< 2\%$ a las 120 h. En las larvas de *G. mellonella*, la concentración de 5×10^5 células/ml resultó la más adecuada para comparar la patogenicidad de las distintas especies. Los resultados de virulencia de las demás especies de *Candida* fueron también similares, encontrándose ligeras diferencias entre ambos modelos.

Conclusiones: Tanto *C. elegans* como *G. mellonella* resultaron modelos adecuados y sencillos para evaluar la virulencia de las especies de *Candida* más frecuentemente identificadas en las candidiasis invasoras. La patogenicidad de *C. albicans* fue significativamente mayor que la del resto de especies.

Financiación: Trabajo financiado parcialmente por los proyectos GIC12 210-IT-696-13 y S-PE13UN121 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritz), PI11/00203 (FIS del MSSI) y UFI 11/25 (UPV/EHU).