

G1

SECRETOOL: herramienta de análisis integral del secretoma en hongos

Ana R. Cortázar¹, Manuel Alfaro², José A. Oguiza², Ana M. Aransay^{*1} y José L. Lavín^{*1}
¹Plataforma de Análisis Genómicos, CIC bioGUNE y CIBERhd, Parque Tecnológico de Bizkaia, 48160, Derio, España. ²Departamento de Producción Agraria, Grupo de Investigación en Genética y Microbiología, Universidad Pública de Navarra 31006 Pamplona, España.
E-mail: acortazar@cicbiogune.es

El secretoma (conjunto de proteínas secretadas por un organismo) ha sido estudiado en múltiples genomas de hongos para determinar qué proteínas lo componen, sus funciones y los procesos en los que intervienen. Las proteínas secretables por la vía clásica, contienen en su extremo N-terminal una secuencia denominada péptido señal (SP), que permiten su caracterización. Dicho SP interviene en el envío de las proteínas hacia el retículo endoplásmico para su subsiguiente transporte por la vía de secreción.

Hemos desarrollado un servicio web, denominado SECRETOOL, que engloba un compendio de herramientas preexistentes dirigidas a la identificación de motivos en la secuencia de aminoácidos de proteínas candidatas a ser secretadas por la vía clásica:

- 1) *TargetP* para la localización del SP en el extremo N-terminal.
- 2) *SignalP* para la detección y localización del sitio de corte del SP.
- 3) *TMHMM* averigua la presencia de un dominio transmembrana como máximo.
- 4) *PredGPI* identifica la existencia de secuencias de anclaje a glicofosfatidilinositol.
- 5) Se ha utilizado además *WoLFPSORT*, una herramienta de predicción de localización subcelular de proteínas para refinar el proceso y eliminar falsos positivos.

SECRETOOL se ha diseñado bajo una única premisa, la simplicidad de uso. Requiere un único paso para su funcionamiento: el envío de un FASTA con las secuencias a analizar, evitando la transformación de datos previa y posterior a cada paso individual del procedimiento. Además, se pueden realizar estudios complementarios de los resultados como, por ejemplo, la búsqueda de ortologías entre distintas especies de hongos y la caracterización de estructuras de dominio con sólo seleccionar dichas opciones antes de solicitar el análisis.

Así pues, SECRETOOL es una herramienta que permite el estudio de secretomas de hongos sin requerir conocimientos avanzados de bioinformática, ampliando así el espectro de potenciales usuarios.

G2

Evaluación preliminar del sistema VITEK MS™ para la identificación rápida de hongos filamentosos

Carlos Ruiz de Alegría Puig, Laura Guzmán Gómez, Jesús Agüero Balbín, M^a Pía Roiz Mesones y Luis Martínez-Martínez

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander.

E-mail: carlosrdap@hotmail.com

Objetivos: MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) se ha convertido en una herramienta fundamental en la identificación bacteriana y de otros microorganismos. El objetivo de este trabajo ha sido hacer una evaluación preliminar del sistema VITEK MS™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) para la identificación de hongos filamentosos de géneros muy diversos.

Material y métodos: Se analizaron 16 hongos filamentosos, identificados previamente por secuenciación de la región ITS y D1-D2 de la subunidad 28S, así como del factor de elongación 1 α . El análisis de los espectros en el Vitek-MS™ se realizó con la base de datos SARAMIS MS-ID v2 (Anagnos Tee GMBH, bioMérieux). La muestra se procesó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Un error común que la máquina puede mostrar es el P150, que indica que el espectro no está en la base de datos. En este caso el fabricante recomienda repetir la adquisición.

Resultados: De los 16 hongos estudiados sólo se encuentran en la base de datos 5 de ellos, de los cuales MALDI-TOF identifica correctamente en género y especie uno de ellos (20%), en 3 (60%) muestra error P150 y en 1 caso (20%) muestra una identificación con bajo porcentaje.

Respecto a los 11 restantes que no se encuentran en la base de datos, en 7 (63,6%) muestra error P150, en 1 (9%) identifica el género pero no la especie, y en 3 (27,3%) identifica erróneamente otros géneros.

Conclusiones: Siendo conscientes del bajo número de muestras podemos concluir que sería necesario hacer más estudios para aumentar la base de datos SARAMIS MS-ID v2. Encontramos una sensibilidad muy baja (20%) y a su vez una especificidad limitada (63%) debido probablemente a la baja potencia del test.

G3

Inhibición de la enzima de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa de *Ustilago maydis* (Hmgr-Um) y su repercusión en la síntesis de esteroides, una propuesta como modelo de estudio para probar compuestos hipolipemiantes y antifúngicos

B. Rosales-Acosta¹, A. Arias-Chávez¹, J.A. Ibarra-García¹, J. Tamariz-Mascarúa² y L. Villa-Tanaca¹

¹Dpto. de Microbiología/Laboratorio de Genética microbiana, ² Dpto. de Química Orgánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, México D.F., México.

E-mail: blanch_rosales@hotmail.com

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (Hmgr) cataliza la síntesis de mevalonato, compuesto clave en la síntesis de colesterol en el ser humano y de ergosterol en los hongos. Un estudio filogenético de diversas proteínas Hmgr reveló que la enzima humana presenta una alta similitud con la enzima de *Ustilago maydis*. Se han diseñado nuevos compuestos hipolipemiantes derivados de las estatinas y fibratos, capaces de inhibir la enzima Hmgr humana, que no presentan los efectos indeseables que presentan los fármacos actuales (hepatotoxicidad, genotoxicidad, nefrotoxicidad, etc.). La efectividad de los compuestos sintéticos como inhibidores competitivos que disminuyen la síntesis de esteroides debe comprobarse. Se sintetizó una serie de compuestos análogos a fibratos (6g y 7a) y junto con la simvastatina, se estudió el efecto de dichos compuestos en *U. maydis* sobre la viabilidad, síntesis de esteroides, inhibición de la actividad Hmgr-Um, formación de tubos de conjugación y *mating* del hongo. Los resultados mostraron que el compuesto 7a fue el más efectivo para inhibir los procesos mencionados. Los experimentos de fraccionamiento celular confirmaron la localización en membrana de la enzima, lo que coincidió con la predicción realizada por análisis bioinformático. La topología de la proteína Hmgr de *U. maydis* deducida de la secuencia nucleotídica presentó sólo cuatro 4 dominios transmembranales, a diferencia de otras Hmgr de hongos que presentan hasta ocho dominios. En conclusión, se propone a la Hmgr-Um como modelo de estudio para probar compuestos hipolipemiantes y antifúngicos.

Funding: CONACyT 133695; SIP20141333

G4

Variabilidad en la formación de biopelículas e hidrofobicidad en aislamientos clínicos de *Candida albicans*

Izabela Maria Wróbel¹, Laura Cabello Murgi¹, Almudena Valentín Verdeguer¹, Javier Pemán^{2,3}, Emilia Cantón³ y Eulogio Valentín¹

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100-Burjassot (Valencia), España. ²Servicio de Microbiología, HUP La Fe, Valencia, Spain. ³Unidad de Microbiología Experimental, IIS La Fe, Valencia, España.
E-mail: Eulogio.Valentin@uv.es

Las infecciones originadas por el género *Candida* presentan una importante prevalencia entre pacientes con el sistema inmunitario comprometido, siendo las más comunes las originadas por *Candida albicans*. La formación de biopelículas por *C. albicans* es un problema médico importante, pero no es mucho lo que se conoce acerca de la variabilidad de la formación de estas sociedades microbianas entre aislamientos clínicos. En el presente estudio se ha examinado la variación cuantitativa de formación de biopelículas y la hidrofobicidad de 448 aislamientos clínicos de *C. albicans*. El método empleado fue la cuantificación de la biopelícula midiendo la absorbancia del cristal violeta fijado a la biopelícula. Las cepas se clasificaron en función de la absorbancia de la biopelícula formada por la cepa estándar *C. albicans* SC5314: no adherente (NA) 0 – 0,2; débilmente adherente (DA) <0,2 – 0,5; moderadamente adherente (MA) <0,5 – 0,7; fuertemente adherente (FA) <0,7 - >1,0. Empleando esta clasificación, 70 cepas fueron SA, 65 cepas fueron MA, 137 cepas fueron DA y 176 cepas fueron NA. No hay una relación directa entre la capacidad de formación de la biopelícula y la patogenicidad-virulencia de *C. albicans*. Con la finalidad de ver si había una correlación entre la formación de biopelículas y la hidrofobicidad de la superficie celular (HSC), la HSC de los 448 aislamientos clínicos de *C. albicans* fue determinada empleando el hidrocarburo xileno. La hidrofobicidad relativa fue obtenida como sigue: $[\text{OD}_{600} \text{ del control} - \text{OD}_{600} \text{ después de añadir el xileno} / \text{OD}_{600} \text{ del control}] \times 100$. No hubo ninguna correlación directa entre la formación de biopelículas y la HSC. Cuatrocientos dos cepas presentaron una HSC de alrededor del 20%, de estas cepas 53 fueron FA, 54 MA, 126 DA y 169 NA, aunque el porcentaje más alto de cepas más hidrofóbicas fue encontrado en las cepas FA (23%). Podemos decir que no existe una correlación positiva entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la capacidad de formación de biopelículas.

Financiación: El trabajo experimental ha sido financiado por el proyecto PI12/01797 del Ministerio de Economía y competitividad-Instituto de Salud Carlos III y por el proyecto FISS PI 12/02786

G5

Detección de compuestos orgánicos volátiles elaborados por hongos mediante Unidades Caninas de biodetección

L. Pons Anglada y M.A. Calvo Torras

Departamento de Sanidad y Anatomía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, (Barcelona) España. E-mail: mariangels.calvo@uab.cat

Los microorganismos son capaces de producir una gran variedad de metabolitos, entre los que podemos citar los compuestos volátiles orgánicos (VOC) que en ocasiones no se detectan por la falta de métodos estandarizados. Muchas de estas pequeñas moléculas (la mayoría con un tamaño inferior a 300 Da) presentan un bajo punto de ebullición y un perfil lipófilo, lo que les confiere su carácter volátil. Los VOC son elaborados por diversos géneros de hongos, y pueden detectarse mayoritariamente en géneros concretos, hecho que permitiría identificarlos y, en caso de contar con un método de detección, localizarlos en el ambiente. En cuanto a los métodos de detección, se han desarrollado detectores electrónicos capaces de clasificar géneros de hongos (*Penicillium*, *Cladosporium*, *Stachybotrys* y *Aspergillus*, entre otros) mediante el análisis de los VOC que emiten los cultivos. Como método de detección alternativo a los detectores electrónicos existe la posibilidad de utilizar Unidades Caninas (UC) de biodetección de microorganismos. Este tipo de perros, adiestrados para detectar, localizar y señalar la presencia de géneros y/o especies concretas de hongos, suponen un método rápido, económico y novedoso de *screening* de entornos y sustratos susceptibles de estar contaminados. Actualmente estas UC están siendo utilizadas con éxito para la detección de hongos deterioradores de edificios (*Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana* y *Antrodia sinuosa*, entre otros) y existe la posibilidad de ampliar su utilización a muchos otros ámbitos. Algunos ejemplos de géneros potencialmente detectables y su aplicación son: *Leptographium* para la prevención de la plaga de las raíces de los pinos, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* para la prevención de toxiinfecciones alimentarias, *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* en el ámbito hospitalario y *Penicillium*, *Alternaria* y *Cladosporium* para la prevención del deterioro del patrimonio histórico y como agentes desencadenantes de procesos de hipersensibilidad. El principal problema a solventar antes de poder adiestrar a perros es obtener una muestra olorosa inocua tanto para el perro como para su adiestrador y evitar la posibilidad de padecer micosis y reacciones de hipersensibilidad.

G6

Mecanismos de *quorum sensing* en el hongo dimórfico *Ophiostoma piceae*

Jorge Barriuso, Felipe de Salas de la Cuadra, Javier Martín Díaz 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

Entre los hongos del género *Ophiostoma*, se incluyen especies patógenas y saprófitas. La especie *Ophiostoma piceae* corresponde al segundo grupo, y es causante del *sap stain* de madera de coníferas, lo que constituye un grave problema para la industria maderera. Es un hongo dimórfico, que crece en forma de levadura o micelio dependiendo de las condiciones de cultivo, lo que sugiere su versatilidad para adaptarse a condiciones ambientales cambiantes. Recientemente se ha publicado el genoma completo de la cepa canadiense UAMH-11346.

El proceso de comunicación intercelular microbiana, conocido como *quorum sensing* (QS), permite a las comunidades de microorganismos coordinar su fisiología y comportamiento. Este mecanismo está mediado por señales químicas difusibles que se acumulan en el medio a medida que aumenta la densidad celular de la población. Este proceso se estudió primero en bacterias pero también se ha descrito en hongos, principalmente levaduriformes, en los que se ha demostrado que la acumulación en el medio de moléculas señal, como el farnesol, puede regular cambios morfológicos, la acumulación de metabolitos secundarios y la secreción de enzimas extracelulares. En la levadura *Candida albicans*, patógeno humano y modelo en estudios de QS, se ha demostrado que el farnesol actúa reduciendo los niveles de AMPc en la célula, regulando la expresión del gen de la adenilato ciclasa (*Cyr1*) y también modula la expresión del factor de transcripción *Tup1*, que reprime la transición de levadura a micelio.

En el presente trabajo demostramos la existencia de mecanismos de QS mediados por farnesol en *O. piceae* CECT 20416. La respuesta a la acumulación de esta molécula en el medio durante el crecimiento del hongo o añadida exógenamente, incluye la diferenciación morfológica de levadura a micelio. Y estudios en la ruta de transducción de señal, indican que la regulación es dependiente de la inducción del gen análogo a *Tup1* en *O. piceae*. Por otra parte, se ha encontrado que esta molécula aumenta (x3) la secreción de una esterasa secretada por el hongo. Esta enzima tiene gran potencial biotecnológico porque actúa tanto sobre ésteres de esteroides como triglicéridos en procesos de hidrólisis o síntesis.

Estos resultados suponen un paso más en la demostración de la existencia de mecanismos de QS en organismos eucariotas, y abren una vía para su potencial aplicación biotecnológica en la mejora de la producción de enzimas en fermentaciones industriales.