

SEM@foro

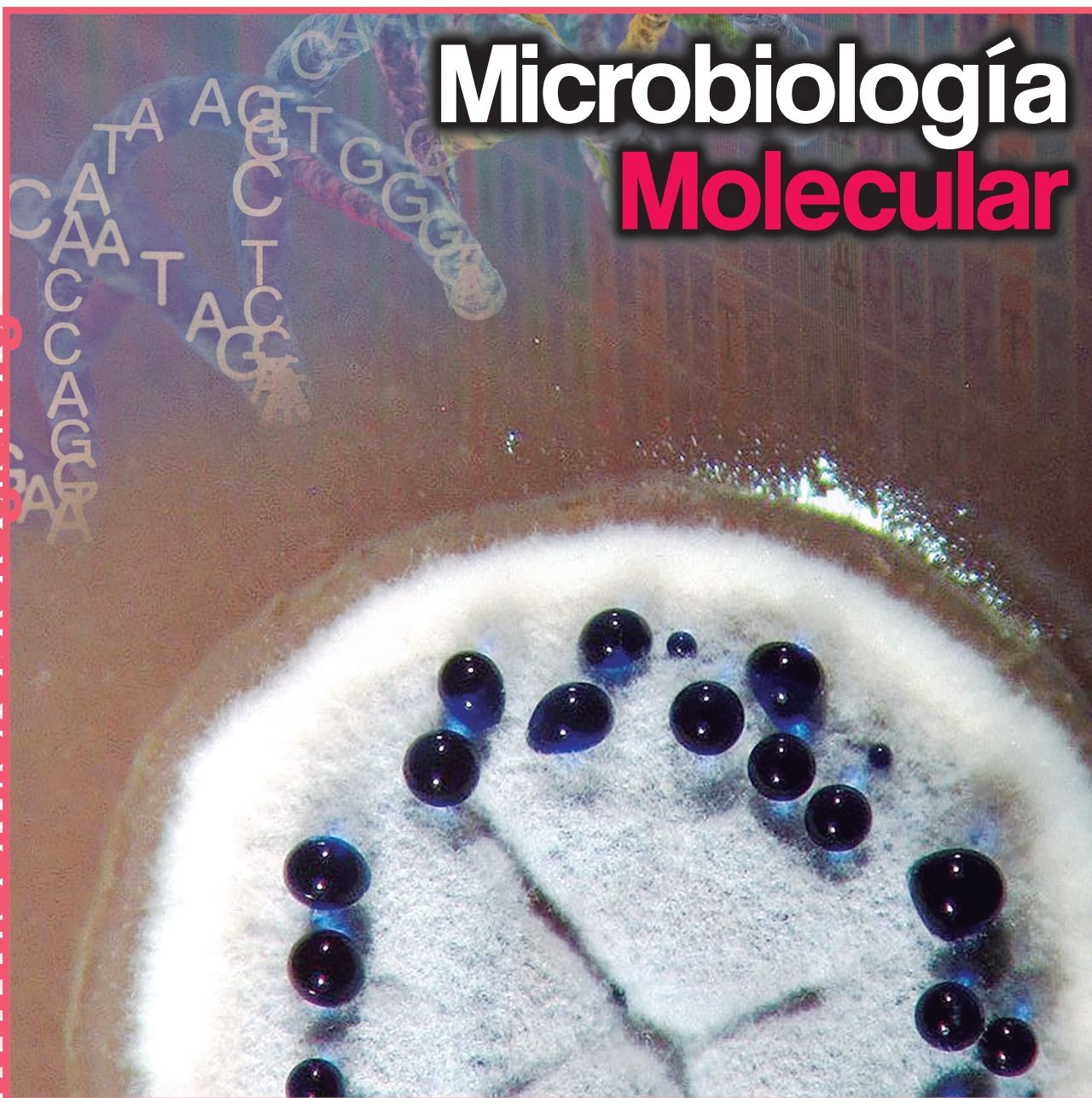
Revista de la Sociedad Española de Microbiología

DICIEMBRE 2014

N.º 58

Microbiología Molecular

www.sem microbiologia.org



ESPECIAL AÑO DE LA BIOTECNOLOGÍA Pág. 41

CIUDADANO ÉBOLA Pág. 38



Incubar, Congelar, Agitar

Incubadores de CO₂, Ultracongeladores y Agitadores Eppendorf

Sus muestras no podrían estar en mejores manos. Conozca la línea completa de Eppendorf en Incubadores de CO₂, Ultracongeladores y Agitadores, para que sus ensayos no se vean nunca comprometidos.

Incubadores CO₂

Control preciso para todas sus necesidades de cultivo celular.

Congeladores y Ultracongeladores -86°C

Eficiencia energética, seguridad y espacio para almacenar sus muestras.

Agitadores Orbitales

El sistema más eficiente para el crecimiento de sus células.

Visite nuestra web para más información.



<http://newbrunswick.eppendorf.com>

Información de contacto:

Eppendorf Ibérica S.L.U. · Tel.: 91 651 76 94 · E-mail: eppendorf@eppendorf.es

Eppendorf® y el logo de Eppendorf son marcas registradas de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania. Todos los derechos reservados, incluidos gráficos e imágenes. Copyright © 2014 by Eppendorf AG.

SUMARIO

SEM@foro



Visite la página web
de la SEM:

www.sem microbiologia.org

Encontrará información
actualizada sobre
congresos, reuniones,
cursos y becas

**Socios protectores
de la SEM:**

Francisco Soria Melguizo, S.A.



Fundación Medina



Para solicitar más información,
inscripciones o publicidad,
diríjase a la Secretaría de la

**Sociedad Española
de Microbiología**

C/ Rodríguez San Pedro, 2
Planta 2ª – despacho 210
28015 Madrid

Tel. 91 561 33 81

secretaria.sem@sem microbiologia.org

Editorial

Microbiología *Semper sint in flore* por Ricardo Guerrero 03

Microbiología, femenino singular

Rebecca C. Lancefield (1895–1981) ordenadora de los estreptococos por Mercè Piqueras 06

Nuestros Grupos

Informes de los grupos especializados..... 12

Colección Española de Cultivos Tipo

¿Es mía mi cepa? 16

Microrreportajes

El Dr. Arturo Levicán recibe el premio a la mejor tesis doctoral sobre Microbiología
del Medio Acuático 18
La plataforma de divulgación científica ENCIENDE y la revista Chispas de la Ciencia..... 19

Congresos

X Reunión de Microbiología Molecular, Segovia 2014 21
XII Congreso Nacional de Micología, Bilbao 2014..... 23
XV Reunión de Taxonomía, Filogenia y Diversidad Microbiana, Alcalá de Henares, 2014 25
2ª Reunión de Docencia y Difusión de la Microbiología, Alicante 2014 28
XIX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos, Zaragoza 2014 30
X Congreso de Microbiología del Medio Acuático, Orihuela, 2014 34

Cursos

El Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología (EHU, Bilbao, 2014) 35

Microbiología y los medios

Ciudadano Ebola por Manuel Sánchez Angulo 38

Especial 2014, Año de la Biotecnología

Año de la Biotecnología por Fco. Javier Pastor Blasco 41
SOCIEDADES HERMANAS: Sociedad Española de Biotecnología..... 43
BIOSPAIN 2014, Santiago de Compostela, por Mª del Mar González Garcés 44
Biomasa y Biotecnología por José Luis García y María Jesús Martínez..... 45
Biotecnología Farmacéutica, asignatura optativa de «obligado conocimiento» Grado de Farmacia (UCM).... 48
Levaduras como fuente de enzimas de interés enológico por I. Belda et al. 55
¿De dónde diablos sale el ZMapp? por Víctor J. Cid..... 57

Especial MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

20 años del Grupo de Microbiología Molecular por Bruno González-Zorn 58
Mecanismos moleculares de patogénesis de la infección bacteriana respiratoria 59
Patogenicidad, diagnóstico y control de *Haemophilus parasuis* 62
Genómica evolutiva de bacterias simbiotes de insectos 64
Caracterización de aislados invasivos de neumococo y mecanismos moleculares de patogenicidad 67
Biología de patógenos bacterianos intracelulares 69
Grupo de genética de micobacterias..... 72
Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas..... 74
Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella*..... 77
Estudios moleculares de cepas invasivas de *Streptococcus agalactiae* (SGB) 78
Efectores de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella enterica* 80
Las GTPasas de la familia RHO y el crecimiento polarizado de las levaduras 82
Metagenómica y sistemática molecular de microorganismos halófilos 84
Estudio de los sistemas de *quorum sensing* en *Stenotrophomonas maltophilia*, implicación en la virulencia
y perspectivas en el diseño de fármacos antibacterianos..... 86
Ensamblajes Macromoleculares Microbianos Sintéticos..... 89
Biología Molecular de corinebacterias: *Corynebacterium glutamicum* como modelo..... 92
Bioestabilizadores de origen microbiano 95
Microbial Biochemistry and Pathogenesis Research Group..... 98
Grupo de Microbiología Clínica y Molecular 100
Grupo de Biología y Genética de la Pared Bacteriana: descubriendo la diversidad y plasticidad
del peptidoglicano de las bacterias..... 102
Caracterización molecular de pared celular de hongos para el desarrollo de nuevas
estrategias terapéuticas. Adhesinas en *Candida glabrata* 105
Interacciones huésped-parásito en infecciones neumocócicas 108
Estudio del **MICROBIOMA HUMANO EN SALUD Y ENFERMEDAD**..... 110
Grupo de Genómica Funcional de levaduras 113
Expresión génica en bacterias de interés medioambiental: de la degradación de contaminantes
a la biología de sistemas 116
Regulación génica en *Streptomyces*..... 119
Pequeños RNAs reguladores de cianobacterias. Adaptación a estrés nutricional y diferenciación celular 121
Desarrollo de un formato estabilizado de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular 124
Unidad de resistencia a antibióticos 127
Sistema de secreción tipo III en la interacción de *Pseudomonas syringae* con la planta 130
Grupo de biofilms bacterianos La vida en comunidad de las bacterias..... 133

Nuestra ciencia

Reseña de artículos científicos de nuestros socios 136

Tesis doctorales

Resúmenes de tesis doctorales..... 137

Carta al presidente

Andrés Vázquez-Torres (Universidad de Colorado) 139

www.sem microbiologia.org

Junta Directiva de la SEM

Presidente

Ricardo Guerrero Moreno

Institut d'Estudis Catalans.
C/ Carmen, 47. 08001 Barcelona. rguerrero@iec.cat

Presidente Electo

Antonio Ventosa Ucero

Dpto. Microbiología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Sevilla.
C/ Prof. García González, s/n. 41012 Sevilla. ventosa@us.es

Vice-Presidente

Francisco García del Portillo

Centro Nacional de Biotecnología. CSIC.
C/Darwin, 3. Campus Universidad Autónoma.
28049 Madrid. fgportillo@cnb.csic.es

Secretario

Juan Alfonso Ayala Serrano

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.
CSIC-Universidad Autónoma de Madrid.
C/ Nicolás Cabrera, 1. 28043 Madrid. jayala@cbm.uam.es

Tesorerera

Irma Marín Palma

Departamento de Biología Molecular.
Universidad Autónoma de Madrid.
Cantoblanco, 28049 Madrid. imarin@cbm.uam.es

Editores de publicaciones

International Microbiology

José Berenguer (Codirector - Madrid)

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.
Departamento de Biología Molecular.
CSIC-Universidad Autónoma de Madrid.
C/ Nicolás Cabrera, 1. 28043 Madrid.
jberenguer@cbm.uam.es

Ricardo Guerrero (Codirector - Barcelona)

Institut d'Estudis Catalans.
C/ Carmen, 47. 08001 Barcelona. rguerrero@iec.cat

SEM@foro

Víctor Jiménez Cid

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid. vicjid@ucm.es

NoticiaSEM

Emilia Quesada Arroquia

Departamento de Microbiología.
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
Campus de Cartuja. 18071 Granada. equesada@ugr.es

Directora de la Colección Española de Cultivos Tipo

Rosa Aznar Novella

Dpto. Microbiología y Ecología.
Facultad de Ciències Biològiques. Univ. de Valencia.
C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot, València.
rosa.aznar@uv.es

Responsable Cursos de Formación Continua on-line

Diego Alejandro Moreno Gómez

Dpto. de Ingeniería y Ciencia de los Materiales.
ETS Ingenieros Industriales.
Universidad Politécnica de Madrid.
José Gutiérrez Abascal, 2. E-28006 Madrid.

Vocales

M^a José Figueras Salvat

Unitat de Biologia i Microbiologia. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat Rovira i Virgili.
C/ Sant Llorenç, 21. E-43201 Reus
mariajose.figueras@urv.cat

Jesús López Romalde

Dpto. Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia, Univ. de Santiago de Compostela.
15706 Santiago de Compostela.
(A Coruña). mpromald@usc.es

Emilia Quesada Arroquia

Departamento de Microbiología.
Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
Campus de Cartuja, 18071 Granada. equesada@ugr.es

Joaquín Moreno Casco

Dpto. Biología Aplicada. E.P.S.
Universidad de Almería.
04120 La Cañada de San Urbano. Almería.
jcasco@ual.es

Diego A. Moreno Gómez

Dpto. de Ingeniería y Ciencia de los Materiales.
ETS Ingenieros Industriales.
Universidad Politécnica de Madrid.
José Gutiérrez Abascal, 2. E-28006 Madrid.

David Rodríguez Lázaro

Grupo Tecnología y Seguridad Alimentaria.
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.
Carretera de Burgos, Km.119. 47071 Valladolid.
ita-rodla@itacyl.es

Presidentes de Grupos

Biodeterioro y Biodegradación

Asunción de los Ríos Murillo

Instituto de Recursos Naturales.
Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC.
Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid.
arios@ccma.csic.es

Hongos Filamentosos y Levaduras (Micología)

Humberto Martín Brieve

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense.
Pza. Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid.
humberto@ucm.es

Biología de Microorganismos Patógenos

Ángel Domínguez Olavarri

Departamento de Microbiología y Genética.
Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca.
ado@usal.es

Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Francisco Javier Pastor Blasco

Dpto. Microbiología.
Facultad de Biología. Univ. de Barcelona.
Avda. Diagonal 645. 08028 Barcelona.
fpastor@ub.edu

Microbiología de los Alimentos

Francisco Javier Carballo García

Área de Tecnología de los Alimentos.
Facultad de Ciencias de Ourense.
Campus Universitario, s/n. Universidad de Vigo. 32004 Vigo.
carbateg@uvigo.es

Microbiología Molecular

Bruno González Zorn

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET).
Universidad Complutense.
Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid.
bgzorn@ucm.es

Microbiología del Medio Acuático

Juan José Borrego García

Dpto. Microbiología. Facultad de Ciencias.
Campus de Teatinos. Universidad de Málaga.
29071 Málaga.
jjborrego@uma.es

Microbiología de Plantas

Antonio de Vicente Moreno

Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias. IHSM-UMA-CSIC.
Campus de Teatinos. Universidad de Málaga.
29071 Málaga.
adevicente@uma.es

Protistología

Ana Martín González

Dpto. Microbiología III. Facultad de Biología.
Universidad Complutense.
C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.
anamarti@bio.ucm.es

Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad

Antonio Ventosa Ucero

Dpto. Microbiología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Sevilla.
C/ Prof. García González, s/n
41012 Sevilla.
ventosa@us.es

Docencia y Difusión de la Microbiología

Montserrat Llagostera Casas

Dpto. de Genética i de Microbiologia.
Universitat Autònoma de Barcelona.
Cerdanyola del Vallès. 08193 Barcelona.
Montserrat.llagostera@uab.cat

Imagen de portada

Colonia de *Streptomyces coelicolor*
Cedida por Ramón Santamaría
(CSIC/Universidad de Salamanca).

SEM@foro es una publicación semestral de la **Sociedad Española de Microbiología (SEM)**

Director: **Víctor Jiménez Cid**. E-mail: **vicjid@ucm.es**.

Co-editores de la sección especial Microbiología Molecular: **Bruno González Zorn**.

Co-editor de la sección «Año de la Biotecnología»: **F. Javier Pastor Blasco**

Webmaster de la SEM: **Jordi Urmeneta Masó**. E-mail: **jurmeneta@ub.edu**. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal, 645. E-08028 Barcelona.

La SEM y el Director no comparten necesariamente las opiniones que puedan aparecer en artículos, informaciones o cartas enviados por los socios, ni se responsabilizan de su veracidad.

ISSN: 2254-4399

Depósito Legal: M-12838-2013

Maquetación e Impresión: **Diseño y Control Gráfico, S.L.** Tel.: 91 731 05 13.

E-mail: **info.dcg@design2aa.com** • **www.design-2aa.com**

www.semicrobiologia.org/sec/SEMaFORO

Microbiología

Semper sint in flore

Ricardo Guerrero

Presidente de la SEM

Cuando Johannes Brahms (1833–1897) recibió el doctorado Honoris Causa de la Universidad de Breslau (ahora Wrocław), escribió, como muestra de agradecimiento, la *Obertura para una fiesta académica*, que él mismo dirigió en esa bella ciudad de la Baja Silesia en enero de 1881. La *Obertura* acaba con un sonoro y alegre recuerdo de una antigua canción universitaria festiva en latín, *Gaudeamus igitur*. Esta canción tiene muchas estrofas, de las cuales solemos cantar las cuatro primeras. La cuarta es, como todo lector recordará, «Vivat Academia, / vivant professores. / Vivat membrum quodlibet, / vivant membra quaelibet, / semper sint in flore.» El himno universitario por excelencia acaba con esas cuatro palabras; por fortuna, ya que la estrofa inmediatamente siguiente empieza diciendo «Vivant omnes virgines, / faciles, formosae,» / (etc., etc., etc.). Este canto ritual es ahora una *koiné* intelectual que liga el pensamiento contemporáneo, y pretende mostrar la excelencia científica y humanística que tiene, o debería tener, la universidad de cada país.

Uno de los principales pilares que han constituido la esencia y búsqueda de la alta calidad intelectual, en cada ámbito concreto del conocimiento, han sido las sociedades científicas. Las sociedades científicas han sido durante décadas o centurias las entidades responsables del progreso intelectual en su campo de saber específico. Y eso en tres aspectos: en la investigación (observación, desarrollo, descubrimiento), en la financiación (es decir, en la captación y distribución de los recursos económicos, que se conseguían y gastaban a través de la sociedad) y, finalmente, en la difusión del conocimiento (generalmente mediante unas publicaciones propias, que tenían un gran prestigio). La realidad actual es bien diferente. La investigación se ha profesionalizado y se lleva a cabo en las universidades y centros de investigación. El dinero lo distribuyen los políticos, a veces hasta con cierto criterio y acierto. ¿Y la difusión?

La mayoría de las sociedades científicas tienen o han tenido una o más publicaciones. Además, actualmente casi todas editan un boletín interno donde dan cuenta de sus actividades, consecuciones y objetivos. Pero las publicaciones que suelen dar prestigio internacional a una sociedad

son las que difunden trabajos de investigación primaria y revisiones originales, y que aplican rigurosamente la evaluación por expertos (*peer review*). No obstante, el hecho de que actualmente alguien publique en una revista de la sociedad correspondiente, sobre todo si es española, condena al pobre autor a ser aún más pobre, por ausencia de recursos externos. ¿Cuántas veces hemos oído decir, incluso a alguna autoridad de la SEM, hablando de su propia revista: «es una revista española y, por tanto, mala»?

Es un criterio que no comparten las multinacionales extranjeras, que compran las revistas de sociedades científicas españolas —y por tanto «malas»— y empiezan a hacer negocio con ellas. Primero, cubriendo con exceso todos los gastos a lomos de la propia sociedad, que, lógicamente, quiere prestigiarse y aparecer con el mejor factor de impacto posible. Después, a través de unos cobros millonarios por «suscripciones múltiples» pagados por universidades, centros de investigación y organismos responsables de la investigación. Más tarde, mediante las suscripciones de revistas concretas a cargo de algunos centros e instituciones. Y, finalmente, por las carísimas «bajadas» de artículos que necesitan los investigadores, cuyo monto total nadie ha revelado

todavía. Además, por si fuera poco, tienen y retienen los derechos de autor.

Las principales revistas científicas del mundo están ahora en manos de unas pocas macroeditoriales comerciales,

que han ido absorbiendo empresas procedentes de la fusión de editoriales pequeñas. Para muchas editoriales comerciales internacionales la publicación de revistas científicas es ahora la principal base de su negocio; hasta de un 42 % (!) de aumento anual, en algún caso. ¿Vamos a continuar con el sistema? ¿Por qué no utilizamos los enormes recursos digitales de que disponemos para difundir el conocimiento de nuestra especialidad de manera inmediata, universal y gratuita? ¿No somos los científicos quienes sabemos qué hay que decir y cómo podemos hacerlo? Evidentemente, hay muchos tipos y prestigios de revistas. Hay revistas internacionales, y nacionales, que son adalides en su campo y prestigan a quienes publican en ellas. Y deben seguir existiendo. Muchas de ellas cuentan con el sistema de acceso libre (*Open Access*), para

Uno de los principales pilares que han constituido la esencia y búsqueda de la alta calidad intelectual han sido las sociedades científicas

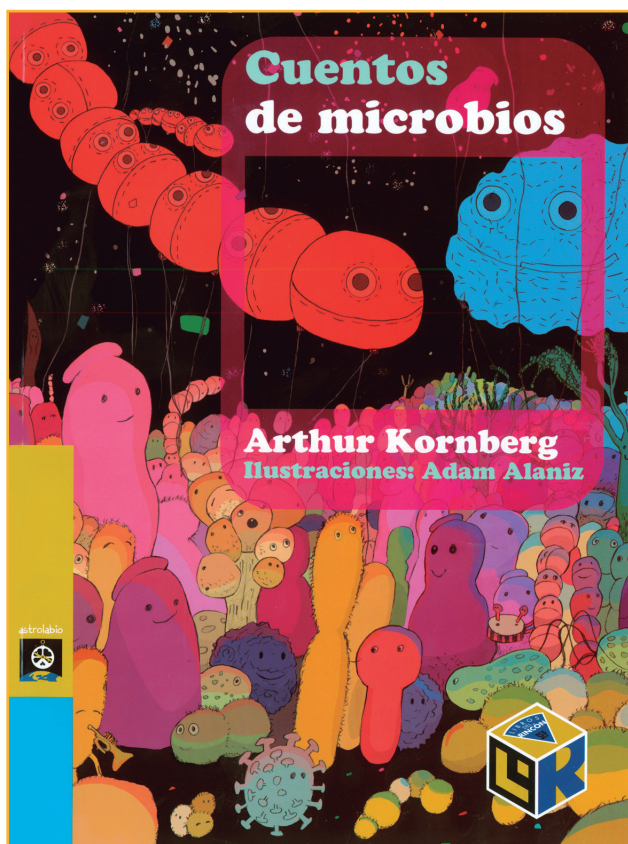


Figura 1. Portada de la edición mexicana de *Cuentos de Microbios*, de Arthur Kornberg. La edición es más sencilla que la española, con un tamaño más pequeño (27 × 20 cm, en vez de los 31 × 24 cm originales), con objeto de abaratar los costes de edición y transporte. La tirada ha sido de 20.000 ejemplares. (Dibujo de M. Berlanga y Ed. Reverte)

lo cual el autor paga a través de su proyecto de investigación, pero siempre mucho menos de lo que les cuesta a las instituciones el derecho a consultar la plétora de revistas comerciales que les obligan a «escoger». Es una lucha que dentro de algunos años se decantará por el modelo del acceso libre (tal como indica la actual *Ley de la Ciencia*, de 2011), y en el cual, de una manera vergonzante, están entrando ahora de tapadillo muchas editoriales multinacionales.

Una sociedad científica puede y debe publicar libros y revistas, sea en el formato actual que sea. La SEM, a lo largo de su ya larga historia (fue fundada en 1946, cuando la inmensa mayoría de los actuales socios ni siquiera eran

Una sociedad científica puede y debe publicar libros y revistas

«a twinkle in their father's eye»), ha publicado diversos e importantes libros. Ahora, no es necesario imprimirlos, pero no debemos perder esa malsana costumbre, cuando sea apropiado. Uno de los más recientes ha sido la traducción de *Cuentos de microbios*, de Arthur Kornberg, de Editorial

Reverte. Además de la edición española, en 2012 se ha hecho una edición no venal en México, destinada a las escuelas primarias de ese inmenso país. La tirada inicial ha sido de 20.000 (!) ejemplares (Figura 1).

La producción de un «libro» es independiente del formato que tenga. Lo importante es el contenido; el concepto o mensaje que el autor o autores quieren transmitir al lector. Por ello, la lengua que se utiliza debe ser impecable. Se ha puesto de moda en algunas escuelas la llamada ortografía natural, a veces para excusar la ignorancia de algunos enseñantes. Esas dos palabras, «ortografía natural», son un oximorón. La ortografía, la lengua, es un producto de la cultura, que es una cosa «artificial», y respetarlas nos une con los otros lectores y nos permite transmitir el mensaje sin ambigüedades.

El gran descubrimiento de la escritura moderna es la utilización de letras, de sonidos, en vez de ideogramas. Utilizando unas pocas letras podemos construir sílabas que unidas, también en pequeño número, expresan miles de palabras, conocidas o por inventar, como es el caso de los neologismos científicos, a cuyo uso y crecimiento la microbiología contribuye generosa y denodadamente. Solemos recordar el origen de nuestros alfabetos modernos, las tres primeras letras del alfabeto fenicio, padre del griego, que corresponden a los símbolos de «vaca», alef, «casa», bet, y «camello», gamel. Pero dos siglos antes, un poco más al norte en la costa de Asia Menor, en Ugarit, ya se utilizaba una ortografía «alfabética», pero basada en los símbolos cuneiformes anteriores (Figura 2). Distinto vehículo, igual objetivo. Como ahora, con los distintos y siempre crecientes formatos digitales.

Éste es el último editorial que escribe para la SEM este sufrido «editorialista aficionado». Después de ocho años, la SEM ha cambiado mucho, como le corresponde a todo organismo vivo y activo. Pero siempre ha conservado el espíritu que unió a los fundadores, hace casi setenta: convocar a científicos, profesionales y docentes que tienen



Figura 2. Tablilla de Ugarit, Siria, con el alfabeto más antiguo conocido (1400 aC). Es anterior al alfabeto fenicio, que dio origen al griego, y éste al latino. La tablilla, que estaba en el Museo de Damasco, tiene unos 4 × 10 cm. La inscripción se lee de derecha a izquierda, y de arriba a abajo. Cada grupo de símbolos es un ideograma (cuneiforme) que originalmente representaba una cosa, pero que aquí solo tiene valor fonético; es decir, indica el sonido por el cual debe empezar cada palabra. La combinación de sonidos (de sílabas) forma nuevas palabras y constituye la base de nuestro actual sistema alfabético de escritura, con un número ilimitado de combinaciones posibles a partir de únicamente de veinte a treinta signos (las «letras» del alfabeto). (Foto: M. Berlanga).

unos intereses y objetivos comunes, trabajar para el mejor conocimiento, uso y mejora de esos organismos que nos precedieron en la Tierra, y que continuarán en ella cuando nuestra especie haya desaparecido de su faz: los microbios.

La microbiología, en sus inicios, era una tecnología que intentaba dominar el principal azote de la especie humana: las enfermedades infecciosas. Sin embargo, la microbiología es desde hace décadas una ciencia que estudia la fisiología, ecogenética y taxonomía del inmenso mundo microbiano, pero que también sirve para comprender el origen y la evolución de la vida a partir de su componente esencial, la célula procariota. Hoy, sabemos que los microbios llevan a cabo funciones esenciales en el mantenimiento de la vida sobre la Tierra. La especie humana, como los demás «macrobios», depende de las actividades del invisible mundo microbiano.

El microbioma (conjunto de información genética de la microbiota de un hospedador eucariota) es esencial para los procesos de evolución (filogenia) y desarrollo individual (ontogenia) de los animales, plantas y hongos. La gran variedad metabólica y ecológica del mundo microbiano representa un recurso amplio e inexplorado de biodiversidad de enorme valor para el futuro. El minúsculo tamaño de sus miembros no nos deja ver su papel esencial en la biosfera y su enorme capacidad para adaptarse a los cambios del ambiente. Igual que ocurrió con Arthur Kornberg (1918–2007; premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1959, junto con Severo Ochoa), que contaba «historias de

microbios» a sus tres hijos (el mayor, Roger, fue premio Nobel de Química en 2006), y a sus ocho nietos, podemos imaginarnos a un «abuelo» bacteriano, contándoles «historias de humanos» a sus «nietos», y explicándoles lo que hacen esos extraños seres que llamamos microbiólogos, que sacrifican fortuna, tiempo y muchas veces relaciones familiares en pos de un mejor conocimiento de su diminuto y arcano mundo (Figura 3).

La microbiología, el «estudio de los microbios», es una de las ciencias más jóvenes. Desde los primeros descubrimientos de Pasteur, no llega a los 150 años. Pero ya ha tenido diversas etapas, que han marcado pasos de gigante en el conocimiento, el uso y el control de los microorganismos. La primera etapa, o la

Primera Edad de Oro de la Microbiología, fue la de los grandes descubrimientos sobre la etiología de las enfermedades infecciosas, de finales del siglo XIX y principios del XX. La Segunda, las décadas de los cuarenta a sesenta del siglo XX, con el descubrimiento de los antibióticos y el desarrollo de la biología molecular. La Tercera, la de la genómica, entre la década de los noventa y primera década del siglo XXI actual. Gracias a los grandes descubrimientos sobre la omnipresencia de los microorganismos en todos los hábitats, y los análisis de su enorme e inesperada diversidad, podemos decir que estamos entrando en la Cuarta Edad de Oro, en la cual no se puede entender el mundo en que vivimos, nuestro cuerpo y toda la evolución biológica, sino a través del conocimiento que nos aportan los microorganismos.

**La especie humana, como los demás
«macrobios», depende de las actividades
del invisible mundo microbiano**

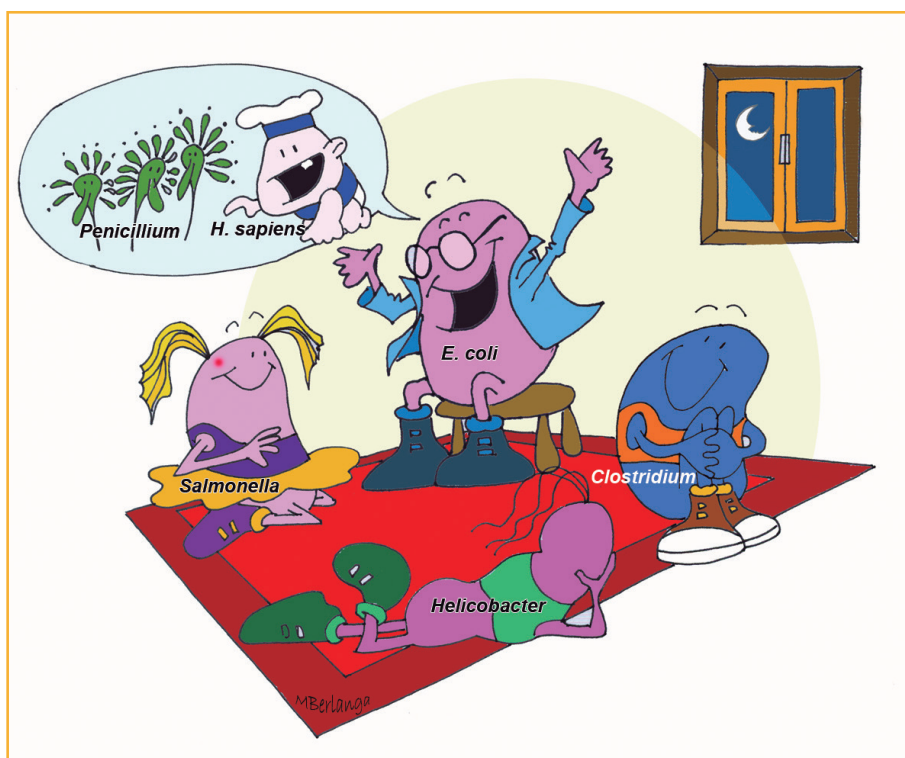


Figura 3. El libro *Cuentos de microbios* es eso, un libro de «cuentos». Y en los cuentos se describen cosas imaginadas como si fueran reales. En los cuentos, hablan los animales y las plantas. ¿Por qué no pueden hablar también los microbios? ¿Por qué no podría un abuelo microbiano contar cuentos de humanos a sus nietos? (Dibujo de M. Berlanga y Ed. Reverte).

Rebecca C. Lancefield

(1895–1981)

ordenadora de los estreptococos

Mercè Piqueras

International Microbiology, Associate Editor

mpiqueras@microbios.org

LOS ESTREPTOCOCOS, UN GRUPO HETEROGÉNEO

«La importancia del problema de la clasificación sistemática de las bacterias para el conocimiento adecuado y el control de las enfermedades infecciosas es cada vez más evidente. Dicho estudio es necesario no solo para esclarecer la relación biológica que existe entre variedades de la misma especie de una bacteria, sino también para resolver problemas epidemiológicos y para desarrollar el conocimiento útil en el esfuerzo para controlar las enfermedades infecciosas mediante medidas profilácticas y terapéuticas específicas.» Así empieza el primer artículo que Rebecca Craighill Lancefield (1895-1981, [Figura 1](#)) dedicó al estudio de los estreptococos ([Figura 2](#)), publicado en 1919 en la revista *Journal of Experimental Medicine*. Por entonces no se sabía cuántos tipos de estreptococos había, ni cuáles eran peligrosos agentes infecciosos, o cómo actuaban en el cuerpo humano. Tampoco se había demostrado la relación que existía entre la infección estreptocócica y la fiebre reumática, aunque ya se tenían indicios de que los estreptococos podían ser una de las causas de la enfermedad.

Cuando, en 1936, empezaron aplicarse los primeros antibióticos, un colega preguntó a Lancefield a qué iba a dedicarse a partir de entonces. Ella llevaba casi veinte años estudiando los estreptococos y había logrado poner orden en unos microorganismos patógenos de gran variabilidad antigénica. Su investigación permitió avanzar enormemente en el tratamiento de las enfermedades que causan esas bacterias grampositivas, entre ellas la fiebre reumática. Respondió al bromista que, gracias a los antibióticos, podría dedicar más tiempo a estudiar la conexión entre los estreptococos del grupo A y la fiebre reumática. Al igual que el colega de Lancefield, muchas personas creyeron que los antibióticos terminarían en unas décadas con las enfermedades infeccio-



Figura 1. Rebecca C. Lancefield (1895–1981).

sas. (Una «leyenda urbana» incluso atribuye a un director general de salud pública de los Estados Unidos —William H. Stewart, 1921-2008, *Surgeon General* de los años 1965 a 1969— haber afirmado que se podía declarar ganada la guerra contra las infecciones.) Sin embargo, esto no ha sido así, y la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un grave problema a escala mundial.

RELACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE LANCEFIELD Y LAS PRINCIPALES ESPECIES DE ESTREPTOCOCOS

Grupo de Lancefield	Especies de interés
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>
B	<i>S. agalactiae</i>
C	<i>S. equi</i> , <i>S. dysgalactiae</i>
D	<i>Enterococcus</i> spp., <i>S. bovis</i> (<i>S. equinus</i> , <i>S. gallolyticus</i> , <i>S. pasteurianus</i> , <i>S. infantarius</i>)
E	<i>S. porcinus</i> *
F	<i>S. anginosus</i> **, <i>S. constellatus</i> **
G	<i>S. canis</i>
R	<i>S. suis</i> ***
No tipables	<i>S. pneumoniae</i> (neumococo), estreptococos "viridans" orales (<i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> ...)

(*) Aislamientos de esta especie pertenecen también a los grupos P, U y V.

(**) Aislamientos de estas especies pertenecen también a los grupos C, A y G.

(***) Aislamientos de esta especie pertenecen también a los grupos S y T.

En cuanto a la fiebre reumática, a cuyo estudio dedicó Lancefield muchos esfuerzos, especialmente a la forma que afecta al corazón (cardiopatía reumática), aunque su incidencia mundial ha disminuido mucho, sigue siendo un azote en los países en vías de desarrollo, sobretodo en los más pobres. De los 12 millones de personas que la padecen, unas dos terceras partes tienen entre cinco y quince años de edad y anualmente se producen unas 300.000 muertes a causa de esa enfermedad. En los países industrializados, en cambio, prácticamente ha desaparecido. La investigación sobre los grupos serológicos del estreptococo y la clasificación que hizo Lancefield sentaron las bases para una mejor comprensión de esta enfermedad y para poder desarrollar métodos de prevención y de tratamiento de la infección.

PRIMEROS AÑOS Y FORMACIÓN ACADÉMICA

Rebecca C. Lancefield (de soltera Rebecca Craighill) nació el 5 de enero de 1895 en el Fuerte Wadsworth, en Staten Island, un distrito de la ciudad de Nueva York. Allí estaba destinado su padre, William Eduard Craighill, coronel del cuerpo de ingenieros del ejército de los Estados Unidos formado en West Point. Debido a la profesión del padre, con destinos diferentes en su carrera militar, Rebecca y sus cinco hermanas, menores que ella, tuvieron que cambiar de escuela con frecuencia, e incluso durante alguna temporada recibieron la formación escolar en casa. De todos modos, su madre, Mary Wortley Craighill, creía en la necesidad de la educación de la mujer y siempre animó a sus hijas a estudiar. Además de Rebecca, su hermana Margaret también obtuvo un título universitario y se dedicó luego con éxito a

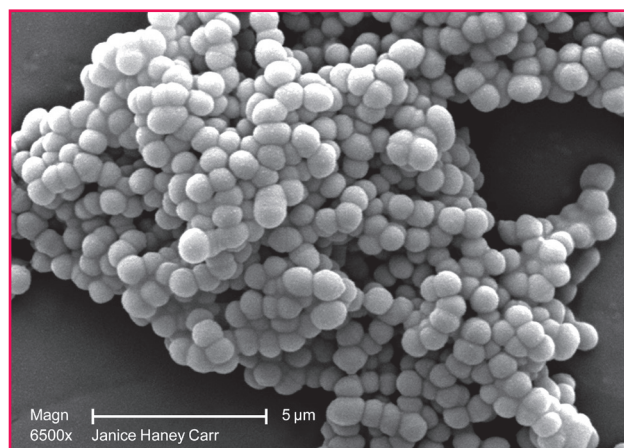


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de un grupo de estreptococos (*Streptococcus* sp.) beta-hemolíticos. (Fotografía de Janice Haney Carr; Public Health Image Library, CDC, dominio público).

la medicina. Rebecca empezó sus estudios universitarios en Wellesley College, una universidad privada femenina (una de las *Seven Sisters*), cerca de Boston, que ya entonces gozaba de gran prestigio. Su intención era especializarse en inglés y francés, pero su compañera de habitación estudiaba zoología y entonces se dio cuenta de que prefería la ciencia a las lenguas y la filología. Gracias a la flexibilidad en las asignaturas que permiten las universidades estadounidenses, se matriculó de zoología y de otras asignaturas de biología. Entre ellas se encontraba el único curso de bacteriología que ofrecía aquel centro. Los dos últimos años estudió también química.

En 1916, cuando Rebecca se graduó en Wellesley College, su padre había fallecido y ella tuvo que ponerse a trabajar en seguida para ayudar económicamente a su madre y hermanas menores. Entró como profesora en un pensionado femenino en Burlington (Vermont), donde dio clases de matemáticas y ciencias. El salario era muy bueno y aunque enviaba dinero a su madre, aún pudo ahorrar para continuar más adelante sus estudios como postgraduada. Con los ahorros que reunió y una beca que le ofrecieron como hija de oficial del ejército, se matriculó en la Columbia University, de Nueva York.

REBECCA, JOVEN GRADUADA

En 1917 entró en el Departamento de Bacteriología de Columbia University, que dirigía Hans Zinsser (1878-1940), bacteriólogo e inmunólogo que gozaba ya de gran prestigio. Él se encontraba entonces en Francia, como oficial médico del ejército estadounidense en la Primera Guerra Mundial. En su ausencia, dirigía el departamento Arnold Kent Balls (1891-1966), que exigía tanta dedicación a los alumnos como su jefe. Además de asistir a clase, Rebecca pasaba muchas horas en el laboratorio del Hospital Presbiteriano, ocupada en la tipificación de neumococos a partir de muestras de pacientes.

Mientras realizaba el máster conoció a Donald Elwood Lancefield (1893-1981), joven zoólogo que realizaba un máster de genética en la misma universidad, en el laboratorio de Thomas Hunt Morgan (1866-1945, premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1933 por sus descubrimientos sobre el papel de los cromosomas en la herencia biológica) y al poco tiempo se casaron. La guerra continuaba y Donald fue llamado a filas. Al principio, en una unidad del cuerpo de sanidad, donde asistió a un curso especial en el Instituto Rockefeller de Investigación Médica (más conocido simplemente como Instituto Rockefeller), que fue el primer instituto de investigación biomédica de los Estados Unidos, creado en 1901 siguiendo el modelo del Instituto Pasteur (fundado en 1887 en París) y del Real Instituto Prusiano de Enfermedades Infecciosas (fundado en 1891 en Berlín, y que desde el principio fue conocido como Instituto Robert Koch). Entre los organizadores del curso para los médicos del ejército se encontraban Alphonse R. Dochez (1877-1955) y Oswald T. Avery (1882-1964). Estos dos investigadores, que habían ofrecido sus servicios al ejército para estudiar los estreptococos aislados de soldados afectados por bronconeumonía, habían regresado de una expedición a Texas, donde visitaron campamentos militares por encargo del *Surgeon General*. Durante el invierno de 1917-1918 había aumentado mucho la incidencia de un tipo de bronconeumonía poco frecuente, secuela del sarampión. Primero se extendió entre los soldados de un acantonamiento, pero durante la primavera de 1918 se dieron casos también en la población civil. Dochez y Avery regresaron de Texas con más de un centenar de muestras de estreptococos para analizar.

Se dio la coincidencia de que a Rebecca, que había terminado el máster en Columbia University, y que en junio de 1918 (la guerra acabó el 11 de noviembre de ese año) había solicitado un puesto de trabajo en el Instituto Rockefeller, le ofrecieron una plaza de técnica en el estudio de aquellos estreptococos. Hasta entonces, la clasificación de los estreptococos se basaba en su comportamiento frente a las células sanguíneas y se consideraba que todas las cepas que lisaban los hematíes formaban un solo tipo, los estreptococos hemolíticos. Sin embargo, a partir de las muestras de Dochez y Avery, y mediante pruebas inmunológicas, comprobaron que el 68% pertenecía a cuatro grupos específicos y el 32% restante quedó de momento sin clasificar. En el extenso artículo de 1919 en el que Dochez, Avery y Lancefield publicaron los primeros resultados de aquel estudio (Figura 3) ya indicaban que el trabajo proseguía y estaban encontrando nuevos tipos serológicos entre las muestras no clasificadas. Aunque Lancefield había sido contratada para trabajar como técnica de laboratorio, Dochez y Avery quisieron que fuese coautora del artículo en reconocimiento a su valiosa contribución en aquella investigación.

Aquel primer trabajo de Lancefield sobre los estreptococos estaba financiado directamente por la Dirección General de Salud Pública, y era un encargo del *Surgeon General*. En 1919, al agotarse los fondos recibidos, el estudio se interrumpió, y Avery y Dochez se centraron de nuevo en la investigación del neumococo, que era en lo que estaban trabajando antes de la guerra. Ella pasó el verano con su

STUDIES ON THE BIOLOGY OF STREPTOCOCCUS.

I. ANTIGENIC RELATIONSHIPS BETWEEN STRAINS OF STREPTOCOCCUS HÆMOLYTICUS.

By A. R. DOCHEZ, M.D., O. T. AVERY, M.D., AND R. C. LANCEFIELD.

(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research.)

(Received for publication, June 1, 1919.)

The importance of the problem of the systematic classification of bacteria for the proper understanding and control of infectious diseases is becoming increasingly evident. Such study is necessary not only in the elucidation of the biological relationship existing between varieties of the same species of bacterium, but is also essential to the working out of epidemiological problems and to the development of knowledge useful in the effort to control infectious diseases by means of specific therapeutic and prophylactic measures. Bacteria closely resembling those responsible for the pathological process in many acute infections have been found to be present and to live, apparently without harm to the host, on the mucous membranes of a large proportion of normal individuals. The resemblance of the pathogenic to the harmless variety of microorganism is frequently so close that in many instances tests of particular specificity are required to show the existing biological differences. In fact, the problem in etiology today is to determine not only the bacterial species causing a given disease, but in addition the number of varieties of the same species that are pathogenic, and whether common and important non-pathogenic varieties exist. The study is one of varying complexity, and methods suitable to one species do not give the desired information when applied to another.

The purpose of such studies may be broadly defined as an effort to relate fixed and determinable characteristics of bacteria to pathogenicity. Though fluctuating variations of bacteria probably occur, it seems not unlikely that in most diseases a sufficiently constant equilibrium has been attained to justify the usefulness of the effort. The

179

Figura 3. Primer artículo de Rebecca C. Lancefield sobre los estreptococos.

marido en Woods Hole, en el Laboratorio de Biología Marina, con el grupo de zoología de Columbia University. Fue el primero de los muchos veranos que los Lancefield pasarían en Woods Hole (Figura 4) con su familia y disfrutando del ambiente del aquel centro de investigación que en la actualidad sigue reuniendo cada verano a grandes científicos en sus laboratorios y aulas. A su regreso a Nueva York, Rebecca entró como ayudante de investigación de Charles W. Metz en el laboratorio de genética de Morgan. Durante dos años realizó estudios citológicos y genéticos en *Drosophila willistoni* y junto con Metz publicó tres artículos con los resultados de aquel trabajo.

Cuando Donald Lancefield terminó la tesis doctoral se le presentó la oportunidad de trabajar como profesor de zoología en la Universidad de Oregón, el estado donde su madre había llegado a los diez años con su familia en una caravana, y él lo aceptó en seguida. Rebecca consiguió también trabajar en la misma universidad dando clases de bacteriología. Sin embargo, fue una estancia corta. Al terminar el curso 1921-1922 regresaron a Nueva York, donde él se reincorporó al departamento de Morgan y Rebecca al de Zinsser para trabajar en su propia tesis doctoral. A pesar de que Zinsser no era muy partidario de tener mujeres en el laboratorio, estaba al corriente del trabajo metódico que ella había realizado anteriormente y la aceptó.



Figura 4. Rebecca (centro) y Donald Lancefield con la Sra. Huettnner (izquierda) en Woods Hole, 1918 (Archivos del Laboratorio de Biología Marina de Woods Hole, licencia Creative Commons 3.0).

Además —quizás para verla menos por el laboratorio— le aconsejó que solicitase una plaza que había disponible en el laboratorio de Homer Swift, en el Hospital del Instituto Rockefeller. Swift empezaba entonces a investigar sobre la fiebre reumática, enfermedad que desde principio de siglo se asociaba a una infección estreptocócica y necesitaba un investigador para el proyecto. Así fue cómo Rebecca entró a trabajar en el centro donde permanecería hasta su jubilación y aun más allá. Donald estuvo muchos años en el Departamento de Zoología de Columbia University y luego se trasladó a Queens College, la joven universidad de la ciudad de Nueva York, inaugurada en 1937 en el distrito de Queens.

FALSA SOSPECHA

En 1914, Homer Swift había empezado a investigar sobre la fiebre reumática y su posible origen en una infección por estreptococos. Su movilización con motivo de la primera guerra mundial interrumpió su trabajo en el Instituto Rockefeller, que no pudo reanudar hasta 1919. Durante varios años le fue imposible recuperar ninguna bacteria específica de las muestras de pacientes afectados de aquella enfermedad, ni pudo reproducir la enfermedad en animales a los que inyectó con organismos obtenidos en medios de cultivo inoculados con las muestras. Como médico clínico, en muchos casos había realizado el seguimiento de los pacientes, registrando los síntomas meticulosamente. Él y su equipo médico se interesaron también por las complicaciones cardíacas de la fiebre reumática y observaron que, en las personas jóvenes, el 90% de cardiopatías tenían su origen en una endocarditis asociada a la fiebre reumática. Por ello, establecieron la necesidad de

un seguimiento cuidadoso y prolongado de los pacientes para evitar un empeoramiento y recaídas.

Cuando Lancefield empezó a trabajar con Swift, el estreptococo «sospechoso» de causar la fiebre reumática era *Streptococcus viridans*. Por eso, y al mismo tiempo que ella preparaba su tesis con Zinsser, durante dos años intentó obtener un antígeno de *S. viridans* que reaccionase de manera específica con suero de pacientes afectados, para poder disponer de una prueba diagnóstica fiable. Sin embargo, todo su empeño fue en vano y llegó a la conclusión que dicha especie no era la causante de la fiebre reumática. De todos modos, el trabajo realizado con *S. viridans* le fue útil para su tesis y en 1925 obtuvo el doctorado en Columbia University. A partir de entonces trabajó exclusivamente en el Instituto Rockefeller, donde retomó la investigación de los estreptococos hemolíticos que había realizado con Dochez y Avery. Ellos, en un laboratorio en el mismo piso, habían vuelto al estudio de los neumococos y analizaban los polisacáridos de su pared celular.

CLASIFICAR PARA CONOCER

El método usado para el estudio de los estreptococos era el análisis serológico, que Dochez y Avery utilizaban desde hacía años para clasificar los diferentes tipos de neumococos. Para Lancefield, el análisis serológico de los estreptococos, que formaban un grupo muy extenso, era un paso esencial para poder determinar la naturaleza química de los antígenos y comprender su papel en el desarrollo de la infección. Los serotipos se identificaban mediante anticuerpos que se combinan solo con los antígenos específicos para cada serotipo. En su análisis de los estreptococos hemolíticos, Lancefield encontró dos antígenos en forma

soluble; uno era específico de tipo, es decir, servía para clasificar las cepas en serotipos, y el otro estaba presente en todas las cepas, lo que se conoce como antígeno específico de especie. Cuando analizó el antígeno específico de tipo esperaba encontrarse con algo parecido a lo que ocurre en los neumococos y algunas otras bacterias patógenas, en las que dicho antígeno es un polisacárido de la cápsula bacteriana. Sin embargo el que ella aisló era una proteína, que luego denominó proteína M, que parecía tener la misma función como factor de virulencia que la del polisacárido en el neumococo. En cambio, el antígeno específico de especie sí que era un polisacárido al que llamó carbohidrato C.

Mediante el análisis de las proteínas M y T, Lancefield también estableció los serotipos dentro de cada grupo y descubrió que la proteína M protegía a las bacterias del ataque de los glóbulos blancos. En 1928 publicó una serie de artículos en la revista *Journal of Experimental Medicine* que eran un compendio del trabajo realizado en los años precedentes, con la descripción detallada de la proteína M y el carbohidrato C. Actualmente, los estreptococos beta-hemolíticos se clasifican en varias especies e incluso géneros diferentes.

A medida que sus estudios avanzaban con el análisis de más cepas de orígenes distintos se dio cuenta de que lo que ella había considerado un antígeno específico de especie era en realidad específico de grupo. En un artículo publicado en 1933 en *The Journal of Experimental Medicine* y citado numerosísimas veces, Lancefield describió el laborioso estudio de clasificación serológica que realizó con 106 cepas de estreptococos hemolíticos aislados de personas enfermas, de otros animales, y de leche y queso. Las cepas procedentes de infecciones humanas tenían un carbohidrato común, pero encontró carbohidratos diferentes en cepas que procedían de infecciones de otros animales. Eso significaba que en la naturaleza había varios grupos serológicos de estreptococos hemolíticos. A las cepas humanas en las que halló el carbohidrato C las denominó grupo A, y a las siguientes fue dándoles las letras del alfabeto a medida que las iba encontrando. Así, el grupo B esta formado por cepas aisladas de vacas y de leche; el grupo C, de cerdos y algunos otros animales; el grupo D, de varios productos lácteos y queso, etc. La American Society for Microbiology incluye este trabajo de Lancefield y sus descubrimientos entre los principales acontecimientos de la historia de la microbiología.

Al otro lado del Atlántico, el microbiólogo británico Frederick Griffith (1877-1941), descubridor del fenómeno de la transformación genética, también trabajó en la clasificación de los estreptococos en grupos serológicos. Durante unos años, Griffith y Lancefield intercambiaron información y cepas y muestras de suero, comprobando que los tipos encontrados por ambos coincidían en gran parte. Para evitar duplicidades en la clasificación, Lancefield adoptó la numeración que Griffith asignó a sus serotipos. Fue una colaboración muy valiosa que se interrumpió súbitamente cuando Griffith murió, en Londres, víctima de un bombardeo alemán durante la Segunda Guerra Mundial.

Los investigadores que estudiaban la fiebre reumática constataron la especificidad de tipo de los estreptococos

que aislaban en ataques recurrentes de fiebre reumática y llegaron a la conclusión que cada nuevo ataque estaba causado por una cepa diferente. Sin embargo, cuando se empezaron a aplicar los antibióticos, se vio que cepas de un mismo tipo podían causar una nueva infección porque el antibiótico, al eliminar el estreptococo en una fase inicial de la infección, frenaba la producción de anticuerpos. Los estudios de Lancefield sobre la proteína M fueron la base para un mejor conocimiento de aquella enfermedad y su epidemiología.

MADUREZ

Cuando los Estados Unidos entraron en la Segunda Guerra Mundial, el Gobierno pidió de nuevo la colaboración de los investigadores del Instituto Rockefeller. Lancefield fue nombrada miembro civil de la Oficina de Investigación Científica y Desarrollo y asesora del Comité de Epidemiología de las Fuerzas Armadas en la Comisión de Enfermedades Estreptocócicas y Estafilocócicas (esta última Comisión se mantuvo hasta 1972; tras su disolución, sus miembros siguieron reuniéndose y adoptaron el nombre de «Sociedad Lancefield»). Durante la guerra, Lancefield trabajó identificando las cepas de estreptococos que le enviaban y preparando antisueros que iban destinados a los laboratorios militares. Luego siguió recibiendo cepas procedentes de investigadores de todo el mundo. La colección Lancefield de estreptococos de la actual Rockefeller University (Figura 5) comprende miles de cepas de estreptococos, casi



Figura 5. Vista parcial del Instituto Rockefeller de Investigación Médica (ahora Rockefeller University). (Foto de Dmadeo, licencia Creative Commons 2.5, 2.0 y 1.0).

todas las que ella reunió a lo largo de su vida profesional [The Lancefield collection of *Streptococcus* strains, <http://www.rockefeller.edu/vaf/lanceindex.php>].

Lancefield trabajó en el laboratorio hasta pocos meses antes de su muerte, aunque en los últimos años los achaques de la vejez no siempre le permitían mantener un horario regular. El retiro forzoso se produjo el Día de Acción de Gracias de 1980, cuando se fracturó la cadera a causa de una caída en su casa y ya no pudo volver a andar. Falleció en Nueva York el 3 de marzo de 1981. Su marido, que entonces era profesor emérito de Queens College, le sobrevivió sólo unos meses. Dejaron una hija y dos nietos. Su hija, Jane Hersey, aunque no siguió los pasos de sus padres en el mundo de la biología, durante algún tiempo se dedicó a la edición científica.

En las últimas décadas de su vida, Rebecca Lancefield recibió numerosos y merecidos galardones; entre otros, el Premio a la Trayectoria Profesional de la Asociación de Cardiología de los Estados Unidos, la Medalla de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos y la Medalla de la Academia de Medicina de Nueva York. En 1973, la Rockefeller University reconoció el trabajo que Lancefield llevó a cabo en aquel centro concediéndole un doctorado *honoris causa*. Y en 1976, sesenta años después de que ella se graduara en Wellesley College, aquel centro también le otorgó un doctorado honorífico. Lancefield fue la segunda mujer que presidió la American Society for Microbiology (entonces American Association of Bacteriologists), en 1943 (la primera fue Alice C. Evans, en 1928) y la primera que presidió la American Association of Immunologists (1961-1962).

LA IMPRONTA DE LANCEFIELD

La tradición establecida por Lancefield en la investigación sobre estreptococos se mantiene en la Rockefeller University, y *Streptococcus pyogenes* es uno de los principales organismos modelo con los que se trabaja en el Laboratorio de Patógenos Bacteriana e Inmunología de aquella universidad. Naturalmente, ahora se emplean otras técnicas y se investigan otros aspectos de la infección. Los objetivos que persigue el grupo que durante años ha dirigido Vincent A. Fischetti, discípulo de Lancefield, son: a) desarrollar lisinas de bacteriófagos (o fagos) de patógenos grampositivos, para usarlos para suprimir la colonización de membranas mucosas humanas y tratar las infecciones causadas por esos organismos; b) descifrar las primeras fases de la infección por *S. pyogenes*, para poder diseñar métodos que interfieran con el establecimiento de la infección; c) identificar el mecanismo de adhesión de las bacterias grampositivas a las proteínas de superficie de las células de su hospedador y desarrollar métodos para bloquearlo, dado que las bacterias desnudas no causan infección; y d) preparar estrategias de vacuna de las mucosas para inducir una respuesta inmunitaria que impida la colonización y subsiguiente infección por *S. pyogenes* [Research Direction

of the Fischetti Lab, <http://www.rockefeller.edu/vaf/>]. Es posible que en las festividades que se celebran en aquel laboratorio aun se beba el ponche de huevo (*eggnog*) preparado según la receta de la familia de Rebecca Lancefield, una tradición que ella introdujo en la celebración con sus colegas de la fiesta de Acción de Gracias.

Lancefield nunca creyó importantes los premios o menciones honoríficas a mujeres por el hecho de haber sido las primeras en alguna actividad; prefería los que se concedían por el valor de trabajo realizado, sin tener en cuenta el sexo. Aunque era consciente de las dificultades para conciliar la profesión de investigadora y la familia, creía que con determinación y esforzándose en el trabajo era posible. De todos modos, el ambiente familiar propició que ella fuese a la universidad en una época en la que la presencia de las mujeres en los estudios superiores era aún minoritaria. Luego compartió la vida con un hombre que entendió las aspiraciones de su esposa y pudo dedicarse a la investigación en un ambiente que tampoco era muy favorable para la mujer. Baste mencionar que no fue nunca directora del departamento en el que trabajaba. El valor de su investigación le fue reconocido en su tiempo, pero probablemente muchos microbiólogos y microbiólogas que hoy en día trabajan en ámbitos no médicos desconocen que los grupos de Lancefield en los que clásicamente se han clasificado los estreptococos deben su nombre a una mujer que dedicó toda su carrera profesional al estudio de esas bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

- Antony TT. (1997). Rebecca Craighill Lancefield (1895-1981). In: Grinstein LS, Bierman, Rose RK (eds) Women in the biological sciences: A bibliographical sourcebook. Greenwood Press, Westport, CT, pp. 266-273.
- Corner GW. (1964). A history of the Rockefeller Institute. 1901-1953 Origins and growth. The Rockefeller Institute Press, Nueva York.
- Dochez AR, Avery OT, Lancefield RC. (1919). Studies on the biology of *Streptococcus*. I. Antigenic relationships between strains of *Streptococcus haemolyticus*. J Exp Med 30:179-213.
- Emrich J, Peery B. (2013). PI in the Scotland Yard of streptococcal mysteries: Rebecca Lancefield, Ph.D. (AAI 1992, President 1961-62). The American Association of Immunologists Newsletter, pp. 19-24.
- Hanson E. (2004). Women scientists at the Rockefeller Institute, 1901-1940. En: Stapleton DH (ed.), Creating a tradition in Biomedical Research. Contributions to the history of the Rockefeller University, The Rockefeller University Press, Nueva York pp. 211-225.
- Lancefield RC. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med 57:571-595.
- Mackay J, Mensah GA. (2004). The atlas of heart disease and stroke. World Health Organization, Geneva.
- McCarty M. (1987). Rebecca Craighill Lancefield (1895-1981) Biographical Memoirs. Academy of Sciences, Washington, pp. 225-246 (incluye una selección de la bibliografía de Lancefield).
- Schwartz J. (1990). Mrs L. Research Profiles. The Rockefeller University, Summer 1990
- Spillberg B, Taylor-Blake B. (2013). On the exoneration of Dr. William H. Stewart: debunking an urban legend. Infect Dis Poverty 2:3.

MICROORGANISMOS PÁTÓGENOS

Ángel Domínguez
Presidente



El grupo de Biología de los Microorganismos Patógenos, después de reuniones entre diversos miembros de su Junta Directiva, consultas a través de correos electrónicos y diversas conversaciones y reuniones de sus miembros y considerando la situación científica y económica por la que atraviesan la mayoría de los grupos de investigación que lo componen decidió no organizar este año la reunión habitual. Se acordó estudiar y revisar las actividades del grupo en el próximo Congreso de la SEM (Logroño, 2015).

DOCENCIA Y DIFUSIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA

Montserrat Llagostera
Presidenta del Grupo D+D SEM



Entre las diferentes actividades de nuestro grupo, merecen especial interés la celebración de la XVIII edición del Curso de Iniciación a la Investigación (Universidad del País Vasco (UPV/EHU), 19-20 de junio del 2014) y la II Reunión de nuestro grupo realizada en Alicante (5-6 de septiembre de 2014). Sin embargo, sólo voy a comentaros que ambos eventos fueron muy exitosos e interesantes y que cumplieron con creces los objetivos marcados, dado que ya habéis podido leer en NoticiaSEM breves resúmenes al respecto y en este número (pag. 35) encontrareis reseñas más detalladas. Por ello, en este artículo me centraré en otras actividades que igualmente son destacadas y que se han realizado en estos últimos meses.

FEMS y enseñanza de la Microbiología

El día 8 de julio fuimos invitados, junto con otras sociedades microbiológicas europeas a un debate en la sede de la FEMS en Delft. Víctor J. Cid, Secretario del Grupo, fue en esta ocasión el delegado de la Junta D+D en esta reunión y publicó un resumen al respecto en el NoticiaSEM del pasado julio. Los dos puntos importantes son (a) la manifestación de interés por parte de FEMS de promover una iniciativa a nivel europeo en Educación,

para lo cual cuentan con la SEM como una de las sociedades más activas en este sentido; y (b) la cita del Congreso FEMS 2015 en Maastricht, en el que la comisionada para la Educación, Joanna Verran, desea que las iniciativas en Educación ganen peso. Por eso es importante que pongáis en vuestra agenda el Congreso FEMS y, si vais a atender, tengáis en cuenta que habrá sesiones y pósteres dedicados a difusión y docencia en los que podéis exponer vuestras iniciativas en un foro internacional al tiempo que dais visibilidad a la SEM y al Grupo.

Relatos Microscópicos

Por fin y después de muchos esfuerzos disponemos ya de una versión electrónica del libro «Relatos Microscópicos», fruto de nuestro primer concurso científico-literario de relatos cortos, que puede adquirirse a través de Amazon. Como veréis, además de contener el texto de los relatos ganadores del concurso y de algunos de los finalistas, se trata de un libro ilustrado. Agradecemos enormemente a todos los ilustradores que han participado su buena disposición ya que con ello se ha conseguido un libro mucho más atractivo para los lectores que esperamos que sean muchos y con una amplia variedad de edades.

La edición electrónica significa que el libro está a disposición del público en general, pero no nos damos por satisfechos. Así, además de que la calidad de las ilustraciones sería mucho mejor en papel, hemos detectado que el formato electrónico no es el más adecuado para que nuestro libro forme parte de las bibliotecas de las escuelas. También hemos encontrado serias dificultades para poder regalar un libro electrónico. Todo ello hace que su difusión sea limitada y no se consigue la calidad que deseamos. Por ello, estamos decididos a continuar trabajando para conseguir editar un libro en formato papel. En este sentido seguimos en contacto con la editorial Hélice para analizar todas las opciones que se nos ocurran. No obstante, os animamos a que lo compréis en el formato que actualmente está disponible ya que estamos seguros que los relatos y sus ilustraciones os encantarán.

Difusión de la Microbiología

Uno de los objetivos de nuestro grupo ha sido desde sus inicios promover la difusión de la Microbiología de todas las formas posibles y en ello estamos, intentando encontrar fórmulas que mejoren dicha difusión tanto entre nuestros socios como con la sociedad. En esta línea hemos trabajado en tres sentidos:

- a) **Mejorar la cultura sobre difusión y su metodología entre los miembros de la SEM.** Para ello, el Simposio de nuestro grupo en el XXIV Congreso de la SEM de 2013 se centró en «Microbiología y periodismo: una relación simbiótica» y el formato de la II Reunión de nuestro Grupo fue mucho más participativo y dinámico, además de contar con un taller centrado específicamente en difusión, en el que todos los participantes aprendimos un montón.
- b) **Atención a los medios.** Tal vez sea porque diferentes acontecimientos que impactan a nuestros conciuda-

danos están relacionados con la Microbiología, pero lo cierto es que nuestra Sociedad recibe con mayor frecuencia mensajes electrónicos de periodistas y profesionales de la comunicación solicitando entrevistas o consultas referentes a temas microbiológicos. Para poder atenderlos convenientemente, nuestro grupo ha puesto en práctica una idea que salió ya en nuestra asamblea del 2013. Consiste en disponer de una base de datos de socios de la SEM que recoja sus datos de contacto y palabras clave para poder responder de forma inmediata a las diferentes consultas de los profesionales de la comunicación. En estos momentos disponemos de un listado reducido. Por ello os pedimos que si estáis interesados en colaborar con nosotros en este aspecto, enviéis vuestros datos a nuestro secretario (vicjcid@ucm.es) o a mí (montserrat.llagostera@uab.cat). Os estaremos sumamente agradecidos ya que necesitamos ampliar dicha base de datos.

- c) **Difusión de la ciencia SEM.** Una de las espinitas sobre la que se ha debatido en diferentes ocasiones en la Junta Directiva de nuestra sociedad es promover la difusión entre los miembros de la SEM de los logros científicos de sus miembros. A este respecto, la revista SEM@foro contribuye enormemente, dedicando números monográficos a la actividad científica de los miembros de los grupos especializados. No obstante, en su momento, nos marcamos como objetivo que tanto el boletín Noticias SEM como la revista SEM@foro dispusieran de una sección dedicada a publicar resúmenes sobre los logros científicos de los miembros de la SEM. Ello ha sido hasta el momento una tarea ardua y no bien cubierta. Por ello, propusimos a los Presidentes de los grupos especializados que designaran a una persona para el cargo de «**Delegado de Difusión**». Su función básica es la de servir de nexo de unión entre dichos grupos y los editores de SEM@foro y de NoticiaSEM para que la actividad investigadora de sus miembros se vea reflejada en ambas publicaciones. En el boletín de octubre de NoticiaSEM encontraréis los delegados de difusión de cada grupo especializado.

Grupo de trabajo de Jóvenes Investigadores de la SEM (JISEM)

Este grupo de trabajo ha demostrado ser muy activo y entre sus actividades merecen destacarse la organización de la mesa redonda «Foro de Jóvenes Microbiólogos» en la II Reunión de nuestro grupo y el estreno en el boletín NoticiaSEM de octubre de una sección propia que os recomiendo que leáis si aun no lo habéis hecho. En la mesa redonda, entre otros aspectos, se respondió a una pregunta que algunos de nosotros tenemos en mente hace ya un cierto tiempo: ¿Qué se entiende por joven investigador? La respuesta fue: «todos los investigadores que no ocupen un puesto fijo o funcional en algún Organismo de Investigación». En consonancia con ello, se decidió hacer un censo de los miembros de la SEM que están incluidos en esta categoría. Por ello, os anuncio que en un tiempo prudencial os pediremos ayuda para realizar dicho censo.

Por otra parte, también en la mesa redonda se trató de la conveniencia de que las Juntas directivas de los grupos especializados cuenten con un miembro con voz pero sin voto que pertenezca al grupo JISEM. Por ello, os animo a que penséis en ello y lo instauréis en la medida de lo posible en vuestras Juntas como ya lo ha hecho, al menos que sepamos, una de ellas.

Aparte de lo que os he comentado estamos trabajando en otros muchos aspectos que para no alargarme más, dejo su exposición para futuros artículos. No obstante no quisiera finalizar sin indicaros que durante el próximo año debemos proceder a la renovación de la Junta de nuestro grupo. Os iremos informando de todo ello.

Nos encontrareis en <http://www.semicrobiologia.org/ddm/index.php> Muchas gracias a todos por vuestra colaboración.

MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Francisco Javier Carballo
Presidente



Renovación parcial de la Junta Directiva del Grupo de Microbiología de los Alimentos

Entre los días 8 y 22 del pasado mes de septiembre tuvo lugar la votación «on-line» para la renovación parcial de la Junta Directiva del Grupo. Dejaron sus cargos de vocales, tras 8 años de permanencia en los mismos (2006-2014), los Drs. José Fernández-Salguero Carretero, de la Universidad de Córdoba, y David Rodríguez Lázaro, del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). El Grupo agradece sinceramente la valiosísima aportación de ambos durante estos años.

En su lugar fueron elegidos los Drs. Marta Hernández Pérez, del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), y Carlos Alonso Calleja, de la Universidad de León. Igualmente, fueron reelegidos en sus cargos los Drs. Gonzalo García de Fernando Minguillón, de la Universidad Complutense de Madrid (Vicepresidente), y Antonia María Picón Gálvez, del INIA (Secretaria).

XX Congreso nacional de microbiología de los alimentos

El próximo Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos tendrá lugar D.m., en fechas todavía por determinar, en León, en el año 2016. Correrá la presidencia de la organización a cargo del Dr. D. Carlos Alonso Calleja, Profesor Titular de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de León.

BIODETERIORO, BIODEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN

Asunción de los Ríos
Presidenta del Grupo



En julio de este año 2014, se han realizado elecciones para la renovación de los cargos de Presidente, Vicepresidente, Tesorero-Secretario y 3 Vocales de la Junta Directiva del Grupo de Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación de la SEM. La Junta saliente se presentó a la reelección y fue la única candidatura presentada. Todo el proceso se ha desarrollado con normalidad y con una participación del 30% la junta que se expone a continuación ha sido ratificada.

- Presidenta
Asunción de los Ríos Murillo
- Vicepresidenta
Ana M^a García Ruiz
- Secretario-Tesorero
Constantino Ruibal Villaseñor
- Vocales
Concepción Calvo Sainz
Concepción Abrusci Bernal
Marta Urizal Comas

Nos ponemos de nuevo a vuestra disposición para lo que necesitéis. Gracias a todos los miembros del Grupo por la participación en este proceso de elecciones.

HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS

Humberto Martín
Presidente del Grupo



Como muchos de vosotros pudisteis comprobar, el pasado XII Congreso Nacional de Micología celebrado en Bilbao durante el pasado mes de junio fue todo un éxito, tanto a nivel científico como organizativo y de asistencia. Es obligatorio agradecer el estupendo trabajo realizado por Guillermo Quindós y su equipo, responsables de este fenomenal resultado. En este mismo número de SEM@foro (pag. 23) encontraréis una magnífica reseña sobre lo más destacado que tuvo lugar durante su desarrollo. Nos tenemos que congratular también por las espléndidas reseñas de los grupos de investigación que participaron en la elaboración del pasado número de este

boletín, especial sobre Hongos Filamentosos y Levaduras. Por último, en la asamblea del grupo especializado que se celebró durante el congreso se decidió encargar la organización del próximo Congreso Nacional de Micología, que tendrá lugar en 2016, a nuestra compañera María Ángeles de la Torre, en Lleida. Desde la Junta Directiva le damos todo nuestro ánimo y le ofrecemos nuestro mayor apoyo en esta tarea.

PROTISTOLOGÍA



Ana Martín González
Presidenta del Grupo



La organización del VII *European Congress of Protistology* (VII ECOP) conjuntamente con la Reunión Anual de *The International Society of Protistologists* (ISOP), que tendrá lugar en Sevilla del 5-10 de septiembre de 2015, esta avanzada y ya podemos informar sobre parte del programa científico. Los congresos ECOP los organiza cada 4 años la FEPS (Federation of European Protistological Societies) y en esta ocasión el GEP actúa como grupo anfitrión. El VII ECOP será especial porque es la primera vez que se organiza conjuntamente con ISOP.

Los contenidos del Congreso intentan contemplar temas muy diversos de distintos grupos taxonómicos de protistas parásitos y de vida libre, así como aspectos muy actuales, objeto de intensa controversia entre los protistólogos. Varios de los 12 Simposios previstos son los siguientes:

- *Sex in Protists* (organizado por M. Dunthorn y T. Weisse, Alemania) (simposio ISOP).
- *Kin-discrimination in Protists* (Organizado por A. Espinosa y G. Paz y Miño, EE.UU. y Canadá) (simposio ISOP).
- *New challenges in microalgae biotechnology* (Organizado por F. Valverde y A. Serrano, Sevilla, España).
- *Genome Editing in Protists* (Organizado por R. Docampo, Estados Unidos).
- *Insights of Novel Protists Lineages* (Organizado por R. Massana, Barcelona, España).
- *Protists and environmental stress* (Organizado por J.C. Gutiérrez, Madrid, España).
- *Functional ecology in aquatic Protists* (Organizado por T. Weisse, Austria).

Las ocho *Plenary Lectures* serán impartidas por: Roberto Docampo (Estados Unidos), N. Guillen (Francia), P. Luporini (Italia), J. Pawlowski (Suiza), entre otros. De momento, también están previstas cuatro workshops: *Free-living amoebae infections: are they rare pathogens or an emerging threat?* (J. Lorenzo-Morales, Las Palmas, España), *Symbiosis in Protists* (G.F. Esteban, Bournemouth, UK), *Community*



ecology through the lens of high-throughput sequencing (R. Massana, Barcelona, Spain), *Protists and Wastewater Treatment* (Grupo de Bioindicación de Sevilla y varios socios del Grupo Especializado de Protistología).

Desde aquí animo a todos los miembros de la Sociedad Española de Microbiología para que asistan a este Congreso, donde conocerán importantes e interesantes aspectos de los Protistas. Y sobre todo, espero que los miembros de nuestro Grupo Especializado apoyen, con su asistencia y participación, su proyección internacional, así como el establecimiento de relaciones científicas entre los protistólogos, que desemboquen en la petición de proyectos de investigación conjuntos y el establecimiento de redes temáticas internacionales.

MICROBIOLOGÍA DE PLANTAS



Antonio de Vicente
Presidente

La próxima reunión del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas, que será ya la VI, se celebrará en Miraflores de la Sierra (Madrid), en la Residencia La Cristalera de la UAM, durante los días 11 al 13 de Marzo de 2015. Dicha reunión del Grupo se está organizando por Rafael Rivilla y Marta Martín (UAM) y Emilia López y Pablo Rodríguez (CBGP-UPM-INIA). Así que id reservando estas fechas en vuestras agendas de 2015, pues os esperamos a todos, tanto a los 62 socios que ya formamos parte del grupo de Microbiología de Plantas, como a todos aquellos que queráis compartir con nosotros vuestros trabajos. Pronto recibiréis la primera circular con información más detallada.

En la Reunión del Grupo del próximo mes de Marzo se producirá la renovación parcial de la Junta Directiva del Grupo Especializado, en 2015 corresponde renovar los cargos de Pre-

sidente, Tesorero y uno de los dos Vocales. Por tanto, en breve se pondrá en marcha el proceso electoral que pretendemos sea totalmente *on-line* como en las pasadas elecciones de 2013; y desde ya os animo a participar en este proceso electoral.

Por último insistiros en que nos hagáis partícipes a toda la SEM de vuestros avances científicos y los de nuestros colegas, así como de otras actividades que consideréis de interés, para ello no dudéis en poneros en contacto con nuestro delegado de difusión, Ramón Peñalver (rpenal@ivia.es), para darle la difusión oportuna a través de las distintas publicaciones de la SEM.

MICROBIOLOGÍA DEL MEDIO ACUÁTICO



Juan José Borrego
Presidente del Grupo

El X Congreso SEM de Microbiología del Medio Acuático (MMA) se celebró con éxito en las ciudades de Elche y Orihuela, los días 7 al 9 de septiembre de 2014 (ver la reseña en la sección CONGRESOS, pág. 34 de este número).

Delegada de difusión del grupo

La Junta Directiva del Grupo ha designado a la Prof. Dra. Inés Arana Basabe de la Universidad del País Vasco como Delegada de Difusión del Grupo. Su misión será la de conectar a nuestro grupo con los editores de la revista SEM@foro y del boletín electrónico Noticias SEM. Agradecemos a Inés su amable aceptación de este puesto, y solicitamos a nuestros socios la máxima colaboración con ella para suministrarle noticias, publicaciones, reseñas de interés. Su mail es: ines.arana@ehu.es.

XI Congreso del grupo 2016

En la Asamblea celebrada en el X Congreso se decidió la sede y organizador del XI Congreso del Grupo. Se celebrará en 2016 en Oviedo, siendo el Presidente del Comité Organizador el Dr. José Agustín Guijarro. En breve podremos concretar las fechas y el lugar del evento.

Renovación parcial de la junta directiva

En el 2015 se procederá a la elección de miembros de la Junta Directiva del Grupo, correspondiente a los cargos de Vicepresidencia, Secretaría y 2 Vocalías. El plazo de recepción de candidaturas finaliza el próximo 15 de diciembre, y las elecciones se realizarán por vía electrónica en el primer trimestre del año 2015. Los resultados se proclamarán en la próxima Asamblea del Grupo en el XXV Congreso Nacional de la SEM a celebrar en Logroño.

¿Es mía *mi cepa*?



Rosa Aznar Novella

Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología y directora de la CECT, Universidad de Valencia.



Aurora Zuzuarregui

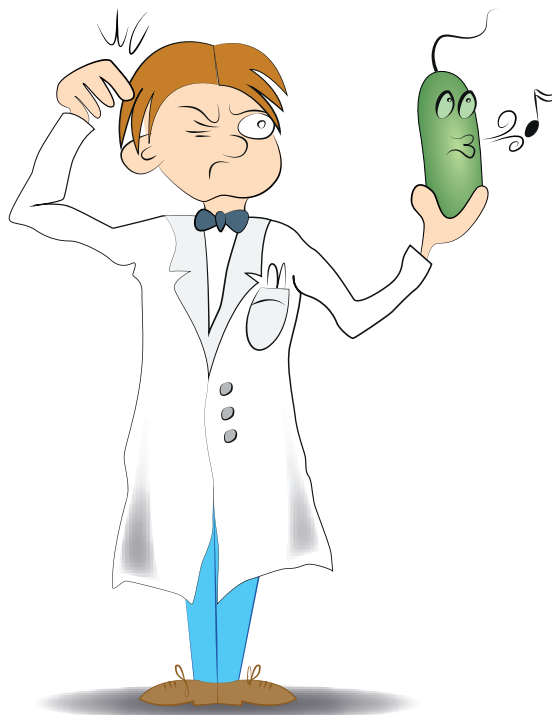
Gestora del Centro de Recursos Microbianos, CECT, Universidad de Valencia

¿SON MÍAS LAS CEPAS QUE HE AISLADO? ¿PUEDO HACER CON ELLAS LO QUE QUIERA? ¿PUEDO VULNERAR LEYES O DERECHOS DE OTROS?

Las respuestas a estas y otras preguntas similares son complejas ya que dependen de la legislación que regula el acceso y posterior uso de los recursos microbianos. Según el Convenio sobre la Diversidad Biológica (**CBD, Convention on Biological Diversity**), artículo 15, punto 1: «En reconocimiento de los derechos soberanos de los estados sobre sus recursos naturales, la facultad de regular el acceso a los recursos genéticos incumbe a los gobiernos nacionales y está sometida a la legislación nacional», es decir, los estados son propietarios de sus recursos genéticos (incluidos los microbianos).

El CBD es un tratado internacional jurídicamente vinculante para las Partes firmantes. Tiene tres objetivos principales: la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. Aunque el Convenio entró en vigor el 29 de diciembre de 1993, los instrumentos necesarios para garantizar su cumplimiento todavía están en proceso de maduración. Uno de los temas más complejos ha sido la regulación sobre el acceso a los recursos y el reparto de beneficios (**ABS, Access and Benefit Sharing**). Para impulsar este tercer objetivo del CBD se elaboró el **Protocolo de Nagoya**, de carácter igualmente vinculante, y que ha entrado en vigor el 12 de octubre de 2014 a la vez que el **Reglamento UE 511/2014**, relativo a las medidas sobre ABS en la Unión Europea. Según esta normativa los usuarios europeos de recursos genéticos deberán asegurarse de que **utilizan**

dichos recursos de forma legal, lo que quiere decir, *grosso modo*, que conocen el origen (*in situ*) de la cepa, poseen la documentación que acredita que fue obtenida legalmente y pueden demostrar que se está **utilizando** de acuerdo a las condiciones establecidas, si las hubiere.



¿Y cómo sé yo si estoy utilizando *mi* cepa de forma legal? Averiguando si el país dónde se aisló posee legislación sobre el acceso a sus recursos y qué condiciones establece. Gracias al CBD y al Protocolo de Nagoya se han ido poniendo en marcha herramientas para facilitar, al menos, el acceso a la información. Una de ellas es la herramienta de administración de acceso a los recursos genéticos y distribución de beneficios (**ABS Management Tool**) que comprende estándares de buenas prácticas y manuales para asistir a empresas, investigadores, comunidades locales e indígenas y gobiernos en aras del cumplimiento con el CBD. Aunque todavía está en desarrollo también nos resultará esencial la página web de la **ABS Clearing House**, donde se podrá acceder al perfil de los países y obtener información sobre sus puntos nacionales de contacto, legislación nacional relativa a ABS, certificados de conformidad de cepas, etc. Otra herramienta prevista en el Reglamento UE es el **Registro de Colecciones de Cultivo**. Los usuarios que obtengan cepas de colecciones registradas tendrán garantías de haber actuado con la diligencia debida, tal y como expresa el reglamento.

En España existen dos leyes elaboradas tras la firma del CBD que tratan de establecer los principios generales sobre conservación y utilización de recursos genéticos, la **ley 30/2006** especialmente dedicada a los recursos fitogenéticos, y la **ley 42/2007** sobre conservación y uso sostenible de la biodiversidad. Estas leyes deben desarrollarse en reales decretos que dicten los protocolos de actuación de recolectores, usuarios y proveedores de cepas en nuestro país. Hasta el momento España no ha regulado el acceso a los recursos genéticos y, por tanto, las cepas pueden ser obtenidas de territorios españoles no protegidos sin necesidad de solicitar un consentimiento informado previo (**PIC, Prior Informed Consent**) a la autoridad competente.

Además de lo ya mencionado respecto al CBD, hay otras consideraciones a tener en cuenta en relación a los derechos de propiedad intelectual (**IPR, Intellectual Property Rights**) sobre las cepas. Los recursos genéticos, tal como se encuentran en la naturaleza, no son creaciones de la

mente humana, y por ello no pueden protegerse directamente como propiedad intelectual. Sin embargo, la adición de valor en el proceso de acceso a la cepa (aislamiento, purificación, etc.) o de su caracterización (identificación, detección de posibles usos, etc.), puede estar sujeta a derechos de propiedad intelectual, siempre de acuerdo con los tratados internacionales de los que el país es parte (Tratado de Budapest, Convención de París, etc.) y a la legislación nacional vigente.

La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) es consciente de la inquietud que pueden generar estos temas en los usuarios de microorganismos y quiere ayudar a investigadores y empresas compartiendo su conocimiento y experiencia. La CECT está participando en reuniones nacionales sobre esta temática, como la «I Jornada sobre ABS en España», además de trabajar en el proyecto europeo MIRRI, que tiene un grupo de trabajo especialmente dedicado al marco legal y operativo para el acceso a los recursos microbianos. El objetivo principal de esta parte del proyecto es definir una política sobre IPR y ABS para las Colecciones de Cultivo y los Centros de Recursos Microbianos europeos de acuerdo al CBD. Se pretende que dicha política sea transparente y eficaz, que minimice los trámites administrativos y que evite el aumento de la restricción de acceso a los recursos microbianos.

BIBLIOGRAFÍA Y PÁGINAS DE INTERÉS

- ABS Clearing House** <https://absch.cbd.int/>
ABS Management Tool <https://www.iisd.org/abs/>
CBD y Protocolo de Nagoya <http://www.cbd.int/intro/default.shtml>
CECT <http://www.cect.org>
I Jornada sobre ABS en España <http://unesourjc.org/jornada-abs/>
Ley 30/2006 <http://www.boe.es/boe/dias/2006/07/27/pdfs/A28165-28178.pdf>
Ley 42/2007 <https://www.boe.es/buscar/pdf/2007/BOE-A-2007-21490-consolidado.pdf>
MIRRI <http://www.mirri.org>
Organización Mundial de la Propiedad Intelectual <http://www.wipo.int/portal/es/>
Reglamento UE 511/2014 <http://www.boe.es/doue/2014/150/L00059-00071.pdf>

SEM@foro y **NoticiaSEM** publican artículos de opinión y divulgación sobre Microbiología, así como todo tipo de reseñas e información sobre la actividad de los Grupos Especializados de la SEM, congresos, simposios, seminarios, etc.

Además, **SEM@foro** y **NoticiaSEM** admiten **PUBLICIDAD** de las actividades, servicios o productos de tu empresa o institución.

Solicita los precios de publicidad a los directores de las publicaciones o a secretaria.sem@semicrobiologia.org.

El Dr. Arturo Levicán recibe el premio a la mejor tesis doctoral sobre Microbiología del Medio Acuático

Grupo especializado Microbiología del Medio Acuático

Informa: Inés Arana (Universidad del País Vasco)

El premio a la mejor tesis doctoral del grupo de Microbiología del Medio Acuático de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) ha sido entregado al Dr. Arturo Levicán Asenjo por el trabajo *Sanitary Importance of Arcobacter*. La tesis doctoral ha sido dirigida por la Dra. María José Figueras y el Dr. Luís Collado y realizada en el Departamento de Ciencias Médicas Básica de La Universidad Rovira i Virgili. La tesis se presentó durante la sesión inaugural de la de la X edición del Congreso Nacional de Microbiología del Medio Acuático de la SEM, celebrado en las ciudades de Elche y Orihuela (Alicante) del 7 al 9 de septiembre de 2014.

La tesis premiada contribuye a esclarecer la importancia sanitaria de las especies del género *Arcobacter*, aportando datos sobre su posible virulencia e incidencia en moluscos bivalvos, que son considerados un alimento de alto riesgo y también en aguas residuales de origen humano. Además, se demuestra que especies de este género pueden ser con-

fundidas con *Campylobacter*, por lo que podrían estar siendo subestimada su importancia en infecciones humanas. En este trabajo se informa del primer caso de diarrea atribuida a *Arcobacter* en España y se describen 7 nuevas especies de este género bacteriano. A lo largo de la realización de este trabajo, se ha diseñado el único método capaz de identificar inequívocamente todas las especies descritas hasta el momento. Fruto del trabajo de esta tesis se han publicado 10 artículos en revistas de prestigio.

El Dr. Arturo Levican Asenjo actualmente realiza un postdoctorado en la Universidad Andrés Bello, Viña del mar, Chile, donde estudia la microbiota de *Genypterus chilensis*, una especie autóctona de Chile.

El resumen de la conferencia de apertura del X Congreso Nacional de Microbiología del Medio Acuático impartida por el Dr. Arturo Levican puede consultarse en: <http://geneticpcr.com/news/106-congreso-nacional-de-microbiologia-.html>



Figura 1. Magistral exposición del Dr. Levicán durante la inauguración del X Congreso Nacional de Microbiología del Medio Acuático y entrega del premio Investigación MMA.

La plataforma de divulgación científica **ENCIENDE** y la revista **Chispas de la Ciencia**

¡Cuéntale tu investigación a todos nuestros niños!

Pilar Calvo de Pablo

Delegada de la SEM en el proyecto ENCIENDE



ENCIENDE

ENSEÑANZA DE LAS CIENCIAS EN LA DIDÁCTICA ESCOLAR

En el año 2003, ante la necesidad de tener un interlocutor cualificado y unificado en todos aquellos asuntos que afecten a la ciencia, ya sea ante la propia sociedad civil como ante sus poderes públicos representativos, se funda la Confederación de Sociedades Científicas de España, COSCE. En la actualidad, la sociedad agrupa a más de 75 sociedades científicas siendo su Presidente el profesor Carlos Andradás y su vicepresidente el profesor Ricardo Guerrero.

Entre sus objetivos prioritarios, COSCE quiere promover el papel de la ciencia y contribuir a su difusión «como un ingrediente necesario e imprescindible de la cultura». Con esta necesidad nace, en 2010, ENCIENDE (ENseñanza de las CIENCIAS en la Didáctica Escolar), un proyecto para fomentar la enseñanza de las ciencias en las edades más tempranas que ha contado con el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación y con el del Ministerio de Economía y Competitividad, a través de su Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación.

Con este proyecto, la COSCE emprendió «su papel de puente entre la comunidad educativa y la comunidad científica, para involucrar a toda la sociedad y trabajar en pro de una ciudadanía sensibilizada, educada y formada en ciencia».

ENCIENDE se configura, por tanto, como «la plataforma de participación de la comunidad para la enseñanza de las ciencias en la didáctica escolar en España, abierta a maestros, docentes, científicos, investigadores, comunicadores de la ciencia y familias, así como a todos quienes estén interesados en mejorar la enseñanza de las ciencias e incrementar las vocaciones científicas en nuestro país». <http://enciende.cosce.org/>

Una de sus acciones más directas es el boletín ENCIENDE con la publicación, desde febrero de 2013, de la revista **Chispas de la Ciencia** que supone una aproximación del

trabajo del científico mediante artículos amenos, cercanos, para un público entre 6 y 14 años, especialmente de temas científico-tecnológicos de actualidad.

¿DE QUÉ FORMA ESTAMOS PARTICIPANDO DESDE LA SEM EN ESTA PLATAFORMA?

Especialmente hemos sido muy activos en la publicación de artículos. Desde septiembre de 2013, fecha en la que entré a formar parte de la comisión permanente, en representación de la Sociedad Española de Microbiología, se han publicado 6 relatos en relación a los microorganismos. Son los siguientes:

- «Mi historia con un protista»
<http://enciende.cosce.org/boletin/index.asp?item=81>
- «Las bacterias que viven... ¡En tu boca!»
<http://enciende.cosce.org/boletin/index.asp?item=86>
- «¿Se comunican las bacterias?»
<http://enciende.cosce.org/boletin/index.asp?item=109>
- «¿Tienen frío los mohos?»
<http://enciende.cosce.org/boletin/index.asp?item=112>
- «Joyas microbianas: las diatomeas»
<http://enciende.cosce.org/boletin/index.asp?item=127>
- «Cómo limpiar las aguas: la depuración» y «El (famoso) virus del ébola»
<http://enciende.cosce.org/boletin/sumario.asp?item=710>

Boletín ENCIENDE **Chispas de la ciencia**

INMUNOLOGÍA
Conoce a nuestra policía local: el sistema inmunitario
 Por Margarita del Val
 ¿Cómo logra nuestro organismo defenderse de tantos agentes infecciosos?
 Ver este artículo

BIOLOGÍA
Joyas microbianas: las diatomeas
 Por Lucía Arregui García-Rovés
 Son microscópicas, demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista, pero en cambio son ¡la joya de la naturaleza!
 Ver este artículo

BIOLOGÍA
¿Se comunican las bacterias?
 Por Pilar Calvo
 Esas minúsculas células que son las bacterias sí son capaces de comunicarse. En este recurso te explicamos cómo lo hacen y la utilidad de esa comunicación.

<http://enciende.cosce.org>

¿QUÉ OTRAS ACCIONES DESARROLLA LA PLATAFORMA ENCIENDE?

- Por un lado está el intercambio de experiencias, los encuentros: profesores y científicos que pueden realizar una visita a un centro atendiendo a las demandas hechas por estos.
- Por otro lado, están los proyectos. Iniciativas realizadas por los colegios o institutos, un profesor o



Carlos Andradás (Presidente de la COSCE) y de José Miguel Rodríguez Espinosa (Presidente de la Comisión Permanente).



grupo de profesores, para acercar y potenciar la enseñanza de la ciencia en los centros. Los proyectos son abiertos, por lo que pueden ser del tipo visita lúdica, taller, seminario, actividad.

http://enciende.cosce.org/proyectos_recientes.asp?item=9

- Además existen los simposios, de carácter anual. Este año se ha celebrado el III Simposio. En ellos, además de compartir una jornada con experiencias relevantes de algún ponente se hace entrega de los premios a los mejores proyectos que han concursado en la convocatoria anual.
<http://enciende.cosce.org/index.asp?item=30&idomaNum=1&emp=enciende>
- Para el curso actual queremos iniciar el desarrollo de cursos de actualización para el profesorado de primaria y secundaria.

¿DE QUÉ FORMA PODÉIS LOS SOCIOS DE LA SEM COLABORAR CON ENCIENDE?

- Lo más inmediato es animaros a la publicación de algún breve artículo en relación a vuestra investigación. Para haceros una idea del formato, estilo de redacción y demás os aconsejo ver la página de la revista y los links que os he incorporado. Podéis enviarme el artículo a mi correo pcalvo@ucm.es y junto con el resto de miembros de la comisión permanente lo evaluaremos para su inclusión en la revista.
- Podéis inscribiros como socios de la plataforma de forma gratuita. Recibiréis el boletín mensual además de todas las actividades que se vayan realizando.
- Y por último, tendremos una excelente base de datos dentro de la docencia y difusión de la microbiología para contar con profesores interesados en hacer llegar nuestro conocimiento sobre los microorganismos a los alumnos preuniversitarios.

X Reunión de Microbiología Molecular, Segovia 2014

Bruno González Zorn

Presidente del Grupo



Del 9 al 11 de junio celebramos en Segovia la X Reunión del Grupo especializado de Microbiología Molecular, en la que estuvieron presentes en torno a 110 asistentes. Esperamos que los participantes estén de acuerdo con los organizadores en decir que fue un éxito. Nuestro objetivo básico para esta Reunión fue hacerlo económicamente accesible al mayor número de personas, especialmente estudiantes de doctorado, pues el propósito final de estas reuniones es potenciar la participación de nuestros investigadores más jóvenes.

Para la realización de la reunión contamos con el extraordinario apoyo del Campus María Zambrano de Segovia de la Universidad de Valladolid (UVA), que nos cedió el Edificio Vicerrector Santiago Hidalgo para la organización del evento. Este edificio, antiguo local de la Escuela de Magisterio, se encuentra magníficamente localizado dentro del casco antiguo, enfrente de la más antigua iglesia románica de Segovia, San Juan de los Caballeros, y a tan solo 5 minutos del acueducto. La disponibilidad de una amplia explanada, con vistas al río Eresma, junto con el buen tiem-





po que nos acompañó, propiciaron un entorno ideal para la Reunión, pues pudimos disfrutar de los *coffee-breaks*, cócteles y sesiones de posters al aire libre, incluyendo una larga *Beer-Poster session*.

Además de la UVA, queremos en este resumen mostrar también nuestro agradecimiento a todos los patrocinadores por su apoyo (Visavet, Biomedal, Radio Nacional de España, Centro de Información Cerveza y Salud - CICS, Euraxess, Simple Informática, Biotools, Dismalab, Segovia Convention Bureau y Fundación Caja Rural de Segovia), en especial al CICS por su patrocinio para el cóctel de bienvenida y la sesión de póster.

Ya en el ámbito científico, como ya hemos mencionado y como en ocasiones anteriores, los protagonistas del evento fueron los jóvenes investigadores. Comunicaciones de primer nivel sobre, entre otros temas, macromoléculas, sRNAs, aplicaciones biotecnológicas, cianobacterias, agentes antimicrobianos o la charla inaugural del profesor Luis Rubio (*Why we study nitrogenase?*) aseguraron un excelente nivel científico. Además, todos los ponentes tuvieron que presentar igualmente un póster, con la posibilidad en muchas ocasiones de poder ampliar aquella información que no tenía cabida en la charla oral.

En la línea de reducir los costes del congreso en estos tiempos complicados para la ciencia, los premios otorgados fueron más modestos que en anteriores ediciones, pero pudimos aun así premiar diez de las comunicaciones que sobresalieron por encima de los demás. Dichas comunicaciones fueron las representadas por los siguientes autores: Alicia Muro Pastor, Álvaro San Millán Cruz, Carla Daniela Solórzano, Daniel Yero Corona, David Ruano Gallego, Felix

Sangari García, Jerónimo Rodríguez Beltrán, Laura Molina García, María José Ferrándiz Avellano y Sonia Sáenz Lahoya.

Además, otorgamos tres premios especiales gracias a varios patrocinadores: VISAVET-BRUKER galardonó a Montserrat Argandoña por su comunicación sobre Espectrometría de masas; SIMPLE INFORMATICA a Pedro González Torres por su comunicación relacionada con Bioinformática; y BIOMEDAL concedió su III Premio al artículo *Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance*, de María Antonia Sánchez Romero y Josep Casadesús, publicado en la revista PNAS.

A todos los ganadores, enhorabuena y gracias por hacer que nuestra ciencia crezca cada día de forma sobresaliente. Al resto de los autores, gracias por ponérselo difícil para elegir los ganadores. Gracias también al extenso jurado y a los *chairman* de las sesiones.

Además de la parte académica, la visita guiada nocturna por el maravilloso casco histórico, para la cual el Ayuntamiento de Segovia nos iluminó la ciudad, la excelente cena de despedida en La Floresta (cochinillo segoviano partido con plato incluido) y las características ideales de Segovia para este tipo de eventos (tamaño, alojamientos, comida, clima) contribuyeron a desarrollar vínculos tantos profesionales como personales entre los asistentes a esta Reunión.

Nuestro más sincero agradecimiento a todos aquéllos que asistieron a la X Reunión. Esperamos que realmente disfrutais de la Reunión tanto como nosotros disfrutamos organizándola.

Nos vemos en Sevilla.

XII Congreso Nacional de Micología

Bilbao 18-20 junio 2014

M^a Angeles de la Torre

Universidad de Lleida

El XII Congreso Nacional de Micología, preparado por nuestros compañeros de la **Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)** liderados por **Guillermo Quindós**, fue todo en éxito organizativo y participativo. La universidad fue una magnífica anfitriona al acoger el congreso dentro del programa oficial de Cursos de Verano. La amabilidad y hospitalidad de los responsables hicieron que todo funcionase con fluidez y sincronización. Los asistentes registrados fueron 256 y se presentaron 93 comunicaciones. El fabuloso enclave de la ciudad de Bilbao acogió a los congresistas, que disfrutamos tanto de su exquisita gastronomía como de la gran belleza de la ciudad.

Antes de la inauguración oficial del congreso se realizaron cuatro talleres muy interesantes y prácticos, especialmente dirigidos a aquellos miembros más jóvenes de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) y Asociación Española de Micología (AEM) que están en el comienzo de sus carreras investigadoras. Los talleres llevaban los siguientes títulos: **«Cómo escribir un artículo científico y que te lo publiquen»**, **«Problemas frecuentes en el diagnóstico de laboratorio de las candidiasis y de otras infecciones por levaduras»**, **«Problemas frecuentes en el diagnóstico de laboratorio de las infecciones por hongos filamentosos»** y **«Problemas frecuentes en el estudio de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos»**. Todos los talleres fueron organizados por la AEM.

El congreso se inauguró con una magnífica conferencia impartida por el Dr. Francisco Xavier Pastor Molás titulada: **«El árbol y el bosque: el laboratorio de Micología médica y la realidad clínica»**, en donde se puso de manifiesto con brillantez las actuales dificultades en el diagnóstico clínico micológico. Seguidamente, disfrutamos de una sesión plenaria, **«Avances en Micología»**, en la que diversos investigadores de prestigio hicieron un interesante recorrido por los progresos de esta disciplina en los últimos años. Al final de la tarde, todos los congresistas fuimos invitados a una exquisita recepción en el Ayuntamiento de Bilbao. Por el camino pudimos disfrutar de las bellísimas vistas de la ciudad, de la magnífica arquitectura del famoso

museo modernista Guggenheim y de un bellissimo paseo a lo largo del curso de la ría del Nervión / Ibaizabal. Durante la recepción, el concejal de Sanidad del Ayuntamiento de Bilbao, el vicerrector de la UPV/EHU y los presidentes de las sociedades AEM y SEM nos dieron a todos una muy cordial bienvenida. Además, fuimos deleitados con un bellissimo baile de auresku interpretado con sumo gusto por un dantzari. A continuación, y para completar el evento, un delicioso cóctel ofrecido por los organizadores hizo gala de la merecida fama acuñada por la cocina vasca. Hay que decir que disfrutamos de un tiempo meteorológico ideal que nos permitió pasear por la ciudad y recorrer barrios tan emblemáticos como el castizo Casco Antiguo con su Mercado de la Ribera, el mayor mercado cubierto de Europa, y visitar la monumental plaza Nueva / Barria de estilo neoclásico, así como el palacio Arriaga, magnífico exponente del estilo arquitectónico neobarroco. Así, todos pudimos comprobar que la ciudad de Bilbao en la actualidad brilla en todo su esplendor.

Ambas sociedades, SEM y AEM, organizaron dos sesiones plenarios conjuntas, una al comienzo del congreso que versaba sobre los avances en Micología, y otra al cierre del mismo relacionada con la interacción hongo-anfitrión. En ambas sesiones se pudo comprobar la excelente colaboración y el vínculo que existe entre ambos grupos de científicos.

La mañana del jueves comenzó con la exposición de una serie de comunicaciones orales, seleccionadas entre todos los trabajos/pósteres presentados. Dentro de la segunda reunión **«Enfermedad Fúngica Invasora»**, que se celebraba conjuntamente con el congreso, se impartió un interesante taller sobre la terapia antifúngica nebulizada. Seguidamente tuvieron lugar dos mesas redondas, la primera **«El equilibrio ecológico y epidemiológico de las enfermedades fúngicas invasoras»** y la segunda **«Micosis en América Latina»**. Paralelamente se desarrolló un interesante taller titulado **«El papel de los hongos descomponedores en los ecosistemas terrestres»**. Dos mesas redondas, **«En el filo de la navaja: equilibrio ecológico**

y epidemiológico de las EFI» y «El papel de los hongos en los restos leñosos de los ecosistemas terrestres» completaron la primera parte de la sesión. Por la tarde se desarrollaron dos grupos de sesiones en paralelo: «Genoma fúngico y taxonomía» y «Nuevos retos de la Micología», organizadas por la AEM, y «Regulación celular fúngica» y «Los modelos fúngicos», con la SEM como organizadores. La defensa de los pósteres tuvo lugar a mitad de la tarde con gran éxito, lo que demuestra que la efervescencia de las nuevas generaciones de micólogos actúa con fuerza renovadora. La cena del congreso se celebró por la noche en el restaurante del Museo de Bellas Artes de Bilbao, en la que la agradable gastronomía bilbaína fue acompañada por un concierto de música barroca por el grupo Aula Boreal.

El último día de Congreso comenzó con dos mesas redondas simultáneas: «Evolución y perspectivas del tratamiento empírico y de la terapia dirigida de las EFI» (dentro de la reunión Enfermedad Fúngica Invasora) y «Micosis orales y subcutáneas», y dos sesiones exposi-
tivas: la AEM coordinó las charlas de la sesión «Micosis emergentes», mientras que la SEM hizo lo propio con la

sesión «Micología aplicada». Durante el transcurso del día también se ofrecieron otras dos mesas redondas: «Farmacoeconomía y EFI en tiempos de tribulación» y «Aspergilosis en el paciente crítico», que completaron así un extenso, interesante y profundo recorrido que abarcó todos los aspectos relacionados con el conocimiento actual en España de la Micología Clínica, Básica y Aplicada. El exitoso congreso se cerró con la conferencia impartida por el Dr. Juan Carlos Ribas, galardonado con el premio Fleming por la SEM, quien hizo gala de su reconocida erudición y nos deleitó con una interesante y amena charla titulada «La pared fúngica es esencial en la regulación de la citocinesis».

La clausura oficial del congreso permitió que los congresistas se despidieran en el relajado ambiente de un cóctel de despedida amenizado por la música de jazz del grupo Gintonic, confiando en encontrarse pronto en el XIII Congreso de Micología que se celebrará en Lleida. En definitiva, el enorme esfuerzo cooperativo de la SEM, AEM y la UPV/EHU, hicieron de este encuentro en Bilbao un momento memorable que todos recordaremos con sumo agrado.



Figura 1. Recepción de los congresistas en el Ayuntamiento de Bilbao.

XV Reunión de Taxonomía, Filogenia y Diversidad Microbiana de la SEM

José Luis Copa Patiño y Juan Soliveri de Carranza

Universidad de Alcalá

Durante los días 3 y 4 de julio se celebró en la Universidad de Alcalá la XV Reunión del grupo especializado de Taxonomía, Filogenia y Diversidad Microbiana de la SEM. A la misma asistieron 56 investigadores con una gran representación de jóvenes científicos que, durante dos días, intercambiaron experiencias y conocimientos sobre los tres aspectos fundamentales que definen al grupo: la taxonomía, la filogenia y la diversidad microbiana.

La organización de esta XV Reunión corrió a cargo de la Universidad de Alcalá, estando presidida por el Prof. José Luis Copa Patiño y, como Secretario, el Prof. Juan Soliveri de Carranza. Tuvimos un Presidente de Honor, el Prof. Fernando Laborda Rodríguez, que inicia una nueva etapa en su vida como Profesor Emérito jubilado y al que quisimos rendirle un sentido homenaje como organizador y fundador de nuestro antiguo Departamento de Microbiología, más tarde de Microbiología y Parasitología y hoy día de Biomedicina y Biotecnología. La reunión tuvo lugar en el

antiguo edificio del Colegio Mayor de San Ildefonso, un marco inigualable, situado en el casco antiguo de la ciudad de Alcalá de Henares y que hoy en día es sede del Rectorado de la Universidad.

La inauguración formal de la Reunión se realizó en el Paraninfo, acompañada de una fuerte tormenta que refrescó el rigor del verano en estas tierras. El Paraninfo es una de las joyas de nuestra Universidad, lugar donde se entregan los Premios Cervantes por Su Majestad el Rey y que constituyó un marco inigualable para iniciar la reunión. La inauguración estuvo presidida por el Vicerrector de Docencia y Estudiantes, Prof. José Vicente Saz Pérez, microbiólogo y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Príncipe de Asturias. Le acompañaban en la mesa el Prof. Antonio Ventosa, como Presidente de nuestro Grupo especializado de la SEM, y el Presidente Honorífico, el Presidente y el Secretario del Comité Organizador de la Reunión. Acabada la Inauguración, nos trasladamos a la Sala de Conferencias



Internacionales, lugar donde se llevaron a cabo todas las presentaciones. Dicha Sala, al tener una disposición ovalada, donde todos los participantes miran al centro de la sala como si de una mesa se tratara, nos permitió asistir a las presentaciones y discusiones de una manera más cercana, animando a interesantes debates.

La conferencia inaugural corrió a cargo del Prof. Juan Antonio Sáez Nieto, Jefe del Área de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, que versó sobre «La identificación de bacterias patógenas en humanos: usuales atípicas, inusuales, emergentes y nuevas especies». La conferencia transcurrió de forma afable y distendida, no exenta de rigor científico, y en la que se repasó la labor que realiza su laboratorio con todas aquellas cepas que se resisten a ser identificadas o que hay que tipificar convenientemente. Después de la conferencia hubo tiempo, al igual que al día siguiente, para visitar el área de posters, 26 en total, y comentar con sus autores los resultados expuestos. Durante la Reunión se programaron dos conferencias invitadas: «Research into the use of soil microbial characterisation in forensic case work: MISAFE an EU funded collaborative research Project» por José Carlos Cordero Pérez, Responsable de Microbiología y Genética no humana del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil, y «Metagenómica de virus en ecosistemas polares y en la cavidad oral humana» por el Dr. Alberto López-Bueno del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). La primera de ellas no pudo ofrecerse por causas totalmente justificadas, siendo la conferencia de clausura la del Dr. Alberto López-Bueno. En ella nos mostró el fascinante mundo de los virus, hablándonos sobre su diversidad y complejidad a la hora de su clasificación, utilizando como ejemplo sus estudios realizados en ecosistemas polares y en la cavidad oral. Finalmente, como parte muy importante de la Reunión, tuvieron lugar las comunicaciones orales ofrecidas por jóvenes investigadores. Debido al tiempo de que se disponía en la Reunión, se ofrecieron 16 comunicaciones orales repartidas en el día y medio de trabajo.

Durante el desarrollo de la Reunión, se llevó a cabo la Asamblea del Grupo, donde entre otras cosas, se felicitó a la Prof. Martha Trujillo por su reciente elección como Presidente de BISMIS (Bergey's International Society for

Microbial Systematics) y se informó, por parte de los miembros que asistieron al mismo, del reciente Congreso BISMIS 2014, celebrado en Edimburgo. Hubo tiempo también para aspectos más formales: el Secretario dio lectura al acta anterior para su aprobación y la tesorera informó del estado de cuentas del Grupo. Finalmente, se acordó nombrar



una comisión formada por miembros de la Junta Directiva y por alguno de los miembros de la Comisión Organizadora, para otorgar los premios a las mejores comunicaciones orales y en poster. En total se concedieron 6 premios a los siguientes investigadores Paulina Corral Villa (Universidad de Sevilla), Víctor González Menéndez (Fundación MEDINA, Granada), María Mas Lladó (Universitat de les Illes Balears), Raúl Riesco Jarrín (Universidad de Salamanca), Ariadna Sanglas Baulenas (Universitat de Barcelona) y Eva Tarazona Castellblanque (Universitat de València).

Además del programa científico, los participantes pudieron disfrutar de un programa social que incluyó una visita guiada a la Universidad de Alcalá, donde se nos explicó la historia de la misma, visitando el Paraninfo, el Patio Trilingüe y la recientemente restaurada Capilla de San Ildefonso. Posteriormente, realizamos otra visita guiada al casco antiguo de Alcalá de Henares, centrándonos en ciertos enclaves que hablan de la rica historia de la ciudad: casa de Cervantes, casa de Azaña, barrio judío, lugar donde estuvo enclavada la antigua sinagoga de Alcalá, un patio típico de las casas antiguas de Alcalá, Capilla del Oidor, etc. Tanto la recepción de bienvenida, como la cena de clausura, se realizaron en lugares con especial encanto, tales como el Restaurante La Cúpula, antigua iglesia de Alcalá, y el Parador Nacional de Turismo.

Finalmente el día 5 de julio tuvimos la oportunidad de realizar una excursión a la cercana ciudad de Sigüenza, con comida incluida en un afamado restaurante de la ciudad. Esta ciudad fue un importante y rico enclave en época medieval, contando con Obispado y Universidad propia. Visitamos el castillo (actualmente Parador Nacional de

Turismo), la casa del Doncel (perteneciente a la Universidad de Alcalá), así como la Catedral, con su impresionante mezcla de románico y gótico, lugar donde reposa «El Doncel», una de las principales esculturas del gótico tardío español. Antes, se hizo una parada muy cerca de Sigüenza, en las salinas de Imón. Son salinas de interior, antiguamente de gran importancia, ya que en la época medieval eran un filón de riqueza que explotaron tanto la Corona como la Iglesia. En este lugar, embriagados algunos del ambiente «salino», disfrutamos enormemente fotografiando, visitando sus arcaicas estructuras o ...tomando muestras..., que el trabajo nunca se olvida. Creo que fue una excursión difícil de olvidar, lo sentimos por los que se la perdieron.





2ª Reunión de Docencia y Difusión de la Microbiología

Informa: Víctor J. Cid, Secretario del grupo D+DM

En el Campus de Sant Vicent el Raspeig de la Universidad de Alicante, durante los calurosos días 5 y 6 de septiembre se celebró la segunda cita para los miembros del Grupo Especializado en Docencia y Difusión de la Microbiología. Los también calurosos anfitriones fueron en esta ocasión **Pepa Antón, Kika Colom, Manuel Martínez, Manuel Sánchez, Fernando Santos y Marina Torreblanca**, profesores de la citada universidad y de la Miguel Hernández.

La reunión estuvo precedida de dos magníficos talleres, el primero práctico, impartido en el aula de informática sobre el uso de herramientas de análisis metagenómico con fines pedagógicos en estudios de Grado y el segundo, impartido por **Manuel Martínez y Fernando Santos**. El segundo, a cargo de **Kika Colom y Enrique Perdiguero**, brillante por la calidad del planteamiento, la deslumbrante retórica este último, experto en Historia de la Ciencia y comunicación científica, y sin duda por el interés candente del tema en ese momento (¡y lo que quedaba!): la epidemia de Ébola y su tratamiento por los medios de comunicación. No os cuento más porque **Manuel Sánchez Angulo** comparte la experiencia de los privilegiados que estuvimos allí con todos los lectores de **SEM@foro** en su artículo «**Ciudadano Ébola**», en este número (pág. 38).

Hubo después tiempo para el picoteo con amigos y colegas, regado con cerveza artesana elaborada *ad hoc* para los amantes de la fermentación y también vino «joven» (no porque no hubiera pasado por crianza, sino porque fue cortesía del grupo de Jóvenes Investigadores, JISEM).

Sería imposible reseñar en unas líneas todas las ideas y debates que surgieron en la intensa jornada posterior. Una excelente idea de la organización fue la exposición oral de los pósters en micropresentaciones de dos minutos, un formato dinámico y participativo muy productivo. Hubo premios a las mejores ideas e iniciativas, como el otorgado a los jóvenes blogueros de **Microbios & Co** (<http://microbiosandco.blogspot.com.es>). Se habló de todo: docencia universitaria, cursos on-line, cine, divulgación... Comentaré no obstante las mejores jugadas, pecando acaso de subjetividad, que fueron las sesiones destacadas y organizadas en formato de mesa redonda. La primera, la sesión de **Microbiología en la enseñanza preuniversitaria**, organizada por **Pilar Calvo** y el comité organizador y torpemente moderada por quien escribe estas líneas. En ella, Adoración Sánchez, Isabel Fernández Boan y la propia Pilar Calvo (profesoras de instituto, las dos últimas también asociadas en la universidad), Francisco Coloma (coordinador de F.P.) y Rosa Mejías (experta en formación





de profesorado) mantuvieron con el público un debate interesantísimo sobre cómo incidir en el currículo microbiológico y, en general, en la cultura científica de nuestros estudiantes de secundaria y formación profesional, víctimas de una deriva política y legal absurda que impide la implementación y actualización de los programas. De las líneas de acción que surgieron hablaremos pronto en estas páginas.

La otra sesión abierta digna de especial reconocimiento, fue la organizada por el entusiasta **Nacho Belda** con la colaboración de **Ana Alastruey** sobre las actividades y perspectivas de JISEM, el grupo de trabajo de Jóvenes Investigadores. Trajeron ideas frescas que están cristalizando (su dinámica web <https://sites.google.com/site/jovenesinvestigadoressem/>, su participación en múltiples iniciativas como los Cursos de Iniciación, NoticiaSEM, las Juntas Directivas de algunos grupos, etc. etc) y, sobre todo, datos para llamar a la reflexión a una sociedad científica que no parece preocuparse de su cantera. Como los resultados de una encuesta que prueba que la inmensa mayoría de los estudiantes de Másteres en Microbiología en España ni siquiera conoce la existencia de la SEM.

Calor humano, calor meteorológico y un buen caldo de cultivo para las ideas. Bolonia ya no es la protagonista, pero el placer de enseñar, divulgar y compartir la Microbiología supuso en Alicante un paso más para la consolidación de D+D SEM, un grupo joven y con vocación de permanecer siempre joven.



XIX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

24-26 septiembre 2014, Zaragoza

Santiago Condón Usón

Presidente del Comité Organizador del Congreso



Fotografía del grupo de participantes en la puerta del Paraninfo de la Universidad de Zaragoza, sede del Congreso.

Del 24 al 26 de septiembre de 2014 se ha celebrado en el Paraninfo de la Universidad de Zaragoza la XIX edición del Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos que ha contado con casi 200 asistentes (sema-limentos2014.unizar.es).

El Congreso se inició el miércoles 24 de septiembre con la inauguración oficial presidida por el Magfco. Sr. D. Manuel López, rector de la Universidad de Zaragoza, acompañado por el Ilmo. Sr. D. José Francisco Sancho, director general de Salud Pública del Gobierno de Aragón, el Ilmo. Sr. D. Juan José Badiola, presidente de la Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria, el Ilmo. Sr. D. Francisco Javier Carballo, presidente del Grupo de Alimentos de la SEM y el Dr. Santiago Condón, presidente del Comité Organizador del Congreso.

El Congreso se estructuró en: una conferencia inaugural, diez sesiones de temas diversos, tres «workshops», una sesión de entrega de premios y una conferencia de clausura. Durante todo el Congreso los asistentes tuvieron la oportunidad de leer las 120 comunicaciones en formato de poster en la sala destinada a tal fin. La conferencia inaugural fue patrocinada por el Ilustre Consejo General de Colegios Veterinarios de España y fue impartida por el



Acto oficial de Inauguración del Congreso. De izquierda a derecha: Ilmo. Sr. D. Francisco Javier Carballo, presidente del Grupo de Alimentos de la SEM, Ilmo. Sr. D. José Francisco Sancho, director general de salud pública del Gobierno de Aragón, Magfco. Sr. D. Manuel López, rector de la Universidad de Zaragoza, Ilmo. Sr. D. Juan José Badiola, presidente de la Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria, y Dr. Santiago Condón, presidente del Comité Organizador del Congreso.

Dr. Jorge Galán, director del departamento de «Microbial Pathogenesis» de la Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, de Estados Unidos. El Dr. Galán ha sido distinguido con el premio «Robert Koch» y es miembro de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos. La charla llevaba por título: Mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* y *Campylobacter jejuni*: resultados similares para estrategias distintas». El Dr. Galán describió con detalle las estrategias seguidas a lo largo de varios años para descubrir los mecanismos de resistencia y patogenicidad de *Salmonella* Typhi y la forma de interpretar los resultados. Este descubrimiento permitirá en breve elaborar una vacuna que es esperable permita erradicar las fiebres tifoideas de nuestro planeta.

Las sesiones incluyeron consecutivamente una o varias ponencias y comunicaciones orales. La sesión I (Avances metodológicos en Microbiología de los Alimentos) fue moderada por el Dr. Javier Carballo de la Universidad de Vigo, e incluyó la ponencia: «Biología molecular de comunidades microbianas y posibles aplicaciones en microbiología de los alimentos», que corrió a cargo del Dr. Daniel López, director de laboratorio del «Institute for Molecular Infection Biology», de la Universidad de Würzburg, Alemania. A continuación se presentaron tres comunicaciones orales. En la ponencia se pusieron ejemplos de las últimas metodologías de biología molecular aplicadas en campos diversos de la microbiología, y las comunicaciones mostraron la aplicación de algunas de estas técnicas en el campo de la microbiología de los alimentos.

Las sesiones II y III (La seguridad alimentaria y la microbiología de los alimentos desde distintas perspectivas) fueron moderadas por los Dres. José Fernandez Salguero de la Universidad de Córdoba (sesión II) y Dr. Gonzalo García de Fernando de la Universidad Complutense de Madrid (sesión III), e incluyeron las ponencias «La perspectiva de los sistemas sanitarios de salud», que corrió a cargo de la Dra. Rosa del Campo, investigadora Miguel Servet del

Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid; «La perspectiva de los investigadores», a cargo del Dr. Miguel Ángel Asensio, catedrático de la Universidad de Extremadura y antiguo presidente de SEM-Alimentos; «Actividades recientes de la EFSA sobre riesgos biológicos en seguridad alimentaria», a cargo de D. Pablo Romero, «scientific officer» de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria; y «La perspectiva de las industrias agroalimentarias», a cargo de la Dra. Blanca Jáuregui, directora del departamento de I+D+i de Centro Nacional de Tecnología Alimentaria (CNTA). Las sesiones se completaron con cuatro comunicaciones orales. Los ponentes dieron su visión sobre la problemática actual y los desafíos que actualmente tiene planteados la microbiología de los alimentos, y las comunicaciones se seleccionaron para mostrar investigaciones con enfoques hasta ahora poco frecuentes en nuestro campo.

Las sesiones IV y V se dedicaron a la «Biotecnología microbiana de los alimentos». La sesión IV fue moderada por el Dr. Baltasar Mayo, investigador del IPLA-CSIC, e incluyó la ponencia «Probióticos y microbiota intestinal. De dónde venimos y a dónde vamos» a cargo de la Dra. Clara González de los Reyes-Gavilan, directora del IPLA-CSIC. En esta sesión se incluyeron cinco comunicaciones orales. La sesión V fue moderada por el Dr. Vicente Sanchís, de la Universidad de Lérida, e incluyó la ponencia «Bacterias lácticas del vino y fermentación maloláctica», impartida por el Dr. Albert Bordons, catedrático emérito de la Universidad Rovira i Virgili. La ponencia fue seguida por cuatro comunicaciones orales relacionadas con el tema microbiología/enología.

Las sesiones VI y VII se dedicaron a los «Retos microbiológicos en la industria alimentaria actual». La sesión VI se centró en productos cárnicos, fue moderada por D. Jesús García, presidente del Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Zaragoza, e incluyó las ponencias: «Descontaminación de canales» impartida por la Dra. Elena González Fandos, catedrática de la universidad de la Rioja; «*Listeria monocytogenes* en productos cárnicos», a cargo de D. Antonio Español, inspector del Servicio de Seguridad Alimentaria, Salud Ambiental y Coordinación, del Gobierno de Aragón; y «*Toxoplasma gondii* en la industria cárnica», impartida por la Dra. Susana Bayarri, profesora de la Universidad de Zaragoza. La sesión VII se centró en ovoproductos y alimentos de origen vegetal y fue moderada por el Dr. David Rodríguez del ITACyL. La sesión incluyó las ponencias: «Impacto en la salud pública de una extensión de la fecha de caducidad del huevo cáscara», a cargo de D. Pablo Romero, «scientific officer» de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria; «Descontaminación de frutas y hortalizas», impartida por Dña. Silvia García de la Torre, investigadora del Centro Nacional de Tecnología Alimentaria (CNTA); y «Descontaminación de harinas y frutos secos», a cargo del Dr. Nicolás Meneses, investigador del departamento de I+D de Buhler (Suiza). Las ponencias fueron seguidas por cinco comunicaciones que mostraban estrategias varias para resolver problemas concretos de la industria alimentaria.

La sesión VIII, titulada «Avances en fisiología microbiana de interés en microbiología de los alimentos», fue



Acto oficial de Clausura del Congreso. De izquierda a derecha: Dr. Santiago Condón, presidente del comité organizador, y Dr. Francisco Javier Carballo, presidente del Grupo de Alimentos de la SEM

moderada por la Dra. Antonia Picón del INIA, e incluyó las ponencias tituladas: «Una mirada positiva a los biofilms bacterianos», impartida por el Dr. Diego Romero, investigador de la Universidad de Málaga y del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea del CSIC; y «Respuestas adaptativas al estrés en microorganismos patógenos y sus implicaciones para la seguridad alimentaria», a cargo del Dr. Avelino Álvarez, investigador del «Teagasc Food Research Centre» de Irlanda. La sesión se completó con dos comunicaciones orales.

Las sesiones IX y X se incluyeron bajo el epígrafe general «Tecnologías emergentes y microbiología predictiva». Las sesiones fueron moderadas por el Dr. Alfredo Palop de la universidad de Cartagena. La sesión IX incluyó la ponencia «Microbiología predictiva orientada a la integración en una evaluación de riesgos microbiológicos alimentarios», impartida por el Dr. Pablo Fernández Escámez, catedrático de la universidad de Cartagena y miembro del panel de riesgos biológicos de la EFSA, que fue seguida de tres comunicaciones orales relacionadas con la aplicación de la microbiología predictiva en nuestro campo de trabajo. La sesión X incluyó una ponencia, impartida por la Dra. Mercedes López, profesora de la universidad de León, que versó sobre «Posibilidades y limitaciones del plasma frío para la conservación e higienización de los alimentos», y cinco comunicaciones orales seleccionadas para dar una idea amplia sobre nuevas tecnologías. Dos comunicaciones estaban relacionadas con los efectos de los antimicrobianos naturales en bacterias y virus entéricos, y las otras tres a la higienización/conservación de los alimentos con luz ultravioleta, altas presiones y pulsos eléctricos de alto voltaje.



Entrega del III Premio OXOID a la mejor Tesis doctoral en Microbiología de los Alimentos al Dr. Juan S. Aguirre. De izquierda a derecha: Dr. Gonzalo García de Fernando, director de la tesis, Dña. Patricia Vezina, delegada de Oxoid-Thermo Scientific en España, Dr. Javier Carballo, y Dra. Antonia Picón, presidente y secretaria respectivamente del Grupo de Alimentos de la SEM.

El congreso incluyó también tres «workshops», el primero de los cuales fue patrocinado por la empresa OXOID-Thermo Scientific, llevaba por título «PCR en Seguridad Alimentaria: Optimización del proceso» y fue impartido por Dña. Itziar Olea. El segundo día, la empresa ZEULAB patrocinó la charla: «Sistemas lab-in-box para la detección de microorganismos y antibióticos en los alimentos», que fue impartida por el Dr. Pedro Razquín, gerente de la empresa. El tercer día, el Dr. José Félix Álvarez impartió la charla «Detección de contaminación microbiana en alimentos en tiempo real: Bac-Trac», patrocinada por la empresa GOMEN-SORO.

La buena disposición de empresas y asociaciones diversas hizo posible ampliar el número de premios que tradicionalmente distinguen a trabajos y personas destacadas en nuestro campo. El «III Premio Especial del Grupo de Microbiología de Alimentos al mejor joven investigador en Microbiología de Alimentos» fue adjudicado al Dr. Ignacio Álvarez, actualmente profesor titular de la Universidad de Zaragoza por su trayectoria en el estudio de la aplicación de las nuevas tecnologías de procesado para la pasteurización y esterilización de los alimentos. Este joven investigador impartió la conferencia de clausura que llevaba por título «Tecnologías emergentes de conservación: ¿Nos olvidamos del calor?». El «III Premio de Investigación OXOID a la mejor Tesis doctoral en Microbiología de los Alimentos» recayó en la tesis doctoral titulada. «Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los supervivientes a diferentes procesos de conservación de los alimentos», de la que fue autor el Dr. Juan Aguirre y director el Dr. Gonzalo García de Fernando Minguión, y que fue realizada en la Universidad Complutense de Madrid. La ponencia que resumía el contenido de la tesis fue impartida por el director del trabajo en ausencia del premiado. El premio a la mejor comunicación del Congreso fue adjudicado a Josué Delgado de la universidad de Extremadura por su trabajo titulado «Efecto sobre la síntesis de proteínas y mecanismo de acción de la proteína antifúngica PgAFP en *Aspergillus flavus*». Por primera vez se otorgó el «Premio MICROKIT a la comunicación más innovadora» que recayó en el trabajo «Selección y optimización de las condiciones de producción de PHBs a partir de subproductos de maíz y de patata», desarrollado en el Centro Nacional de Tecnología Alimentaria (CNTA). El premio fue recogido por la Dra. Raquel Virto, directora del trabajo. Finalmente, y también por primera vez, se otorgó un premio a la comunicación de mayor interés médico, patrocinado por el Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Zaragoza. El premio fue compartido por las comunicaciones «Los fructanos tipo inulina influyen sobre las especies de bifidobacterias intestinales y el perfil de ácidos grasos de cadena corta en mujeres obesas» desarrollado en el IPLA-CSIC, y «Efecto inhibidor de metabolitos y compuestos fenólicos de extractos de arándano rojo frente a la adherencia de *E. coli* uropatógena» desarrollado en el CIAL (CSIC-UAM). Los premios fueron recogidos por los primeros firmantes, Dña Nuria Salazar y Dña Adelaida Esteban.

Durante el Congreso tuvo lugar la asamblea general del Grupo Especializado de Microbiología de los Alimentos. En la asamblea se informó a los asistentes de los resultados de las votaciones para la elección de distintos cargos de la junta directiva y se confirmaron los nombramientos. El presidente agradeció sus esfuerzos a los doctores José Fernández Salguero y el Dr. David Rodríguez que cesaban en su cargo y felicitó a los Drs Marta Pérez de ITACyL y al Dr Carlos Alonso de la Universidad de León por su elección como vocales. Igualmente felicitó a los doctores Gonzalo García de Fernando Minguillón y Antonia Picón por su reelección como vicepresidente y secretaria respectivamente. Tras valorar distintas posibilidades, se decidió que el XX

Congreso Nacional del grupo de Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología fuese organizado por el Dr. Carlos Alonso Calleja. La nueva edición se celebrará en 2016 en León.

El acto de clausura fue presidido por el Ilmo. Sr. Francisco Javier Carballo, presidente del grupo de alimentos de la Sociedad Española de Microbiología, acompañado del Dr. Santiago Condón, presidente del Comité Organizador del XIX Congreso.

En la pagina electrónica del Congreso (semalimentos2014.unizar.es) está disponible el libro de ponencias y comunicaciones, así como fotografías diversas. Esta documentación será de libre acceso.



I Premio MICROKIT a la comunicación más innovadora, desarrollada en el CNTA. De izquierda a derecha: Dra. Raquel Virto, directora de la investigación y Dr. Javier Carballo, presidente del Grupo de Alimentos de la SEM.



Entrega del Premio a la comunicación de mayor interés médico, que fue compartido por Dña. Nuria Salazar y Dña. Adelaida Esteban. De izquierda a derecha: Dra. Antonia Picón, secretaria del Grupo de Alimentos de la SEM, las premiadas, y Dr. Javier Carballo, presidente del Grupo de Alimentos de la SEM.



Premio a la mejor comunicación del Congreso a D. Josué Delgado. De izquierda a derecha: Javier Carballo, presidente del Grupo de Alimentos de la SEM, el premiado y Dra. Antonia Picón, secretaria del Grupo de Alimentos de la SEM.



Entrega del III Premio Especial del Grupo de Microbiología de los Alimentos a jóvenes investigadores al Dr. Ignacio Álvarez. De izquierda a derecha: Dr. Javier Carballo, presidente del Grupo de Alimentos de la SEM, Dr. Ignacio Álvarez y Dra. Antonia Picón, secretaria del Grupo de Alimentos de la SEM.

X Congreso de Microbiología del Medio Acuático

Juan José Borrego

Universidad de Málaga. Presidente del Grupo



El X Congreso SEM de Microbiología del Medio Acuático (MMA) se celebró con éxito en las ciudades de **Elche y Orihuela**, los días **7 al 9 de septiembre de 2014**. El Centro de Congresos Ciudad de Elche albergó la mayor parte del programa del Congreso, mientras que la conferencia de clausura tuvo lugar en el centenario Ateneo Cultural Casino Orcelitano de Orihuela. Al evento asistieron investigadores especialistas en microbiología de aguas, tanto del ámbito académico como de empresas relacionadas con el sector. La conferencia de apertura titulada «Importancia sanitaria de *Arcobacter*» fue presentada magistralmente por el Dr. Arturo Levican Asenjo, Universidad Andrés Bello, Chile, que recibió el premio a la mejor tesis doctoral otorgado por el Grupo MMA. El invitado de honor, Dr. Vicente Catalán Cuenca, Director de I + D + i en Labaqua S.A., fue el encargado de poner el broche final del Congreso con su conferencia de clausura titulada «Métodos rápidos para el control microbiológico de la calidad del agua potable».

Fue destacable la implicación de los investigadores jóvenes en las 5 sesiones (Patología de especies acuícolas I y II, Biodiversidad, Innovación tecnológica, y Ecología) en las que se distribuyeron las 43 comunicaciones orales que tuvieron lugar durante el Congreso. El Grupo MMA, que también celebró su Asamblea, concedió un premio a la mejor comunicación de cada una de las 5 sesiones. Asimismo se entregó el II Premio Mikrokit a la mejor comunicación de la especialidad.

Los congresistas participaron en diversos actos sociales como la recepción de bienvenida en el palmeral de Elche y visita al centro de la ciudad, el paseo por la monumental Ciudad Orihuela, destacando la visita a su Universidad Histórica (s. XVI) con categoría plena de Universidad Pública de todas las ciencias y artes desde 1569, equiparada con las Universidades de Salamanca, Alcalá de Henares y Valencia.

El Congreso culminó con la cena de clausura en el exclusivo enclave de los jardines del Hotel Huerto del Cura.

La organización del congreso fue responsabilidad del Dr. Antonio Martínez-Murcia, con la eficaz e inestimable ayuda de su equipo, D^a Gema Bru, D^a Alicia González, D^a Lyudmyla Korenyuk, y D. José Antonio Serrano, actuando como secretario el Dr. Aaron Navarro, todos de la empresa de base tecnológica Genetic Analysis Strategies S.L. La calidad científica fue considerada de excelencia y avalada con la ayuda del Comité Científico formado por: Dr. Juan José Borrego García (Presidente; Universidad de Málaga), Dr. Anicet Blanch Gisbert (Universidad de Barcelona), Dr. Albert Bosch Navarro (Universidad de Barcelona), Dr. Antonio Camacho Gonzalez (Universidad de Valencia), Dr. Vicente Catalán Cuenca (Labaqua), Dra. Maria José Figueras Salvat (Universidad Rovira i Virgili), Dra. Silvia González Acinas (Instituto de Ciencias del Mar), Dr. José Agustín Guijarro Atienza (Universidad de Oviedo), Dr. Jesús López Romalde (Universidad de Santiago de Compostela), Dra. Consuelo Esteve Sánchez (Universidad de Valencia), Dra. Rosa M. Pintó Solé (Universidad de Barcelona), Dra. Maria Jesús Pujalte Domarco (Universidad de Valencia), Dr. Francisco Rodríguez Valera (Universidad Miguel Hernández) y Dr. Antonio Sánchez Amat (Universidad de Murcia).

Finalmente, un agradecimiento a las instituciones que hicieron posible el X Congreso MMA, con su apoyo y colaboración, como fueron la Universidad Miguel Hernández, el Excmo. Ayuntamiento de Elche y el Excmo. Ayuntamiento de Orihuela; con especial mención a las empresas Labaqua S.A., Bertin Technologies, y el Ateneo Cultural Casino Orcelitano de Orihuela.



Acto de Inauguración.



Universidad Histórica de Orihuela (S.XVI).

El Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología

Una propuesta de la **SEM** que no pierde su tirón entre los **futuros científicos**

Inés Arana y Maite Orruño

Organizadoras del curso. Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

La apuesta de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) por el estímulo de las vocaciones científicas entre los estudiantes interesados en la investigación en Microbiología ha continuado con la celebración del XVIII Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología (CIIM2014). El curso se celebró en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Leioa) entre los días 18 y 20 de Junio de 2014 con el patrocinio de la Fundación Ramón Areces y del Vicerrectorado de Campus de Bizkaia (UPV/EHU) y la colaboración de la Facultad de Ciencia y Tecnología.

Edición tras edición, los alumnos seleccionados disfrutaban de una beca que incluye la inscripción al curso y alojamiento y manutención durante la celebración del mismo. Desde el curso pasado, además, los alumnos seleccionados tienen abonada su inscripción en el siguiente Congreso Nacional de la SEM que se celebra bianualmente, en este caso en el año 2015.

El análisis de la información derivada de la preparación y organización del curso se ha realizado siguiendo las pautas establecidas por Llagostera y Barbé, organizadores del curso en 2013. En esta edición, se recibieron 78 solicitudes con un amplio origen geográfico (Figura 1), destacando por su número los solicitantes provenientes de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (21%) y de la Universidad de Granada (14%). El elevado porcentaje de solicitudes recibidas desde la UPV/EHU puede atribuirse al hecho de ser la sede del curso y la difusión y publicidad realizada por los profesores del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología en los diferentes grupos de docencia.

De entre las solicitudes admitidas, el 77% correspondieron a alumnos que cursaban el último año de Grado o de Licenciatura (Figura 2), fundamentalmente de titulaciones de Biociencias (Biología, Bioquímica, Biotecnología o del nuevo Grado de Microbiología). Esta situación es muy similar a la detectada el curso pasado (Llagostera y Barbé, 2013, SEM@foro 56).

El análisis de la distribución por nota de los solicitantes se ha realizado considerando únicamente las notas de Grado o de Licenciatura. Nuevamente, la distribución es similar

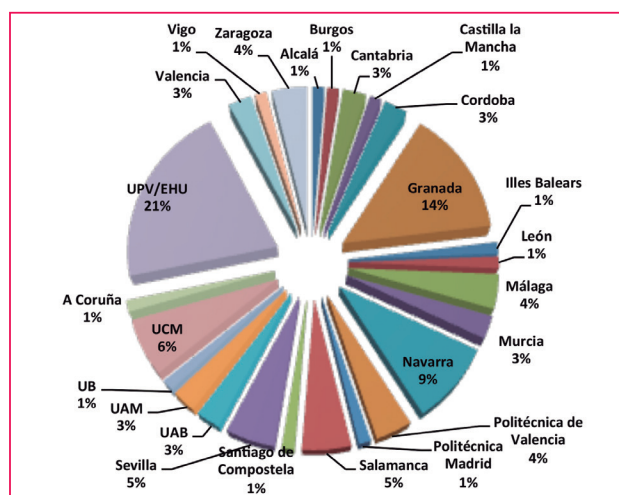


Figura 1. Distribución por Universidades, expresada en porcentaje, de las solicitudes de inscripción recibidas.

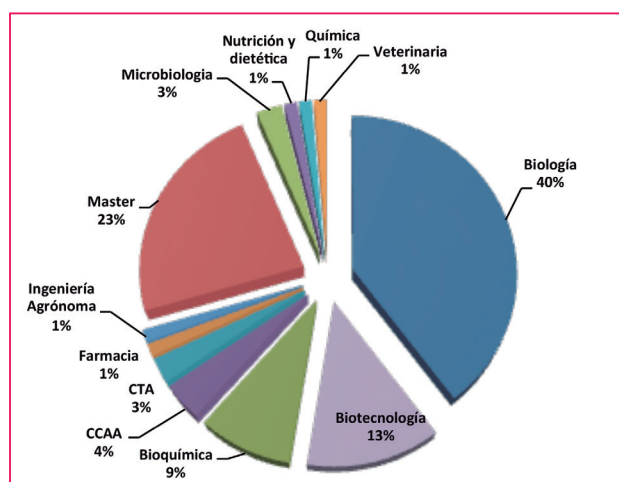


Figura 2. Distribución atendiendo a los estudios en curso, expresada en porcentaje, de las solicitudes de inscripción recibidas.

a la obtenida el curso pasado, primando las solicitudes de alumnos con buenos expedientes (34% con notas superiores a 8). Resulta destacable que muchos de los solicitantes alegaron y demostraron otros méritos como estancias en el extranjero, realización de prácticas externas, becas, participación en congresos nacionales e internacionales o artículos, indicativo de que nuestros estudiantes sobresalientes tratan de ampliar y mejorar sus *currícula*.

Como es habitual se seleccionaron 20 alumnos atendiendo a su expediente y considerando, además, los méritos demostrados y a primar la diversidad en las universidades de origen de los solicitantes. Asimismo, al curso han asistido 8 alumnos invitados que han participado de todas las actividades. Dentro de este último grupo, la mayoría pertenecían a la UPV/EHU dado el apoyo económico recibido de la misma.



Figura 3. Alumnos del curso participando en diferentes actividades, en el aula y en la bodega.

En esta edición se incorporaron, como novedad, dos ponencias «Ética en la investigación como indicativo de calidad de la investigación universitaria» e «Iniciando una carrera investigadora». La primera de estas ponencias se seleccionó debido a la importancia creciente a las consideraciones éticas, en especial bioéticas, en cualquier investigación y a la aparición en los últimos años de una legislación que regula estas cuestiones que todo investigador precisa conocer. La segunda de las ponencias incorporadas deriva de la petición realizada por los alumnos de la edición anterior del curso y contó con la colaboración del Grupo de Jóvenes Investigadores de la Sociedad Española de Microbiología (JISEM) a quienes agradecemos su apoyo. Esta ponencia fue impartida por el Dr. David Pérez-Pascual, alumno del IX Curso quien describió su recorrido investigador, y la de otros compañeros, desde la realización del curso hasta el momento actual, haciendo hincapié en la motivación que supuso el curso para ellos y en la red de contactos que establecieron a raíz del mismo. El interés suscitado por ambas ponencias se reflejó en el debate abierto entre alumnos, profesores e investigadores acompañantes que tuvo lugar al término de las mismas.

Queremos resaltar y agradecer la participación en los debates de los ponentes que nos acompañaron durante los tres días (Dr. Antonio Ventosa y Dr. David Pérez-Pascual) o de investigadores que asistieron a diversas ponencias (Dr. Julio Abalde y el investigador Ikerbasque, Dr. Vladimir Kabardin).

Como colofón del curso, alumnos y organizadores asistimos como invitados a la conferencia (Premio Fleming) «La pared fúngica es esencial en la regulación de la citocinesis» impartida por el Dr. Juan C. Ribas en el XII Congreso Nacional de Micología.

Como actividad relacionada con la Microbiología se programó una visita a una bodega de *txakoli* con el acompañamiento del enólogo D. Agustín Olazabalaga, en principio de una duración de 90 minutos. Esta visita se prolongó por espacio de más de dos horas debido al interés especial que suscitó el Laboratorio de Microvinificaciones. En este laboratorio, los alumnos recibieron explicaciones, ilustradas con los materiales y aparataje presentes, acerca de escalado, inoculación, selección de cepas, etc., pudiendo conocer de cerca la aplicación industrial de los conocimientos de Microbiología.

Al finalizar el curso, se solicitó a los alumnos que cumplimentarán la encuesta ya utilizada el curso anterior. En ella se recababa información acerca de aspectos tales como organización, alojamiento, nivel de las ponencias, etc.;

incluyendo un apartado para que los alumnos expresarán su opinión más libremente. Este modelo de encuesta nos pareció adecuado ya que, en su edición anterior, sirvió para detectar la necesidad de información acerca de los modos de iniciar una carrera investigadora. En base a esa información se incluyó una de las ponencias del curso actual.

Al igual que en el curso anterior, el grado de satisfacción del alumnado es elevado. Si bien, tal y como se deduce de los comentarios adicionales hay aspectos a mejorar o reconsiderar.

Entre los puntos que más agradaron a los alumnos se encuentran la visita y la relación con profesores y otros alumnos asistentes. Entre los aspectos peor puntuados o sugerencias a mejorar se encuentran la disparidad en la apreciación del nivel o interés de las ponencias. Creemos que este hecho es atribuible al diferente nivel académico del alumnado, alumnos de último curso de Grado y de diferentes Grados con un número mayor de créditos relacionados con la Microbiología impartidos; último curso de Licenciaturas que incluyen un año más de docencia; y alumnos que acaban de finalizar un Máster fundamentalmente relacionado con Microbiología, lo que implica una cierta especialización. Estas diferencias se traducen en un nivel distinto de conocimientos microbiológicos que pudieran incidir en su apreciación del nivel docente de las ponencias.

Otra de las sugerencias es la necesidad de impartir docencia práctica. Para este comentario encontramos que el diferente nivel académico de los alumnos dificultaría enormemente la decisión del tipo de prácticas, además de incrementar notablemente los costes del curso.

Finalmente, desde la organización queremos resaltar que, si bien, ha sido una actividad exigente y estresante por momentos, también ha sido muy enriquecedora y gratificante. Por ello, animamos a otros docentes/investigadores a organizar las próximas ediciones y/o a participar de esta actividad.

AGRADECIMIENTOS

Sociedad Española de Microbiología.

Fundación Ramón Areces.

Vicerrectorado de Campus de Bizkaia de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

Vicerrectorado de Proyección y Transferencia de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

Dr. Guillermo Quindós y organización del XII Congreso Nacional de Micología (Bilbao 2014).



Ciudadano Ébola

Un **pequeño repaso** al tratamiento periodístico de la reciente **crisis de salud pública**

Manuel Sánchez Angulo

Universidad Miguel Hernández, Elche

m.sanchez@umh.es

Mientras escribo este artículo se ha confirmado que Teresa Romero ha superado la infección del virus Ébola y su marido ha dado una rueda de prensa tras pasar la cuarentena preceptiva. Han transcurrido más de 80 días desde que el pasado 7 de agosto se repatrió a los misioneros cooperantes Juliana Bonoha Bohé y Miguel Pajares, comenzando lo que se ha dado en llamar como la «crisis del Ébola». Aún no se ha dado por finalizada, y probablemente no se debería bajar la guardia hasta que este brote epidémico de Ébola desaparezca de África. Durante estas 12 semanas, raro ha sido el día en que no ha aparecido una noticia dedicada al virus en alguno de los principales medios de comunicación, fueran estos la prensa escrita, la radio, la televisión o algún medio digital (en la SEM hemos creado una página web donde se recogen algunas: <http://bit.ly/1wJPPHU>). Como suele suceder en este tipo de crisis, de la noche a la mañana España se convirtió en el país con más «expertos por metro cuadrado» en Microbiología, Virología, Epidemiología, Bioseguridad y Salud Pública ¡sin haber siquiera estudiado una carrera! Afortunadamente, poco a poco los diversos medios de comunicación comenzaron a entrevistar a alguno de nosotros cuando buscaban una opinión fundamentada sobre algún aspecto científico, epidemiológico o terapéutico de la situación.

En la pasada Reunión sobre Docencia y Difusión celebrada durante el 5 y 6 de septiembre en Alicante (<http://bit.ly/10AWPE0>) se realizó un interesante taller dirigido por los profesores Kika Colom y Enrique Perdiguer y dedicado a la difusión de las noticias de Microbiología en los medios de comunicación. El taller consistió en analizar diversas noticias sobre el brote de Ébola que habían sido clasificadas previamente en diez categorías. Una de esas categorías era «El Ébola en España», pero casi todas las demás estaban relacionadas con la situación en África. En ese momento, la situación en nuestro país parecía totalmente controlada. Juliana Bonoha había superado la cuarentena y ya había dejado el hospital mientras que el médico Manuel García Viejo no sería repatriado hasta el 22 de septiembre. Creo que nadie pensó que algunas de las situaciones que comentamos como algo que sucedía en unos países lejanos y en

vías de desarrollo, podría reproducirse aquí como el reflejo en un espejo. Veamos algunos ejemplos:

ASPECTOS TÉCNICOS

Hay que reconocer que hay muchos medios de comunicación, digitales y audiovisuales, que han intentado dar una información sobre el virus Ébola y la enfermedad que causa, lo más científica e informativa posible. RTVE dedicó una serie de documentales de *La Noche Temática* a explicar la epidemia (<http://bit.ly/1E33XHh>). Y los diferentes periódicos han publicado en sus webs una serie de gráficos interactivos muy cuidados que probablemente serán utilizados por más de un docente (ejemplos en El País: <http://bit.ly/1LQZQDK>, y El Mundo, <http://mun.do/1zfMMSW>).

VACUNAS Y TRATAMIENTOS

Aunque cuando dimos el taller lo que estaba en boca de todos era el famoso «suero curativo» (<http://bit.ly/1kvRI0a>), lo cierto es que son varios los tratamientos y vacunas que se estaban desarrollando en diversos laboratorios del mundo. Ya en el año 2011 se anunció el desarrollo de una vacuna efectiva en ratones (<http://bit.ly/1Dvhk08>). Sin embargo la actual epidemia ha cambiado mucho las cosas: por un lado ha provocado que se aceleren los procesos de examen de los diferentes tratamientos, que se autorice el uso compasivo de los mismos (<http://bit.ly/1rsXjkl>) o que se prueben nuevas combinaciones (<http://bit.ly/1vhGAmH>). Finalmente también ha causado que se destinen más fondos a la investigación básica en esta enfermedad (<http://1.usa.gov/107IkY0>).

COERCIÓN

En esta categoría se incluían las noticias en las que los gobiernos o autoridades públicas aplicaban medidas de Salud Pública por la fuerza. El 20 de agosto de 2014, se publicaba en «El País» una noticia sobre las protestas frente a las medidas de cuarentena en Liberia y se acompañaba

de una foto de un soldado reprimiendo a un manifestante (<http://bit.ly/1wb6iNV>). Una imagen bastante parecida podríamos ver en la noticia del 8 de octubre dedicada a las manifestaciones que se oponían al sacrificio del perro «Excalibur» (<http://bit.ly/1zFp8k1>).

EFFECTOS COLATERALES

El Ébola no es la peor desgracia que sufre el continente africano. Como se apunta en la columna de opinión de Quique Bassat «Ébola: la canción del verano» (<http://bit.ly/1tCKAl8>), esta enfermedad puede distraernos de otros desastres y enfermedades como son la tuberculosis, la malaria, el hambre o la pobreza. Aquí hemos padecido el mismo efecto. Así, la noticia del fallecimiento de diez personas por un brote de legionelosis en Sabadell, que ha sido considerado como el peor desde el año 1985, ha pasado casi completamente desapercibida (<http://bit.ly/1w2rjcf>).

MIEDO INTERNACIONAL

Desde que en marzo comenzó el brote de Ébola las diferentes autoridades sanitarias de organizaciones como la OMS o el CDC, no han parado de decir que el riesgo de un brote del virus en países no africanos es casi nulo, y que en caso de que se produjera el riesgo de extensión sería muy limitado (<http://bit.ly/1pOcAPA>). En la revista *The Lancet* se publicó un artículo (<http://bit.ly/10hYxd5>) en el que se insistía que las medidas de restricción más efectivas eran en las impuestas en los aeropuertos de los países afectados por el Ébola, y no en los aeropuertos de destino. A pesar de ello, las medidas de control no han cesado de aumentar en todos los países, llegándose a extremos como el de la prohibición de que un español entrara en Corea del Norte por considerar a nuestro país como zona de riesgo (<http://mun.do/1wDFZjx>).

COOPERACIÓN INTERNACIONAL

Una vez más se ha vuelto a cumplir la frase que dice que el primer mundo no se ocupa de las enfermedades del tercer mundo hasta que éstas no llaman a su puerta (<http://bit.ly/1tiin9M>). Algunas voces dentro de la propia OMS han reconocido que su gestión no ha sido la más adecuada (<http://mun.do/1ptY1yA>). Lo que está quedando claro es que la mejor forma de combatir a la enfermedad es poner el mayor número posible de medios humanos y materiales en los países más afectados, sobre todo mejorando los sistemas de salud pública (<http://mun.do/1vW6TQZ>). El propio Obama ha tomado la determinación de poner 750 millones de dólares y movilizar un contingente de 3000 militares entrenado en biodefensa y llevarlo a África usando las bases militares en el Mediterráneo (<http://bit.ly/1ZpqfUJ>).

HÉROES Y VILLANOS

En toda tragedia siempre hay unos héroes a los que ensalzar y unos villanos a los que vilipendiar. Hay que



reconocer que estamos teniendo mucho de la primera, pero desgraciadamente también de la segunda. Los médicos y el personal sanitario han recibido una atención especial y merecida por parte de la prensa. Una de las noticias más llamativas fue publicada en agosto y trató de la muerte de cinco médicos y enfermeras que habían firmado como autores en un artículo publicado en *Science* (<http://bit.ly/1paUMKI>). También han sido frecuentes las entrevistas a médicos y cooperantes que están luchando contra la epidemia en los países más afectados (<http://mun.do/103jnMq> y <http://bit.ly/10zeGet>). Asimismo, son muchas las entrevistas que se han realizado a los miembros del equipo médico que trató a Teresa Romero (<http://bit.ly/1rSRZZc>). En el lado oscuro probablemente la noticia más representativa sea la de las inaceptables declaraciones del Consejero de Sanidad de la Comunidad de Madrid (<http://mun.do/1vqZRav>) pero aquí también deberíamos incluir a las personas que han intentado crear el pánico en la sociedad mediante la difusión de bulos por las redes sociales en la que incluso han falsificado noticias o suplantado identidades de científicos (<http://bit.ly/1tDCLeT> y <http://bit.ly/1sDQGw9>). O también a los charlatanes que venden «curas milagrosas» sin ninguna base científica (<http://bit.ly/1ndZXzk>).

IGNORANCIA Y ALARMISMO

Una característica común a muchas epidemias es el miedo, y el miedo provoca que las personas tengan comportamientos irracionales. En agosto nos sorprendíamos con algunas imágenes y noticias que hablaban de asaltos en hospitales africanos para expulsar a los enfermos por Ébola (<http://mun.do/1o3Xdyk>). O también de la expansión de la infección debido a algunas de las costumbres funerarias de las diversas etnias o cultos (<http://bit.ly/1tbVBYS>). Eran muchas las personas que pensaban que eso no podía pasar aquí. Sin embargo a partir del 5 de octubre pudimos comprobar que nuestra sociedad «del primer mundo» no era tan distinta. Hubo un colegio que se negó a admitir a la hija de una enfermera del hospital de Alcorcón donde habían atendido a Teresa Romero (<http://mun.do/1veAzMx>). Por si fuera poco, se generó un auténtico pánico que provocó

que muchas peluquerías perdieran sus clientes (<http://bit.ly/1sGRZuz>). Y más recientemente, el presidente del Consejo General de Enfermería ha denunciado que hay personal sanitario que evita el contacto con sus propios compañeros del Hospital Carlos III (<http://mun.do/1wdKelN>). También ha habido comportamientos esperpénticos como la aparición en TVE de la actriz Ana Obregón diciendo que se había comprado por internet dos «trajes anti-ébola» por miedo al contagio (<http://bit.ly/1E3rgkm>).

HISTORIAS PERSONALES

Uno de los más conocidos recursos periodísticos para acercar al gran público los efectos de un suceso trágico, es realizar una extensa entrevista o publicar un reportaje sobre alguno de sus protagonistas. Algunas veces tenemos ejemplos de cómo no deberían hacerse dichos reportajes, como es el caso de la infortunada entrevista en directo que realizó Jesús Cintora a una convaleciente Teresa Romero (<http://bit.ly/1tiFego>). Pero en líneas generales esas entrevistas están bien realizadas y no son tan improvisadas, lo que nos ha permitido conocer el «lado humano» de los diferentes aspectos de esta crisis: el punto de vista de la repatriada Juliana Bonoha (<http://bit.ly/1tSB7Y6>), el esfuerzo de los cooperantes que siguen trabajando en África (<http://mun.do/1wHBFZ7>), cómo continúa la vida de aquellos que han conseguido superar la enfermedad (<http://bit.ly/1FZp27q> y <http://bit.ly/1sMAFaQ>), el rechazo que sufren aquellos sanitarios que han tratado a los enfermos (<http://mun.do/1E5Xprv>), qué es lo que han hecho algunos políticos para frenar la epidemia (<http://mun.do/1nGlPDG>) y por supuesto la forma en que los médicos y científicos han abordado a la enfermedad (<http://bit.ly/1pHnMvb> y <http://bit.ly/1w08vjQ>).

En resumen podríamos decir que la cobertura informativa, al menos de los medios escritos, ha sido completa, diversa y correcta en líneas generales. Y gracias a ellos hemos comprobado una vez más que los seres humanos somos capaces de realizar comportamientos execrables, pero que afortunadamente, son mucho más abundantes los comportamientos ejemplares.



2014

Año de la Biotecnología

Francisco Javier Pastor

Presidente del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

El Año de la Biotecnología, con mayúsculas, está finalizando. El parlamento español, recogiendo una solicitud previa de 4 sociedades científicas españolas, declaró el año 2014 como «**Año de la Biotecnología en España**». Detrás de esta declaración está la iniciativa de la Federación Española de Biotecnólogos (FEBiotec), con el apoyo de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBiot), la Sociedad Española de Microbiología (SEM) y la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO). La declaración nombra a la biotecnología como protagonista destacada en la vida española en 2014. El objetivo es impulsar el desarrollo biotecnológico en todas sus facetas, investigación, enseñanza, divulgación, transferencia y, como no, producción industrial. De hecho, se reconoce la creciente implicación de la biotecnología en la sociedad española y el crecimiento del sector biotecnológico en España. La aceptación e interés social por la biotecnología es evidente por la gran cantidad de estudiantes que se matriculan cada año en la titulación «Grado en Biotecnología», que pese a su juventud en el panorama universitario español se imparte en 18 universidades públicas y 6 privadas, en dos de ellas recién estrenado, y del que ya han salido varias promociones de graduados. También hay un buen número de universidades que imparten Másteres y otros Estudios de Postgrado en las distintas vertientes de la biotecnología. Tienen gran aceptación entre los graduados y profesionales de ámbitos cercanos para aproximarse y actualizar los conocimientos en biotecnología, en constante expansión. Respecto a la implicación de la biotecnología en el tejido industrial español, hay que destacar el crecimiento en el número de empresas de biotecnología y de productos biotecnológicos en el mercado nacional. Según el informe Anual ASEBIO 2013, presentado en julio de 2014, la facturación de las empresas de biotecnología o que la usan (bioeconomía) alcanzó el 7,8% del PIB del año 2012, año en el que se

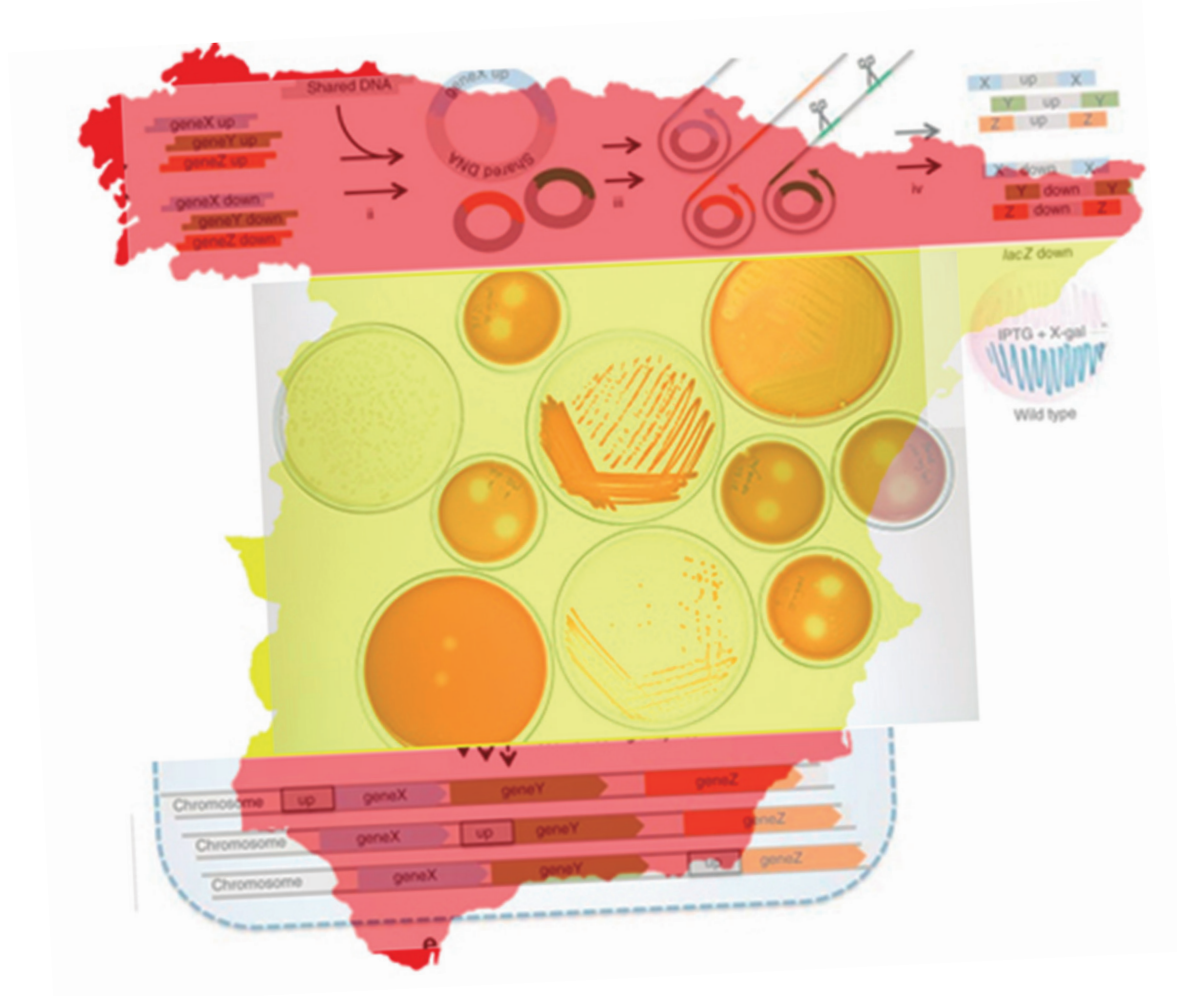
publicaron más de 900 patentes. Estos datos avalan la importancia del sector biotecnológico en nuestro país.

Durante este año se han realizado un gran número de actos y eventos relacionados directamente con la biotecnología. Cabe destacar los Congresos, Conferencias o Workshops Internacionales especializados en las distintas áreas de la biotecnología que se celebraron en España. Entre ellos merece mencionarse el Congreso ANQUE-ICCE-BIOTEC 2014 organizado conjuntamente por Sociedad Española de Biotecnología y la Asociación Nacional de Químicos de España (ANQUE). El Congreso fue simultáneamente un evento de la Federación Europea de Ingeniería Química, y contó con importante participación de científicos nacionales y extranjeros, y de empresas de biotecnología. Se realizaron ponencias, conferencias y mesas redondas en los aspectos más innovadores de investigación en bioenergía, biorefinerías, biocatálisis, sostenibilidad, ingeniería de sistemas, nanotecnología, biomateriales, biotecnología ambiental, gestión de recursos hídricos, biotecnología de alimentos, biotecnología vegetal, sistemas de diagnóstico, nuevas terapias, y un largo etcétera de temáticas de biotecnología que sin duda reflejan la buena salud del entramado científico y empresarial español. A escala nacional, el Congreso CMIBM'14, del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM, presentó también las temáticas más relevantes de la biotecnología y contó con una importante participación de científicos y la nutrida afluencia de jóvenes investigadores. La coincidencia de Congresos celebrados durante este año con el 25 aniversario de la Sociedad Española de Biotecnología es sin duda significativa de la relevancia de la biotecnología en el momento actual.

Uno de los eventos del año ha sido la celebración del Biotech Annual Congress 2014 (BAC2014) en Barcelona, organizado por la Federación Española de Biotecnólogos.

Este ha sido el octavo Congreso organizado por esta federación, que se inició como Congreso Interuniversitario de Biotecnología dirigido a estudiantes, y que se ha ampliado progresivamente a profesionales de biotecnología. El Congreso contó con ponencias de científicos de elevado prestigio nacional e internacional, entre ellos el Dr. Werner Arber (Premio Nobel de Medicina y Fisiología). Tuvo una notoria participación juvenil, con un elevado porcentaje de estudiantes de grado y postgrado de distintas universidades españolas. La juventud de los asistentes al Congreso fue uno de los aspectos más interesantes y al mismo tiempo sorprendente del mismo (tuve la oportunidad de coincidir con alumnos de asignaturas que imparto en el grado). La gran participación y el elevado nivel de las preguntas que formularon los estudiantes son un claro indicativo de la preparación e interés en problemas biotecnológicos en el sector estudiantil. La extensa masa crítica de académicos, investigadores, y profesionales que se ha formado en las últimas décadas en España puede contar con una nutrida fuente de recursos humanos, basada en las nuevas generaciones de universitarios preparados y cualificados que la Universidad está produciendo continuamente. El futuro

del desarrollo biotecnológico parecería asegurado, a no ser por los recientes problemas de financiación a la ciencia en general y a la biotecnología en particular. Las entidades públicas tanto estatales como autonómicas deben inyectar recursos financieros en investigación, desarrollo e innovación para evitar que la coyuntura económica deteriore el excelente tejido científico y tecnológico actual, conseguido con el importante esfuerzo de la sociedad española. Las empresas biotecnológicas constituyen un factor clave tanto por su inversión en I+D+i como por su contribución a la economía nacional. Las Administraciones deben encontrar fórmulas e incentivos para facilitar su actividad y promover el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos de valor. El futuro de la Biotecnología depende de que las nuevas promociones de graduados, doctores y científicos puedan satisfacer sus aspiraciones profesionales en puestos acordes con su preparación. En empleos cualificados que permitan el retorno, en forma de desarrollo biotecnológico y social, de la inversión económica y humana que ha supuesto su formación. Confiamos que la declaración de Año de la Biotecnología, aparte de testimonial, sirva de incentivo para consolidar la biotecnología en nuestro país.





Sociedad Española de BIOTecnología



Mario Díaz¹



María J. Hernáiz²

¹Presidente de SEBiot. ²Secretaria General de SEBiot

La Sociedad Española de Biotecnología se fundó hace 25 años para promover el desarrollo de la Biotecnología en todas sus ramas y actividades. Durante este tiempo SEBiot ha sido testigo y partícipe de la gran evolución del campo y de forma permanente ha trabajado para transmitir sus avances a través de publicaciones, congresos y actividades formativas.

La promoción de la I+D de la Biotecnología tiene una palabra perfectamente descriptiva para SEBiot: transferencia. Procuramos la transferencia, o colaboración, entre las distintas entidades científicas públicas y privadas entre los diferentes campos científicos (biológicos, químicos, físicos, ingenieriles o sociales). En la práctica, esa es efectivamente una de las características de la Biotecnología, la conjunción e intercambio de conocimientos entre áreas diferentes que buscan la aplicación de conocimientos sobre materiales biológicos. La concepción más usual de transferencia entre las ciencias y la tecnología, y finalmente hacia la empresa, es muy evidente y está resultando muy fructífera en biotecnología. La colaboración con las empresas y la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO) para esta transferencia a la empresa ha tenido muchos ejemplos, y sin duda tiene un futuro brillante.

Por otra parte, la promoción de la Educación de la Biotecnología ha sido otra constante en estos 25 años, a través de cursos y seminarios para estudiantes. SEBiot ha estado muy preocupada por la formación universitaria de la Biotecnología y ha sido un elemento fundamental en su definición y conceptualización. La titulación en Biotecnología en España fue promovida prácticamente desde los inicios de SEBiot, y se galvanizó con su establecimiento en la Universidad Autónoma de Barcelona en 1999, con el empuje de Carles Solà, presidente «in pectore» de SEBIOT.

A partir de ahí, SEBiot siempre ha apoyado el desarrollo de la Asociación de Estudiantes de Biotecnología (FEBIOTEC) en todas las formas posibles, estructurales y económicas. La difusión social se ha tratado en forma desigual en estos 25 años a través de la impartición de conferencias, apoyo en páginas en red, o la elaboración de documentos o libros de difusión e incorporación de las nuevas tecnologías on line.

Por todo ello, el reconocimiento en España del Año Nacional de la Biotecnología (ANB-2014) tiene para SEBiot dos visualizaciones. Por un lado sentimos que es el resultado del trabajo de mucha gente durante mucho más de 25 años, demostrando la potencia y vigor que ha adquirido la Biotecnología en España. Por otro lado, ANB-2014 es para SEBiot una nueva oportunidad de seguir contribuyendo, con nuestras capacidades, al desarrollo de la Biotecnología.

Este año ANB-2014 seguiremos trabajando con mayor ilusión ya que es un año de felicitación para todos los que hemos contribuido a ello.



Mesa presidencial del Congreso SEBiot 2014 en Madrid.

2014

BIOSPAIN

asebio



Dra. María del Mar González Garcés

Técnico de Gestión Dpto. Microbiología II
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid



En palabras de su organizador clave, ASEBIO, BIOSPAIN es el mayor evento biotecnológico organizado por una asociación nacional de la industria y uno de los más importantes del mundo en cuanto a empresas participantes. En su edición de 2014 en Santiago de Compostela, una serie de instituciones locales coordinadas

por la Xunta de Galicia participaron en la organización.

Del 24 al 26 de septiembre se ha celebrado el VII Congreso Internacional de Biotecnología organizado por la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO), bajo la etiqueta ya consolidada de **Biospain 2014**, en la Ciudad Universitaria de Santiago de Compostela con la colaboración de más de 800 entidades privadas y públicas.

El miércoles 24 la ministra de Sanidad, Ana Mato fue recibida por Regina Revilla, presidenta de ASEBIO y visitó Biospain acompañada del presidente de la Xunta, Alberto Núñez Feijóo, del Rector de la UIMP, César Nombela Cano y unos 20 consejeros autonómicos de salud, economía, alimentación y medio ambiente.

Uno de los platos fuertes de estas jornadas giró en torno al décimo aniversario del Instituto Roche, que permitió escuchar a científicos tan destacados como Gerardo Jiménez-Sánchez de la Harvard School of Public Health, que inauguró un ciclo de conferencias centradas en los avances en medicina personalizada que podremos esperar la próxima década.

Los participantes al congreso pudieron relacionarse con las empresas colaboradoras mediante entrevistas concertadas facilitadas a través de un sistema «one to one» durante los tres días de la celebración. Este sistema de *meetings*, usado desde 2004, ha experimentado un crecimiento exponencial de participación superando las 2.500 entrevistas que hubo en Biospain Bilbao 2012.

Biospain también contó con el II Foro de Formación y Empleo, espacio que tiene como objetivo ofrecer una zona de encuentro para que los estudiantes del sector interactúen con empresas biotecnológicas para explorar oportunidades de empleo y con centros de formación para conocer su oferta formativa especializada en Biotecnología.

Durante estos días la Biotecnología española peregrinó a Santiago de Compostela, ofreciendo una imagen de fortaleza en el sector, uno de los menos castigados por los tiempos de crisis, quizás por su sorprendente capacidad emprendedora, la calidad de su capital humano y su adecuación a la demanda tecnológica que caracteriza a nuestros tiempos.

biospain
2014

7th INTERNATIONAL
MEETING ON
BIOTECHNOLOGY



Biomasa y Biotecnología

José Luis García y María Jesús Martínez

Dpto. Biología Medioambiental. Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid

El concepto de biomasa nos resulta muy familiar aunque posiblemente no todo el mundo lo defina de la misma manera. El glosario de términos de la OCDE define la biomasa como «la cantidad de materia viva de origen vegetal o animal presente en un momento dado en un área determinada». Pero la definición de biomasa que se utiliza en las directivas de la Unión Europea (UE) es diferente ya que se define como «la fracción biodegradable de productos, desechos y residuos de la agricultura (incluyendo sustancias vegetales y animales), silvicultura e industrias relacionadas, así como la fracción biodegradable de los residuos municipales e industriales». Finalmente, otras definiciones inciden en su valor energético y consideran que la biomasa es «la materia orgánica que puede ser convertida en combustible y es por lo tanto considerada como una fuente potencial de energía».

Independientemente de que la biomasa proceda de seres vivos o muertos recientemente, o sea más o menos biodegradable, o derive de residuos de diferentes actividades industriales o urbanas, es evidente que en estos momentos existe un enorme interés por la utilización sostenible de toda la biomasa que se genera continuamente en el planeta. En primera instancia gran parte de esta biomasa la utilizamos para alimentarnos, para mantener nuestra salud o para otros muchos fines industriales, pero en todos estos procesos se generan una gran cantidad de residuos, susceptibles de un mayor aprovechamiento mediante el uso de la biotecnología. Por esto aparece en los años 80 el concepto de biorrefinería, que implica la utilización completa de toda

la materia prima de partida y la integración de procesos tradicionales con procesos nuevos, incluyendo los bioprocesos que permitan la optimización de los rendimientos y uso de toda la materia prima (Figura 1).

Actualmente existen muchas maneras de utilizar esta biomasa residual, pero su destino y transformación están en gran medida ligados a la complejidad de su composición y a su origen (primario, secundario o terciario). La manera más sencilla de utilizar y rentabilizar la biomasa residual es usarla como fuente de energía mediante su combustión y para esto obviamente no hay que utilizar la biotecnología. Sin embargo, otras opciones, algunas clásicas y relativamente sencillas, como el uso directo como materiales de construcción o su transformación en abono orgánico mediante su compostaje, y otras más sofisticadas, como la utilización de residuos agrícolas para la producción de biocombustibles, requieren procesos biotecnológicos para su tratamiento y transformación (Johnson, 2007).

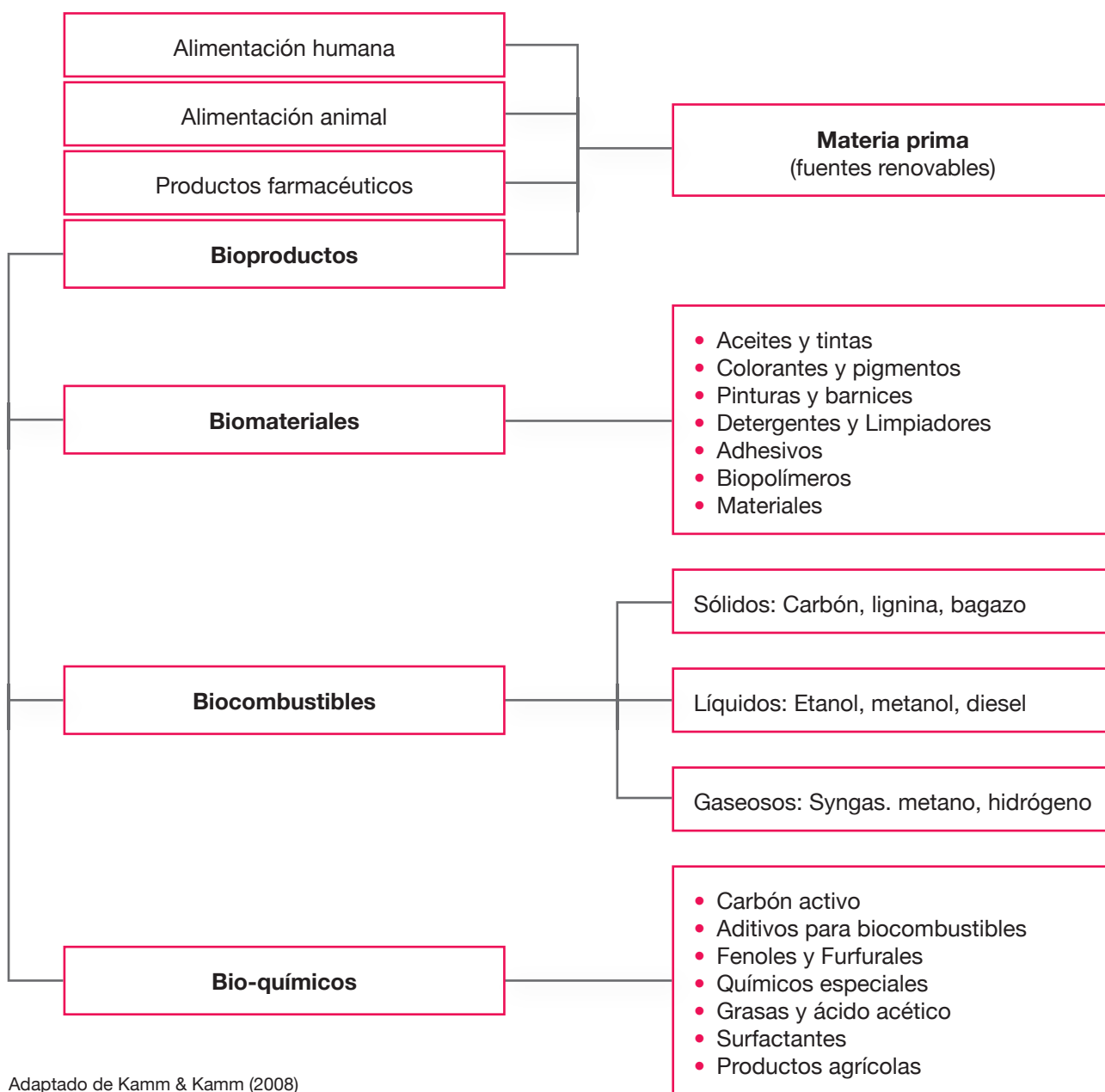
En lo que se refiere a los grandes retos que el reciclado de la biomasa residual plantea hay que ser conscientes de que la mayor fracción de la biomasa residual está constituida por materiales lignocelulósicos derivados de los residuos generados por las actividades agrícolas y forestales. Por consiguiente, una gran parte de los esfuerzos actuales se destinan a encontrar soluciones biotecnológicas para el reciclado de estos residuos. El concepto de biorrefinería de la lignocelulosa surge con fuerza los últimos años (Himmel y Bayer, 2009), especialmente por la necesidad de conseguir bioetanol de segunda generación (2G), ya que

su producción a partir de sacarosa o almidón (bioetanol de primera generación, 1G) ha generado intensos debates porque podría causar disfunciones comerciales en el sector alimentario.

Para utilizar los azúcares de la lignocelulosa en los procesos de producción de etanol 2G es necesario eliminar la lignina y para ello actualmente se utilizan procesos físicos, químicos o una mezcla de ambos (Alvira *et al*, 2010). Sin embargo, la biotecnología puede aportar soluciones específicas para los distintos pasos del proceso, ya que por ejemplo existen hongos capaces de degradar preferentemente

la lignina (Salvachúa *et al*, 2011) y otros que secretan enzimas que la despolimerizan (Martínez *et al*, 2009) o que contribuyen a aumentar el rendimiento del proceso (Jurado *et al*, 2009; Salvachúa *et al*, 2013). Para hidrolizar la celulosa y la hemicelulosa de la lignocelulosa existen muchos cócteles enzimáticos comerciales procedentes de hongos y bacterias, varios de ellos de origen recombinante (Mohanram *et al*, 2013; Bornscheuer *et al*, 2014).

También la biotecnología es necesaria para optimizar la etapa de fermentación, ya que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede fermentar la glucosa procedente de la



Adaptado de Kamm & Kamm (2008)

Figura 1.

hidrólisis de la celulosa pero no las pentosas (15-30%) procedentes de la hemicelulosa y por eso se han introducido en esta levadura los genes de la degradación de las pentosas de otros organismos (Matsushika *et al*, 2009; Van Vleet y Jeffries, 2009; Kim *et al*, 2012).

Por otro lado, las denominadas microalgas (eucarioatas y procariotas) son también una fuente de biomasa muy importante. Actualmente se utilizan casi exclusivamente para alimentación (*Artrospira platensis* o espirulina) (Hosseini *et al*, 2013), pero se está trabajando intensamente con ellas para solucionar el debate sobre el uso de azúcares alimentarios para la producción de etanol, ya que se ha propuesto el uso de tierras no cultivables para el cultivo de algas para la generación de biodiesel y bioteanol de tercera generación (3G) (Singh *et al*, 2011; Larkum *et al*, 2012). De todas formas estos procesos aún no están resueltos a escala industrial.

La complejidad de algunos residuos orgánicos, sobre todo los residuos urbanos, hacen difícil su uso sin procesos previos de separación muy costosos y por eso se ha propuesto resolver la complejidad de esta biomasa residual mediante su pirólisis y transformación en gas de síntesis (syngas, $\text{CO} + \text{H}_2 + \text{CO}_2$) que posteriormente se transforma mediante catálisis química o por fermentación bacteriana en etanol u otros productos (bioplásticos, reactivos químicos) (Liu *et al*, 2014; Choi *et al*, 2010).

Por último, señalar que en España se están desarrollando diferentes acciones estrategias en Biotecnología, a nivel regional y nacional, para conseguir el aprovechamiento sostenible de la biomasa, independientemente de cuál sea su origen, en las que cooperan distintos grupos de investigación y empresas, y que hay grupos españoles y empresas que lideran y coordinan estas iniciativas en Europa. En este sentido, destacar en España distintas Plataformas Tecnológicas (*e.g.*, BioPlat, SusCHEM, PLANETA, BIOVEGEN), Asociaciones (*e.g.*, APPA, AVEBIOM, COSE) y Redes Temáticas (*e.g.*, LIGNOCEL, SELVIREN), que agrupan un gran número investigadores de centros de investigación, universidades y empresas, con carácter multidisciplinar, para contribuir al aprovechamiento integral de la biomasa, convirtiendo residuos en productos de alto valor añadido y contribuir al desarrollo de nuevas empresas de base tecnológica.

REFERENCIAS

- Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M and Negro MJ. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101:4851-4861.
- Bornscheuer U, Buchholz K, and Seibel J. (2014). Enzymatic Degradation of (Ligno)cellulose. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53:10876-10893.
- Choi D, Chipman DC, Bents SC and Brown RC. (2010). A techno-economic analysis of polyhydroxyalkanoate and hydrogen production from syngas fermentation of gasified biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:1032-1046.
- Himmel ME and Bayer EA. (2009). Lignocellulose conversion to bio-fuels: current challenges, global perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:316-317.
- Hosseini SM, Khosravi-Darani K and Mozafari MR. (2013). Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. *Mini. Rev. Med. Chem.* 13:1231-1237.
- Johnson FX. (2007). Industrial Biotechnology and Biomass utilization: Prospects and challenges for the developing world. United Nations Industrial Development Organization. Vienna.
- Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá MA, Martínez AT and Martínez M J. (2009). Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* 100:6378-6384.
- Kamm B and Kamm M. (2004). Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:137-145.
- Kim SR, Ha SJ, Wei N, Oh EJ and Jin YS. (2012). Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* 30:274-282.
- Larkum AW, Ross IL, Kruse O and Hankamer B. (2012). Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol.* 30:198-205.
- Liu K, Atiyeh HK, Stevenson BS, Tanner RS, Wilkins MR and Huhnke RL. (2014). Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. *Bioresour. Technol.* 151:69-77.
- Martínez A T, Ruiz-Dueñas F J, Martínez M J, del Río J C and Gutiérrez A. (2009). Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:348-357.
- Matsushika A, Inoue H, Kodaki T and Sawayama S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:37-53.
- Mohanram S, Amat D, Choudhary J, Arora A and Nain L. (2013). Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sus. Chem. Proc.* 1:15.
- Salvachúa D, Prieto A, Lopez-Abelairas M, Lú-Chau T, Martínez A T and Martínez M J. (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102:7500-7506.
- Salvachúa D, Prieto A, Martínez A T and Martínez M J. (2013). Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Irpex lacteus* and its application in the enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:4316-4324.
- Singh A, Nigam PS, and Murphy JD. (2011). Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresour. Technol.* 102:10-16.
- Van Vleet JH and Jeffries TW. (2009). Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009 20:300-306.

Biotecnología Farmacéutica, asignatura optativa de «obligado conocimiento» en el Grado de Farmacia (UCM)

A. R. Alcántara¹, M.J. Hernáiz¹, J. M. Sánchez-Montero¹, M. D. Saco², M. S. Martín², M. Torres², A. Sanchez-Muñoz³, C. Guillén³, A. Heras⁴, M. Elorza⁴, B. Elorza⁴, M. Molina⁵, J. Pla⁵, H. Martín⁵, J. De La Fuente⁵

¹Dpto. de Química Orgánica y Farmacéutica, ²Dpto de Biología Vegetal II,

³Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, ⁴Dpto. de Químico Física II

y ⁵Dpto. de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

¿QUÉ SE ENTIENDE POR BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA?

Delimitar el contexto de la Biotecnología supone un considerable problema, pues ya de entrada nos encontramos a día de hoy múltiples definiciones de la misma según la fuente bibliográfica que se consulte. Así, una definición comúnmente aceptada es la que se puede encontrar en el Convenio sobre Diversidad Biológica, elaborado por la ONU en 1992, según el cual la Biotecnología podría definirse como «toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos» (<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>).

Esta definición clásica es lo suficientemente amplia como para incluir en ella todas las diferentes áreas de trabajo que se juxtaponen dentro de esta ciencia eminentemente pluridisciplinar, y que han sido convenientemente clasificadas siguiendo un código de colores, tal y como aparecen en la **Figura 1**.

Evidentemente, cualquier definición de **Biología Farmacéutica** debe incluir todo **material hecho o derivado a partir de materiales naturales que pueda ser usado para terapia** (humana o animal), considerando la doble vertiente que incluye tanto el **uso de sistemas biológicos** para producir fármacos como el **empleo de las actuales técnicas biotecnológicas** para producir dichos fármacos. Así, términos tales como «fármacos biológicos», «biofármacos» o «productos farmacéuticos biotecnológicos» han sido adoptados de manera habitual, y aunque muchas veces

LOS COLORES DE LA BIOTECNOLOGÍA	
BIOTECNOLOGÍA ROJA (Biotecnología Sanitaria)	Comprende las aplicaciones terapéuticas, diagnósticas, de salud animal y de investigación biomédica. 
BIOTECNOLOGÍA VERDE (Biotecnología Vegetal)	Aplicaciones relacionadas con la mejora de plantas y cultivos vegetales. 
BIOTECNOLOGÍA BLANCA (Biotecnología Industrial)	Biología aplicada a procesos industriales, que emplea organismos vivos y enzimas para obtener productos de interés reemplazando tecnologías contaminantes. 
BIOTECNOLOGÍA AZUL (Biotecnología Marina)	La biotecnología azul se ocupa de la exploración y explotación de los organismos marinos (o de agua dulce) con objeto de crear nuevos productos. 
BIOTECNOLOGÍA GRIS (Biotecnología Ambiental)	Aplicaciones ambientales de la biotecnología, centradas en la creación de soluciones tecnológicas que ayuden a la protección del medioambiente. 
BIOTECNOLOGÍA DORADA	Desarrollos y procesos bioinformáticos: aplicación de métodos informáticos y computación en el análisis de datos experimentales y simulación de los sistemas biológicos. 
BIOTECNOLOGÍA MARRÓN	Aplicaciones veterinarias, como fármacos veterinarios, vacunas, pruebas de diagnóstico, clonación, biofactorías, etc. 
BIOTECNOLOGÍA NARANJA	Divulgación y formación en Biotecnología 
BIOTECNOLOGÍA PÚRPURA	Engloba las medidas de seguridad, la legislación y los valores y principios ético-morales establecidos por la sociedad en materias y aplicaciones biotecnológicas. 
BIOTECNOLOGÍA AMARILLA	Biología Nutricional, enfocada en alimentos 
BIOTECNOLOGÍA NEGRA	Prevención del Bioterrorismo 

Figura 1. Los colores de la Biotecnología.

se usan de manera indistinta, no deben confundirse¹. En efecto, aunque puede asumirse que «fármacos biológicos» se puede referir a cualquier compuesto farmacéutico producido a través de protocolos biotecnológicos, se suele aplicar a productos médicos derivados de la sangre, tales como vacunas, toxinas o alérgenos. Por su parte, el término «biofármaco» se empleó por primera vez en la década de los 80 para describir tanto a las proteínas de uso terapéutico que se comenzaron a producir por entonces usando las (entonces) incipientes técnicas de ingeniería genética como a los anticuerpos monoclonales que comenzaron a ser producidos mediante la tecnología del hibridoma. Finalmente el término «producto farmacéutico biotecnológico» es más amplio, pues engloba a cualquier producto de uso terapéutico que haya sido obtenido mediante el empleo de sistemas biológicos (tejidos o células) o de biomoléculas (enzimas o anticuerpos).

Sin duda alguna, el impacto de la Biotecnología en la investigación y en la industria farmacéutica ha sido enorme^{2,3}, pero también sobre la docencia en los grados de Farmacia, puesto que los nuevos graduados deben estar preparados no solo para la práctica farmacéutica, sino que también deben poseer un conocimiento profundo en todo lo que concierne a estos nuevos avances en la investigación en Biotecnología Farmacéutica⁴. En este sentido, la Comisión Europa financió el Proyecto PHARMINE, para recabar datos e información sobre los estudios de Farmacia en Europa⁵. El consorcio PHARMINE se creó en 2008 y estuvo constituido por 50 universidades de estados miembros de la Unión Europea que son miembros de la Asociación Europea de Facultades de Farmacias (EAFF), así como otras asociaciones que representaban a las farmacias comunitarias, (PGEU), hospitalarias (EAHP), e industrias (EIPG), así como la Asociación Europea de Estudiantes de Farmacia (EPSA). Este consorcio encuestó a farmacias y farmacéuticos en diferentes ámbitos: comunidad, hospital, industria y otros sectores, y asimismo revisó cómo se organizaban las instituciones de educación superior y los cursos en la Unión Europea, de manera que se obtuvieron perfiles de educación farmacéutica en Europa, con información exhaustiva de los estados miembros de la UE y otros países europeos⁶. Así, como resultado destacado del informe final PHARMINE (disponible a través de la dirección http://www.pharmine.org/losse_paginas/Country_Profiles/) se recomendó que **la Biotecnología fuera una asignatura obligatoria dentro del Itinerario Intracurricular de Farmacia Industrial**, puesto que el conocimiento de la producción, protocolos de garantías de calidad y aplicaciones de los medicamentos obtenidos a través de procesos biotecnológicos, nanotecnológicos y genómicos son de obligado conocimiento a nivel de grado, master y post-grado en la carrera de Farmacia.

BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DENTRO DEL GRADO EN FARMACIA EN LA UCM

En efecto, el Grado en Farmacia que se imparte en la Universidad Complutense de Madrid, en vigor desde el curso 2010-2011, ha incluido la Biotecnología Farmacéutica

como Materia Complementaria dentro del Itinerario Intracurricular Industrial, dividiéndola dentro de dos asignaturas, llamadas respectivamente Biotecnología Farmacéutica I y II, que denominaremos a partir de ahora **BTFI** y **BTFII**, las cuales desarrollaremos a continuación.

BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA I (BTFI)

Así, la BTFI, como recoge la Ficha Docente de la asignatura (accesible a través de la dirección web <http://147.96.70.122/Web/Programa/803544.pdf>), **Figura 2**, pretende que «el alumno se familiarice con las herramientas básicas que posibilitan la manipulación genética de microorganismos enfocadas hacia su utilización en la producción de sustancias de interés biotecnológico. Por ello, se describirán los fundamentos de biología molecular y tecnología de ADN recombinante como herramientas en biotecnología. También se pretenderá que el alumno conozca los diferentes sistemas de expresión génica, tanto en procariontes como en eucariotas, su potencialidad y limitaciones. Estos conocimientos se desarrollarán desde un punto de vista aplicado concretándose en procesos de interés actual que tengan utilidad terapéutica, interés industrial o medioambiental».

La docencia de la BTFI es responsabilidad del **Departamento de Microbiología II**. El enfoque de esta asignatura, fundamentalmente centrada en la Biotecnología microbiana, deriva de la importancia de los microorganismos en el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante y de muchas de sus aplicaciones con fines industriales. El descubrimiento hacia finales del siglo XIX de que los microorganismos eran la causa de diferentes enfermedades para el hombre, supuso un avance esencial hacia el tratamiento y profilaxis de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, esta visión «negativa» de los microbios está, claramente, equilibrada con el papel de muchos microorganismos en procesos de interés para el ser humano. La utilización de microbios, por ejemplo, en la producción de alimentos es conocida desde hace mucho tiempo y tiene un valor económico enorme en

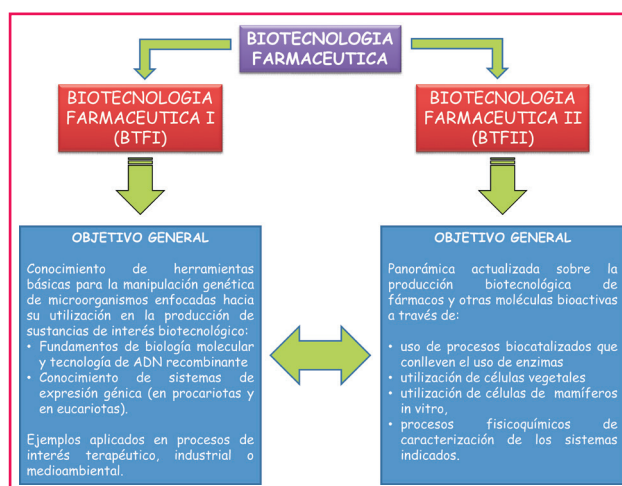


Figura 2. Objetivos generales de las Asignaturas de Biotecnología Farmacéutica en el Grado de Farmacia, UCM.

la industria actual. A partir del siglo XIX surge con fuerza la utilización de microorganismos para el desarrollo de productos de valor terapéutico, industrial o ecológico. Ejemplo de ello lo constituye la producción de antibióticos, con el ejemplo paradigmático de la penicilina, producida por un hongo filamentoso. A partir de esta tradicional microbiología industrial, el desarrollo de la biología molecular y las técnicas de manipulación genética permiten el desarrollo de la biotecnología microbiana, que utiliza microorganismos como huéspedes de procesos de interés industrial. En esta asignatura se repasan las herramientas básicas que posibilitan la manipulación genética de microorganismos, haciendo especial hincapié en los sistemas de expresión heteróloga (tanto en bacterias como en hongos) que permiten producir proteínas de cualquier origen en estas células fáciles de manejar y de cultivar a gran escala.

Existen muchas razones por las cuales los microorganismos presentan ventajas frente a otros tipos de seres vivos en el contexto de la producción industrial de sustancias, tales como su crecimiento relativamente rápido, sencillo y poco costoso. Esta tecnología ha posibilitado el surgimiento de la ingeniería metabólica que crea individuos optimizados para la producción de un proceso concreto y ha permitido desarrollar microorganismos que producen productos farmacéuticos biotecnológicos como vacunas y hormonas de forma segura, eficaz y, consecuentemente, con un menor coste⁷. El esquema básico en el desarrollo de un sistema de obtención de este tipo de productos en microorganismos se muestra en la **Figura 3**, y sus venta-

jas hacen que siga siendo una estrategia prioritaria de las compañías farmacéuticas, siendo cada vez mayor el número de fármacos que se obtiene en la actualidad siguiendo esta metodología. Algunos de los ejemplos paradigmáticos, como la producción de insulina y el desarrollo de análogos de esta hormona mediante mutagénesis dirigida, son utilizados en la asignatura para ilustrar tanto sus logros como su potencial. Los microorganismos son, igualmente, una pieza básica de la industria farmacéutica para el desarrollo de rastreos de sustancias de interés farmacológico; estos rastreos son en muchos casos lo suficientemente baratos y convenientes para que la industria farmacéutica los utilice como alternativa a otros sistemas en la identificación de compuestos bioactivos.

Los avances recientes en las tecnologías de secuenciación masiva (pirosecuenciación entre ellas) están permitiendo conocer con gran rapidez los genomas de muchos seres vivos así como conocer la enorme diversidad biológica de determinados nichos ambientales; ello ha permitido el desarrollo de la llamada metagenómica, de enorme importancia por cuanto representa una fuente de conocimiento biológico sin recurrir a las tradicionales técnicas de cultivo clásicas. Los estudios de genómica funcional están permitiendo adscribir a muchos genes una función definida y la combinación de ambas herramientas (disponibilidad de genomas completos, funciones de genes) proporciona datos cruciales acerca de la evolución biológica de los seres vivos. Una herramienta esencial en esta metodología radica en la bioinformática o biología computacional, a la que se presta especial atención durante la docencia de esta asignatura. El estudio *in silico* de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, permite predecir actividades bioquímicas, localizaciones celulares, estructuras tridimensionales y en última instancia, asignarles una función. También constituye una pieza esencial para el desarrollo de la llamada biología sintética en que se intentan generar seres vivos (células microbianas) a la carta optimizados para la realización de una función concreta de interés biotecnológico a partir del conocimiento individual de genes, rutas y procesos biológicos de seres vivos diversos.

En definitiva, si actualmente los fármacos situados en los primeros puestos por volumen de negocio son de base biotecnológica, todo apunta a que en el corto plazo el objetivo de las grandes empresas farmacéuticas va a ser incrementar este tipo de productos de modo espectacular. La asignatura BTFI pretende proporcionar al alumno de Farmacia las bases moleculares fundamentales para que pueda participar en esta próxima y prometedora etapa biotecnológica.

BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA II (BTFII)

Por su parte, la Ficha Docente de la BTFII (<http://147.96.70.122/Web/Programa/803545.pdf>), indica que su objetivo general es «proporcionar al alumno una panorámica actualizada sobre la producción biotecnológica de fármacos y otras moléculas bioactivas a través del uso de procesos biocatalizados que conlleven el uso de enzimas, células vegetales

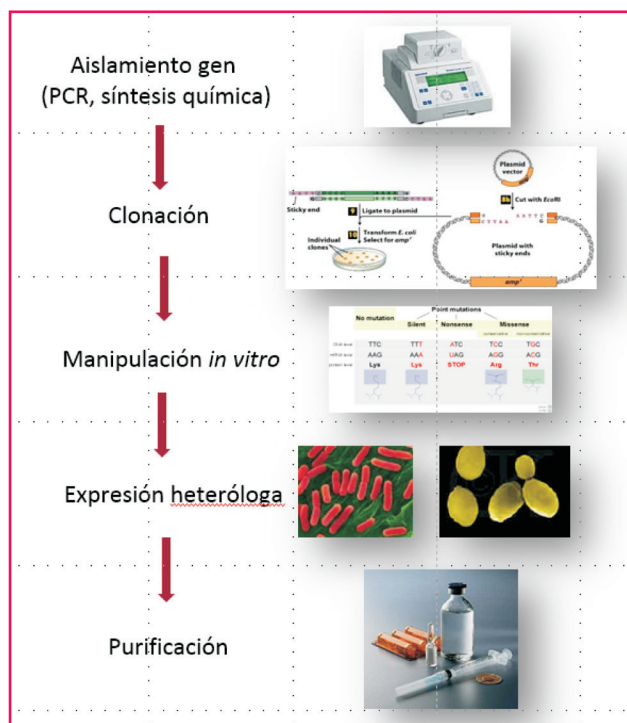


Figura 3. Esquema de obtención de un producto farmacéutico biotecnológico en microorganismos.

y de mamíferos in vitro, y diferentes procesos fisicoquímicos de caracterización de los sistemas indicados». Los objetivos específicos (OE) de esta asignatura se reflejan en la Figura 4, y surgen de la colaboración efectiva de cuatro Departamentos de la Facultad de Farmacia, que se encargan de manera coordinada de su impartición.

En efecto, el **Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica** se encarga de cubrir el Objetivo Específico 1 (**OE1**), encaminado a que el alumno, en primer lugar, conozca las bases moleculares de la Biocatálisis aplicada a la producción de fármacos y moléculas bioactivas. Para ello se profundizará en las diferentes estrategias para la preparación y optimización de biocatalizadores de uso industrial, a través del estudio de los conocimientos necesarios para la búsqueda de nuevas enzimas naturales, obtención de enzimas por ingeniería genética, síntesis de nuevas enzimas, inmovilización de enzimas, así como el estudio de la ingeniería del medio de reacción, dentro del ámbito que implica el uso de biocatalizadores para conseguir la transformación de una sustancia (no natural para el biocatalizador) en otra que pueda tener interés para la síntesis de un fármaco, en lo que se conoce como Biotransformaciones^{8,9}. Desde el punto de vista de la Industria Farmacéutica, la Biocatálisis es de gran importancia¹⁰⁻¹², ya que las enzimas producen de un modo específico y selectivo únicamente uno de los

isómeros posibles, que se obtendrá de forma enantiopura¹³. La separación de estos estereoisómeros es de crucial importancia cuando se pretenden utilizar estos compuestos como posibles fármacos, ya que las propiedades de estos pueden ser muy diferentes pudiéndose dar el caso de que uno de los enantiómeros produzca un efecto beneficioso (eutómero) mientras el otro (distómero) sea altamente perjudicial para el organismo, pudiendo citar como ejemplo el tristemente conocido caso de la talidomida acaecido en EEUU a finales de los años 50 del siglo pasado.

Posteriormente, se detallan diferentes ejemplos de utilización de biocatalizadores en procesos industriales de preparación de moléculas bioactivas de interés farmacológico (ej, anticancerígenos como el taxol, antiolesterolémicos como la atorvastatina, antidiabéticos como la sitagliptina, etc). Con todo ello se le proporciona al alumno una panorámica actualizada sobre la producción biotecnológica de fármacos y otras moléculas bioactivas a través del uso de procesos biocatalizados por enzimas células, con incidencia en todos los aspectos que conlleva el proceso biocatalizado, que quedan de manifiesto en la Figura 5.

El OE2 es responsabilidad del **Departamento de Biología Vegetal II**. Tal y como se indicó en la Introducción, la Biotecnología Vegetal (Biotecnología Verde) aprovecha el potencial que tienen las plantas como fuente principal para

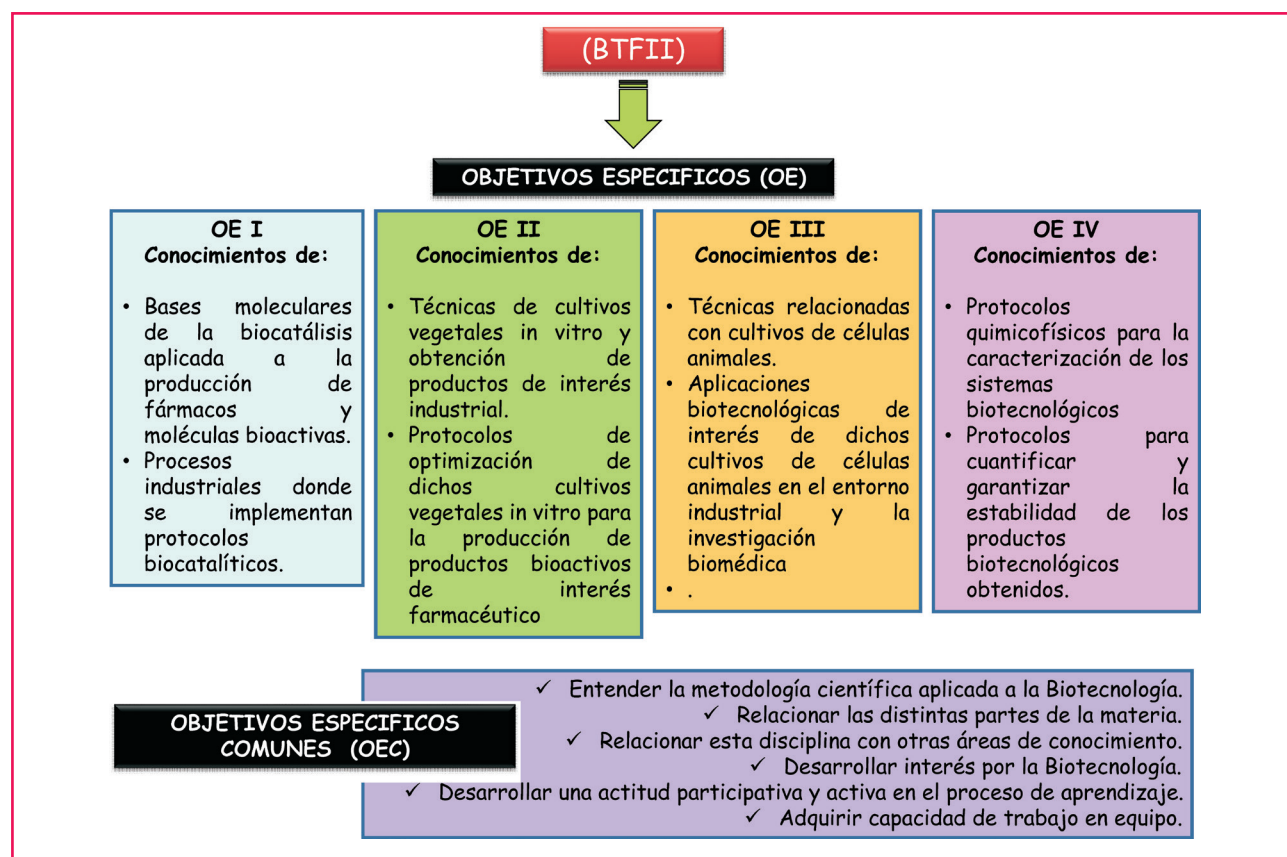


Figura 4. Objetivos específicos de la Asignatura de Biotecnología Farmacéutica II.

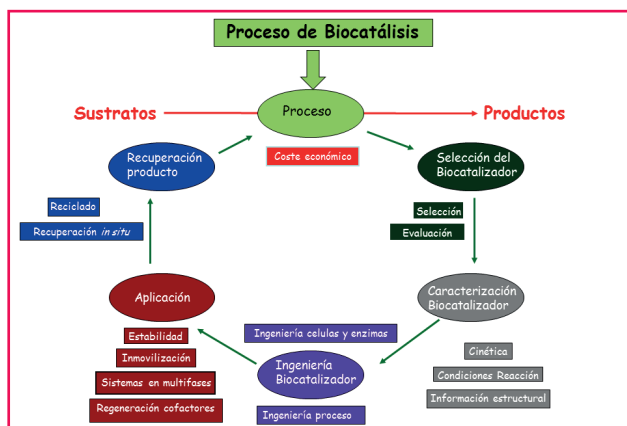


Figura 5. Esquema de un proceso biocatalítico integrado.

la obtención de metabolitos secundarios de interés para la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética entre otras, puesto que estos compuestos, por la diversidad de sus estructuras, constituyen la base de una gran parte de los medicamentos obtenidos por síntesis¹⁴. Teniendo en cuenta el interés industrial de estos compuestos, la Biotecnología Vegetal se ha convertido en una herramienta necesaria para abordar los principales aspectos de su producción, mediante el desarrollo y aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, en sus diferentes modalidades (células, tejidos y órganos)¹⁵, tal y como se recoge en la Figura 6. Cabe señalar que, mediante estas técnicas se han obtenido compuestos bioactivos, como cardenólidos, alcaloides, diterpenos, flavonoides, etc., procedentes de diversas especies de plantas medicinales. Sin embargo, a pesar del gran número de investigaciones que se están realizando y aunque hay resultados muy prometedores, todavía son poco numerosos los casos de éxito a nivel de producción a gran escala en combinación con la tecnología de biorreactores. Entre

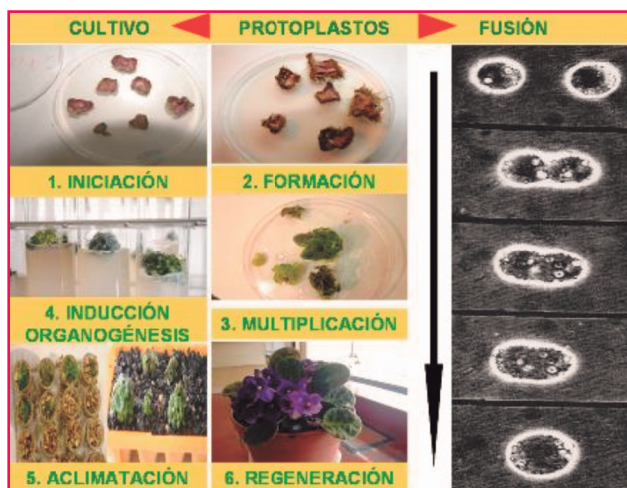


Figura 6. Cultivo de células animales para aplicaciones biotecnológicas.

éstos, cabe destacar la producción de shikonina, berberina, podofilotoxina, vincristina, vinblastina, paclitaxel y camptotecina¹⁶.

Por otra parte, estas técnicas del cultivo *in vitro* también tienen una especial importancia para el estudio y la investigación de los aspectos teóricos y prácticos, de especial interés en un programa de Biotecnología Farmacéutica, relacionados con la propagación y el mejoramiento de plantas medicinales, así como la conservación de su germoplasma, la obtención de productos bioactivos mediante biotransformaciones y las posibilidades que ofrece la tecnología de protoplastos. Cabe citar el hecho de un grupo de alumnos presentaron en las IX Jornadas Complutenses, celebradas en el curso 2013-2014, una comunicación relacionada con la tecnología de protoplastos y sus aplicaciones, lo que pone de manifiesto el interés que han despertado estos últimos aspectos, como forma de participar en el Año de la Biotecnología en España.

El **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular** se encarga de cubrir el **Objetivo Específico 3 (OE III)** enfocado al conocimiento de las técnicas de cultivo de células animales y sus aplicaciones biotecnológicas, tal y como recoge la Figura 7. Los nuevos retos en Biomedicina que se están planteando en este siglo XXI para el tratamiento de las enfermedades implican nuevos abordajes experimentales a diferentes niveles^{17,18}. Un mayor entendimiento a nivel molecular de las patologías es esencial para el desarrollo de nuevas terapias y su futura utilización en la clínica. Dicho avance puede contribuir también a la mejora de las terapias actuales. Desde la generación y utilización de modelos animales de diferentes enfermedades que sirvan para profundizar en el conocimiento a nivel básico de éstas, hasta el diseño de fármacos para el tratamiento, implican procesos biotecnológicos. Los profesores implicados del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la impartición de dicha asignatura, hacen en primer lugar una introducción general a los cultivos celulares que incluye aspectos básicos pero elementales de metodología, que incluye parámetros clave en el mantenimiento de un cultivo y tipos de cultivo, para después pasar a presentar diferentes aplicaciones biotecnológicas derivadas directamente del uso de las células animales en el entorno industrial y la investigación biomédica. En particular, se desarrollan los siguientes aspectos de la Biotecnología de los cultivos de células de mamífero:

- Ingeniería tisular (bioingeniería de órganos y su aplicación en clínica)
- Bio-reactores y producción de moléculas de interés farmacológico a escala industrial.
- Descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas y fármacos y estudios de toxicología.

TERAPIAS ALTERNATIVAS CELULARES

Una vez más se pone en evidencia que tanto para la generación de proteínas recombinantes por parte de las células animales, como para la modificación genética de las propias células humanas con fines terapéuticos se requiere

la aplicación de diferentes técnicas de ingeniería genética que permiten la expresión del gen de interés de una forma eficiente y segura.

Finalmente, el **Departamento de Química Física II (Fisicoquímica Farmacéutica)** es el responsable de cumplir el Objetivo Específico IV (**OEIV**). Su docencia se centra en explicar los métodos de caracterización quimicofísica de los productos biotecnológicos y las interacciones de éstos en los sistemas de aplicación y la estabilidad^{19,20}. No cabe duda de que cualquier proceso y producto biotecnológico obtenido por cualquiera de los protocolos presentados en los OEI, OEII y OEIII debe estar caracterizado quimicofísicamente, puesto que deben estudiarse tanto las interacciones que se establecen con el medio así como su estabilidad. En efecto, cualquier sistema debe estar perfectamente caracterizado, debe ser estable e interactuar con los medios o sistemas de reacción solo en la dirección deseada.

Así, se comienza por presentar al alumno las técnicas de identificación (es imprescindible elegir alguna propiedad quimicofísica que lo diferencie de otros posibles productos):

- Emisión o absorción de energía por métodos espectroscópicos (ultravioleta/visible, infrarrojo. RMN).
- Entalpías de cambios de fase: Calorimetría de barrido DSC.

- Peso molecular: viscosimetría, propiedades coligativas (Pm bajos), cromatografía de permeabilidad en gel, GPC, Tamaño molecular: Microscopía electrónica, Difusión cuasi-elástica de la luz, Ultracentrifugación, Volumen hidrodinámico.
- Cargas eléctricas: Potencial Z (carga superficial).
- Conductividad y Solubilidad: (a concentración, T, disolvente y Fuerza iónica determinada).

En lo que respecta al apartado de interacciones, hay que tener en cuenta el medio en el que se presenta el producto biotecnológico, otros posibles productos presentes en dicho medio y las interacciones más importantes, como son aquellas que se puedan originar con las moléculas, células y tejidos u órganos en el organismo. En este sentido, se consideran las interacciones a nivel molecular (electrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, enlaces de hidrógeno, detalle de cinéticas de reacción, etc). Finalmente, lo que hace referencia al apartado de estabilidad, se incide al alumno en las variables por considerar, tales como medio de reacción, temperatura, fuerza iónica, balance hidrofóbico/hidrofílico, pH o presión.

Por último, después de la rápida visión de las técnicas o métodos fisicoquímicos para caracterizar, determinar interacciones y estudiar estabilidad, se aborda la necesidad de que estos métodos y variables estandarizadas queden

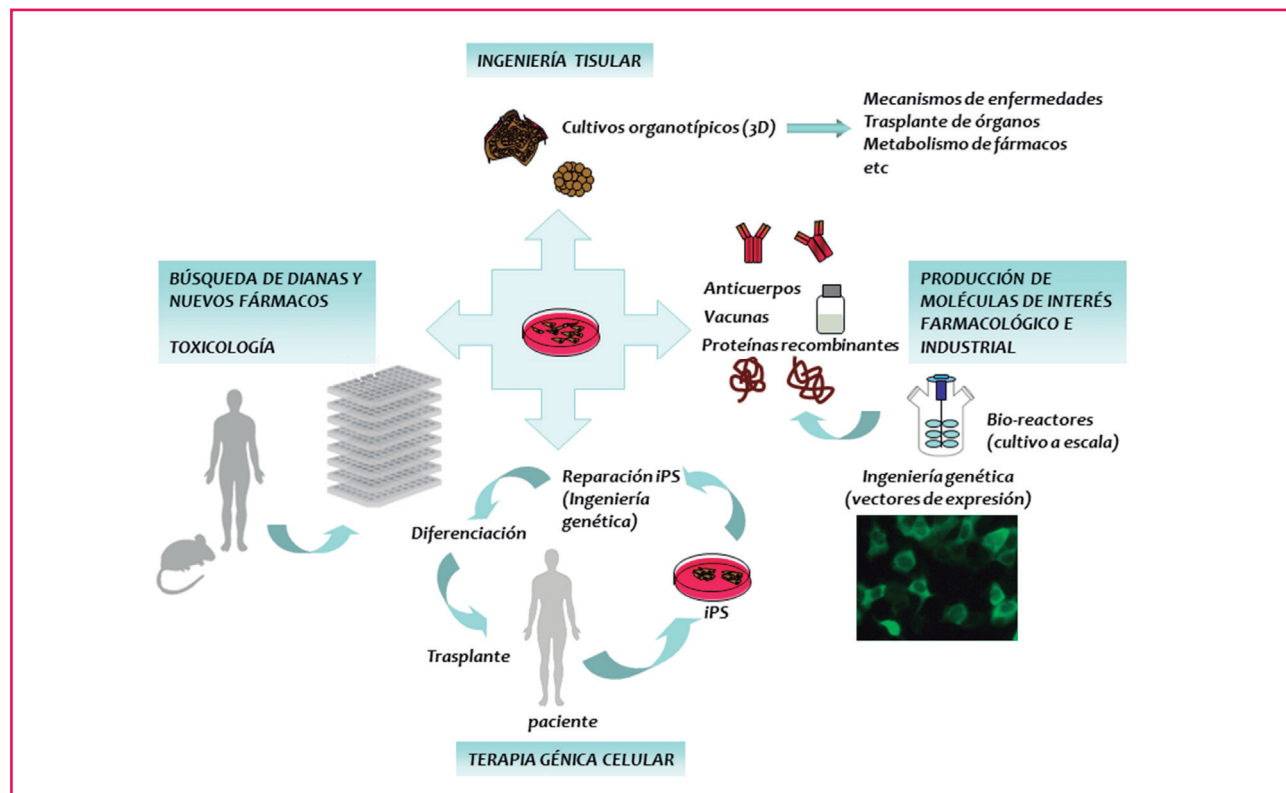


Figura 7. Cultivo de células y tejidos vegetales para aplicaciones biotecnológicas.

universalmente unificados y validados. En este sentido, se presentan los planteamientos recogidos en *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, <http://www.ich.org/>), para mantener un foro de diálogo constructivo entre las autoridades reguladoras y la Industria Farmacéutica sobre las diferencias reales y percibidas en las técnicas y requisitos para el registro de productos en la UE, EE.UU. y Japón, a fin de garantizar una más oportuna introducción de nuevos medicamentos, y su disponibilidad para los pacientes. Por tanto, se contribuye a la protección de la salud pública desde una perspectiva internacional, al supervisar y actualizar los requisitos técnicos armonizados que conducen a una mayor aceptación de los datos de investigación y desarrollo²¹. De esta manera, se pretende evitar futuros requisitos divergentes mediante la armonización de determinados temas necesaria como resultado de los avances terapéuticos y el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de productos medicinales. Así, el alumno llega al fin de la asignatura con las capacidades en biotecnología y con el convencimiento de que, sin una buena caracterización quimicofísica con métodos y protocolos validados por la ICH de los productos biotecnológicos, no habrá alcanzado el objetivo final de la asignatura.

CONCLUSIÓN

De todo lo expuesto hasta ahora, creemos que queda justificado el «entrecomillado» que aparece en el título del artículo; en efecto, para la correcta formación de un graduado en Farmacia, cuyo enfoque profesional vaya orientado principalmente hacia el área de I+D+i, pensamos absolutamente necesario que éste haya adquirido una noción clara de lo que es y supone la Biotecnología Farmacéutica. Para ello, los conocimientos adquiridos al cursar estas asignaturas le supondrán un primer paso para su desarrollo profesional, y sentarán las bases de conocimiento necesario para abordar su camino en el apasionante mundo biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Walsh G. (2007). *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications*. (Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England: John Wiley & Sons Ltd).
2. Parayil A, Gago F. (2013). New horizons in pharmaceutical biotechnology by melding biology and engineering. *Curr Opin Biotech* 24:1069-1071.
3. Bingham A, Ekins S. (2009). Competitive collaboration in the pharmaceutical and biotechnology industry. *Drug Discov Today* 14:1079-1081.
4. Vizirianakis IS. (2002). Pharmaceutical education in the wake of genomic technologies for drug development and personalized medicine. *Eur J Pharm Sci* 15:243-250.
5. Atkinson J, Nicholson J, Rombaut B. (2012). Survey of pharmaceutical education in Europe. PHARMINE – Report on the integration of the industry component in pharmacy education and training. *Euro Ind Pharm* 13:17-20.
6. Savova A, Mitov K, Stoimenova A, Manova M, Petrova G. (2012). Pharmaceutical Biotechnology education in the pharmacy curriculum at european universities. *Biotechnol Biotechnol Equip* 26:3187-3191.
7. Ferrer-Mirallès N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vázquez E, Villaverde A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* 8:8.
8. Faber K. (2011). *Biotransformations in Organic Chemistry. A textbook*. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
9. Drauz K. (2012). *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*. (Wiley-VCH).
10. Liese A, Seelbach K, Wandrey C. (2006). *Industrial Biotransformations*. (Weinheim: John Wiley and sons, Inc. Verlag GmbH & Co, kGaA.).
11. Muñoz Solano D, Hoyos P, Hernáiz MJ, Alcántara AR, Sánchez-Montero JM. (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour Technol* 115:196-207.
12. Hoyos P, Pace V, Hernáiz MJ, Alcántara AR. (2014). Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry. A greener future. *Curr Green Chem* 1:155-181.
13. Fessner WD, Anthonsen T. (2009). *Modern biocatalysis: stereoselective and environmentally friendly reactions*. (Wiley-VCH).
14. Naivy PA, Elio J. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotechnología Vegetal* 11:195-211.
15. Karuppusamy S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res* 3:1222-1239.
16. Newman DJ, Cragg GM. (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75:311-335.
17. Freshney RI. (2011). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. (Wiley).
18. Gil-Loyzaga PE. (2011). *Cultivo de Células Animales y Humanas, Aplicaciones en Medicina Regenerativa*. (Editorial Visión Libros).
19. Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. (2006). *Principles of Physical Biochemistry*. (Pearson/Prentice Hall).
20. Sheehan D. (2013). *Physical Biochemistry: Principles and Applications*. (Wiley).
21. Molzon JA, Giaquinto A, Lindstrom L, Tominaga T, Ward M, Doerr P, Hunt L, Rago L. (2011). The Value and Benefits of the International Conference on Harmonisation to Drug Regulatory Authorities: Advancing Harmonization for Better Public Health. *Clin Pharmacol Ther* 89:503-512.

Levaduras como fuente de enzimas de interés enológico

Ignacio Belda, Eva Navascués, Alejandro Alonso, Domingo Marquina, Antonio Santos.

Departamento de Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid

La investigación aplicada a la industria avanza para dar respuesta a los retos que impone un mercado cada vez más exigente en términos de calidad y seguridad de productos. La industria agroalimentaria, pilar fundamental de la economía española, realiza grandes inversiones en Investigación y Desarrollo (I+D) que garanticen su progreso económico de la mano del avance tecnológico. Tras décadas de protagonismo de la viticultura como foco de interés prioritario de enólogos y bodegas, actualmente la microbiología cobra cada vez más relevancia dentro de la industria enológica. El estudio de los procesos microbianos involucrados en la elaboración de vino, al margen de la bien conocida fermentación alcohólica, ha dado lugar a una extensa línea de investigación con las levaduras llamadas no-*Saccharomyces* como centro de interés. La presencia y dominancia de *Saccharomyces cerevisiae* es un hecho esperado y deseado durante el proceso de fermentación vínica puesto que de su vigor fermentativo va a depender la llegada a término de la fermentación. Este papel relevante ha provocado que *S. cerevisiae* protagonizara la mayor parte de la investigación en microbiología enológica en las pasadas décadas. Sin embargo, el conocimiento sobre el potencial enzimático de las levaduras no-*Saccharomyces*, dominantes en las primeras etapas fermentativas, ha derivado en un intenso estudio sobre su aplicación para la mejora de las propiedades tecnológicas y sensoriales de los vinos elaborados en la industria.

La aplicación de enzimas y complejos enzimáticos de origen fúngico es una práctica habitual en enología. Estas enzimas se aplican tanto con objetivos sensoriales, a través de la liberación de precursores aromáticos o la extracción de fenoles y pigmentos por ejemplo, como con objetivos de optimización tecnológica a través de la mejora del vino en aspectos relacionados con su procesamiento, almacenamiento o aspecto, como puedan ser su filtración (a través de la hidrólisis de pectinas y residuos celulósicos) o el aumento de

la seguridad en el almacenamiento mediante la estabilización proteica entre otros. La gran variedad de enzimas y complejos enzimáticos puestos a disposición de los enólogos por las distintas casas comerciales dedicadas a esta industria pone a su disposición un abanico enorme de posibilidades para garantizar la calidad del producto final así como para aportar el toque de distinción a los vinos en función del saber hacer de cada enólogo y bodega. Las levaduras no-*Saccharomyces*, a cambio de presentar un metabolismo fermentativo menos eficiente que *S. cerevisiae*, ofrecen un enorme potencial enzimático que permite manejar de forma indirecta todos los procesos citados anteriormente, alterando en menor medida la naturaleza inherente al proceso de fermentación vínica. Entre las enzimas producidas por estas levaduras y que inciden en el perfil aromático de los vinos podemos destacar diversas enzimas glicosidasas relacionadas con la liberación de precursores de aromas terpénicos, que aportan aromas herbáceos característicos de variedades de uva como Albariño o Moscatel, o ciertas actividades liasas responsables de la liberación de aromas tiólicos, cuyos descriptores principales son el aroma a pomelo o ciertas frutas tropicales, característicos de vinos de variedades como Verdejo o Sauvignon blanc. La aplicación de



VERDEJO

VIOGNIER

PINOT BLANC



las levaduras no-*Saccharomyces* en procesos industriales de fermentación se realiza a través de las llamadas fermentaciones mixtas, combinadas o *multistarter* en las que se aplican inóculos complejos de levaduras de especies no-*Saccharomyces* seguidos de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* que garantizan la llegada a término de la fermentación. Actualmente, en los catálogos de levaduras de las grandes casas comerciales de productos enológicos, existen cepas de levaduras no-*Saccharomyces* para su uso industrial como inóculos. Entre las especies más frecuentemente empleadas destacan *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces thermotolerans* o *Metschnikowia pulcherrima* cada una de ellas indicada para distintos fines y con distintos protocolos de uso en función de sus propiedades metabólicas (poder fermentativo, resistencia al etanol y al SO_2 , etc.). Menos estudiadas, aunque no por ello menos interesantes, son actividades enzimáticas como pectinasas, o proteasas, ausentes en la inmensa mayoría de cepas de *S. cerevisiae* pero presentes en una gran variedad de especies no-*Saccharomyces*. Estas enzimas presentan incidencia en parámetros sensoriales como la extracción de aromas, color o fenoles mediante la ruptura de pectinas de la uva o la contribución a la estabilidad proteica de los vinos.

Además de su potencial enzimático y la consecuente incidencia en el perfil aromático de los vinos, el metabolismo de estas levaduras menos especializado en el proceso de fermentación alcohólica contribuye al aumento de la presencia de metabolitos o subproductos de interés en el vino diferentes al etanol que inciden en la modificación de parámetros con respecto a las fermentaciones industriales tradicionales exclusivamente inoculadas con *S. cerevisiae*. Así, entre las contribuciones generales más destacadas en el uso de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* se encuen-

tra el aumento en el contenido en glicerol en los vinos, el aumento en la intensidad y estabilidad del color o el aumento en el contenido en manoproteínas.

La aplicación de técnicas transcriptómicas y metabólicas permite adquirir conocimientos sobre la fisiología en fermentación de las levaduras no-*Saccharomyces*, cuyo metabolismo y regulación genética en fermentaciones vínicas es todavía poco conocido. Estos estudios permitirán conocer, tal y como se hiciera en las últimas décadas con las cepas industriales de *S. cerevisiae*, la respuesta transcripcional y las contribuciones metabólicas en fermentación de las distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en distintas condiciones fermentativas, permitiendo su uso correcto en la industria y la optimización al máximo de sus propiedades y favoreciendo así su implantación en el mercado enológico en el que todavía hoy tienen una baja presencia.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Jolly NP, Varela C, Pretorius IS. (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14:215-237
- Belda I, Navascués E, Marquina D, Santos A, Calderón F, Benito S. (2014) Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology* (In press)
- Cordente AG, Curtin CD, Varela C, Pretorius IS. (2012) Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:601-618.
- Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyer D, Gallardo-Chacón JJ, Ballester J, Vichi S, Guérin-Schneider R, Caixach J, Alexandre H. (2012) Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology* 32:243-253.
- Bisson L, Karpel JE. (2010) Genetics of Yeast Impacting Wine Quality. *Annual Reviews of Food Science and Technology* 1:139-62.
- Rossignol T, Kobi D, Jacquet-Gutfreund L, Blondin B. (2009) The proteome of a wine yeast strain during fermentation, correlation with the transcriptome. *Journal of Applied Microbiology* 107:47-55.



CABERNET SAUVIGNON



GARNACHA



SYRAH



TEMPRANILLO

Imágenes www.pinterest.com

Biotecnología y retos en Salud

¿De dónde diablos sale el ZMapp?

Víctor J. Cid.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

Por desgracia, 2014, el «año de la Biotecnología», será recordado más bien en los anales de la memoria bio-sanitaria colectiva como «el año del Ébola». Entre los tratamientos experimentales que han estado en boca de todos, el más mediático y enigmático, acaso por su nombre alienígena, ha sido el ZMapp™. Se trata de una suero-terapia, una estrategia de inmunización pasiva en la línea del suero antidiftérico por el que von Behring ganó el Nobel en su primera edición en 1901, pero a la vez es un prodigio de la Biotecnología que amalgama todo el conocimiento acumulado desde entonces.

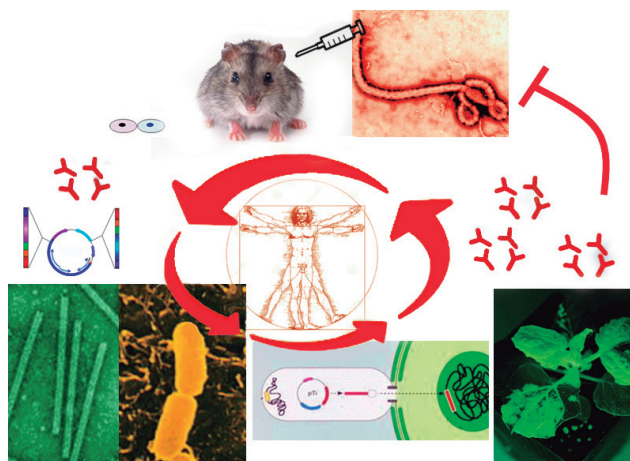
El fármaco, resulta de una colaboración público-privada entre compañías y organismos estatales de EEUU y Canadá. Se trata de un cóctel de tres anticuerpos monoclonales «humanizados» que habían demostrado eficiencia en primates y cobayas¹, procedentes a su vez de dos cócteles previos, ZMAb (Defyris Inc., Toronto, Canada) y MB-003 (Mapp Biopharmaceuticals, San Diego, CA, EEUU)². Por tanto, el nombre no viene de otra galaxia, sino que es el acrónimo de ambas marcas. El primer paso del desarrollo implica por tanto, la ingeniería genética requerida para la «humanización» de la inmunoglobulina murina y la tecnología de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs). Pero la producción a gran escala de

mAbs tendría un coste inasumible para un medicamento de uso universal. Aquí entra en juego la biotecnología de plantas más ecléctica, puesto que el ZMapp se produce en plantas del género *Nicotiana*. Los cDNAs que codifican los mAbs seleccionados se introducen en vectores basados en el virus del mosaico del tabaco³, el de Beijerinck e Ivanowsky, el primer virus descubierto a finales del XIX, otro guiño histórico. Sin embargo, aunque estos vectores dirigen bien la expresión, la transfección transitoria es difícil de gestionar desde el punto de vista de su rendimiento en estrategias de «pharming» (el arte de producir fármacos recombinantes en explotaciones hortícolas, digamos). Aquí es donde entra en juego la genética bacteriana, pues no es otro que *Agrobacterium tumefaciens* y su sistema de secreción de tipo IV el utilizado para el diseño de la transferencia de los vectores a la solanácea mediante el uso de secuencias del plásmido Ti. El proceso de transferencia del vector de expresión a la planta, llamado «magniflection», consiste en sumergir transitoriamente las plantas en masa en una suspensión de *Agrobacterium* listo para inyectar, un proceso que se puso a punto para la producción industrial de vacunas recombinantes⁴.

En definitiva, pronto sabremos si el ZMapp realmente salvó vidas humanas o quizás queden olvidados los días en que sonaba como la única esperanza, ensombrecido por nuevas estrategias terapéuticas o quizás —ojalá— vacunas. No viene del futuro ni de otra dimensión, no: viene de un siglo de investigación y de lo mejor de nuestra Tierra: virus, bacterias, plantas, ratones y todo un despliegue de la mejor Biotecnología. Una buena oportunidad para demostrar a la sociedad que nuestra ciencia puede aportar soluciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Qiu X, Wong G, Audet J, *et al.* (2014) Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514: 47–53.
2. <http://www.mappbio.com/zmapinfo.pdf>
3. Gleba Y, Tusé D, Giritch A. (2014) Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 375:155–92.
4. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. (2005) Magniflection -a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23:2042–8.



20 años del Grupo de Microbiología Molecular

Bruno González Zorn

Presidente del Grupo

El grupo de Microbiología Molecular es uno de los once grupos especializados pertenecientes a la Sociedad Española de Microbiología (SEM), fundada en 1946. Este Grupo comenzó su actividad el 11 de abril de 1995, liderada por una Junta directiva que presidía Josep Casadesús Pursalt, y con el fin de aglutinar la actividad microbiológica en España que empleaba herramientas emergentes comunes (Tabla). Desde entonces, ha pasado lo que, en medidas humanas, no bacterianas, es una generación. La primera reunión del Grupo tuvo lugar en Pamplona en 1996, bajo la dirección de G. Pisabarro, J. Berenguer y J. Pla. Según podemos ver en el cuadernillo de Abstracts (Figura 1), el concepto se basaba

PRESIDENTE DEL GRUPO	AÑOS DE PRESIDENCIA
Josep Casadesús Pursal	1995 – 2000
Antonio Juárez Giménez	2000 – 2004
Juan M ^a García Lobo	2005 – 2008
María Molina Martín	2009 – 2013
Bruno González Zorn	2014 –



Figura 1. Carátulas de los libros de resúmenes de las Reuniones del Grupo de Microbiología Molecular.

en que los jóvenes investigadores, hoy nuestros senior más prestigiosos, pudieran aprovechar la reunión para presentar sus resultados y discutirlos en una atmósfera distendida y científica.

Desde entonces, el número de socios del Grupo ha ido incrementando paulatinamente (Figura 2), y hemos seguido celebrando regularmente nuestra reunión de Grupo en diversas localizaciones de nuestra geografía española (Figura 1). A pesar de las vicisitudes que tanto de la Sociedad Civil como la Comunidad Científica, han sufrido a lo largo de este tiempo, el espíritu del Grupo de *Micro Molecular* se ha mantenido intacto. No es necesario analizar la bibliometría de los miembros del Grupo para saber que el nivel científico del mismo goza de una salud impecable. En la última Reunión del Grupo, celebrada en Segovia, se presentaron más de 60 comunicaciones orales, casi todas impartidas por miembros jóvenes y entregamos el III Premio Biomedal, cada vez más prestigioso. El nivel científico fue, como lo ha sido siempre, extraordinario. Por otro lado hemos instaurado *TablonMicroMol*, que nos permite mantenernos comunicados más estrechamente que antes, y nuestros colegas en el extranjero que regresan a España se unen al Grupo, o se mantienen unidos cuando deciden empezar aventuras fuera de nuestras fronteras.

El futuro del Grupo está ligado al de sus miembros. Seguimos teniendo equipos muy competitivos, algunos de los cuales aumentan en tamaño, otros generan fructíferas esporas que crean nuevos grupos de investigación de gran capacidad. Tras una generación, los que

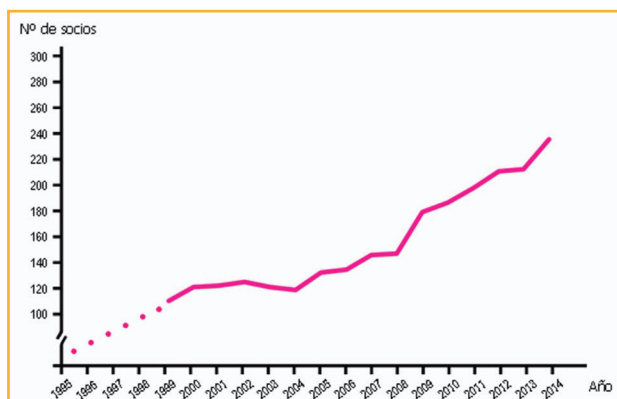


Figura 2. Evolución del número de socios del Grupo de Microbiología Molecular.

empezamos la tesis doctoral el año de la primera Reunión, vemos cómo este Grupo es más bien una familia, y creemos que el pilar más importante del mismo no es el científico, sino el personal. Nuestros recuerdos más intensos son los momentos vividos en nuestras reuniones, y creemos y queremos que las generaciones futuras tengan la suerte de poder criarse en un ambiente tan enriquecedor como hemos podido hacerlo nosotros. Así lo siento, y así quería agradecerlos a todos vuestro apoyo al Grupo, uno de los valores más cardinales que tenemos.

Mecanismos moleculares de patogénesis de la infección bacteriana respiratoria

Junkal Garmendia

Instituto de Agrobiotecnología CSIC-UPNa-Gobierno de Navarra,
Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias CIBERES

juncal.garmendia@unavarra.es

Nuestro equipo, coordinado por la Dra. Junkal Garmendia, forma parte del Grupo de Sanidad Animal del Instituto de Agrobiotecnología (IdAB), en Navarra, un centro Mixto de titularidad compartida entre el

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), la Universidad Pública de Navarra (UPNa) y el Gobierno de Navarra. Asimismo, el equipo es miembro del Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Cristina Viadas, Begoña Euba, Javier Moleres, Junkal Garmendia, Ariadna Fernández e Irene Rodríguez.

torias (CIBERES), una red de investigación multidisciplinaria y multiinstitucional en enfermedades respiratorias apoyada por el Instituto Nacional de Salud Carlos III y los Ministerios españoles de Economía y Competitividad y Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. El equipo comenzó su andadura en 2009, estudiando aspectos básicos de la infección respiratoria bacteriana mediante aproximaciones de microbiología molecular y celular, y con carácter traslacional. Así, nuestro marco de trabajo es la generación de conocimientos mecanísticos del proceso infeccioso para su traslado al desarrollo de estrategias terapéuticas para combatir enfermedades infecciosas de interés. Nuestros estudios implican la utilización de células respiratorias inmortalizadas y primarias, modelos animales pre-clínicos, y material clínico de origen humano y porcino. El interés de nuestro grupo se centra en la infección respiratoria por patógenos bacterianos oportunistas del género *Haemophilus* spp., que aprovechan una situación de inmunodepresión del individuo hospedador para provocar infecciones sintomáticas. En la actualidad, trabajamos con las especies *Haemophilus influenzae*, asociada a patología humana, y *Haemophilus parasuis*, asociada a patología porcina.

En humanos, *H. influenzae* es un colonizador asintomático de la nasofaringe de la mayor parte de la población sana. En población infantil, *H. influenzae* es causante de otitis media, bronquiolitis y traqueobronquiolitis. En población adulta de edad avanzada, este patógeno puede provocar neumonía. Además, *H. influenzae* está asociado a la progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), una enfermedad respiratoria crónica de elevada prevalencia mundial, y cuyo principal factor de riesgo es el tabaquismo. La EPOC es una obstrucción irreversible y progresiva de los espacios de intercambio gaseoso. Las partículas y los gases nocivos presentes en el humo de tabaco generan una inflamación pulmonar elevada y crónica, lo que provoca fibrosis, obstrucción de las vías aéreas

menores, enfisema y pérdida de elasticidad pulmonar. Todo ello contribuye a la pérdida de la función pulmonar, la reducción de la calidad de vida del paciente y el aumento de la mortalidad. El humo de tabaco favorece también el desarrollo de infecciones pulmonares que provocan un elevado porcentaje de las agudizaciones periódicas sufridas por los enfermos EPOC, denominadas exacerbaciones. Las exacerbaciones son el principal factor de morbilidad y mortalidad de los pacientes EPOC, y generan un gasto elevado para los sistemas sanitarios nacionales. *H. influenzae* es uno de los microorganismos más frecuentemente aislados del tracto respiratorio inferior de enfermos EPOC, en fase estable y en exacerbación. En este contexto, nuestros intereses se centran en la identificación y explotación de dianas terapéuticas para combatir la infección por *H. influenzae*. Nuestras líneas de trabajo se resumen a continuación:

- Interacción de *H. influenzae* con los epitelios respiratorios nasal, faríngeo, bronquial y alveolar humano. En los últimos años, hemos determinado que *H. influenzae* tiene una fase de vida intracelular en células epiteliales respiratorias, e identificado un repertorio de elementos implicados en la transducción de señales de la célula humana que son utilizados por el patógeno para acceder a su nicho intracelular. La posible relación entre la localización intracelular de *H. influenzae* y la infección crónica a pesar del uso de antibióticos, nos ha llevado a explorar estrategias para restringir dicha vida intracelular basadas en el concepto *host-directed therapeutics* (terapias dirigidas al hospedador), mediante la intervención farmacológica de funciones celulares empleadas por *H. influenzae* para acceder a su nicho intraepitelial.
- Factores de virulencia y elementos esenciales para la supervivencia del patógeno durante la infección.

Hemos caracterizado un repertorio de genes de *H. influenzae* implicados en la interacción patógeno-célula respiratoria humana, y que codifican estructuras de la superficie bacteriana. La identificación de funciones bacterianas esenciales en el proceso infeccioso nos ha llevado a explorar estrategias antimicrobianas basadas en el concepto *anti-virulence therapy* (terapias dirigidas al patógeno), destinadas a la intervención de funciones bacterianas esenciales durante la infección.

- Adaptación de *H. influenzae* al aparato respiratorio humano. El éxito de *H. influenzae* como patógeno radica en gran medida en su adaptación al aparato respiratorio humano, un aspecto esencial para evadir la inmunidad respiratoria. Hemos caracterizado a nivel genómico y fenotípico un repertorio de cepas clínicas de *H. influenzae*, aisladas de muestras respiratorias de pacientes pediátricos y respiratorios crónicos adultos. Entre otros, hemos reportado un conjunto de polimorfismos asociados a la infección crónica por *H. influenzae*, potencialmente relacionados con la resistencia del patógeno a la muerte mediada por péptidos antimicrobianos del sistema inmune innato. La identificación de estos rasgos genéticos nos ha llevado a explorar estrategias antimicrobianas basadas en el concepto *anti-adaptation therapy* (terapias dirigidas al patógeno), destinadas a la intervención de funciones implicadas en la adaptación del patógeno al aparato respiratorio humano.
- Exposoma e interferencia terapéutica en la infección respiratoria. La infección asociada a EPOC está modulada por la exposición del paciente al humo de tabaco y a la medicación antiinflamatoria recibida de forma crónica. Ambos aspectos forman parte del exposoma del paciente EPOC, y entender su interferencia en la progresión de la infección por *H. influenzae* puede resultar esencial para el diseño racional de estrategias antimicrobianas efectivas. Hemos determinado que la exposición al humo de tabaco disminuye la capacidad fagocítica del macrófago alveolar para ingerir *H. influenzae*, lo que reduce a su vez la eficiencia de su procesamiento fagolisosomal. Actualmente, nuestro interés se centra en entender la interferencia de terapias antiinflamatorias con distintos mecanismos de acción en la infección por *H. influenzae*.

En ganado porcino, *H. parasuis* es un colonizador asintomático de las fosas nasales de la mayor parte de los animales sanos, y el agente causante de la enfermedad de Glässer, asociada a condiciones estresantes de manejo, traslados y destete de lechones. Este patógeno oportunista es reservorio de un repertorio de plásmidos naturales portadores de genes de resistencia a varias familias de antibióticos. Este aspecto, junto al hecho de que el género

Haemophilus spp. se caracteriza por su competencia natural para captar ADN del medio externo, hacen de *H. parasuis* un reservorio natural de resistencia antibiótica transmisible a otras especies con repercusión en salud humana, como es *H. influenzae*. En este contexto, nuestros intereses se centran en la identificación de plásmidos naturales en aislados de *H. parasuis* integrantes de la microbiota respiratoria de cerdos sanos, y la caracterización de su transmisibilidad y estabilidad en *H. influenzae*.

Desarrollamos el conjunto de nuestra actividad de forma cooperativa y multidisciplinar, en colaboración con grupos nacionales e internacionales expertos en microbiología clínica, veterinaria y molecular, en neumología, y en el empleo de tecnologías de última generación.

PUBLICACIONES

- Puig C, Domenech A, Garmendia J, Langereis JD, Mayer P, Calatayud L, Liñares J, Ardanuy C, Martí S. (2014) Non-typeable *Haemophilus influenzae* isolates from invasive disease and otitis media present higher biofilm formation than strains recovered from respiratory infections. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Sep 5. pii: AEM.02544-14
- Garmendia J, Viadas C, Calatayud L, Mell JC, Martí-Llitas P, Euba B, Llobet E, Gil C, Bengoechea JA, Redfield RJ, Liñares J. (2014) Characterization of nontypable *Haemophilus influenzae* isolates recovered from adult patients with underlying chronic lung disease reveals genotypic and phenotypic traits associated with persistent infection. *PLoS One* 9(5):e97020
- Morey P, Viadas C, Euba B, Hood DW, Barberán M, Gil C, Grilló MJ, Bengoechea JA, Garmendia J. (2013) Relative contribution of lipooligosaccharide inner and outer core modifications to nontypable *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Infection and Immunity* 81: 4100-4111
- Garmendia J, Martí-Llitas P, Moleres J, Puig C, Bengoechea JA. (2012) Genotypic and phenotypic diversity of the noncapsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *Int Microbiology* 15: 159-172
- López-Gómez A, Cano V, Moranta D, Morey P, García del Portillo F, Bengoechea JA, Garmendia J. (2012) Host cell kinases, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology* 158: 2384-2398
- Garmendia J, Morey P, Bengoechea JA. (2012) Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *European Respiratory Journal* 39: 467-477
- Martínez-Moliner V, Soler-Llorens P, Moleres J, Garmendia J, Aragon V. (2012) Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*. *Microbiology* 158:2117-24
- Martí-Llitas P, López-Gómez A, Mauro S, Hood DW, Viadas C, Calatayud L, Morey P, Servín A, Liñares J, Oliver A, Bengoechea JA, Garmendia J. (2011) Nontypable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. *PLoS One* 6: e21133
- Morey P, Cano V, Martí-Llitas P, López-Gómez A, Regueiro V, Saus C, Bengoechea JA, Garmendia J. (2011) Evidence for a non-replicative nontypable *Haemophilus influenzae* intracellular stage in epithelial cells. *Microbiology* 157: 234-250
- Martí-Llitas P, Regueiro V, Morey P, Hood DW, Saus C, Saulea J, Agustí AG, Bengoechea JA, Garmendia J. (2009) Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infection and Immunity* 77: 4232-4242

Patogenicidad, diagnóstico y control de *Haemophilus parasuis*

Virginia Aragón, Nuria Galofré-Milà, Bernardo Bello-Ortí y Florencia Correa Fiz

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) y Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona

virginia.aragon@cresa.uab.es



Foto de grupo. Miembros actuales del grupo. De izquierda a derecha, Nuria Galofré, Florencia Correa Fiz, Virginia Aragón y Bernardo Bello.

Haemophilus parasuis es el agente causal de la enfermedad de Glässer, una enfermedad sistémica caracterizada por poliserositis fibrinosa, meningitis y artritis. Esta enfermedad es una de las más importantes en los lechones destetados, aunque también puede afectar a los cerdos en otras fases de producción. Las infecciones por *H. parasuis* tienen un gran impacto económico en todos los países productores de porcino.

H. parasuis es una bacteria exclusiva del cerdo que es capaz de colonizar las vías respiratorias superiores de este animal desde temprana edad. En los lechones, *H. parasuis* se detecta en la cavidad nasal desde los dos días de vida. Esta colonización temprana se produce al transmitirse la bacteria por contacto directo entre los lechones y su madre, de quien, a la vez, obtienen anticuerpos que los protegen.

Esta doble vida, como parte de la microbiota respiratoria y como patógeno, es el reflejo de la existencia de una gran variabilidad de cepas, que van desde no virulentas (colonizadoras) a altamente virulentas (invasivas).

El control de la enfermedad se puede realizar mediante una rápida intervención con antimicrobianos o mediante progra-

mas de vacunación, ya que *H. parasuis* es un patógeno extracelular y se ha demostrado que los anticuerpos son esenciales en la protección. Las vacunas comerciales son bacterinas, que proporcionan una protección dependiente de serovariedad. En la actualidad hay una gran presión social para reducir el uso de antibióticos en el ganado, por lo que es necesaria una vacuna eficaz frente a todas las cepas virulentas.

La patogenia de la enfermedad de Glässer conlleva un paso de la bacteria por el pulmón antes de proceder a la invasión sistémica. Como se ha dicho anteriormente, no todas las cepas de *H. parasuis* tienen la misma capacidad patogénica. Las cepas que no poseen factores de virulencia, cuando alcanzan el pulmón son eliminadas por los macrófagos alveolares y la infección queda controlada (Figura 1A). Así, la localización de las cepas no virulentas se limita al tracto respiratorio superior donde no representan un riesgo para la salud de los lechones. Por otro lado cuando una cepa virulenta alcanza el pulmón, se induce una clara infiltración de neutrófilos (Figura 1B) y una inhibición de la activación de los macrófagos alveolares. La resistencia a la fagocitosis de las cepas virulentas parece implicar varios

mecanismos, entre ellos la expresión de cápsula bacteriana. Además, las cepas virulentas son capaces de incorporar ácido siálico a moléculas de su superficie, como el lipooligosacárido y el polisacárido capsular, que puede facilitar la evasión del sistema inmune. Al no ser eliminadas por los macrófagos, las cepas virulentas se multiplican dentro del animal y pueden alcanzar el torrente circulatorio, donde sobreviven por ser resistentes al complemento sérico. Una vez en el torrente sanguíneo, pueden alcanzar e invadir otros órganos dando lugar a la enfermedad sistémica. Finalmente, la multiplicación de la bacteria induce una fuerte inflamación, que es la responsable de las lesiones que se observan en los animales, y en los casos graves de su muerte.

Clásicamente, la clasificación de las cepas de *H. parasuis* se hace por serotipación, pero una gran proporción de cepas no son serotipables. Más recientemente se han desarrollado métodos de genotipado, especialmente un MLST («multilocus sequence typing»), que agrupa las cepas con una cierta relación con su origen clínico. Sin embargo, este método no es práctico para el diagnóstico rutinario. Estudios genómicos permitieron identificar un grupo de genes que están diferencialmente presentes en cepas de distinto origen patológico. Estos genes se denominaron *vtaA* (del inglés «virulence-associated trimeric autotransporters») y codifican proteínas de membrana externa, con un dominio translocador y uno pasajero que contiene dominios de colágenos y otros dominios con posible papel en adhesión. El estudio en mayor profundidad de estos genes permitió el diseño de una PCR capaz de identificar cepas con potencial patógeno y así, diferenciarlas de las cepas puramente colonizadoras del tracto respiratorio superior. En estudios con macrófagos alveolares porcinos nuestro grupo pudo determinar que dos de estos autotransportadores, VtaA8 y 9, provocaban un retraso en la fagocitosis por macrófagos, demostrando su papel en la resistencia a la fagocitosis y apoyando su presencia en cepas virulentas. Además, la presencia de las VtaA en la superficie bacteriana y su expresión diferencial en cepas virulentas, nos llevó a plantearnos su potencial uso en una vacuna dirigida contra las cepas virulentas. De hecho, en experimentos *in vivo* realizados por nuestro grupo vacunando lechones con una mezcla de seis VtaAs se observó una protección parcial frente a una infección letal con una cepa de *H. parasuis*. Actualmente nuestro grupo está realizando estudios de transcriptómica del patógeno durante las fases iniciales de la infección y participa en un proyecto de identificación de la microbiota respiratoria y el papel de *H. parasuis* como componente de la microbiota normal del cerdo.

Nuestros principales colaboradores son el Dr. Marcelo Gottschalk y el Dr. Mario Jacques de la Universidad de Montreal (Canadá), el Dr. Dan Tucker de la Universidad de Cambridge (UK), el Dr. Javier Domínguez del INIA (Madrid) y la Dra. Junkal Garmendia del Instituto de Agrobiotecnología (Pamplona).

PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS

Aragon V, Cerdà-Cuellar M, Fraile L, Mombarg M, Nofrarias M, Olvera A, Sibila M, Solanes D, Segalés J. (2010). Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. *Vet Microbiol* 142:387-393.

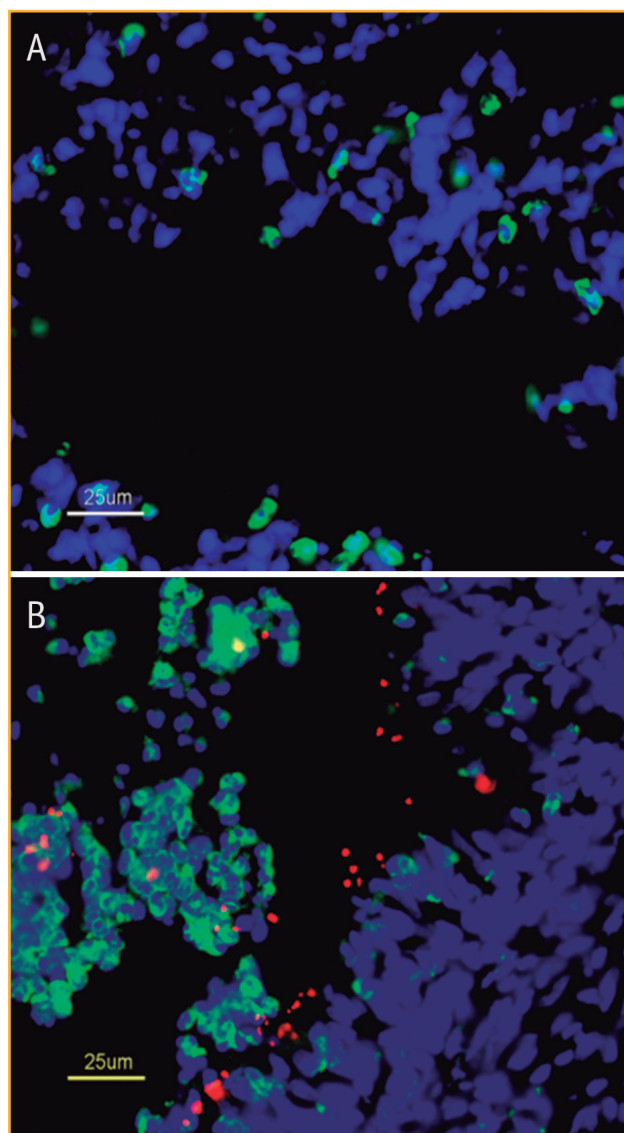


Figura 1. Cortes de pulmones de lechones infectados intranasalmente con la cepa no virulenta SW114 (A) o la cepa virulenta Nagasaki (B), 1 día post-infección. *H. parasuis* se marcó con un suero hiperinmune de conejo (rojo). El anticuerpo monoclonal 6D10, donado por J. Domínguez (INIA), se usó para marcar los neutrófilos (verde). Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul).

Bello-Orti B, Costa-Hurtado M, Martínez-Moliner V, Segalés J y Aragon V. (2014). Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract. *Vet Microbiol* 170:430-437.

Costa-Hurtado M, Ballester M, Galofré-Milà N, Darji A, Aragon V. (2012). VtaA8 and VtaA9 from *Haemophilus parasuis* delay phagocytosis by alveolar macrophages. *Vet Res* 43:57.

Costa-Hurtado M, Olvera A, Martínez-Moliner V, Galofré-Milà N, Martínez P, Domínguez J y Aragon V. (2013). Changes in macrophage phenotype after infection of pigs with *Haemophilus parasuis* strains of different virulence. *Infect Immun* 81:2327-2333.

- Howell KJ, Weinert LA, Luan SL, Peters SE, Chaudhuri RR, Harris D, Angen O, Aragon V, Parkhill J, Langford PR, Rycroft AN, Wren BW, Tucker AW y Maskell DJ; BRaDP1T Consortium. (2013). Gene Content and Diversity of the Loci Encoding Biosynthesis of Capsular Polysaccharides of the 15 Serovar Reference Strains of *Haemophilus parasuis*. J Bacteriol 195:4264-4273.
- Martínez-Moliner V, Soler-Llorens P, Moleres J, Garmendia J, Aragon V. (2012). Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*. Microbiology 158:2117-2124.
- Mullins MA, Register KB, Brunelle BW, Aragon V, Galofré-Milà N, Bayles DO, Jolley KA. (2013). A curated public database for multilocus sequence typing (MLST) and analysis of *Haemophilus parasuis* based on an optimized typing scheme. Vet Microbiol 162:899-906.
- Olvera A, Ballester M, Nofrías M, Sibila M, Aragon V. (2009). Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. Vet Res 40:24.
- Olvera A, Martínez-Moliner V, Pina-Pedrero S, Pérez-Simó M, Galofré-Milà N, Costa-Hurtado M, Aragon V, Bensaid A. (2013). Serum cross-reaction among virulence-associated trimeric autotransporters (VtaA) of *Haemophilus parasuis*. Vet Microbiol 164:387-391.
- Olvera A, Pina S, Macedo N, Oliveira S, Aragon V, Bensaid A. (2012). Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vtaA). Vet J 191:213-218.
- Olvera A, Pina S, Pérez-Simó M, Aragón V, Segalés J, Bensaid A. (2011). Immunogenicity and protection against *Haemophilus parasuis* infection after vaccination with recombinant virulence associated trimeric autotransporters (VtaA). Vaccine 29:2797-2802.
- Perry MB, MacLean LL, Gottschalk M, Aragon V, Vinogradov E. (2013). Structure of the capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from *Haemophilus parasuis* strains ER-6P (serovar 15) and Nagasaki (serovar 5). Carbohydr Res 378:91-97.

Genómica evolutiva de bacterias simbiotes de insectos

Andrés Moya, Amparo Latorre, Francisco J. Silva, Rosario Gil, Juli Peretó, Carlos García Ferris, Purificación Carrasco, Ana Gutiérrez Preciado, Sergio López Madrigal, Alejandro Manzano, Vanesa Martínez, Mariana Reyes y Diego Santos García

Genética evolutiva, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva.
Universitat de València

andres.moya@uv.es



Foto de grupo. Miembros del grupo durante la visita del Dr. Matsuura (Octubre 2014). De izquierda a derecha, Yee Ying Chang, Francisco Silva, Carlos Vargas, Mariano Collantes, Mariana Reyes, Miquel Barberá, Ana Gutiérrez, Rosario Gil, Purificación Carrasco, Amparo Latorre, Yu Matsuura, Carlos García y Andrés Moya. Delante, Diego Santos.

Los insectos constituyen el grupo animal con más especies conocidas y, con excepción de algunos hábitats extremos, han conquistado todos los espacios terrestres conocidos. Las interacciones simbióticas con microorganismos, altamente interdependientes y bien reguladas, han sido claves en este carácter adaptativo de los insectos. De hecho, se estima que prácticamente todos los insectos están implicados en algún tipo de simbiosis con bacterias. Nuestro grupo está especializado en el estudio de estas interacciones bacteria-insecto desde la doble perspectiva evolutiva y sistémica, tomando como punto de partida el análisis genómico de asociaciones simbióticas con diferente antigüedad y nivel de integración, y utilizando técnicas experimentales y computacionales.

Alrededor del 15% de los insectos mantienen simbiosis mutualistas obligadas con bacterias endosimbiontes. Estas bacterias viven en células especializadas del hospedador (bacteriocitos) que con frecuencia se agrupan formando un órgano (bacterioma) situado en la cavidad abdominal del cuerpo del insecto. Atendiendo a su relevancia para la supervivencia del hospedador, existen endosimbiontes primarios (P-endosimbiontes, esenciales) y secundarios (S-simbiontes, facultativos). Los P-endosimbiontes se transmiten exclusivamente de forma vertical, de la madre a la descendencia. El establecimiento de este tipo de relaciones permitió a los hospedadores alimentarse con dietas pobres en algunos nutrientes esenciales, que son aportados por sus endosimbiontes, y la colonización de nuevos nichos. Es el caso de insectos que se alimentan de savia vegetal (pulgones, mosca blanca, cochinillas), pobre en aminoácidos esenciales y algunas vitaminas, o de sangre de vertebrados (mosca tse-tse, piojos), pobre en vitaminas y cofactores. En otros insectos

con dietas complejas (hormigas, cucarachas), la asociación es también nutricional, permitiendo el reciclaje de nitrógeno y su aprovisionamiento en fases del desarrollo en que su aporte es escaso o nulo pero imprescindible (por ejemplo, la metamorfosis). A cambio, las bacterias se benefician de un nicho intracelular estable, con una fuente permanente de nutrientes por parte del hospedador.

Para entender la naturaleza del proceso que lleva al establecimiento de estas relaciones mutualistas obligadas, en nuestro laboratorio investigamos la evolución de genomas de endosimbiontes de insectos en varias fases del proceso de integración, desde simbiosis recientes con genomas no reducidos, hasta otras extremas con genomas tan reducidos que no cubren las necesidades nutricionales de sus hospedadores y requieren del establecimiento de consorcios microbianos (Tabla 1). Ello nos ha permitido plantear hipótesis que expliquen el ritmo, modo y consecuencias del proceso de reducción genómica que experimentan estas bacterias. Para completar este tipo de estudios, estamos llevando a cabo análisis de expresión génica global, transcriptómico y proteómico, que nos permitan comparar las distintas soluciones que diferentes sistemas adoptan en función de sus simbioses y del grado de reducción de sus genomas. Es el caso de cuatro especies de pulgones con un mismo P-endosimbionte (*Buchnera aphidicola*) que aparece junto a otro simbiote (*Serratia symbiotica*) con distintos grados de integración (desde facultativo a co-primario), o el de cepas de mosca blanca con un mismo P-endosimbionte (*Portiera aleyrodidarum*) y diferentes S-simbiontes. De particular interés es el caso de las cochinillas algodonosas de la subfamilia *Pseudococcinae*, donde se presenta una endosimbiosis anidada,

ENDOSIMBIONTE	HOSPEDADOR	GENOMA (KB)	% GC	GENES	REF.
<i>Blochmannia floridanus</i>	<i>Camponotus floridanus</i> (hormiga)	706	27.4	631	4
<i>Buchnera aphidicola</i> BBp	<i>Baizongia pistacea</i> (pulgón)	618	25.3	553	20
<i>Buchnera aphidicola</i> BCc	<i>Cinara cedri</i> (pulgón)	422	20.2	402	15
<i>Serratia symbiotica</i> SCc		1763	29.2	772	5
<i>Buchnera aphidicola</i> BCt	<i>Cinara tujaefilina</i> (pulgón)	445	23.0	405	6
<i>Serratia symbiotica</i> SCt		~2500	~52.0	~1600	11
<i>Sodalis pierantonius</i> SOPE	<i>Sytophilus oryzae</i> (gorgojo)	4513	56.1	4147	13
<i>Tremblaya princeps</i> PCVAL	<i>Planococcus citri</i> (cochinilla algodonosa)	139	58.8	155	7
<i>Moranella endobia</i> PCVAL		538	43.5	483	8
<i>Blattabacterium cuenotti</i> BBge	<i>Blattella germanica</i> (cucaracha)	641	27.1	631	9
<i>Blattabacterium cuenotti</i> BCpu	<i>Cryptocercus punctulatus</i> (cucaracha de la madera)	610	23.8	589	12
<i>Blattabacterium cuenotti</i> BBor	<i>Blatta orientalis</i> (cucaracha)	638	28.2	627	14
<i>Portiera aleyrodidarum</i> BT-QVLC	<i>Bemisia tabaci</i> (mosca blanca)	351	26.2	314	16
<i>Cardinium</i> cBtQ1		1010	36.1	915	17
<i>Evansia muelleri</i>	<i>Xenophyes cascus</i> (bicho del musgo)	357	25.0	369	18

Tabla 1. Genomas de endosimbiontes secuenciados en nuestro laboratorio.

en la que una bacteria endosimbionte (*Tremblaya princeps*) alberga en sus células un segundo endosimbionte co-primario (*Moranella endobia*).

Nuestros análisis sobre genomas reducidos han sido además el punto de partida de diversos proyectos teóricos sobre de la composición y evolución de hipotéticos genomas mínimos, así como la inferencia de sus redes metabólicas y el análisis sistémico de las mismas (FBA, variabilidad, clasificación de modos, comparación de «subconjuntos enzimáticos» con los datos de transcriptoma y proteoma...). También hemos iniciado una línea de trabajo experimental utilizando la cucaracha *Blattella germanica* como insecto modelo, para conocer la regulación de la expresión génica en endosimbiontes de insectos sometidos a dietas con distinto contenido proteico.

Además de las relaciones endosimbióticas, muchos insectos mantienen asociaciones con comunidades bacterianas ectosimbióticas, cuyo papel en la biología de los insectos empezamos a conocer. Muchos de estos ectosimbiontes colaboran en el procesado de una dieta de bajo nivel nutricional, generalmente tóxica, por lo que su potencial biotecnológico es obvio. Queremos, además, estudiar el posible papel de los ectosimbiontes que componen la microbiota intestinal de *Blattella germanica* complementando el papel de los endosimbiontes.

ALGUNAS PUBLICACIONES RELEVANTES DEL GRUPO

- Belda E, Silva FJ, Peretó J, Moya A.** (2012). Metabolic networks of *Sodalis glossinidius*: a systems biology approach to reductive evolution. *PLoS One* 7:e30652.
- Carrasco P, Pérez-Cobas AE, van de Pol C, et al.** (2014). Succession of the gut microbiota in the cockroach *Blattella germanica*. *Int Microbiol* 17: 99-109.
- Delaye L, González-Domenech CM, Garcillán-Barcia MP, et al.** (2011). Blueprint for a minimal photoautotrophic cell: conserved and variable genes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *BMC Genomics* 12:12-25.
- Gil R, Silva FJ, Zientz E et al.** (2003). The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9388-9393.
- Lamelas A, Gosalbes MJ, Manzano-Marín A, et al.** (2011a). *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*: a missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genet* 7: e1002357.
- Lamelas A, Gosalbes MJ, Moya A, Latorre A.** (2011b). New clues about the evolutionary history of metabolic losses in bacterial endosymbionts, provided by the genome of *Buchnera aphidicola* from the aphid *Cinara tujaefilina*. *Appl Environ Microbiol* 77:4446-4454.
- López-Madrigal S, Latorre A, Porcar M, Moya A, Gil R.** (2011). Complete genome sequence of *Candidatus Tremblaya princeps* strain PCVAL, an intriguing translational machine below the living-cell status. *J Bacteriol* 193:5587-5588.
- López-Madrigal S, Latorre A, Porcar M, Moya A, Gil R.** (2013). Mealybugs nested endosymbiosis: going into the 'matryoshka' system in *Planococcus citri* in depth. *BMC Microbiol* 13:74.
- López-Madrigal S, Beltrà A, Resurrección S, et al.** (2014). Molecular evidence for ongoing complementarity and horizontal gene transfer in endosymbiotic systems of mealybugs. *Front Microbiol* 5:449.
- López-Sánchez MJ, Neef A, Peretó J, et al.** (2009). Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, primary endosymbiont of the cockroach *Blattella germanica*. *PLoS Genet* 5:e1000721.
- Manzano-Marín A, Lamelas A, Moya A, Latorre A.** (2012). Comparative genomics of *Serratia* spp.: two paths towards endosymbiotic life. *Plos One* 7:e47274.
- Manzano-Marín A, Latorre A.** (2014). Settling down: the genome of *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara tujaefilina* zooms in on the process of accommodation to a cooperative intracellular life. *Genome Biol Evol* 6:1683-1698.
- Neef A, Latorre A, Peretó J, et al.** (2011). Genome economization in the endosymbiont of the wood roach *Cryptocercus punctulatus* due to drastic loss of amino acid synthesis capabilities. *Genome Biol Evol* 3:1437-1448.
- Oakeson KF*, Gil R*, Clayton AL, et al.** (2014). Genome degeneration and adaptation in a nascent stage of symbiosis. *Genome Biol Evol* 6: 6-93. (* equal contribution).
- Patiño-Navarrete R, Moya A, Latorre A, Peretó J.** (2013). Comparative genomics of *Blattabacterium cuenoti*: the frozen legacy of an ancient endosymbiont genome. *Genome Biol Evol* 5:351-361.
- Pérez-Brocal V, Gil R, Ramos S, et al.** (2006). A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science* 314:312-313.
- Santos-García D, Farnier PA, Beitia F, et al.** (2012). Complete genome sequence of «*Candidatus Portiera aleyrodidarum*» BT-QVLC, an obligate symbiont that supplies amino acids y carotenoids to *Bemisia tabaci*. *J Bacteriol* 194:6654-6655.
- Santos-García D, Rollat-Farnier PA, Beitia F, et al.** (2014a). The genome of *Cardinium* cBtQ1 provides insights into genome reduction, symbiont motility, and its settlement in *Bemisia tabaci*. *Genome Biol Evol* 6:1013-1030.
- Santos-García D, Latorre A, Moya A, et al.** (2014b). Small but powerful, the primary endosymbiont of moss bugs, *Candidatus Evansia muelleri*, holds a reduced genome with large biosynthetic capabilities. *Genome Biol Evol* 6:1875-1893.
- van Ham RC, Kamerbeek J, Palacios C, et al.** (2003). Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:581-586.

Caracterización de aislados invasivos de neumococo y mecanismos moleculares de patogenicidad

Asunción Fenoll y José Yuste

Laboratorio de Referencia de Neumococos. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid

afenoll@isciii.es

jyuste@isciii.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Marisol Escolano, José Yuste, Asunción Fenoll, Bruno Corsini, María Dolores Vicioso, Leire Aguinagalde, Isabel Hernández.

El Laboratorio de Referencia de Neumococos (LRN) se dedica desde el año 1979 a la vigilancia microbiológica de *Streptococcus pneumoniae* (serotipos y resistencia antibiótica) de los aislados clínicos de neumococo que se reciben en el laboratorio, procedentes de hospitales de las distintas comunidades autónomas. En este sentido, nuestro laboratorio fue pionero identificando el primer aislado de neumococo resistente a penicilina en España en el año 1982. Desde entonces, se han identificado y caracterizado cerca de 80.000 aislados clínicos invasivos de neumococo que están disponibles en nuestra amplia colección de cepas. Con el fin de buscar nuevas estrategias terapéuticas que pudieran combatir el grave problema de la resistencia antibiótica, se inició una línea de investigación basada

en la acción combinada de diferentes antimicrobianos y anticuerpos específicos, demostrando la existencia de un sinérgismo entre determinados antibióticos y el sistema inmune mediado por la presencia de anticuerpos frente a neumococo. A partir del año 2010, con la incorporación del Dr. José Yuste, se ampliaron las líneas de trabajo del laboratorio con especial interés en la identificación y caracterización de diferentes factores de virulencia de neumococo, analizando diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador. El LRN está formado por dos facultativos que son la Dra. Asunción Fenoll que es la responsable del laboratorio de referencia y se encarga de la parte diagnóstica y epidemiológica y por el Dr. José Yuste que es el responsable de la unidad de investigación.

El resto de integrantes del laboratorio son tres titulados superiores que están realizando su tesis doctoral (Leire Aguinagalde, Bruno Corsini y Marisol Escolano) y dos técnicos de laboratorio (María Dolores Vicioso e Isabel Hernández). A continuación se exponen las principales líneas de investigación del laboratorio.

BASES MOLECULARES DE LA VIRULENCIA DE NEUMOCOCO

Streptococcus pneumoniae es el principal agente etiológico de las neumonías adquiridas en la comunidad y uno de los principales responsables de sepsis y meningitis bacteriana no epidémica afectando principalmente a la población pediátrica y a los adultos mayores de 65 años. Aunque la cápsula polisacárida de neumococo es el principal factor de virulencia, existen numerosas proteínas, muchas de ellas de función desconocida, que también participan en el establecimiento de la enfermedad invasiva. Uno de los principales objetivos del laboratorio, consiste en estudiar diferentes mecanismos moleculares implicados en diversas fases del proceso infeccioso como son la colonización del tracto respiratorio superior, la neumonía y la sepsis. Para ello, se utilizan mutantes de diferentes cepas con el fin de evaluar su capacidad para colonizar e invadir el hospedador utilizando líneas celulares epiteliales humanas. Otro aspecto que estudia el grupo, consiste en evaluar la capacidad de evasión de la respuesta inmune del hospedador, analizando la evasión de la inmunidad mediada por el sistema del complemento así como la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares humanos y macrófagos utilizando diferentes líneas celulares. Para poder abordar estos estudios se utiliza la citometría de flujo y la microscopía confocal como principales técnicas metodológicas. Esta línea de investigación se realiza en colaboración con los Dres. Ernesto García y Pedro García del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, con el Dr. Javier Galiano del ISCIII y con el Dr. Jeremy S Brown de University College en Londres.

BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS PROTEICOS COMO POSIBLES CANDIDATOS A NUEVAS VACUNAS ANTINEUMOCÓCICAS

El desarrollo, comercialización y administración tanto de las vacunas polisacáridas de neumococo como de las vacunas conjugadas proporcionan un beneficio significativo en la lucha frente a la enfermedad neumocócica invasiva. Sin embargo, estas vacunas proporcionan una cobertura limitada ya que tan sólo confieren protección frente a unos determinados serotipos. Por ello, la identificación y caracterización de diferentes proteínas de neumococo que estén presentes en todos los aislados clínicos, como posibles candidatas a una vacuna universal proteica, sería de gran relevancia y repercusión en salud pública para combatir la elevada morbilidad y mortalidad producida por este importante patógeno humano. En nuestro grupo, estamos estudiando el papel protector de un grupo de proteínas que pertenecen a la familia de las proteínas de unión a colina y dentro de éstas, a las hidrolasas de pared celular

de neumococo en colaboración con el grupo del CIB-CSIC mencionado anteriormente.

IMPORTANCIA DE LA EXPOSICIÓN AL HUMO DE TABACO EN LA PERSISTENCIA PULMONAR PRODUCIDA POR AISLADOS CLÍNICOS DE NEUMOCOCO PROCEDENTES DE PACIENTES CON EPOC

Como ya se ha comentado anteriormente, *S. pneumoniae* es la principal causa de neumonías adquiridas en la comunidad tanto en adultos como en niños. Recientemente se ha descrito que un grupo reducido de aislados de neumococo pertenecientes a serotipos muy concretos, están frecuentemente asociados a episodios de exacerbaciones agudas en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), siendo el tabaco un factor de riesgo para esta enfermedad. El principal objetivo de esta línea se basa en caracterizar posibles factores de virulencia de la bacteria implicados en este fenotipo persistente que origina neumonías recurrentes en estos pacientes. Desde la perspectiva del hospedador, otro de los objetivos de esta línea de trabajo, consiste en caracterizar el papel que tiene la exposición de diferentes células del hospedador al humo de tabaco y cómo afecta al fenotipo de persistencia de los distintos aislados clínicos. Esta línea se desarrolla en colaboración con las Dras. Josefina Liñares y Carmen Ardanuy del Hospital de Bellvitge.

BIBLIOGRAFÍA

- Martín-Galiano AJ, Yuste J, Cercenado MI, de la Campa AG. (2014). Inspecting the potential physiological and biomedical value of 44 conserved uncharacterised proteins of *Streptococcus pneumoniae*. BMC Genomics.15:652.
- Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. (2013). Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 81:2606-15.
- Ramos-Sevillano E, Rodríguez-Sosa C, Cafini F, Giménez MJ, Navarro A, Sevillano D, Alou L, García E, Aguilar L, Yuste J. (2012). Cefditoren and ceftriaxone enhance complement-mediated immunity in the presence of specific antibodies against antibiotic-resistant pneumococcal strains. PLoS One. 7:e44135.
- Fenoll A, Aguilar L, Giménez MJ, Vicioso MD, Robledo O, Granizo JJ, Coronel P. (2012). Comparative in vitro activity of common antibiotics and relationship with changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing otitis in children prior to and 10 years after introduction of conjugate vaccines in Spain. Int J Antimicrob Agents. 40:376-7.
- Fenoll A, Aguilar L, Giménez MJ, Vicioso MD, Robledo O, Granizo JJ, Coronel P. (2012). Variations in serotypes and susceptibility of adult non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates between the periods before (May 2000-May 2001) and 10 years after (May 2010-May 2011) introduction of conjugate vaccines for child immunisation in Spain. Int J Antimicrob Agents. 40:18-23.
- Ramos-Sevillano E, Rodríguez-Sosa C, Díez-Martínez R, Giménez MJ, Olmedillas E, García P, García E, Aguilar L, Yuste J. (2012). Macrolides and β -lactam antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. Antimicrob Agents Chemother.;56:5534-40.
- Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. (2011). Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by

- the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One. 6:e23626.
- Fenoll A, Aguilar L, Vicioso MD, Gimenez MJ, Robledo O, Granizo JJ.** (2011). Increase in serotype 19A prevalence and amoxicillin non-susceptibility among paediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluid in a passive laboratory-based surveillance in Spain, 1997-2009. BMC Infect Dis. 11:239.
- Tarragó D, Aguilar L, García R, Gimenez MJ, Granizo JJ, Fenoll A.** (2011). Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from children in Spain, 1990 to 2008. Antimicrob Agents Chemother. 55:2297-302.
- Cafini F, Yuste J, Giménez MJ, Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Ramos-Sevillano E, Torrico M, González N, García E, Coronel P, Prieto J.** (2010). Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant *S. pneumoniae* (serotypes 6B, 19F and 23F) in a sepsis model. PLoS One. 5:e12041.
- Campuzano S, de Ávila BE, Yuste J, Pedrero M, García JL, García P, García E, Pingarrón JM.** (2010). Disposable amperometric magnet-immunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*. Biosens Bioelectron. 26:1225-30.
- Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jönsson G, Hyams C, Cohen JM, Camberlein E, Sriskandan S, Brown JS.** (2010). Impaired opsonization with complement and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* in sera from subjects with inherited C2 deficiency. Microbes Infect. 12:626-34.
- Yuste J, Khandavilli S, Ansari N, Muttardi K, Ismail L, Hyams C, Weiser J, Mitchell T, Brown JS.** (2010). The effects of PspC on complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae* vary with strain background and capsular serotype. Infect Immun. 78:283-92.
- Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Giménez MJ, Aragonese-Fenoll L, Hanquet G, Casal J, Tarragó D.** (2009). Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. J Clin Microbiol. 47:1012-20.

Biología de patógenos bacterianos intracelulares

María Graciela Pucciarelli y Francisco García del Portillo

Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» Universidad Autónoma de Madrid
y Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

mg.pucciarelli@uam.es

fgportillo@cnb.csic.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha. M. Graciela Pucciarelli, Francisco García del Portillo, Pablo García, Estel Ramos, Diana Barroso, Gadea Rico, Daniela Gargano y Noelia López.

Muchas enfermedades que impactan la salud del hombre y animales están causadas por bacterias que invaden y colonizan el nicho intracelular de células eucariotas. Entre estas enfermedades destacan, entre otras, tuberculosis, fiebre tifoidea, listeriosis, clamidiosis, brucelosis, rickettsiosis, fiebre Q y legionelosis. Algunas bacterias patógenas que producen estas patologías, como las de los géneros *Rickettsia* spp., *Chlamydia* spp. y *Coxiella* spp., son incapaces de crecer y proliferar fuera de la célula eucariota.

De enorme interés en investigación son también las bacterias patógenas intracelulares «facultativas» que colonizan distintos tipos celulares eucariotas además de ambientes diversos fuera del hospedador. Los datos obtenidos hasta la fecha muestran la existencia de sistemas de regulación que se encargan de reprogramar la fisiología de la bacteria durante la transición desde el ambiente extracelular al intracelular, ó viceversa. Nuestro grupo aborda como principal objetivo el conocimiento de estas pautas de regulación y, por ende, los mecanismos de adaptación al estilo de vida intracelular una vez el patógeno ha invadido la célula eucariota. Para acometer esta empresa, utilizamos dos bacterias con distinta envoltura y variado modo de vida intracelular. Por un lado, la bacteria Gram-positiva *Listeria monocytogenes*, agente causante de la listeriosis. *L. monocytogenes* atraviesa barreras de defensa naturales como el epitelio intestinal, la barrera hematoencefálica y la placenta. Como segundo patógeno modelo, la bacteria Gram-negativa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), agente causante de gastroenteritis y, eventualmente, de enfermedad sistémica si existen riesgos adicionales como coinfección o alteraciones en defensas del hospedador. Ambos patógenos inician la infección en ganado y humanos tras el consumo de alimentos contaminados.

LA PARED CELULAR BACTERIANA Y LA ADAPTACIÓN AL AMBIENTE INTRACELULAR EUCARIOTA

Una estructura celular clave en el mantenimiento de la forma e integridad de casi todas las bacterias es la «pared» o envuelta. Dentro de la pared es la macromolécula de peptidoglicano, también conocida como «mureína», la que asegura la forma e integridad celular. Históricamente, la bioquímica del peptidoglicano ha sido estudiada intensamente por ser blanco de antibióticos como los del grupo de beta-lactámicos. Estudios más recientes indican que el peptidoglicano es una señal de alarma para sistemas de defensa innatos del hospedador. Así, se han caracterizado receptores dispuestos en el citosol de células eucariotas, como Nod1 y Nod2, que reconocen «patrones moleculares» presentes en fragmentos del peptidoglicano. Curiosamente, este reconocimiento se da en el interior de la célula eucariota, indicando que la evolución parece haber diseñado defensas para el control de infecciones bacterianas intracelulares. De interés, determinados patógenos bacterianos intracelulares han evolucionado reali-

zando modificaciones en el peptidoglicano que influyen en su reconocimiento por enzimas de defensa (por ejemplo, lisozima) o receptores tipo Nod. En el contexto de nuestra investigación, estamos también interesados en una gran familia de proteínas unidas covalentemente al peptidoglicano en el género *Listeria*. La gran mayoría de estas proteínas de superficie (aparecen en una media de 40 en todas las especies y estirpes de este género con genoma secuenciado) son exclusivas de *Listeria*, existiendo un número apreciable de las mismas que están presentes sólo en especies patógenas. La función de aproximadamente el 90% de estas proteínas es desconocida, aunque se postula podrían estar involucradas en la adaptación de *Listeria* a ambientes diversos.

NUESTRA INVESTIGACIÓN EN *L. MONOCYTOGENES* Y *S. ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM

Los abordajes experimentales que utiliza nuestro grupo tienen un denominador común, el «aislamiento de bacterias de células eucariotas infectadas en cultivo». Esta metodología es laboriosa en lo que respecta al número de células eucariotas que hay que infectar para obtener la cantidad de material bacteriano necesaria para realizar biología molecular. Como ejemplo ilustrativo, la obtención de 10^7 bacterias intracelulares (el equivalente a 10 microlitros de un cultivo bacteriano que ha crecido una noche en medio de laboratorio!!!) supone infectar aproximadamente del orden de 10^7 fibroblastos o células epiteliales. Cuando el experimento tiene por objeto la purificación de peptidoglicano sintetizado por la bacteria intracelular, estos

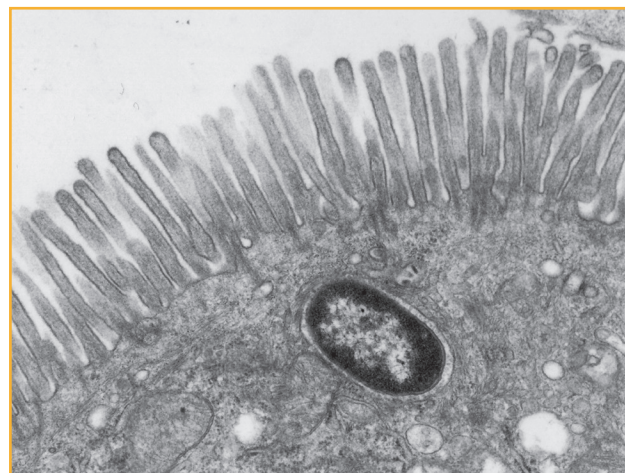


Imagen de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium tras invadir un enterocito del epitelio intestinal de ratón. Nótese que la bacteria se localiza en un compartimento vacuolar, también conocido como fagosoma o SCV, por «*Salmonella*-containing vacuole». A diferencia de este estilo de vida intracelular, *Listeria monocytogenes* utiliza proteínas que degradan la membrana fagosomal, proliferando posteriormente en el citosol de la célula infectada.

números se incrementan en varios órdenes de magnitud. A pesar de estas dificultades, este abordaje experimental es el único que permite obtener información sobre la biología del patógeno durante su ciclo de infección intracelular. Así, hemos obtenido logros como el transcriptoma de *S. Typhimurium* cuando persiste en un estado intracelular de no crecimiento; la estructura del peptidoglicano que *S. Typhimurium* sintetiza en el interior de células epiteliales; el proteoma de la pared de *L. monocytogenes* aislada de células epiteliales infectadas; y, el perfil de expresión en tiempo real y a lo largo de distintas fases de la infección intracelular de 56 RNA pequeños reguladores (sRNA) de *S. Typhimurium*.

La información de «carácter global» obtenida en esos estudios nos permite en la actualidad abordar con similar metodología preguntas que ahora dirigimos a proteínas, RNAs reguladores y procesos concretos. Como ejemplo, hemos descifrado una regulación que actúa sobre una proteína de *L. monocytogenes* unida a peptidoglicano que el patógeno induce en el ambiente intracelular. El aumento de los niveles de esta proteína requiere la unión de un sRNA regulador a una región 5'-UTR (región no traducida del mRNA) de una variante del transcrito del gen diana. En *S. Typhimurium* estamos estudiando enzimas implicadas en la síntesis, remodelación e hidrólisis del peptidoglicano en bacteria intracelular, siempre teniendo como referencia bacteria crecida en medios de laboratorio. Dentro de este grupo de enzimas hemos identificado algunas exclusivas del género *Salmonella*. Curiosamente, algunas de ellas son reguladas positivamente en el ambiente intracelular.

Señalar igualmente nuestro interés por conocer la «biología celular» de la infección intracelular, centrándonos en un modelo de infección persistente en el que la bacteria no prolifera en la célula eucariota. Los datos obtenidos hasta la fecha implican a la maquinaria autofágica de la célula hospedadora como regulador del crecimiento de *S. Typhimurium*. En el caso de la infección persistente, la autofagia del patógeno intracelular muestra características distintivas a lo descrito en la literatura en otros modelos de infección.

Destacar como mensaje final las extraordinarias diferencias que observamos en muchos procesos cuando estudiamos estas bacterias en el ambiente intracelular y extracelular. El entender cómo, cuándo, y quién es el responsable de estos cambios mantendrá sin duda nuestro entusiasmo por esa «vida» todavía tan misteriosa que determinadas bacterias patógenas desarrollan en el interior de nuestras células.

BIBLIOGRAFÍA

- Ortega AD, Quereda JJ, Pucciarelli MG y García-del Portillo, F. (2014). Non-coding RNA regulation in pathogenic bacteria located inside eukaryotic cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 4:162. eCollection 2014.
- Quereda JJ, Ortega AD, Pucciarelli MG*, y García-del Portillo, F. (2014). The *Listeria* small RNA Rli27 regulates a cell wall protein inside eukaryotic cells by targeting a long 5'-UTR variant. *PLoS Genetics* 10(10):e1004765. doi: 10.1371/journal.pgen.1004765. (*) co-corresponding author.
- Hernández, SB, Cava F, Pucciarelli MG, García-del Portillo F., de Pedro MA y Casadesús J. (2014). Bile-induced peptidoglycan remodelling in *Salmonella enterica*. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.12491.
- Bécavin C, Bouchier C, Lechat P, Archambaud C, Creno S, Gouin E, Wu Z, Kühbacher A, Brisse S, Pucciarelli MG, García-Del Portillo F., Hain T, Portnoy DA, Chakraborty T, Lecuit M, Pizarro-Cerdá J, Moszer I, Bierre H y Cossart P. (2014) Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S and EGD-e highlights genomic divergence underlying differences in pathogenicity. *mBio* doi: 10.1128/mBio.00969-14.
- Mariscotti JF, Quereda JJ, García-Del Portillo F, Pucciarelli MG. (2014) The *Listeria monocytogenes* LPXTG surface protein Lm01413 is an invasin with capacity to bind mucin *Int. J. Med. Microbiol.* 304:393-404.
- Quereda JJ y Pucciarelli MG (2014) Deletion of the membrane protein Lmo0412 increases the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* 16:623-632.
- Núñez-Hernández C, Alonso A, Pucciarelli MG, Casadesús J y García-Del Portillo F. (2014). Dormant intracellular *Salmonella* discriminates among SPI-2 effectors to persist inside fibroblasts. *Infect. Immun.* 82: 221-232.
- Gonzalo-Asensio J, Ortega AD, Rico-Pérez G, Pucciarelli MG y García-Del Portillo F (2013). A Novel antisense RNA from the *Salmonella* virulence plasmid pSLT expressed by non-growing bacteria inside eukaryotic cells. *PLoS One* 8(10):e77939. doi: 10.1371/journal.pone.0077939.
- Silva, IJ, Ortega AD, Viegas SC, García-del Portillo F (*) y Arraiano CM. (2013). An RpoS-dependent sRNA regulates the expression of a chaperone involved in protein folding. *RNA* 19: 1253-1265. (*) co-corresponding author.
- Hernández, S.B., Ayala, J.A., Rico-Pérez, G., García-del Portillo, F., Casadesús, J. (2013). Increased bile resistance in *Salmonella enterica* mutants lacking Prc periplasmic protease *Int. Microbiol.* 16:87-92.
- Núñez-Hernández C, Tierrez A, Ortega AD, Pucciarelli MG, Godoy M, Esiman B, Casadesús J y García-del Portillo, F. (2013). Genome expression analysis of non-proliferating intracellular *Salmonella* unravels an acid pH-dependent PhoP-PhoQ response essential for dormancy. *Infect. Immun.* 81:154-165.
- Ortega, A.D., Gonzalo-Asensio, J. y García-del Portillo, F. (2012). Dynamics of *Salmonella* small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells. *RNA Biology* 9:469-488.
- García-del Portillo F, Calvo E, D'Orazio V y Pucciarelli MG (2011). Association of ActA to peptidoglycan revealed by cell wall proteomics of intracellular *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* 286:34675-34689.
- Aiastui A, Pucciarelli MG y García-del Portillo F. (2010). *Salmonella* invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect. Immun.* 78:2700-2713.

Grupo de genética de micobacterias

Jesús Gonzalo-Asensio, José Antonio Aínsa, Sofía Samper, Nacho Aguiló, Isabel Otal y Carlos Martín

Universidad de Zaragoza, IACS, CIBERES, IIS Aragón

carlos@unizar.es



Foto de grupo. De izda a dcha y de arriba abajo: Carlos Martín Montañés, Irene Pérez Sánchez, Alberto Cebollada Solanas, Sofía Samper Blasco, Samuel Álvarez Arguedas, Santiago Uranga Maiz, Carmen Lafoz Pueyo, Isabel Otal Gil, José Antonio Ainsa Claver, Jesús Gonzalo Asensio, Ana Picó Marco, Ana Belén Gómez Aguirre, Begoña Gracia Díaz, Nacho Aguiló Anento, Nedra Meftahi.

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas que causa mayor número de muertes en el mundo, junto con el SIDA y la malaria. En 2012 la epidemia de TB causó más de 1,3 millones de muertes y 8,4 millones de personas enfermaron de TB, siendo las formas pulmonares las responsables de la transmisión de la enfermedad. La aparición de cepas multirresistentes (TB-MDR) y extensamente resistentes (TB-XDR) a los fármacos constituye una nueva amenaza para el control de esta enfermedad. En su último informe, la OMS señala que los casos de TB-MDR aumentaron en la mayoría de países con alta incidencia de la enfermedad.

Nuestra investigación multidisciplinar del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) incluye el estudio de la epidemiología de la enfermedad, las bases moleculares de la resistencia y la búsqueda de nuevos fármacos y de nuevas vacunas como actuaciones fundamentales para avanzar en el control de la TB.

NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS Y ESTUDIO DE LA INMUNIDAD

Trabajamos desde hace más de 15 años en el desarrollo de la vacuna MTBVAC, una bacteria viva basada en la atenuación de *M. tuberculosis* mediante la eliminación de los genes *phoP* y *fadD26* (Arbués *et al.*, 2013). El grupo fue pionero en la identificación del gen *phoP* como un importante regulador de la virulencia en *M. tuberculosis* y recientemente ha descubierto como mutaciones en *phoP* han tenido un gran impacto en la evolución de *Mycobacterium* y su adaptación a diferentes hospedadores (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2014).

Hemos llevado a cabo una exhaustiva caracterización de la vacuna (lipidómica, transcriptómica (Solans *et al.*, 2014)

y proteómica (Solans *et al.*, 2014)) para comprender las propiedades de MTBVAC como vacuna a nivel molecular.

La pérdida de varios antígenos podría explicar la falta de protección inducida por la actual vacuna BCG. Por esto, pretendemos demostrar que la presencia de estos antígenos en MTBVAC conduce a una mayor inmunogenicidad, y también a una mejor protección de esta vacuna respecto a BCG.

Por otro lado, también estamos interesado en el estudio de mecanismos de patogenicidad de *M. tuberculosis*, concretamente en la inducción de apoptosis en la célula hospedadora como mecanismo de virulencia. Nuestras investigaciones demuestran como este fenotipo es un rasgo específico de cepas virulentas, que aprovechan el proceso de apoptosis para infectar nuevas células hospedadoras, (Aguiló *et al.*, 2013, Aguiló *et al.*, 2014).

TRANSPOSICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TB

Diversos polimorfismos como mutaciones puntuales, transposición o recombinación, influyen en la transmisibilidad y adaptación de *M. tuberculosis* al hospedador. El transposón *IS6110*, específico del CMT, tiene utilidad como marcador epidemiológico. Se han localizado las copias de *IS6110* en el genoma de cepas de alto interés para la población, facilitando así la identificación y diferenciación de estas cepas (Alonso *et al.*, 2011, Alonso *et al.*, 2013, Millan *et al.*, 2013).

Los estudios de tipificación genómica permiten diferenciar entre cepas del CMT y ofrecen la posibilidad de detectar brotes, diferenciar transmisión reciente de reactivación, realizar estudios poblacionales, y apoyar en la vigilancia epidemiológica. Desde 2004, en colaboración con el Depar-

tamento de Salud y Consumo del Gobierno de Aragón, y con el fin de disminuir la tasa de incidencia de tuberculosis, realizamos la caracterización molecular sistemática de las cepas del CMT de Aragón.

La fotografía de las cepas circulantes entre nuestra población nos permite identificar los aislados más prevalentes, caracterizarlos y estudiar los polimorfismos genéticos que pudieran estar interviniendo en su comportamiento (Millan *et al.*, 2013, Alonso *et al.*, 2013, Villellas *et al.*, 2013). Desde enero de 1998, coordinamos junto con el Instituto de Salud Carlos III, el Grupo Español de Trabajo sobre Tuberculosis MDR, una red que colabora con CNE en la vigilancia molecular de la TB-MDR en Europa, aportando los distintos patrones genéticos obtenidos en nuestro laboratorio (Gavin *et al.*, 2012, de Beer *et al.*, 2014).

BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA Y NUEVOS FÁRMACOS CONTRA TB

Hemos estudiado mecanismos de resistencia intrínseca a antibióticos, tales como enzimas modificantes de aminoglicósidos, y caracterizamos la proteína Rv1258c como la primera bomba de eflujo funcional de *M. tuberculosis*. Demostramos la contribución de las bombas de eflujo a la resistencia a fármacos (Rodrigues *et al.*, 2013) y al estrés oxidativo, y a la supervivencia del bacilo mediada por la bomba Rv1258c (Ramón-García *et al.*, 2012), en la que además descubrimos un polimorfismo específico de las cepas de la familia Beijing (Villellas *et al.*, 2013).

La posibilidad de inhibir las bombas de eflujo es una opción terapéutica interesante (Rodrigues 2011) que ha orientado nuestro interés hacia el descubrimiento de nuevos fármacos contra TB. En colaboración con diversos grupos hemos descrito moléculas activas frente a *M. tuberculosis* (Familiar *et al.*, 2010, Tizón *et al.*, 2011, Luo *et al.*, 2013), y hemos demostrado que la capacidad de la bomba Rv1258c para transportar las nuevas espectinamidas es un factor clave para su actividad antituberculosis (Lee *et al.*, 2014).

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiló JI, Alonso H, Uranga S, Marinova D, Arbués A, de Martino A, Anel A, Monzon M, Badiola J, Pardo J, Brosch R, Martín C. (2013) «ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*» *Cell Microbiol.* 15:1994-2005.
- Aguiló N, Uranga S, Marinova D, Martín C, Pardo J. (2014) Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Death Dis.* 17;5:e1343.
- Alonso H, Aguiló JI, Samper S, Caminero JA, Campos-Herrero MI, Gicquel B, Brosch R, Martín C, Otal I. Deciphering the role of IS6110 in a highly transmissible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain, GC1237. *Tuberculosis (Edinb).* (2011). 91:117-26.
- Alonso H, Samper S, Martín C, Otal I. (2013) Mapping IS6110 in high-copy number *Mycobacterium tuberculosis* strains shows specific insertion points in the Beijing genotype. *BMC Genomics.* 14:422.
- Arbues A, Aguiló JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, Puentes E, Fernandez C, Parra A, Cardona PJ, Vilaplana C, Ausina V, Williams A, Clark S, Malaga W, Guilhot C, Gicquel B, Martín C. (2013) Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine.* 31:4867-73.
- De Beer JL, Kodmon C, van der Werf MJ, van Ingen J, van Soolingen D; ECDC MDR-TB Molecular Surveillance Project Participants. (2014). Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011. *Euro Surveill.* 19.
- Familiar O, Munier-Lehmann H, Ainsa JA, Camarasa MJ, Pérez-Pérez MJ. (2010) Design, synthesis and inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis* thymidine monophosphate kinase of acyclic nucleoside analogues with a distal imidazoquinolinone. *Eur J Med Chem.* 45:5910-8.
- Gavin P, Iglesias MJ, Jiménez MS, Rodríguez-Valín E, Ibarz D, Lezcano MA, Revillo MJ, Martín C, Samper S; Spanish Working Group on MDR-TB. (2012) Long-term molecular surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in Spain. *Infect Genet Evol.* 12:701-10.
- Gonzalo-Asensio J, Malaga W, Pawlik A, Astarie-Dequeker C, Passemar C, Moreau F, Laval F, Daffé M, Martín C, Brosch R, Guilhot C. (2014) Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *PNAS* 111:11491-6.
- Lee RE, Hurdle JG, Liu J, Bruhn DF, Matt T, Scherman MS, Vaddady PK, Zheng Z, Qi J, Akbergenov R, Das S, Madhura DB, Rath C, Trivedi A, Villellas C, Lee RB, Rakesh, Waidyarachchi SL, Sun D, McNeil MR, Ainsa JA, Boshoff HI, Gonzalez-Juarrero M, Meibohm B, Böttger EC, Lenaerts AJ. (2014) Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. *Nat Med.* 20:152-8.
- Luo X, Pires D, Ainsa JA, Gracia B, Duarte N, Mulhovo S, Anes E, Ferreira MJ. (2013) *Zanthoxylum capense* constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and ex vivo within human macrophages. *J Ethnopharmacol.* 146:417-22.
- Millán-Lou MI, López-Calleja AI, Colmenarejo C, Lezcano MA, Vitoria MA, del Portillo P, Otal I, Martín C, Samper S. (2013). Global study of IS6110 in a successful *Mycobacterium tuberculosis* strain: clues for deciphering its behavior and for its rapid detection. *J Clin Microbiol.* 51:3631-7.
- Ramón-García S, Mick V, Dainese E, Martín C, Thompson CJ, De Rossi E, Manganelli R, Ainsa JA. (2012) Functional and genetic characterization of the tap efflux pump in *Mycobacterium bovis* BCG. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:2074-83.
- Rodrigues L, Ainsa JA, Amaral L, Viveiros M. (2011) Inhibition of drug efflux in mycobacteria with phenothiazines and other putative efflux inhibitors. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 6:118-27.
- Rodrigues L, Villellas C, Bailo R, Viveiros M, Ainsa JA. (2013) Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:751-7.
- Solans L, Aguiló N, Samper S, Pawlik A, Frigui W, Martín C, Brosch R, Gonzalo-Asensio J. A Specific Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Causes Differential ESAT-6 Expression and Identifies WhiB6 as a Novel ESX-1 Component. *Infect Immun.* 82:3446-56.
- Solans L, Gonzalo-Asensio J, Sala C, Benjak A, Uplekar S, Rougemont J, Guilhot C, Malaga W, Martín C, Cole ST. (2014) The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 10:e1004183
- Tizón L, Otero JM, Prazeres VF, Llamas-Saiz AL, Fox GC, van Raaij MJ, Lamb H, Hawkins AR, Ainsa JA, Castedo L, González-Bello C. (2011) A prodrug approach for improving antituberculosis activity of potent *Mycobacterium tuberculosis* type II dehydroquinase inhibitors. *J Med Chem.* 54:6063-84.
- Villellas C, Aristimuño L, Vitoria MA, Prat C, Blanco S, García de Viedma D, Domínguez J, Samper S, Ainsa JA. (2013) Analysis of mutations in streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J Clin Microbiol.* 51:2124-30.

Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas

José Berenguer

Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» CSIC-Universidad Autónoma de Madrid



Foto de grupo. Miembros del grupo de Biotecnología y Genética de Bacterias Termófilas. De pie desde la izquierda: Leticia Torres, Eloy Ferreras, Marcos Almendros, José Berenguer, Carlos Brício, Esther Sanchez, Laura Alvarez, Jorge Perez. Sentados: Aurelio Hidalgo, Maria Luisa del Pozo, Alba Blesa.

Los organismos termófilos se han convertido en los últimos 20 años en modelos biológicos muy relevantes en distintos ámbitos de las Biociencias. Uno de tales aspectos es el aprovechamiento que de la estabilidad intrínseca de sus componentes se ha hecho para desarrollar aplicaciones biotecnológicas de enorme repercusión, como el proceso de amplificación de ADN que ha significado un salto extraordinario en nuestra capacidad de detección de la información genética en pruebas diagnósticas, forenses, y en todos los ámbitos de la Biología. Además, dada la asociación entre estabilidad térmica y resistencia a solventes orgánicos y detergentes, existe en la industria un gran interés por la utilización de estas enzimas en procesos de biocatálisis. Un segundo aspecto relevante viene dado por la mayor facilidad para cristalizar que tienen las proteínas y los grandes complejos biológicos de los termófilos. Gracias a ello, las primeras estructuras de alta resolución que se obtuvieron de los ribosomas, las máquinas que fabrican proteínas, o del denominado complejo respiratorio I, pieza fundamental para la respiración, fueron obtenidos a partir de bacterias termófilas. Por tanto, los organismos termófilos constituyen también excelentes modelos en Biología Estructural. Finalmente, los organismos termófilos que crecen a mayor

temperatura, son los más parecidos a los primeros seres vivos que habitaron este planeta. Aunque este aspecto es aún controvertido, la mayor parte de las comparaciones genéticas entre organismos señalan a los organismos termófilos como los más antiguos en la evolución, constituyendo su análisis una forma de viajar en el tiempo para descubrir cómo fueron los primeros habitantes de la tierra.

A pesar de este interés biológico y aplicado, la utilización de organismos termófilos como modelo se ve restringida por la dificultad que su cultivo presenta para un laboratorio. Mucho esfuerzo ha sido empleado por diversos laboratorios en el mundo para «domesticar» algunos de estos organismos. A pesar de ello, sólo se ha tenido éxito razonable con las arqueas *Sulfolobus* spp y *Thermococcus* spp, y la bacteria *Thermus thermophilus* (Cava *et al.*, 2009).

Nuestro grupo de investigación ha sido uno de los que ha participado en la domesticación y adaptación al laboratorio de *Thermus thermophilus*, y hoy en día constituye nuestro modelo principal de trabajo (Cava *et al.*, 2009). A diferencia de otras bacterias termófilas extremas, muchos aislados de *T. thermophilus* crecen rápidamente en el laboratorio, duplicando su población a 70°C cada 45 min en medios líquidos,

y formando colonias en placa en 24 horas. Además, la disponibilidad de un aparato de competencia natural muy eficiente nos ha permitido desarrollar un juego de herramientas genéticas completo que da acceso a su análisis fisiológico y funcional, e incluso a su utilización como factoría celular para la producción de proteínas (Hidalgo y Berenguer 2013).

Empleando este modelo, en nuestro laboratorio seguimos dos líneas de investigación paralelas. Por un lado, estudiamos el proceso de la desnitrificación presente en algunas cepas de *Thermus* spp y su regulación (Cava *et al*, 2008a), y la forma en que esta capacidad se transfiere horizontalmente, y por otro, desarrollamos aplicaciones biotecnológicas derivadas del organismo o de sus enzimas (Hidalgo y Berenguer 2013).

Por desnitrificación se conoce a un proceso en el que en vez de oxígeno se emplean óxidos de nitrógeno para quemar los nutrientes y obtener energía, eliminando de paso el nitrato del medio. Nuestro grupo ha descrito y caracterizado un conjunto de reductasas necesarias para respirar nitrato (Nar), nitrito (Nir) (Álvarez *et al*, 2014) y óxido nítrico (Nor) a alta temperatura, y hemos descubierto que los genes que las codifican se hallan integrados en una región del genoma fácilmente transferible a otras cepas de la misma especie (Álvarez *et al*, 2011). Entre los aspectos bioquímicos y funcionales más interesantes que hemos descrito se encuentra el hecho de que la Nar de *T. thermophilus*, además de reducir el nitrato, es capaz de actuar como transportador de electrones hacia la Nir y la Nor, algo que en organismos no termófilos es llevado a cabo por el complejo respiratorio III, al que la Nar sustituye en este papel (Cava *et al*, 2008b). Otros aspectos importantes han sido descritos para la Nor, que contiene una subunidad adicional de función desconocida (Bricio *et al*, 2014) y dispone de varias vías de entrada de protones desde el citoplasma (Schurig-Briccio *et al*, 2007). A nivel más genético nos intriga el mecanismo de transferencia de ADN por contacto directo célula-célula, pues no se parece a ninguno de los hasta ahora descritos (César *et al*, 2011). Es interesante destacar que durante su estudio comparado con el sistema de transformación natural hemos descubierto la existencia de una proteína parecida al Argonauta humano que protege a las células mediante un sistema único de interferencia ADN-ADN, el primero de este tipo que ha sido descrito, de la posible acción nociva de genes de origen desconocido adquiridos del medio ambiente (Swarts *et al*, 2014).

En una línea más aplicada, nuestros esfuerzos se han concentrado principalmente en dos aspectos. Por un lado, hemos desarrollado un procedimiento que permite la selección de formas termoestables de enzimas y proteínas procedentes de organismos no termófilos mediante interferencia de plegamiento (Chautard *et al*, 2007). Esta técnica consiste en expresar en nuestra bacteria modelo a alta temperatura fusiones entre la proteína a estabilizar y una proteína que confiera una propiedad detectable, como es la resistencia a un antibiótico. Normalmente, la proteína no estable plegará mal en estas condiciones e interferirá con el plegamiento del testigo, dando lugar a bacterias sensibles. Por el contrario, las variantes termoestables plegarán bien, no interferirán, y generarán clones resistentes. De esta forma hemos estabilizado desde proteínas terapéuticas

(Chautard *et al*, 2007) a enzimas de utilidad en biocatálisis. En el futuro inmediato y a través de proyectos de la UE y del MINECO, desarrollaremos versiones de alta capacidad de cribado de este método, empleando para ello variantes termoestables de proteínas fluorescentes que hemos desarrollado. Por otro lado, hemos utilizado enzimas procedentes de distintas cepas para su utilización en procesos de biocatálisis (Almendros *et al*, 2012; Rocha-Martín *et al*, 2011; Rocha-Martín *et al*, 2012; Torres *et al*, 2012; Torres *et al*, 2013).

BIBLIOGRAFÍA

- Almendros M, Berenguer J, Sinisterra JV. (2012). *Thermus thermophilus* nucleoside phosphorylases active in the synthesis of nucleoside analogues. *Appl Environ Microbiol* 78:3128-3135.
- Álvarez L, Bricio C, Hidalgo A, Berenguer J. (2014). Parallel pathways for nitrite reduction during anaerobic growth in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* 196:1350-1358.
- Álvarez L, Bricio C, Gómez MJ, Berenguer J. (2011). Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:1352-1358.
- Bricio C, Alvarez L, San Martín M, Schurig-Briccio LA, Gennis RB, Berenguer J. (2014). A Third Subunit in Ancestral Cytochrome c-Dependent Nitric Oxide Reductases. *Appl Environ Microbiol* 80:4871-4878.
- Cava F, Zafra O, Da Costa MS, Berenguer J. (2008a). The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environ Microbiol* 10:522-533.
- Cava F, Zafra O, Berenguer J. (2008b). A cytochrome c containing nitrate reductase plays a role in electron transport for denitrification in *Thermus thermophilus* without involvement of the bc respiratory complex. *Mol Microbiol* 70:507-518.
- Cava F, Hidalgo A, Berenguer J. (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13:213-231.
- Hidalgo A, Berenguer J. (2013). Biotechnological applications of *Thermus thermophilus* as host. *Current Biotech* 2:304-312.
- César CE, Álvarez L, Bricio C, Van Heerden E, Littauer D, Berenguer J. (2011). Unconventional lateral gene transfer in extreme thermophilic bacteria. *Int Microbiol* 14:187-199.
- Chautard H, Blas-Galindo E, Menguy T, Grand'moursel L, Cava F, Berenguer J, Delcourt M. (2007). An activity-independent selection system of thermostable protein variants. *Nat Methods* 4:919-921.
- Rocha-Martín J, Vega D, Bolívar JM, Godoy CA, Hidalgo A, Berenguer J, Guisan JM, Lopez-Gallego F. (2011). New biotechnological perspectives of a NADH oxidase variant from *Thermus thermophilus* HB27 as NAD⁺-recycling enzyme. *BMC Biotechnol* 11:101.
- Rocha-Martín J, Vega D, Bolívar JM, Hidalgo A, Berenguer J, Guisan JM, Lopez-Gallego F. (2012). Characterization and further stabilization of a new anti-prelog specific alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 for asymmetric reduction of carbonyl compounds. *Bioresour Technol* 103:343-350.
- Schurig-Briccio LA, Venkatakrishnan P, Hemp J, Bricio C, Berenguer J, Gennis RB. (2013). Characterization of the nitric oxide reductase from *Thermus thermophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12613-12618.
- Swarts DC, Jore MM, Westra ER, Zhu Y, Janssen JH, Snijders AP, Wang Y, Patel DJ, Berenguer J, Brouns SJ, Van Der Oost J. (2014). DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature* 507:258-261.
- Torres LL, Cantero A, Del Valle M, Marina A, Lopez-Gallego F, Guisan JM, Berenguer J, Hidalgo A. (2013). Engineering the substrate specificity of a thermophilic penicillin acylase from *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 79:1555-1562.
- Torres LL, Ferreras ER, Cantero A, Hidalgo A, Berenguer J. (2012). Functional expression of a penicillin acylase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB27 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 11:105-117.

Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella*

Félix J Sangari y Juan M García Lobo.

Instituto de Biomedicina y Biotecnología. Universidad de Cantabria-CSIC

sangarif@unican.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha, Félix J. Sangari, Juan M. García Lobo, Asunción Seoane, Candela González-Riancho e Íñigo Pariza.

La brucelosis es una zoonosis producida por diversas bacterias del género *Brucella*, como *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*. En los animales que constituyen su hospedador natural, como vacas, cabras u ovejas, dan lugar a abortos e infertilidad principalmente, mientras que en los humanos la enfermedad se manifiesta como un síndrome febril que puede progresar a una fase crónica caracterizada por la aparición de severas complicaciones como endocarditis, artralgia, epididimitis o neurobrucelosis. Si no se trata, la brucelosis crónica representa una amenaza, especialmente en áreas endémicas, como América Central y Sudamérica, Oriente Próximo, los países mediterráneos, el norte de África y los países del Cáucaso y Asia Central. Se maneja la cifra de unos 500.000 casos humanos nuevos cada año, aunque probablemente esta cifra esté infravalorada y sea 4 ó 5 veces superior. Una de las peculiaridades de este género bacteriano, y que explica en gran manera

su éxito, es que carece de factores de virulencia clásicos, y más bien ha desarrollado una estrategia furtiva de modificación de sus patrones moleculares asociados a patógenos para evitar ser reconocido en primera instancia por el sistema inmune innato, y lograr éxito en la infección.

Nuestro trabajo sobre *Brucella* se inició con el desarrollo de métodos para la manipulación genética del género. Utilizamos de forma pionera la mutagénesis por trasposición en *Brucella* y fruto de aquellos esfuerzos obtuvimos varios mutantes sobre los que hemos desarrollado muchos de nuestros proyectos posteriores. Sin dudas, de todos ellos el que realmente perseguíamos y consideramos uno de nuestros mejores logros fue un mutante que era sensible al eritritol. *Brucella* es uno de los pocos géneros bacterianos capaces de utilizar eritritol como fuente de carbono y además se estableció una relación muy sugerente entre la presencia de eritritol en la placenta de los ungulados y la capacidad abortiva de *B. abortus*. Otro

argumento que animaba nuestro trabajo, era que la cepa vacunal de *B. abortus* S19 era también sensible al eritritol. La caracterización de nuestro mutante *ery* nos llevó a describir un operón que contiene genes para el catabolismo del eritritol dentro de un agrupamiento mayor que contiene genes para transporte del eritritol y otros genes del metabolismo de carbohidratos, todos ellos inducibles por la presencia de eritritol en el medio de cultivo. Sorprendentemente encontramos que la cepa vacunal S19, sensible a eritritol, ha sufrido una delección que afecta a dos genes esenciales del operón.

El trabajo de caracterización genética se complementaba con experimentos de infección en cultivos celulares y en ratones tratando de establecer el lazo de conexión entre el metabolismo del eritritol y la virulencia de *Brucella*. Concretamente uno de los sistemas más correlacionados con la virulencia de *Brucella* ha resultado ser un sistema de secreción de tipo IV, que se conoce como el operón *vir* de *Brucella*. La regulación por eritritol del operón *vir*, y por ende de la virulencia de *Brucella* ha sido una de nuestras hipótesis más perseguidas.

En una vertiente más aplicada, hemos tratado de explorar nuestros hallazgos, primero en el desarrollo de procedimientos diagnósticos de identificación de la cepa vacunal S19, basados en nuestros datos de secuencia, que resolverían el problema de la diferenciación entre animales vacunados y animales infectados.

Otra aplicación de este trabajo contempla el desarrollo de vacunas para la brucelosis bovina construidas introduciendo de forma controlada mutaciones en los genes del eritritol y el operón de la ureasa, otro de los factores de virulencia que hemos caracterizado en *Brucella*. La ureasa, de modo similar a lo que ocurre en *Helicobacter pylori*, le sirve a *Brucella* para sobrevivir al pH ácido del estómago, e infectar al huésped por vía gastrointestinal, como es el caso más habitual de infección en humanos. Un mutante $\Delta ure \Delta ery$ debería tener por un lado abolida la capacidad de producir abortos mediada por el uso del eritritol y al mismo tiempo ser más segura para el hombre al disminuir la capacidad de producir una enfermedad en el hombre cuando se ingiere la bacteria a través de productos lácteos contaminados. En la actualidad estamos tratando de utilizar mutantes Δery para producir una vacuna basada en *B. melitensis* que sería protectora para cabras.

La secuenciación de genomas y el desarrollo de diferentes «ómicas» ha dado una nueva dimensión a nuestro trabajo. En esta línea comenzamos corrigiendo la anotación del genoma de *B. melitensis* 16M y la nueva anotación la utilizamos para construir el ORFeoma de *Brucella*, una colección ordenada de plásmidos conteniendo todos los ORF's del genoma (Dricot *et al.*, 2004). Con el ORFeoma construimos un microarray que fue utilizado para un primer análisis transcripcional de la respuesta de al eritritol (Rodríguez *et al.*, 2012) así como para el análisis de la respuesta transcripcional de los mutantes en el sistema de dos componentes BvrR/S (Viadas *et al.*, 2010). Posteriormente hemos incorporado la caracterización del transcriptoma por secuenciación profunda de mRNA. Con esta tecnología completamos el análisis transcriptómico de la

respuesta al eritritol lo que reveló profundos cambios en el metabolismo de carbohidratos en respuesta a este compuesto que deben estar en la base de la observada asociación con la inducción de abortos por *Brucella* en rumiantes. También colaboramos en el proceso de secuenciación del genoma de *Brucella ovis* (Tsolis *et al.*, 2009), la especie que causa brucelosis en ovejas y carneros que tiene un gran interés entre otras cosas por ser una especie «rugosa» pero aún patógena para animales. Además esta especie muestra una actividad demostrable de una secuencia de inserción denominada IS711 (Ocampo-Sosa y García-Lobo, 2008), de la que existen unas 25 copias en contraposición de las 5-7 copias que se encuentran en las especies patógenas para el hombre.

Recientemente hemos llevado a cabo el análisis transcripcional por RNAseq direccional, lo que nos ha permitido identificar una colección de posibles RNAs pequeños (sRNA) que probablemente jueguen un papel importante en la regulación de la expresión en *Brucella*. En concreto estamos caracterizando dos de estos sRNAs que por su localización pudieran estar regulando la expresión del sistema de secreción tipo IV de *Brucella*, lo que de alguna manera nos vuelve a enfrentar a nuestra vieja hipótesis de la relación entre virulencia y eritritol a través de la regulación del operón *vir* de *Brucella*.

El grupo de «Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella*» desarrolla su actividad investigadora desde Agosto de 2013 en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec) (<http://web.unican.es/ibbt-ec/>), a donde se trasladó tras estar localizado durante más de 20 años en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. En este nuevo entorno disponemos de más infraestructuras, más espacio, además de estar rodeados por grupos afines con los que compartimos metodología y equipamiento científico similares.

REFERENCIAS

- Dricot A, Rual JF, Lamesch P, Bertin N, Dupuy D, Hao T, Lambert C, Halletz R, Delroisse JM, Vandenhaute J, *et al.* (2004). Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res.* 14:2201–2206.
- Ocampo-Sosa AA, and García-Lobo JM. (2008). Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol.* 8:17.
- Rodríguez MC, Viadas C, Seoane A, Sangari FJ, López-Goñi I, García-Lobo JM. (2012). Evaluation of the Effects of Erythritol on Gene Expression in *Brucella abortus*. *PLoS One* 7, e50876.
- Sangari FJ, Pérez-Gil J, Carretero-Paulet L, García-Lobo JM, Rodríguez-Concepción M. (2010). A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:14081–14086.
- Tsolis RM, Seshadri R, Santos RL, Sangari FJ, Lobo JMG, de Jong MF, Ren Q, Myers G, Brinkac LM, Nelson WC, *et al.* (2009). Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One* 4:e5519.
- Viadas C, Rodríguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, García-Lobo JM, López-Goñi I. (2010). Transcriptome Analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS Two-Component Regulatory System. *PLoS ONE* 5:e10216.

Estudios moleculares de cepas invasivas de *Streptococcus agalactiae* (SGB)

Margarita Laczesky, Marta Vergara, Eduardo Pegels, Patricia Oviedo, Marina Novosak,
Paula Soto, Marina Quiroga

Cátedra de Bacteriología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.
Instituto de Biotecnología Misiones «Dra. Ebe Reca» (InBioMis).
Universidad Nacional de Misiones. Argentina

mlaczeski@gmail.com

El grupo de investigación trabaja desde el año 2004 con diferentes proyectos vinculados al estudio de *Streptococcus agalactiae* (SGB).

SGB permanece aún como una de las causas más frecuentes de morbilidad y morbilidad en recién nacidos. La colonización del tracto genital de la embarazada a término de su edad gestacional, está significativamente asociada a estas infecciones. Los recién nacidos adquieren SGB en el útero por vía ascendente a través de la ruptura de membranas intactas o durante el proceso del parto.

SGB es un microorganismo parte de la microbiota habitual de los tractos genitourinario y gastrointestinal humanos. Es también reconocido como un importante patógeno en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes, siendo responsable de infecciones de piel y tejidos blandos, de endocarditis e infecciones osteoarticulares, principalmente.

Con el objetivo de prevenir la morbilidad y mortalidad del recién nacido, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), ha recomendado dos estrategias con la finalidad de identificar a las madres que, en edad gestacional a término, están colonizadas con SGB y prevenir la enfermedad perinatalógica.

Estas estrategias consisten en identificar los siguientes factores de riesgo: nacimiento previo con enfermedad invasiva por SGB, bacteriuria por SGB durante el embarazo, parto prematuro (antes de las 37 semanas de gestación), temperatura intraparto igual o mayor de 38°C, rotura prematura de membrana igual o mayor de 18 hs y la portación de SGB en el tracto genito anal de la embarazada entre las 35-37 semanas de gestación.

Detectada la colonización materna la profilaxis intraparto (PIP) administrada con penicilina o ampicilina, resulta

en una disminución significativa de las infecciones invasivas neonatales. En aquellas embarazadas con intolerancia a la penicilina, la administración de eritromicina (ERI) y clindamicina (CLI) están recomendadas.

La severidad de la enfermedad neonatal está determinada en gran medida por una serie de factores de virulencia codificados entre otros por el gen *cps* que codifica la cápsula y genes que codifican proteínas de superficie, necesarios todos para la interacción celular huésped-bacteria.

Un importante factor de virulencia es la cápsula. Su estructura polisacárida posibilita la distinción en 10 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX). Estos serotipos capsulares presentan en su distribución variaciones temporales, étnicas y según el lugar de residencia de la embarazada.

La primera proteína de superficie identificada en SGB fue el antígeno C, compuesto por las proteínas α y β . SGB puede así expresar la proteína α -C o la proteína β -C o ambas a la vez.

La proteína α -C y la proteína β -C son codificadas por los genes *bca* y *bac*, respectivamente. La α -C se asocia a la invasión de la célula epitelial y β -C a la inhibición de la fagocitosis al interactuar con la fracción Fc de las IgA.

La proteína Rib, muy asociada a las cepas invasivas es codificada por el gen *rib*.

Otro factor de virulencia, la enzima de superficie, ScpB (C5a peptidasa) codificada por el gen *scpB*, está involucrada en el daño a neutrófilos y en la unión de la fibronectina para promover la adherencia y la invasión bacteriana de las células epiteliales.

Una proteína de superficie, la Lmb, que media en la adherencia a la laminina humana con daño epitelial, colaborando en la invasión del huésped es codificada por el gen *lmb*.

La proteína HylB codificada por el gen *hylB*, colabora en la diseminación a través de los tejidos, con deterioro en el transporte de leucocitos.

El gen *cylE* codifica una β -hemolisina que es una toxina asociada a la injuria de tejidos y diseminación sistémica contribuyendo a la meningitis.

Los estudios actuales han demostrado la capacidad de SGB para invadir células humanas. Sin embargo, los acontecimientos subyacentes a la invasión de la célula huésped son aún escasamente conocidos.

Son varias e importantes las interacciones entre la matriz extracelular y SGB que han sido reportadas y propuestas para la adhesión e invasión bacteriana.

Recientemente se ha identificado en SGB una proteína de adherencia a fibrinógeno, la cual se adhiere fuertemente a las células epiteliales pulmonares y protege a la bacteria de la opsonización en el torrente sanguíneo humano, la proteína FbsB codificada por el gen *fbsB*. Esta proteína, también se asocia a la invasión epitelial.

Una nueva proteína, la FbsA, codificada por el gen *fbsA* protege a la bacteria de la opsonización-fagocitosis y promueve su adherencia a las células epiteliales, sobre todo del endotelio cerebral, colaborando para que el patógeno atraviese la barrera hematoencefálica conduciendo a la meningitis.

Esta hipótesis de que la invasión de las células huéspedes representa un mecanismo importante en la patogenicidad invasiva de SGB y su progresión a neumonía, sepsis y meningitis, fue sostenida en el desarrollo de este trabajo y apoyada en este informe presentado aquí en cepas invasivas neonatales y su correspondiente aislado materno.

Desde la observación de Lancefield en la década del 70, trabajando con modelos animales, referida a la protección que confiere el antígeno C contra las infecciones por SGB, se implicó a estas proteínas de superficie, junto a la cápsula como generadoras de una respuesta inmune protectora, lo que vincula el estudio de los mencionados factores de virulencia a la generación de vacunas maternas que prevengan la enfermedad neonatal.

Con respecto a los perfiles de sensibilidad a macrólidos de SGB, en la actualidad, se conoce con certeza, la aparición de cepas resistentes a eritromicina (ERI) y clindamicina (CLI), de allí la importancia de monitorear la susceptibilidad a estos antimicrobianos e identificar los genes asociados a la misma.

Se han detectado dos mecanismos de resistencia a macrólidos en SGB.

El mecanismo más frecuente es el de modificación del sitio blanco ribosomal por metilación y el mecanismo llamado de eflujo o transporte activo de la droga.

La metilación de la subunidad 23S del rARN por el gen *erm* (eritromicina ribosomal metilasa) *ermB*, *ermA* (subclase

ermTR), causa un cambio conformacional en el ribosoma procarionota y bloquea la unión de los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B al sitio de unión en la subunidad 50S, conduciendo a resistencia.

Este mecanismo confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS_B). Las metilasas pueden expresarse constitutivamente (fenotipo de resistencia constitutivo cMLS_B) o en forma inducible (fenotipo de resistencia inducible iMLS_B).

El mecanismo llamado de eflujo activo fue descrito como mediado por el *mefA* y confiere resistencia a macrólidos pero no a lincosamidas ni a estreptogramina B (fenotipo M).

La resistencia constitutiva cMLS_B y la inducible iMLS_B, ambas están relacionadas con la expresión genes *erm*.

La variable constitutiva presenta elevado nivel de resistencia a cualquier antimicrobiano del grupo MLS_B, a diferencia de la inducible que presenta únicamente resistencia a los macrólidos de 14 átomos (ERI) y 15 átomos (azitromicina) y sensibilidad in vitro a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas (CLI) y estreptograminas B.

En virtud a estos antecedentes y a estudios recientes que incorporan modificaciones a las probables vías de infección del recién nacido, los esfuerzos se encuentran destinados al desarrollo de vacunas maternas que otorguen protección humoral al niño, independientemente de las condiciones antes, durante y después del alumbramiento y a la vigilancia de la resistencia a antibióticos.

Por todo lo expuesto, nuestro esfuerzo se destina al estudio molecular de factores de virulencia que puedan estar implicados en el desarrollo de estrategias vacunales para la región y a la búsqueda de genes asociados a resistencia a macrólidos en SGB.

PUBLICACIONES DEL LOS ULTIMOS 5 AÑOS

Keil A, Laczeski M, Oviedo P, Pegels E, Quiroga M, Fonseca MI, Vergara M. (2010). Detección del gen *rib* en cepas invasivas y colonizantes de *Streptococcus agalactiae* en Misiones. Revista de Ciencia y Tecnología. 14:25-28.

Oviedo P, Pegels E, Laczeski M, Quiroga M, Vergara M. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina. Braz J Microbiol. 44:253-258.

Laczeski ME, Pegels ER, Oviedo PN, Quiroga MI, Vergara MI. (2013). *Streptococcus agalactiae*: medios de conservación accesibles a laboratorios de diagnóstico de baja y mediana complejidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 51:129-139.

Laczeski M, Pegels E, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. (2013). Primer Estudio en Misiones de Genes de Resistencia a Macrólidos en *Streptococcus agalactiae*. Rev. Cienc. Tecnol. 20:66-72.

Laczeski M, Pegels E, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. (2014). Molecular profiles and antimicrobial susceptibility of first isolates of *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Argentina. Adv in Microbiol. 4:317-323.

Efectores de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella enterica*

Francisco Ramos Morales, Joaquín Bernal Bayard, Elena Cardenal Muñoz, Mar Cordero Alba, Fernando Baisón Olmo, Julia Aguilera Herce

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla

framos@us.es



Foto de grupo. Integrantes pasados y actuales del grupo. De arriba abajo y de izquierda a derecha: Francisco Ramos Morales, Joaquín Bernal Bayard (actualmente en el Instituto Pasteur de París como postdoc), Elena Cardenal Muñoz (actualmente en la Universidad de Ginebra como postdoc), Mar Cordero Alba (pendiente de la lectura de su tesis), Fernando Baisón Olmo (tesis en curso) y Julia Aguilera Herce (recién incorporada).

Muchas bacterias patógenas Gram negativas poseen sistemas de secreción tipo III (T3SS) relacionados con la virulencia. Se trata de aparatos relacionados evolutivamente con el flagelo y semejantes a jeringuillas de tamaño minúsculo capaces de inyectar proteínas de las bacterias en las células del organismo eucariótico al que infectan. Estas proteínas, denominadas efectores, suelen interferir con vías de transducción de señales de la célula hospedadora para posibilitar la entrada o la supervivencia del patógeno. En muchos casos se desconoce la función concreta que realiza cada efector. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es una bacteria capaz de infectar numerosas especies animales. Mientras que en ratones produce una enfermedad sistémica, potencialmente mortal, semejante a la fiebre tifoidea, en humanos da lugar a gastroenteritis. Su virulencia depende en gran medida de dos T3SS (T3SS1 y T3SS2) que están codificados en dos islas de patogenicidad denominadas SPI1 y SPI2, respectivamente. Entre los dos secretan más de 30 efectores (Ramos-Morales, 2012). *Salmonella* es un patógeno intracelular que utiliza diversas

vías para entrar en las células hospedadoras. Los efectores del T3SS1 son fundamentales para la invasión de células no fagocíticas como las epiteliales del intestino. Una vez dentro de la célula eucariótica, *Salmonella* se instala en una vacuola. El establecimiento de este nicho de supervivencia y replicación depende de efectores del T3SS2, aunque también participan efectores del sistema codificado en la SPI1.

Nuestro grupo se inició en el año 2004 y su objetivo ha sido, desde el principio, el estudio de efectores de los T3SS de *Salmonella* para tratar de entender la contribución específica de algunos de ellos a la virulencia de esta bacteria. El primer efector que estudiamos fue SlrP. Esta proteína posee un dominio con varios motivos de repeticiones ricas en leucina que suelen estar implicados en interacciones proteína-proteína. En la región carboxilo terminal tiene otro dominio denominado NEL que está presente en otros efectores que forman parte de una nueva familia de proteínas con actividad ligasa de ubiquitina. Nuestra primera contribución fue la demostración de que SlrP posee esta actividad y de que es capaz de interactuar y ubiquitinar a la tioredoxina huma-

na (Trx) (Bernal-Bayard y Ramos-Morales, 2009). Aunque la ubiquitinación se asocia a veces con la degradación de la proteína ubiquitinada a través del proteasoma, ésta no parece ser la consecuencia en este caso puesto que no se observó un descenso en la cantidad de Trx en células humanas HeLa transfectadas con SlrP. En cambio, sí se detectó una caída en el nivel de su actividad. Mediante un escrutinio por el sistema de doble híbrido en levaduras fue posible detectar una segunda diana de SlrP en células humanas. Se trata de la proteína ERdj3, una chaperona del retículo endoplásmico que se une a proteínas mal plegadas y contribuye a su correcto plegamiento. La interacción con SlrP compite con la de los sustratos desnaturalizados y así interfiere con la función de esta chaperona de una manera independiente de ubiquitinación (Bernal-Bayard *et al.*, 2010). Ambos efectos, la bajada de actividad redox y la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo, podrían explicar el aumento en la tasa de muerte celular que hemos observado en los cultivos de células HeLa que expresan SlrP.

Recientemente hemos resuelto, en colaboración con el grupo de la doctora S. Nessler (Orsay, Francia), la estructura tridimensional del complejo formado por SlrP y Trx (Zouhir *et al.*, 2014). Las dos proteínas forman un heterotetrámero en el que las dos moléculas de SlrP interaccionan con las dos de Trx, con una por medio del dominio LRR antes mencionado, con la otra a través de una región conectora existente entre el dominio LRR y el dominio NEL. Curiosamente, la estructura predijo que es el segundo tipo de interacción el más importante para mantener la estabilidad del complejo. Esto se confirmó mediante el uso de mutantes puntuales alterados en los residuos relevantes para la interacción. Además, el modelo permitió acotar las dianas más probables de ubiquitinación en la Trx. Experimentalmente probamos que una de ellas, la lisina en posición 94, es efectivamente ubiquitinada en presencia de SlrP. Se estudió también la expresión y la secreción de SlrP (Cordero-Alba y Ramos-Morales, 2014). Aunque *slrP* se expresó en diferentes medios, la máxima expresión se obtuvo en condiciones que imitan el ambiente intravacuolar. La translocación tuvo lugar por medio de los dos T3SS dependiendo del tipo celular hospedador y el tiempo de infección. La búsqueda de reguladores de *slrP* reveló que este gen está regulado por LeuO, Lon y el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP. Por último, en un análisis transcriptómico y proteómico de células HeLa transfectadas establemente con el gen del efector SlrP se encontró expresión diferencial de un total de 83 genes del hospedador. Este hallazgo servirá de punto de partida para posteriores investigaciones.

El segundo efector que hemos estudiado es SteA. Tiene en común con SlrP el ser uno de los pocos efectores que son sustratos de los dos T3SS de *Salmonella*. Se analizaron las condiciones que afectan a la síntesis de este efector, su secreción al medio de cultivo y su translocación a las células hospedadoras (Cardenal-Muñoz y Ramos-Morales, 2011). El estado redox celular contribuye a la regulación transcripcional de *steA* a través de una vía reguladora que incluye al oxidante periplásmico DsbA, el péptido de membrana interna MgrB y el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP (Cardenal-Muñoz y Ramos-Morales, 2013). Por último se llevó a cabo un análisis

transcriptómico en células HeLa transfectadas establemente con el gen del efector SteA. La expresión de SteA en estas células epiteliales, a través de la modificación de diferentes vías de transducción de señales, dio lugar a una alteración de la morfología celular y una disminución de la tasa de muerte celular espontánea, las uniones intercelulares y la velocidad de migración celular (Cardenal-Muñoz *et al.*, 2014).

Otro aspecto que hemos abordado en nuestros estudios ha sido el intento de identificación de nuevos efectores. Esto nos ha llevado a dos resultados interesantes. Por un lado, al reconocimiento de que PipB2, una proteína conocida como efector del T3SS2, puede ser también secretado por el T3SS1 (Baisón-Olmo *et al.*, 2012). Por otro lado, a la demostración de que SrfJ, una proteína de *Salmonella* que presenta similitud con la glucosilceramidasa humana, es un efector del T3SS2 (Cordero-Alba *et al.*, 2012). El gen *srfJ* está regulado positivamente por PhoP a través del sistema de dos componentes SsrA/SsrB y negativamente por IolR, el represor de los genes implicados en la utilización de mioinositol como fuente de carbono.

Actualmente nos planteamos seguir profundizando en el estudio de estos y otros efectores y comenzar a usar los conocimientos adquiridos en un aspecto aplicado como es la generación de vacunas vivas basadas en la secreción del antígeno de interés a través de los T3SS de *Salmonella*.

REFERENCIAS

- Baisón-Olmo F, Cardenal-Muñoz E y Ramos-Morales F. (2012). PipB2 is a substrate of the *Salmonella* pathogenicity island 1-encoded type III secretion system. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 240-246.
- Bernal-Bayard J y Ramos-Morales F. (2009). *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* 284: 27587-27595.
- Bernal-Bayard J, Cardenal-Muñoz E y Ramos-Morales F. (2010). The *Salmonella* type III secretion effector, *Salmonella* leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* 285: 16360-16368.
- Cardenal-Muñoz E y Ramos-Morales F. (2011). Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector SteA. *PLoS One* 6: e26930.
- Cardenal-Muñoz E y Ramos-Morales F. (2013). DsbA and MgrB regulate steA expression through the two-component system PhoQ/PhoP in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 195: 2368-2378.
- Cardenal-Muñoz E, Gutiérrez G y Ramos-Morales F. (2014). Global impact of *Salmonella* type III secretion effector SteA on host cells. *Biochem Biophys Res Commun* 449: 419-424.
- Cordero-Alba M, Bernal-Bayard J y Ramos-Morales F. (2012). SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IolR. *J Bacteriol* 194: 4226-4236.
- Cordero-Alba M y Ramos-Morales F. (2014). Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 196:3912-3922.
- Ramos-Morales F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biology* Article ID 787934.
- Zouhir S, Bernal-Bayard J, Cordero-Alba M, Cardenal-Munoz E, Guimaraes B, Lazar N, Ramos-Morales F y Nessler S. (2014). The Structure of the SlrP-hTrx1 Complex Sheds Light on the Autoinhibition Mechanism of the Type III Secretion System Effectors of the NEL Family. *Biochem J* 464:135-144.

Las GTPasas de la familia RHO y el crecimiento polarizado de las levaduras

Pilar Pérez

Instituto de Biología Funcional y Genómica CSIC / Universidad de Salamanca

piper@usal.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Elvira Portales, Rebeca Martín-García, Pilar Pérez, Mª Teresa Revilla, Pedro M. Coll, Victor Arribas y Beatriz Santos.

Uno de los mayores retos de la Biología moderna es comprender cómo los componentes celulares son capaces de medir el tamaño celular, calcular la distancia y situarse en posiciones específicas dentro de la célula para que ésta establezca dominios funcionales que den lugar al crecimiento polarizado. Este crecimiento es fundamental en la morfogénesis y el desarrollo de organismos unicelulares y multicelulares y responde a dos tipos de señales: (1) intrínsecas, heredadas y específicas para un tipo de célula en particular y (2) extrínsecas, proporcionadas por fuentes externas tales como hormonas, factores del crecimiento, contacto célula-célula, o señales de la matriz extracelular. En ambos casos, las células necesitan seleccionar sitios de crecimiento y reorganizar su citoesqueleto rompiendo la simetría mediante la acción de distintos circuitos positivos y negativos que refuerzan y amplifican concentraciones locales de moléculas necesarias para el crecimiento. Las principales moléculas implicadas en la selección y mantenimiento de

las zonas de crecimiento polarizado, como las GTPasas Rho, están conservadas desde las levaduras a los mamíferos, sugiriendo que los mecanismos básicos de polarización celular se han mantenido a lo largo de la evolución.

Nuestro grupo trabaja con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* porque es un modelo excelente para el estudio del crecimiento polarizado. Es de forma cilíndrica, crece por los extremos y se divide mediante fisión en la zona media, de forma muy similar a las células animales. Un hecho que hace a esta levadura ideal para los estudios sobre el control espacial de la célula es que su forma, tamaño y división son muy reproducibles. Por tanto, es fácil identificar cepas mutantes que tienen forma, tamaño o división aberrantes. *S. pombe* tiene el genoma más pequeño de todos los eucariotas analizados hasta la fecha pero comparte muchos procesos con las células eucariotas superiores, y tiene valor para los estudios funcionales y comparativos de dichos procesos.

El objetivo fundamental del laboratorio es desentrañar el **papel de las GTPasas Rho en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad de crecimiento de *S. pombe***. Estas proteínas están presentes en todas las células eucariotas y mediante complejas redes bioquímicas, controlan algunos de los procesos fundamentales de la biología celular, tales como morfogénesis, movimiento y división celular. Por otra parte, *S. pombe*, al igual que otros hongos, posee una pared celular cuya biosíntesis está íntimamente relacionada con el crecimiento celular y las GTPasas Rho proporcionan la regulación coordinada de la organización de la actina y de las enzimas biosintéticas de la pared celular. Esta coordinación es esencial para mantener la integridad celular y el crecimiento polarizado. Utilizamos tanto técnicas bioquímicas como ensayos genéticos y genómicos que nos permiten comprender las señales que controlan y son controladas por las GTPasas de la familia Rho. Puesto que muchos componentes de la ruta de señalización de las GTPasas Rho están conservados en todos los eucariotas, nuestro trabajo puede desvelar mecanismos moleculares generales de la polaridad de crecimiento y la morfogénesis.

Las líneas de investigación del laboratorio en la actualidad se resumen en:

- Función de Cdc42 y sus proteínas diana en el mantenimiento de las dimensiones celulares.
- Función de Rho1 en el mantenimiento de la integridad celular.
- Regulación de la citoquinesis por las GTPasas de la familia Rho

PUBLICACIONES RECIENTES

Rincón SA, Ye Y, Villar-Tajadura MA, Santos B, Martín SG, Pérez P. (2009). Pcb1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 20:4390-4399.

Pérez P., Rincón S. (2010). Rho GTPases regulation of cell Polarity and growth in yeasts. *Biochemical J*. 426:243-253.

Soto T, Villar-Tajadura MA, Madrid M, Jero Vicente J, Gacto M, Pérez P, Cansado J. (2010). Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2-GAP. *J. Biol. chem.* 285:11516-25.

Pérez P, Cansado J. (2011). Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Current Protein & Peptid Science* 11:680-92.

Estravis M, Rincón SA, Santos B, Pérez P. (2011). Cdc42 regulates multiple membrane traffic events in fission yeast. *Traffic* 12:1744-1758.

Estravis M, Rincón SA, Santos B, Pérez P. (2012). Cdc42 regulation of polarized traffic in fission yeast. *Communicative & Integrative Biology*. 5:370-3

Viana RA, Pinar M, Soto T, Coll PM, Cansado J, Pérez P. (2013). Negative Functional Interaction Between Cell Integrity MAPK Pathway and Rho1 GTPase in Fission Yeast. *Genetics* 195:421-432.

Muñoz J, Cortés JCG, Sipiczki M, Ramos M, Clemente-Ramos JA, Moreno MB, Martins IM, Pérez P, Ribas JC. (2013). Extracellular cell wall b(1,3)glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J. Cell Biol.* 203:265-282.

Rincón SA, Estravis M, Pérez P. (2014). Cdc42 Regulates Polarized Growth and Cell Integrity in Fission Yeast. *Biochem Soc. Trans.* 42:201-5.

Sánchez-Mir L, Soto T, Franco A, Madrid M, Viana RA, Vicente J, Gacto M, Pérez P, Cansado J. (2014). Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS One* 9:e88020.

Sánchez-Mir L, Franco A, Martín-García R, Madrid M, Vicente-Soler J, Soto T, Gacto M, Pérez P, Cansado J. (2014). Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 34:2745-59.

Martín-García R, Coll PM, Pérez P. (2013). F-BAR domain protein Rga7 collaborates with Cdc15 and Imp2 to ensure proper cytokinesis in fission yeast. *J. Cell Sci.* 127:4146-58.

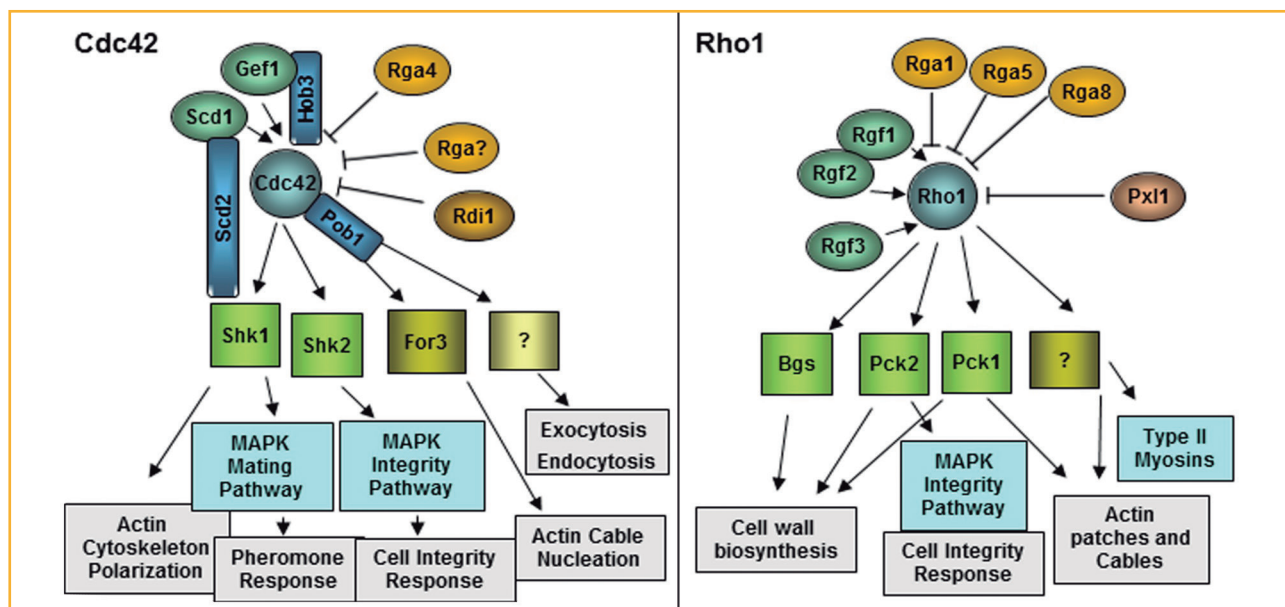


Figura 1. Proteínas reguladoras y dianas de Cdc42 y Rho1 en *S. pombe*.

Metagenómica y sistemática molecular de microorganismos halófilos

Antonio Ventosa, Cristina Sánchez-Porro y Rafael R. de la Haba

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

ventosa@us.es

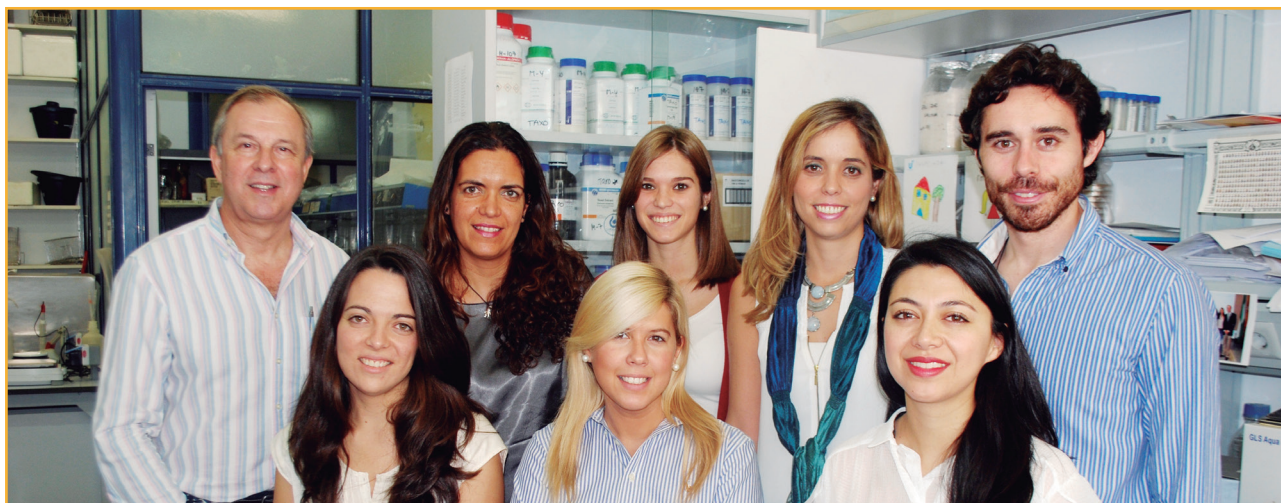


Foto de grupo. De izquierda a derecha: Antonio Ventosa, Cristina Sánchez-Porro, Ana Durán, Carmen infante y Rafael R. de la Haba. Sentadas (de izquierda a derecha): Blanca Vera, Clara López Hermoso y Paulina Corral.

Los ambientes hipersalinos, tales como las salinas o los lagos y suelos hipersalinos, son ambientes extremos en los que los microorganismos deben adaptarse a condiciones de elevada salinidad y en muchos casos a valores extremos de temperatura, pH, concentración de nutrientes, etc. Los microorganismos halófilos que habitan estos ambientes están representados por algunos eucariotas, si bien los mejor adaptados a dichas condiciones extremas son arqueas y bacterias. Las salinas de estanque múltiple, tan abundantes en nuestra geografía, constituyen excelentes modelos para el estudio de la diversidad microbiana y la ecología molecular de los ambientes hipersalinos, pudiéndose estudiar estanques con concentraciones salinas comprendidas entre la del agua de mar y la saturación de sales.

Nuestro grupo viene trabajando en estudios relacionados con diferentes aspectos de los microorganismos halófilos y los ambientes hipersalinos en los que se encuentran, desde su biodiversidad, relaciones evolutivas, filogenómica y taxonomía, etc. En los últimos años hemos realizado una serie de estudios metagenómicos en estanques de salinas localizadas en la costa mediterránea (salinas de Santa Pola, Alicante) así como atlántica (salinas de Isla Cristina, Huelva). Estos estudios han permitido conocer

más detalladamente la diversidad taxonómica y metabólica de los estanques con salinidades intermedias, del 13 al 33% de sales totales, en comparación con los estanques cristalizadores que ya habían sido objeto de estudios más detallados utilizando tanto técnicas tradicionales de cultivo como moleculares independientes de cultivo. Uno de los ambientes hipersalinos mejor estudiados desde el punto de vista microbiológico son las salinas «Bras del Port» de Santa Pola, de las que recientemente se ha publicado un artículo de revisión (Ventosa *et al*, 2014). A diferencia de los estanques cristalizadores, en los que existe un predominio de la arquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi* y de la bacteria halófila *Salinibacter ruber*, en los estanques concentradores con salinidades intermedias existe una mayor diversidad de especies pertenecientes a nueve taxones superiores. El ensamblaje de contigs a partir de las secuencias metagenómicas nos ha permitido detectar la abundante presencia de nuevos representantes de los dominios Archaea y Bacteria en estanques concentradores intermedios, como la nanohaloarquea «*Candidatus Haloredivivus*», nuevas haloarqueas relacionadas con el género *Halorubrum* y una nueva *Gammaproteobacteria*, relacionada filogenéticamente con el género *Alkalilimnicola*.

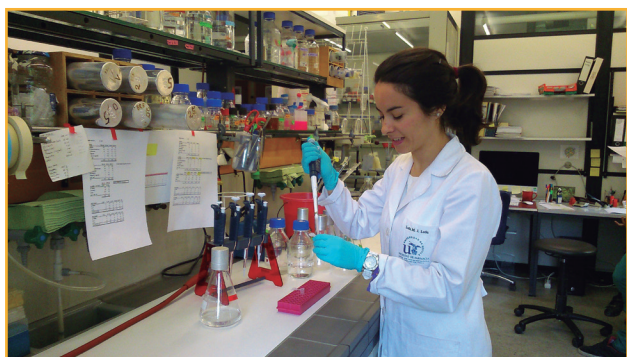


Figura 1. M^a José León en el laboratorio.

Los estudios metagenómicos realizados en las salinas nos han permitido desarrollar distintas estrategias enfocadas al aislamiento y caracterización de nuevos representantes abundantes en las salinas, entre ellas la bacteria perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*, a la que hemos designado como *Spiribacter salinus* (León *et al.*, 2014). El análisis del genoma completo de dicha bacteria ha permitido determinar que se trata de un microorganismo que posee un genoma muy sencillo, con un tamaño de 1,74 MB (el más pequeño descrito para un representante de la familia *Ectothiorhodospiraceae* a la que pertenece), un contenido en G+C de 62,7% y un único operón rRNA. *Spiribacter salinus* posee una versatilidad metabólica muy simplificada, mostrando características típicas de otros microorganismos oligotrofos que alcanzan altas densidades en ambientes acuáticos (López-Pérez *et al.*, 2013). Una de las peculiaridades de esta bacteria es su morfología celular: se trata de un bacilo Gram-negativo curvado en cultivos jóvenes que posteriormente forma espirales; en fase estacionaria tienden a condensarse formando una espiral compacta. Algunas de estas células se rodean de una envoltura externa semejante a la descrita en *Thermus* u *Oceanothermus*. Algunos aspectos que hemos estudiado en detalle de esta nueva bacteria son la composición de los lípidos polares de sus membranas, la estructura de la mureína de la pared celular o su mecanismo de osmorregulación (posee una estrategia «salt-out»). Sin duda alguna los estudios metagenómicos recientes permitirán avanzar en el conocimiento de la biodiversidad de los ambientes hipersalinos y de los mecanismos de adaptación de los microorganismos a dichos ambientes extremos, así como al aislamiento y caracterización de los microorganismos más abundantes en dichos hábitats.

Otro aspecto que nuestro grupo está estudiando en la actualidad es la aplicación de técnicas genómicas en sistemática microbiana. En la actualidad el principal marcador filogenético utilizado en la taxonomía de procariotas es el gen ARNr 16S, si bien presenta ciertas limitaciones como su alto grado de conservación que no permite distinguir en muchos casos entre especies estrechamente relacionadas, su elevada frecuencia de recombinación entre cepas cercanas o la presencia de múltiples copias divergentes. Por ello, hemos

realizado diversos estudios basados en marcadores filogenéticos alternativos, para llevar a cabo un análisis por secuenciación multilocus (MLSA), estudiando tanto las secuencias individuales de genes *housekeeping* como las secuencias concatenadas. Entre los grupos estudiados se encuentran bacterias pertenecientes a la familia *Halomonadaceae* o arqueas del género *Halorubrum*. En éste último grupo hemos realizado un análisis comparativo del esquema MLSA con respecto a la hibridación ADN-ADN (que nos ha permitido validar dicho esquema), así como con respecto a la composición de los lípidos polares mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (ampliamente utilizada en este grupo de arqueas como marcador quimiotaxonómico) y la secuenciación y análisis comparativo de algunos genomas completos.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Papke RT, White E, Reddy P, Weigel G, Kamekura M, Minegishi H, Usami R, Ventosa A. (2011). A multilocus sequence analysis (MLSA) approach to *Halobacteriales* phylogeny and taxonomy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:2984-2995.
- de la Haba RR, Márquez MC, Papke RT, Ventosa A. (2012). Multilocus sequence analysis of the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:520-538.
- Leon MJ, Ghai R, Fernandez AB, Sanchez-Porro C, Rodriguez-Valera F, Ventosa A. (2013). Draft genome of *Spiribacter salinus* M19-40, an abundant Gammaproteobacterium in aquatic hypersaline environments. *Genome Announc.* 1:e00179-12.
- López-Pérez M, Ghai R, Leon MJ, Rodríguez-Olmos A, Copa-Patiño JL, Soliveri J, Sanchez-Porro C, Ventosa A, Rodríguez-Valera F. (2013). Genomes of «*Spiribacter*», a streamlined, successful halophilic bacterium. *BMC Genomics* 14:787.
- Fernandez AB, Ghai R, Martín-Cuadrado A-B, Sanchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2013). Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota from two hypersaline ponds of a marine saltern in Santa Pola, Spain. *Genome Announc.* 1:e00933-13.
- Fullmer MS, Soucy SM, Swithers KS, Makkay AM, Wheeler R, Ventosa A, Gogarten JP, Papke RT. (2014). Population and genomic analysis of the genus *Halorubrum*. *Front. Microbiol.* 5:140.
- Mohan NR, Fullmer MS, Makkay AM, Wheeler R, Ventosa A, Naor A, Gogarten JP, Papke RT. (2014). Evidence from phylogenetic and genome fingerprinting analysis suggests rapidly changing variation in *Halorubrum* and *Haloarcula* populations. *Front. Microbiol.* 5:143.
- Fernandez AB, Ghai R, Martín-Cuadrado A-B, Sanchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2014). Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88:623-635.
- Fernández AB, Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C, Ghai R, Papke RT, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2014). Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Front. Microbiol.* 5:196.
- León MJ, Fernández AB, Ghai R, Sanchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2014). From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:3850-3857.
- Ventosa A, Fernández AB, León MJ, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F. (2014). The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* 18:811-824.
- León MJ, Sanchez-Porro C, de la Haba RR, Llamas I, Ventosa A. (2014). *Larsenia salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halomonadaceae* based on multilocus sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 37:480-487.

Estudio de los sistemas de *quorum sensing* en *Stenotrophomonas maltophilia*, implicación en la virulencia y perspectivas en el diseño de fármacos antibacterianos

Daniel Yero, Pol Huedo, Sonia Martínez-Servat, Paula Martínez, Oscar Conchillo-Solé, Xavier Daura e Isidre Gibert

Grupo de Genética Molecular y Patogénesis Bacteriana
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina y Departament de Genètica i de Microbiologia.
Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici Mòdul B, Parc de Recerca UAB. Bellaterra
(Cerdanyola del Vallès), Barcelona

Isidre.Gibert@uab.cat



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Isidre Gibert, Xavier Daura, Òscar Conchillo, Lionel Costerano, Daniel Yero, Michael Cristòfol, Sònia Martínez-Servat, Miriam Navarro, Sergi Arredondo, actuales integrantes del grupo.

INTRODUCCIÓN: ANTECEDENTES

En los últimos años *Stenotrophomonas maltophilia* ha emergido como patógeno nosocomial oportunista multi-resistente que puede ocasionar importantes infecciones en pacientes inmunodeficientes y en inmunosuprimidos, aumentando cada año el número de aislamientos en todo el mundo (Brooke, 2014). Generalmente está asociada a infecciones del tracto respiratorio pero también puede cau-

sar bacteremia e infecciones localizadas. Los pacientes con fibrosis quística también son colonizados/infectados por *S. maltophilia*. En España existe poca información sobre el papel de esta bacteria en las infecciones nosocomiales pero un estudio retrospectivo relativamente reciente, mostró que *S. maltophilia* es uno de los 15 patógenos microbianos más comunes en infecciones nosocomiales (EPINE, 2013), aunque lo más alarmante de estos estudios es el incremento de cepas resistentes a múltiples drogas (MDR).

Actualmente se conoce poco acerca de los principales mecanismos de virulencia de *S. maltophilia* y, aunque comparte algunos factores de virulencia con *Pseudomonas aeruginosa*, el potencial de virulencia de las principales cepas circulantes se desconoce. Entre otros factores de virulencia expresa la fimbria tipo I y el flagelo produce y secreta un amplio rango de enzimas, incluyendo DNasa, RNasa, fibro lisina, lipasas, proteasas y esterases (Crossman, 2008). La formación de biofilm por esta bacteria nosocomial es uno de sus principales mecanismos de virulencia y resistencia. Mucho más recientemente se ha identificado una molécula llamada «diffusible signal factor» (DSF) que parece asumir el control de la expresión de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana actuando como un señalizador del contacto célula-célula y sensor de la densidad celular (*quorum sensing*, QS). Tanto la formación de biofilm como la regulación de los mecanismos de QS influyen, además de en la virulencia, en el abanico de resistencias que cada vez más poseen estos organismos oportunistas.

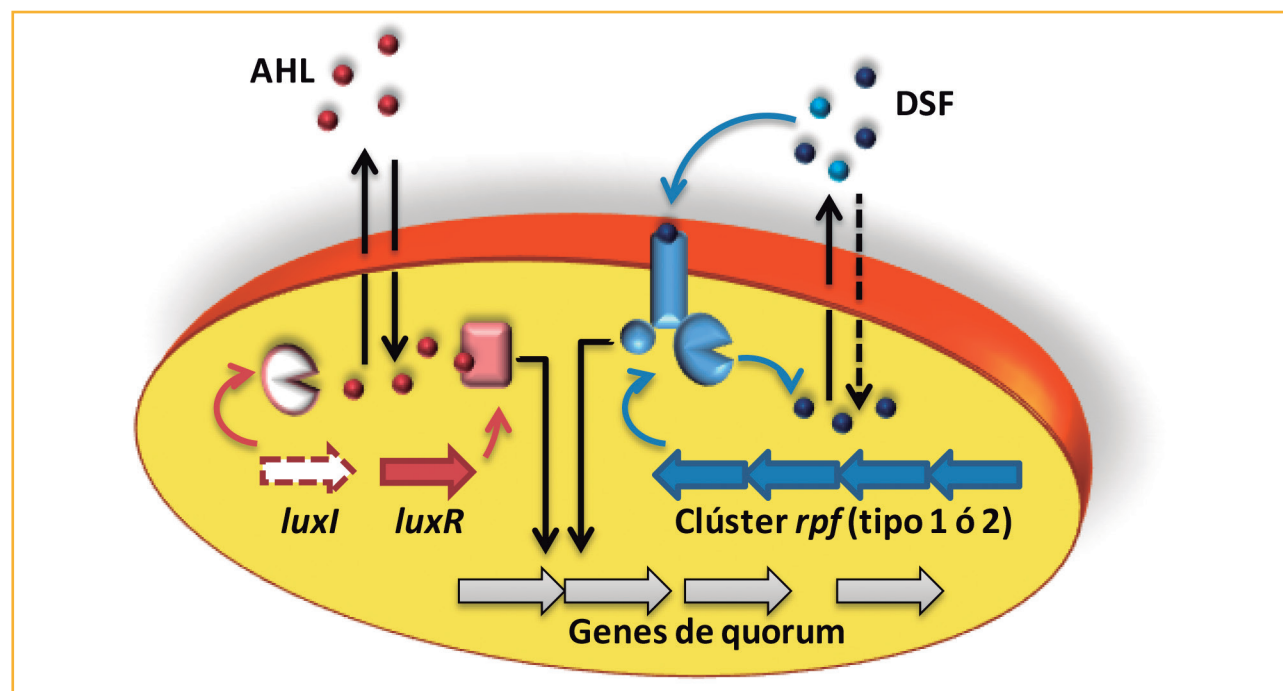
El sistema de QS descrito con anterioridad para *S. maltophilia*, se fundamenta en el DSF, un ácido graso, como molécula señal (Deng *et al*, 2011). La sintasa de DSF es la RpfF, una enoil-CoA hidratasa incluida en el clúster *rpf*. Este clúster codifica para todos los componentes necesarios para la síntesis y la detección del DSF, como la proteína RpfC, que tiene un dominio sensor de DSF y un dominio efector. Este complejo bloquea la producción de DSF tanto a nivel

de DNA, controlando la expresión de *rpfF*, como a nivel de proteína, bloqueando el dominio catalítico de la RpfF a través del dominio REC de la proteína RpfC (Figura). Sin embargo, los mecanismos implicados en la regulación del sistema DSF en *S. maltophilia* son poco conocidos. Además, el mecanismo de QS más estudiado en las proteobacterias, que utiliza como molécula señal las llamadas N. acil homoserina lactonas (AHLs), no había sido descrito con anterioridad en *S. maltophilia*.

RESULTADOS CIENTÍFICOS DEL GRUPO

Nuestro grupo está inmerso en un proyecto que se propone la búsqueda y estudio de determinantes de virulencia en *S. maltophilia*, profundizando en el conocimiento funcional de los procesos de patogénesis de esta bacteria. En particular, nos enfocamos en procesos fisiológicos no esenciales y de elementos reguladores de la expresión génica como determinantes intrínsecos de virulencia, teniendo el fenómeno de *quorum sensing* como objetivo principal. Con un enfoque pan-genómico pretendemos descubrir nuevos factores de virulencia que si bien no pertenezcan a procesos celulares esenciales, estén conservados en todas las cepas, para un futuro diseño de estrategias antimicrobianas de amplio espectro.

A partir de los genomas de *S. maltophilia* disponibles en las bases de datos, y secuencias genómicas parciales de



Sistemas de *quorum sensing* en *Stenotrophomonas maltophilia*. En rojo se muestra el sistema basado en la molécula AHL (el gen para una AHL-sintasa no ha sido descrito aún) y en azul el sistema basado en la molécula DSF. Ambos sistemas, mediante moléculas reguladoras, modifican la expresión de genes específicos de QS, muchos de ellos involucrados en fenotipos relacionados con la virulencia. Las células pueden tener el clúster *rpf* de tipo 1 o de tipo 2, con distintos pares de genes *rpfF/rpfC* (ver texto). En la membrana se representa el complejo formado por RpfC y RpfF y la proteína reguladora RpfG. Probablemente ambos sistemas *rpf* estén involucrados en la síntesis, percepción o la regulación de moléculas señalizadoras diferentes.

aislados clínicos obtenidas por nuestro grupo (Huedo *et al*, 2014a), hemos observado, en primer lugar, la presencia de dos variantes distintas del la sintasa RpfF, RpfF-1 y RpfF-2 (Huedo *et al*, 2014b). De las cepas analizadas hasta el momento, aproximadamente el 60% contienen la RpfF-1 mientras que el 40% restante posee la RpfF-2. Además, cada variante RpfF tiene asociada una RpfC. Utilizando un bioensayo con una cepa reportera, hemos constatado que sólo las cepas pertenecientes al grupo con la variable RpfF/C-1 presentan actividad DSF (Huedo *et al*, 2014b). La caracterización fenotípica realizada en los aislados hospitalarios sugiere que la pertenencia a una población con una variante u otra (RpfF/C-1 o RpfF/C-2) tiene implicaciones en la virulencia. Esto se ha validado en ensayos de infección en pez cebra (*Danio rerio*) así como con el gusano *Caenorhabditis elegans*, dos modelos animales que han sido estandarizados en nuestros laboratorios para *S. maltophilia* (Huedo *et al*, 2014b y Ferrer-Navarro *et al*, 2013). Mediante el uso de mutantes específicos se ha confirmado la implicación de dicho sistema en la virulencia, en la motilidad bacteriana y en la formación de biofilm. Además hemos demostrado que la represión de la síntesis de DSF en las cepas con la variante RpfF/C-2 se debe a que su RpfC solo se activa cuando detecta el propio DSF. Sin embargo, en las cepas del tipo RpfF/C-1, RpfC es más promiscua. La diversidad del sistema de QS basado en DSF en *S. maltophilia* abre la puerta a la idea de que posiblemente ambas variantes RpfF sinteticen moléculas distintas, e impliquen una regulación propia. En este supuesto, estaríamos delante de un nuevo sistema de comunicación celular basado en moléculas lipídicas tipo DSF.

Además, nuestro laboratorio está trabajando también en el estudio de sistemas de QS basado en AHLs en *S. maltophilia*. Así, y contrariamente a lo reportado en la bibliografía, hemos sido capaces de detectar la producción de moléculas tipo AHL a partir de concentrados de sobrenadantes de cultivos. Mediante bioensayos con cepas reporteras y posterior análisis químico, hemos identificado más de un tipo de molécula de AHL. Este descubrimiento supone un avance importante y un buen punto de partida para determinar la posible implicación de este nuevo sistema de comunicación celular en la regulación de la virulencia en *S. maltophilia*. Así, *S. maltophilia* se suma al grupo de bacterias que presentan ambos sistemas de QS: el basado en las moléculas DSF y el basado en moléculas AHL (Figura). Actualmente, y mediante la combinación del análisis *in silico* de los genomas secuenciados con la caracterización de mutantes en genes específicos, se buscan las posibles sintetas que participan en la producción de estas AHLs.

Paralelamente al estudio de los sistemas de QS, nuestro grupo, en colaboración con diferentes hospitales, participa en la caracterización fenotípica y genotípica de aislados clínicos de *S. maltophilia*. Los perfiles genéticos (datos de MLST) y datos clínicos de las cepas se correlacionan con sus fenotipos relacionados con la resistencia y la virulencia, en particular el mecanismo de QS. De este modo se seleccionan cepas modelo para posteriores estudios comparativos. Por ejemplo, la comparación proteómica de tres cepas clínicas de *S. maltophilia* con una cepa atenuada identificó posibles

nuevos factores de virulencia dentro de los que se incluyó Ax21, una proteína regulada por el QS (Ferrer-Navarro *et al*, 2013). Además contamos con plataformas bioinformáticas que permiten hacer estudios de genómica comparada para la búsqueda de nuevas dianas de drogas antibacterianas (Panjkovich, 2014) o proteínas inmunogénicas. Mediante genómica comparada hemos identificado 357 genes exclusivos de una cepa clínica virulenta de *S. maltophilia*, entre los que se encuentran posibles factores de virulencia (Huedo *et al*, 2014a).

PERSPECTIVAS FUTURAS

La caracterización molecular y funcional de nuevos factores de virulencia en *S. maltophilia* deben sentar las bases que permitan desarrollar estrategias eficaces en el control de las infecciones causadas por este patógeno emergente. La busca de inhibidores de los diferentes sistemas de QS forma parte de las estrategias actuales de diseños de drogas antibacterianas. Esto ha abierto las puertas al diseño de drogas «inteligentes» que afecten la virulencia de los patógenos pero que no creen resistencias. El uso de la genómica comparada permitirá también descubrir mecanismos nuevos de resistencia a drogas antibacterianas, que es también uno de los objetivos principales de nuestro grupo.

BIBLIOGRAFÍA

- Brooke JS. (2014). New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 12:1-4.
- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream M-A, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR y Avison MB. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol*. 9:R74
- Deng Y, Wu J, Tao F y Zhang LH. (2011). Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev*. 111:160-73.
- EPINE. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene (2013). Estudio de prevalencia de las infecciones nasocomiales en los hospitales españoles. EPINE-2013., p. 38 pp.
- Ferrer-Navarro M, Planell R, Yero D, Mongiardini E, Torrent G, Huedo P, Martínez P, Roher N, Mackenzie S, Gibert I y Daura X. (2013). Abundance of the Quorum-Sensing Factor Ax21 in Four Strains of *Stenotrophomonas maltophilia* Correlates with Mortality Rate in a New Zebrafish Model of Infection. *PLoS One* 8:e67207.
- Huedo P, Conchillo-Solé O, Yero D, Martínez-Servat S, Daura X y Gibert I. (2014a). Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain M30, Isolated from a Chronic Pressure Ulcer in an Elderly Patient. *Genome Announc*. 2:e00576-14.
- Huedo P, Yero D, Martínez-Servat S, Estibariz I, Planell R, Martínez P, Ruyra A, Roher N, Roca I, Vila J, Daura X y Gibert I. (2014b). Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. *J Bacteriol*. 196:2431-42.
- Panjkovich A, Gibert I y Daura X. (2014). antibacTR: dynamic antibacterial-drug-target ranking integrating comparative genomics, structural analysis and experimental annotation. *BMC Genomics* 15:36.

Ensamblajes Macromoleculares Microbianos Sintéticos

Rafael Giraldo

Departamento de Biología Celular y Molecular, CIB-CSIC, Madrid

rgirald@ Cib.CSIC.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha. Aida Revilla, Cristina Fernández, Rafael Giraldo, María Moreno, Laura Molina y Juan F. Giménez.

En nuestro grupo de investigación abordamos un programa de **Biología Sintética** (BS) cuyo objetivo es el desarrollo de piezas, dispositivos y sistemas para el **modelado de proteinopatías amiloides en microorganismos** (Giraldo, 2010). Pretendemos así deconstruir las amiloidosis en módulos funcionales cuya integración haga posible su mejor comprensión y también, potencialmente, actuaciones con finalidad diagnóstica y/o terapéutica.

Las amiloidosis son procesos degenerativos, neuronales o sistémicos, de una extraordinaria complejidad desde los puntos de vista molecular, celular y de organismos completos (Eisenberg y Jucker, 2012). Sin embargo, en todos los casos estudiados, el agente causal de cada tipo de amiloidosis es relativamente simple: una proteína, como A β y Tau (en la enfermedad de Alzheimer), α -sinucleína (en Parkinson), Htt (en Huntington) o SOD1 (en ALS),

que presenta al menos dos conformaciones; mientras que la nativa es soluble, la otra alternativa agrega formando fibras con un esqueleto β -laminar amiloide. Estos agregados amiloides, más específicamente sus oligómeros precursores o los resultantes de un desensamblaje parcial, son las especies moleculares citotóxicas. Una propiedad fascinante de toda proteína amiloide es la capacidad de replicar su conformación aberrante al moldearla por contacto en moléculas solubles de esa misma proteína. En realidad, la forma ensamblada está compuesta por un conjunto de conformaciones metaestables cuyas energías libres son muy similares, estando por ello en equilibrio las unas con las otras. Esto se manifiesta, para una proteína determinada, en la existencia de «estirpes» o variantes conformacionales y de «cuasiespecies», *v.g.*, familias de conformaciones relacionadas sometidas a selección y replicación (Giraldo,

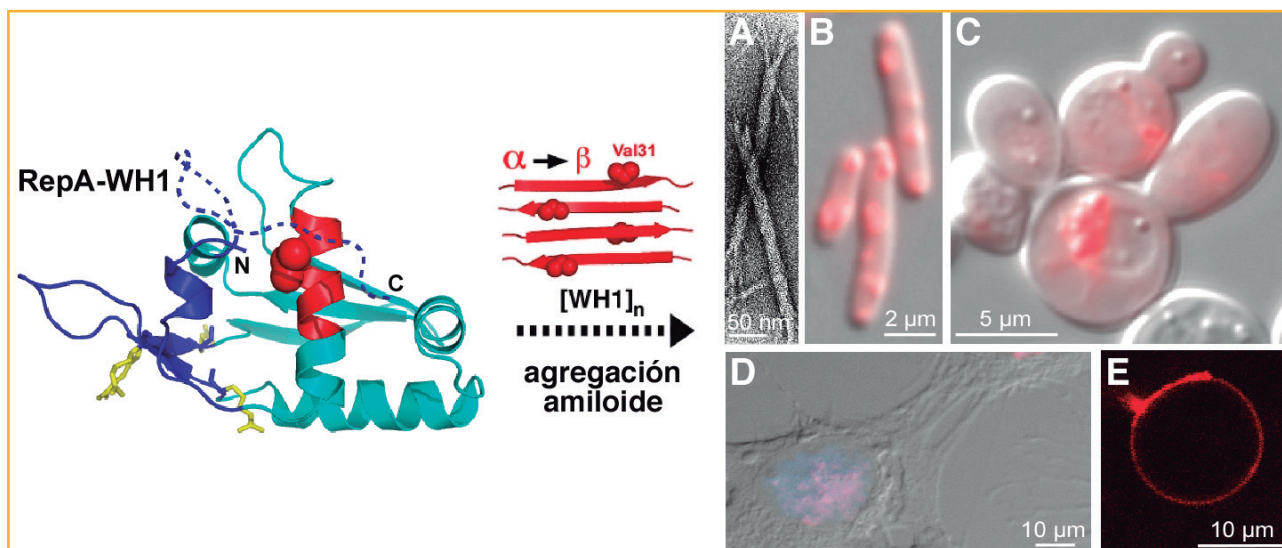


Figura 1. El dominio WH1 de la proteína de replicación plasmídica RepA (izda.), al monomerizar cambia parte de su estructura α -helicoidal en hebras- β (en rojo) y se ensambla como fibras amiloides (A, micrografía electrónica). Al fusionarla a la proteína fluorescente mCherry, RepA-WH1 aparece como inclusiones en el citoplasma de *E. coli* (B) y *S. cerevisiae* (C), microorganismos en los que actúa como prionoide, así como al expresarla en el núcleo (azul) de células de neuroblastoma en cultivo (D). En liposomas citomiméticos, RepA-WH1 agrega en la bicapa lipídica (E).

2010; Eisenberg y Jucker, 2012). Las proteínas amiloides guardan una relación estrecha con los priones, al ser éstos una subclase de amiloides pero con una propiedad adicional que nos es bien conocida como microbiólogos: la infectividad, es decir, su transmisibilidad «horizontal», siquiera en condiciones experimentales, entre células u organismos completos dentro de una población (Eisenberg y Jucker, 2012). El prion arquetípico es PrP, cuyas diversas conformaciones agregadas amiloides están detrás de las encefalopatías espongiformes transmisibles en mamíferos, mientras que los agentes de las demás amiloidosis son denominados «prionoides» al carecer de infectividad. Sin embargo, los estudios más recientes parecen concluir que en todos los procesos neurodegenerativos las conformaciones amiloides siguen, en su dispersión progresiva por el sistema nervioso, una propagación intercelular de tipo infectivo, lo que permitiría calificarlos también, *sensu lato*, como priones (Prusiner, 2012).

La BS de módulos amiloides proteotóxicos en microorganismos como la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* o la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un reto formidable, pues a la complejidad propia de la bioingeniería de proteínas se une el que las bacterias no sufren, de manera natural, amiloidosis intracelulares, mientras que en las levaduras las amiloidosis no son citotóxicas, sino un recurso funcional que confiere adaptaciones fenotípicas rápidas y transmisibles epigenéticamente (Blanco *et al.*, 2012). Sin embargo, por esas mismas razones, la BS nos ofrece la oportunidad de desarrollar modelos microbianos de amiloidosis en los que tanto los agentes etiológicos como sus células hospedadoras pueden ser concebidos *ab*

initio como módulos ortogonales, es decir, sin interacción funcional previa (Giraldo, 2010).

Al establecerse nuestro grupo en 1999 nos interesaba el estudiar la estructura y el mecanismo de acción de las proteínas, denominadas Rep, que inician la replicación del DNA de los plásmidos bacterianos y, de manera colateral, el ensamblaje de las proteínas del complejo de replicación ORC en *S. cerevisiae* (Giraldo, 2003). Descubrimos que la proteína RepA codificada por el plásmido pPS10 experimenta un cambio conformacional que la faculta para pasar de ser un dímero, represor transcripcional del propio gen *repA*, a ser un monómero iniciador de la replicación, proceso activado por la unión a secuencias de DNA específicas que conlleva una remodelación estructural del dominio N-terminal de la proteína (WH1) (Giraldo *et al.*, 2003). RepA-WH1 incrementa así su estructura β -laminar y, finalmente, la proteína agrega en un complejo postreplicativo que inhibe reinicios prematuros de la replicación (Gasset-Rosa *et al.*, 2008a).

En 2007 determinamos que RepA-WH1 se ensambla *in vitro* en fibras amiloides en un proceso promovido por su interacción con oligodesoxirribonucleótidos (Giraldo, 2007; Gasset-Rosa *et al.*, 2008b), lo que nos llevó a explorar si su expresión en la bacteria *E. coli*, desacoplada de la replicación plasmídica, conducía a la formación de agregados amiloides intracelulares. Efectivamente, RepA-WH1, fusionada a una proteína reportera fluorescente, forma inclusiones citoplasmáticas que resultan citotóxicas para las bacterias y que, una vez purificadas, son capaces de acelerar *in vitro* la fibrilación amiloide (Fernández-Tresgüerras *et al.*, 2010). RepA-WH1, dada la ausencia de proteínas homólogas en el proteoma humano en las que pudiera mol-

dear su conformación amiloide y su carácter no infectivo, es clasificable como un prionoide con nivel de bioseguridad 1. Recientemente, en colaboración con el grupo de A. Lindner (INSERM - U. Descartes, París) y gracias en parte a una beca de la FEMS, hemos estudiado la transmisión «vertical» (de célula madre a células hijas) de los agregados de RepA-WH1 mediante técnicas de microfluídica. Dichos estudios nos han llevado a caracterizar la existencia de dos estirpes amiloides, fenotípicamente diferenciadas por su toxicidad y la morfología de los agregados, cuya interconversión es dependiente de un único factor celular: DnaK, la chaperona de la familia Hsp70 en *E. coli* (Gasset-Rosa *et al*, 2014; Molina-García y Giraldo, 2014). Aproximaciones transcriptómicas y proteómicas aún en curso nos están permitiendo el trazar, con una nitidez difícilmente alcanzable en sistemas celulares complejos, las rutas de citotoxicidad amiloide.

Entre las dianas comunes a las proteínas implicadas en las amiloidosis humanas destaca la membrana plasmática, por lo que estamos estudiando también la interacción de RepA-WH1 con liposomas, llevando así la modelización de dichos procesos al extremo del minimalismo citomimético. En dirección diametralmente opuesta, explorando sistemas más complejos, hemos podido establecer (Gasset-Rosa y Giraldo, 2014) que la secuencia responsable de la amiloidosis en RepA-WH1, si se dispone en forma de repeticiones en tándem, es capaz de sustituir en quimeras a las propias del prion de levaduras Sup35p/[PSI⁺] (Liebman y Chernoff, 2012), generando así un nuevo prion sintético funcional, que hemos denominado [REP-PSI⁺]. Éste se manifiesta en forma de diversas variantes fenotípicas cuya interconversión está regulada, al igual que en su parental RepA-WH1, por una chaperona Hsp70 (Ssa1p) y no por Hsp104p, la chaperona que modula la propagación de [PSI⁺] en las levaduras (Liebman y Chernoff, 2012). Por último, estamos explorando la expresión de RepA-WH1 en células humanas en cultivo y desarrollamos sistemas para el cribado en bacterias de moléculas inhibitoras de la amiloidosis, que constituirán pruebas de concepto del potencial de los sistemas bacterianos sintéticos en la modelización y el abordaje farmacológico de proteinopatías amiloides con relevancia biomédica.

REFERENCIAS

- Blanco LP, Evans ML, Smith DR, Badtke MP y Chapman MR. (2012). Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol* 20:66–73.
- Eisenberg D y Jucker M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148: 1188–1203.
- Fernández-Tresguerres ME, Moreno-Díaz de la Espina S, Gasset-Rosa F y Giraldo R. (2010). A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 77:1456–1469.
- Giraldo R. (2003). Common domains in the initiators of DNA replication in *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*: Combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26:533–554.
- Giraldo R. (2007). Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17388–17393.
- Giraldo R. (2010). Amyloid assemblies: Protein legos at a crossroads in bottom-up Synthetic Biology. *ChemBioChem* 11:2347–2357.
- Giraldo R, Fernández-Tornero C, Evans PR, Díaz-Orejas R y Romero A. (2003). A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat Struct Biol* 10:565–571.
- Gasset-Rosa F, Díaz-López T, Lurz R, Prieto A, Fernández-Tresguerres ME y Giraldo R. (2008a). Negative regulation of pPS10 plasmid replication: Origin pairing by zipping-up DNA-bound RepA monomers. *Mol Microbiol* 68:560–572.
- Gasset-Rosa F, Maté MJ, Dávila-Fajardo C, Bravo J, y Giraldo R. (2008b). Binding of sulphonated indigo derivatives to RepA-WH1 inhibits DNA-induced protein amyloidogenesis. *Nucleic Acids Res* 36:2249–2256.
- Gasset-Rosa F, Coquel AS, Moreno-del Álamo M, Chen P, Song X, Serrano AM, Fernández-Tresguerres ME, Moreno-Díaz de la Espina S, Lindner AB y Giraldo R. (2014). Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone. *Mol Microbiol* 91:1070–1087.
- Gasset-Rosa F y Giraldo R. (2014). The Hsp70 chaperone Ssa1p selects for weak variants of [REP-PSI⁺], a novel bacterial-yeast hybrid prion. *En revisión*.
- Liebman SW y Chernoff YO. (2012). Prions in yeast. *Genetics* 191:1041–1072.
- Molina-García L y Giraldo R. (2014). Aggregation interplay between variants of the RepA-WH1 prionoid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196:2536–2542.
- Prusiner SB. (2012). A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science* 336:1511–1513.

Biología Molecular de corinebacterias: *Corynebacterium glutamicum* como modelo

Almudena F. Villadangos, Luis M. Mateos, José A. Gil

Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León

jagils@unileon.es

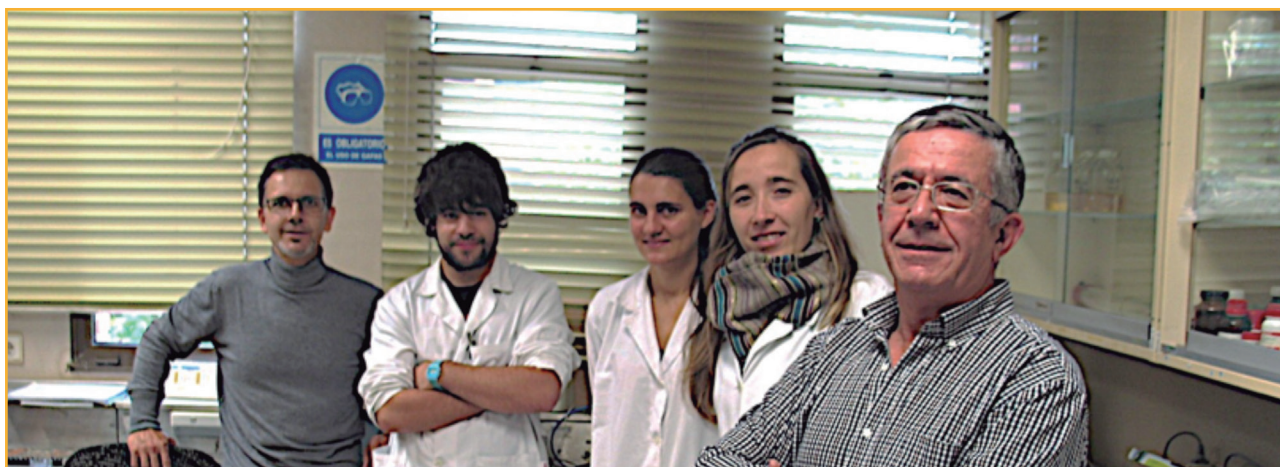


Foto de grupo. De izquierda a derecha. Luis M. Mateos, Alfonso Gonzalo, Miriam Arienza, Almudena F. Villadangos, José A. Gil.

Las corinebacterias son microorganismos Gram positivos del grupo de las actinobacterias que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se localizan en aguas, suelos e incluso en piel y mucosas del hombre y animales. El grupo contiene tanto representantes no patógenos con interés industrial como patógenos, estando filogenéticamente relacionado con representantes de los géneros *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Nocardia*, entre otros, por presentar ácidos micólicos en su pared celular. La tuberculosis y la difteria son las principales enfermedades humanas causadas por actinobacterias (*Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium diphtheriae*, respectivamente), aunque en las últimas décadas algunos representantes del género *Corynebacterium* han sido descritos como patógenos emergentes de enfermos intrahospitalarios que presentan cierto grado de inmunosupresión y/o sometidos a tratamientos crónicos. De esta forma se han identificado y descrito decenas de representantes como *C. aurimucosum*, *C. urealyticum*, *C. atypicum*, etc., causantes, en todos los casos, de

patologías en humanos (Mateos *et al*, 2011). Sin embargo, las especies de corinebacterias no patógenas también han sido ampliamente analizadas y estudiadas debido a su gran importancia biotecnológica por la producción de metabolitos primarios (aminoácidos o nucleótidos), secundarios (antibióticos y compuestos antitumorales) o su implicación en la maduración de quesos, o en bioconversión de precursores metabólicos.

El grupo de investigación dirigido por los doctores José A. Gil y Luis M. Mateos, denominado «Biología Molecular de Corinebacterias» (<http://microbio.unileon.es/wordpress>), estudia diversos aspectos de la Biología Molecular de la corinebacteria *Corynebacterium glutamicum*, una actinobacteria que debe el epíteto de especie «*glutamicum*» a su capacidad para producir ácido glutámico. Durante los últimos quince años, el grupo ha centrado su investigación en: a) el estudio de los procesos de división celular en *C. glutamicum*, con objeto de usar esos conocimientos para el diseño de agentes antimicrobianos que controlen enfer-

medades producidas por corinebacterias y micobacterias patógenas; b) el análisis de la resistencia a arsénico en *C. glutamicum* con el objetivo de conocer los sistemas desintoxicantes de metales y su efecto en el estrés celular, y la consecución de microorganismos capaces de ser utilizados como biocontenedores de metales pesados y aplicados en biorremediación.

DIVISIÓN CELULAR

Hemos estudiado el proceso de división/elongación celular de *C. glutamicum* ya que posee una maquinaria de división «minimalista» cuando se compara con la maquinaria de *Escherichia coli* (Figura 1A), es decir, carece de muchas de las proteínas (FtsA, FtsL, FtsN, AmiC, MinCDE, ZipA, MreB...) que se consideran esenciales en la maquinaria de división celular de *E. coli*. Durante estos últimos años hemos estudiado el papel de la proteína DivIVA en el proceso de elongación celular (Letek *et al.*, 2008; Valbuena *et al.*, 2007), así como el papel de las serín-treonin-proteín quinasas en dicho proceso (Fiuza *et al.*, 2008a y 2008b). Asimismo describimos la presencia de un filamento intermedio (RsmP) en *C. glutamicum* regulado por fosforilación e implicado en el mantenimiento de la morfología bacilar (Fiuza *et al.*, 2010).

C. glutamicum muestra un modelo de crecimiento «raro» que le diferencia de los modelos clásicos de *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Streptococcus pneumoniae* (Figura 1B). Los resultados obtenidos con *C. glutamicum* nos permitirán diseñar compuestos que inhiban la división celular en organismos patógenos relacionados como *C. diphtheriae* o *M. tuberculosis*.

RESISTENCIA BACTERIANA A ARSÉNICO

La otra línea de investigación se ha basado en la interacción arsénico-bacterias; el arsénico ha estado presente en la atmósfera desde la formación de la Tierra y los seres vivos han estado sometidos de forma continua a dicho agente, por lo que es bastante frecuente la presencia de sistemas de desintoxicación o resistencia a arsénico (Mateos *et al.*, 2006). *C. glutamicum* no es una excepción y presenta genes de resistencia a arsénico que se agrupan en dos operones *ars*, codificando cada uno de ellos para un regulador/represor (ArsR), una proteína arseniato reductasa (ArsC) y una arsenito permeasa (Acr3). En ausencia de arsenito (la forma reducida del arsénico inorgánico), el regulador ArsR está reprimiendo la expresión del resto de los genes; en su presencia, ArsR tiene mucha afinidad por arsenito y se libera del operador, permitiendo de esta forma la transcripción de los dos genes restantes (Villadangos *et al.*, 2011). Las enzimas arseniato reductasas intracelulares reducen el arseniato a arsenito (este último es muy tóxico), el cual es rápidamente liberado al exterior de la célula por las arsenito permeasas transmembrales (Fu *et al.*, 2009; Villadangos *et al.*, 2012) (Figura 2). A partir de los análisis de los genes y las correspondientes proteínas desintoxicantes, se obtuvieron clones mutantes y recombinantes de *C. glutamicum* capaces de acu-

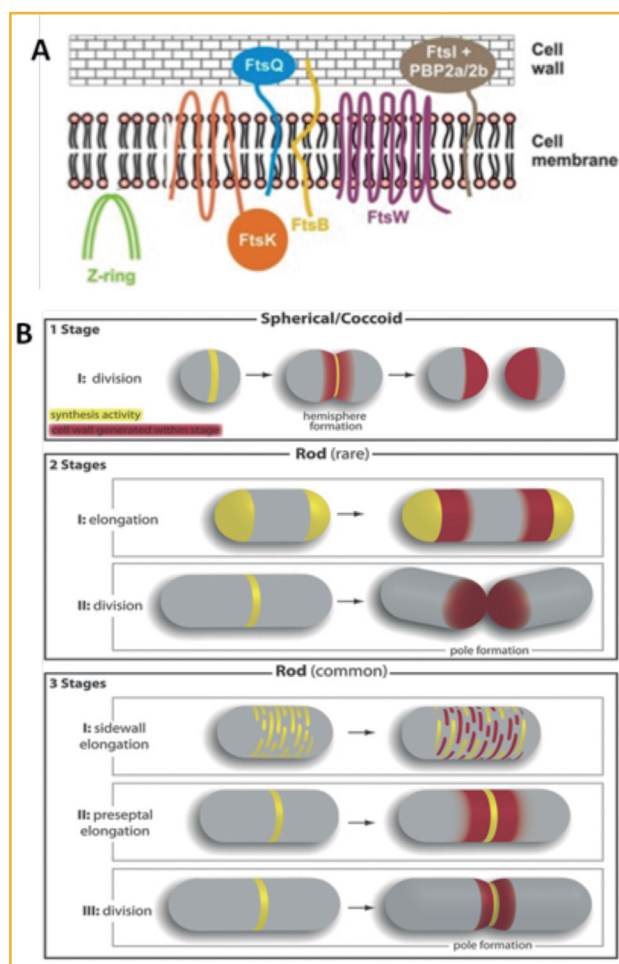


Figura 1. A) Maquinaria de división minimalista de *Corynebacterium glutamicum*. B) Modelos de elongación/división en diferentes bacterias. (1 stage). Crecimiento a nivel del septo de división en bacterias cocoides que carecen de MreB como *Streptococcus pneumoniae* (2 stages). Crecimiento polar en bacterias bacilares que carecen de MreB como *C. glutamicum* o *Mycobacterium tuberculosis*. (3 stages) Crecimiento dirigido por MreB a lo largo de la pared lateral de *B. subtilis* o *E. coli*. El color amarillo muestra los sitios de síntesis de nuevo peptidoglucano y el color rojo muestra el sitio donde se inserta el nuevo peptidoglucano. (<http://jcb.rupress.org/content/179/3/381.full>)

mular hasta 30 veces más arsénico que la cepa silvestre y que podrían ser utilizados en procesos de biorremediación (Ordóñez *et al.*, 2012; Villadangos *et al.*, 2010). Igualmente se han utilizado algunas cepas mutantes de *C. glutamicum* para conseguir bioacumuladores específicos de alguna de las formas inorgánicas de arsénico, bien arsenito o arseniato (Villadangos *et al.*, 2014).

Actualmente, el objetivo principal de la investigación está centrado en el estudio de los mecanismos diferenciales de defensa antioxidante que presentan las actinobacterias, utilizando como modelos *C. glutamicum* y *Rhodococcus equi* (modelo intermedio entre *C. glutamicum* y *M. tuberculosis*). El sistema redox más ubicuo en las células es el

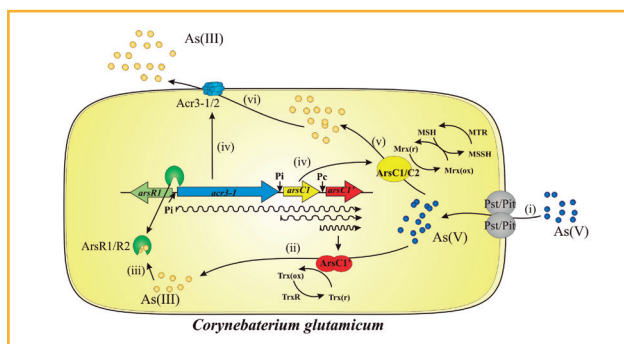


Figura 2. Modelo de resistencia a arsénico en *C. glutamicum*. (i) Entrada de arseniato [As(V)]; (ii) expresión constitutiva de la proteína ArsC1 y reducción de As(V) a arsenito [As(III)]; (iii) unión de As(III) a los reguladores (ArsR1/R2) y desrepresión del operón *ars*; (iv) transcripción de los genes que codifican para las arseniato reductasas (ArsC1/C2/C1'); (v) reducción de As(V) por reductasas ArsC1 y ArsC2 usando el sistema MSH/Mrx1 y (vi) liberación de As(III) formado en la célula a través de las arsenito permeasas Acr3-1/2. (Villadangos *et al*, 2011).

constituido por el sistema tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TrxR), presente en procariotas y eucariotas y constituyendo una primera línea de defensa frente a la oxidación. Sin embargo, los procesos evolutivos han permitido la aparición de otros sistemas redox alternativos que son de diferente naturaleza dependiendo del organismo de que se trate. Estos sistemas alternativos dependen de redoxinas específicas y de compuestos de bajo peso molecular. Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en la descripción de un nuevo sistema redox celular exclusivo de actinobacterias que incluye el pseudoazúcar de bajo peso molecular micotiol (MSH) y la redoxina correspondiente capaz de reconocer de forma específica MSH; esta redoxina se denominó micorredoxina (Mrx) (Ordóñez *et al*, 2009). La «aparición» de este buffer redox diferencial hace que el par MSH/Mrx y/o cualquiera de las proteínas que interactúan con MSH/Mrx (micotiolación) puedan constituir nuevas dianas antimicrobianas susceptibles de ser utilizadas de manera específica para este grupo de microorganismos (Van Laer *et al*, 2012; Van Laer *et al*, 2013). Los estudios basados en el grado de importancia y/o esencialidad de cada una de estas dianas constituyen en estos momentos el grueso de nuestra línea de investigación.

Durante los últimos años nuestro grupo está colaborando con otros grupos de investigación que tienen intereses científicos comunes, y liderados por los investigadores: William Margolin (USA), Klas Flårdh (Suecia), Virginie Molle (Francia), Richard Daniel (UK), Joris Messens (Bélgica), Joern Kalinowsky (Alemania), Barry P. Rosen (USA), Juan Ayala (Madrid) y Jose A. Ainsa (España).

PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

Fiuza M, Canova MJ, Patin D, Letek M, Zanella-Cleon I, Becchi M, Mateos LM, Mengin-Lecreux D, Molle V, Gil JA. (2008a). The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the

serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. J Biol Chem. 283:36553-36563.

Fiuza M, Canova MJ, Zanella-Cleon I, Becchi M, Cozzone AJ, Mateos LM, Kremer L, Gil JA, Molle V. (2008b). From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. J Biol Chem. 283:18099-18112.

Fiuza M, Letek M, Leiba J, Villadangos AF, Vaquera J, Zanella-Cleón I, Mateos LM, Molle V, Gil JA. (2010). Phosphorylation of a novel cytoskeletal protein (RsmP) regulates rod-shape morphology in *Corynebacterium glutamicum*. J Biol Chem. 285:24387-24397.

Fu HL, Meng Y, Ordóñez E, Villadangos AF, Bhattacharjee H, Gil JA, Mateos LM, Rosen BP. (2009). Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. J Biol Chem. 284:19887-19895.

Letek M, Ordóñez E, Vaquera J, Margolin W, Flårdh K, Mateos LM, Gil JA. (2008). DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol. 190:3283-3292.

Letek M, Fiuza M, Villadangos AF, Mateos LM, Gil JA. (2012). Cytoskeletal proteins of actinobacteria. International. J Cell Biol. doi:10.1155/2012/905832.

Mateos LM, Ordóñez E, Letek M, Gil JA. (2006). *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. Int Microbiol. 9:207-215.

Mateos LM, Letek M, Villadangos AF, Fiuza M, Ordóñez E, Gil JA. (2011). Chapter 6: *Corynebacterium*. In: Molecular detection of human bacterial pathogens. Edited by: Dongyou Liu. Taylor y Francis CRC Press. USA. ISBN: 978-1439812389.

Ordóñez E, Van Belle K, Roos G, De Galan S, Letek M, Gil JA, Wyns L, Mateos LM, Messens J. (2009). Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. J Biol Chem. 284:15107-15116.

Ordóñez E, Villadangos AF, Fiuza M, Pereira FJ, Gil JA, Mateos LM, Aller AJ. (2012). Modelling of arsenate retention from aqueous solutions by living coryneform double-mutant bacteria. Environ Chem. 9:121-129.

Valbuena N, Letek M, Ordóñez E, Ayala J, Daniel RA, Gil JA, Mateos LM. (2007). Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. Mol Microbiol. 66:643-657.

Van Laer K, Buts L, Foloppe N, Vertommen D, Van Belle K, Wahni K, Roos G, Nilsson L, Mateos LM, Rawat M, van Nuland NA, Messens J. (2012). Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of Mycobacteria. Mol Microbiol. 86:787-804.

Van Laer K, Dziewulska AM, Fislage M, Wahni K, Hbeddou A, Collet JF, Versées W, Mateos LM, Tamu Dufe V, Messens J. (2013). NrdH-redoxin of *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium glutamicum* dimerizes at high protein concentration and exclusively receives electrons from thioredoxin reductase. J Biol Chem. 15:7942-7955.

Villadangos AF, Ordóñez E, Muñoz MI, Pastrana IM, Fiuza M, Gil JA, Mateos LM, Aller AJ. (2010). Retention of arsenate using genetically modified coryneform bacteria and determination of arsenic in solid samples by ICP-MS. Talanta. 80:1421-1427.

Villadangos AF, Van Belle K, Wahni K, Dufe VT, Freitas S, Nur H, De Galan S, Gil JA, Collet JF, Mateos LM, Messens J. (2011). *Corynebacterium glutamicum* survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms. Mol Microbiol. 82:998-1014.

Villadangos AF, Fu HL, Gil JA, Messens J, Rosen BP, Mateos LM. (2012). Efflux permease CgAcr3-1 of *Corynebacterium glutamicum* is an arsenite-specific antiporter. J Biol Chem. 287:723-735.

Villadangos AF, Ordóñez E, Pedre B, Messens J, Gil JA, Mateos LM. (2014). Engineered coryneform bacteria as a bio-tool for arsenic remediation. Appl Microbiol Biotechnol. DOI 10.1007/s00253-014-6055-2.

Bioestabilizadores de origen microbiano

Carmen Vargas Macías, Joaquín J. Nieto Gutiérrez, Montserrat Argandoña Bertrán,
Francine Piubeli, Manuel Salvador de Lara, Alí Tahrioui, Javier Rodríguez de Moya,
Rosa M^a García Valero y Emilia Naranjo Fernández

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia.
Universidad de Sevilla. Sevilla

jjnieto@us.es

cvargas@us.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Montserrat Argandoña, Joaquín J. Nieto, Francine Piubeli, Carmen Vargas, Rosa García, Emilia Naranjo, Alí Tahrioui y Manuel Salvador.

Nuestro Grupo de investigación (Grupo BIO-320 de la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía) tiene por objeto el estudio de la genética molecular de los procesos de osmoadaptación en procariotas, en concreto en un grupo de microorganismos extremófilos, las bacterias halófilas moderadas, y su aplicación en la producción de compuestos bioestabilizadores útiles en la industria Farmacéutica, Agricultura, y en Biomedicina. Se trata de un Grupo, liderado por los Profs. Carmen Vargas Macías y Joaquín J. Nieto, constituido por 7 doctores y dos graduados, que posee una amplia experiencia en esta línea de investigación, subvencionada en los últimos 20 años por numerosos proyectos nacionales e internacionales del Plan Nacional, de la Junta de Andalucía y de la Comisión Europea.

Chromohalobacter salexigens es una gamma-proteobacteria que está considerada como un excelente modelo biológico para estudiar los procesos de osmoadaptación en bacterias, ya que posee uno de los rangos salinos de crecimiento más amplios de los conocidos (0,5 a 3 M de NaCl en medio mínimo). Para poder compensar este estrés osmótico, es capaz de acumular intracelularmente grandes cantidades de solutos compatibles, compuestos polares de bajo peso molecular, ya sea tras su transporte desde el medio externo si están presentes, como es el caso de la betaína, o mediante su síntesis, en ausencia de dichos compuestos en el medio. Esta estrategia es muy versátil, ya que le permite adaptarse a muy diferentes salinidades externas ajustando la concentración intracelular de dichos solutos compatibles, ya que puede también expulsarlos

En los últimos años, hemos realizado numerosos estudios encaminados a dilucidar los mecanismos moleculares

de osmoadaptación en *C. salexigens*. Así, hemos demostrado que, además de ciertas modificaciones en la composición lipídica de sus membranas, esta bacteria es también capaz de sintetizar trehalosa implicada en la protección frente a elevada temperatura y desecación, mediante los genes *otsAB*, así como betaína, a partir de su precursor, la colina, mediante los genes *betIBA*. También hemos caracterizado a nivel molecular los genes de la síntesis de ectoína (*ectABC* y su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína (*ectD*, *ectE*), así como los genes que codifican los sistemas de captación de las mismas desde el medio externo (*teaABC*). La síntesis de ectoínas en *C. salexigens* así como su regulación, es extraordinariamente compleja, estando osmo- y termorregulada, y en la que intervienen diferentes reguladores (s^5 , s^{32} , Fur, etc), habiendo demostrado por primera vez en bacterias halófilas la interrelación entre la homeostasis de hierro y la osmoadaptación. Recientemente hemos caracterizado a nivel molecular un regulador de respuesta (EupR) de un sistema de dos componentes implicado en la osmodetección, el primero descrito para bacterias halófilas, que parece mediar en el control transcripcional del sistema de captación de ectoínas, codificado por los genes *teaABC*. Además existen rutas de síntesis alternativas y de degradación, actualmente en estudio (Figura 1). Todo ello dificulta en gran medida la obtención de cepas mutantes productoras de ectoínas que sean capaces de superproducir estos compuestos en condiciones más favorables.

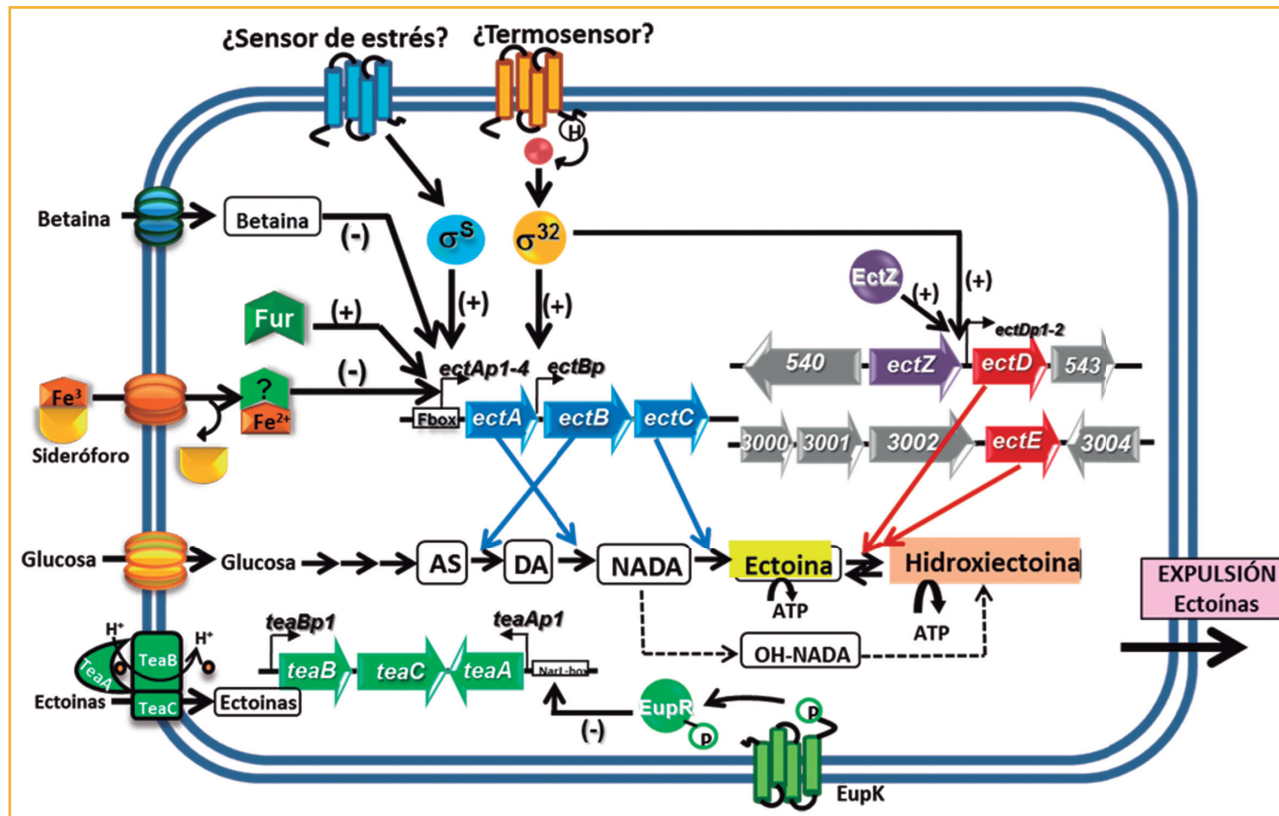


Figura 1. Esquema de los mecanismos de osmoadaptación de *C. salexigens*.

rables a nivel industrial que las actuales, como es, por ejemplo, a temperatura ambiente o en condiciones de baja salinidad. Para ello, nuestro Grupo aborda este objetivo en los últimos años mediante la aproximación de la Biología de Sistemas, en la que se conjugan los datos provenientes de la aplicación de técnicas de Biología Molecular de última frontera, como son la proteómica, la transcriptómica, la metabolómica y la flujómica, con métodos bioinformáticos de modelado *in silico* (Figura 2). A este respecto, hemos completado la primera reconstrucción metabólica refinada a escala genómica de *C. salexigens*, en la que se ha conectado el metabolismo del C y el N con todas las rutas relativas al transporte, síntesis, degradación y eflujo de los principales solutos compatibles acumulados por esta bacteria. Esta red metabólica se ha utilizado para obtener un primer modelo metabólico matemático que refleja con bastante precisión el sistema biológico de estudio, ya que ha sido manualmente revisado en base a estudios bioquímicos y fisiológicos previos, y a datos provenientes de análisis multiómicos recientemente llevados a cabo por nuestro Grupo. Además ha sido validado comparando los resultados de las simulaciones *in silico* con los datos de resultados experimentales (determinación de las cinéticas de crecimiento con diferentes fuentes de carbono y energía y nitrógeno a diferentes salinidades, el análisis de metabolitos extracelulares, la determinación de actividades enzimáticas del metabolismo central, proteómica diferencial, entre otros). Toda la información obtenida a partir de este modelo nos ayudará a predecir mejor las respuestas fisiológicas y así desarrollar nuevas estrategias para optimizar la obtención de cepas de *C. salexigens* hiperproductoras de ectoínas.

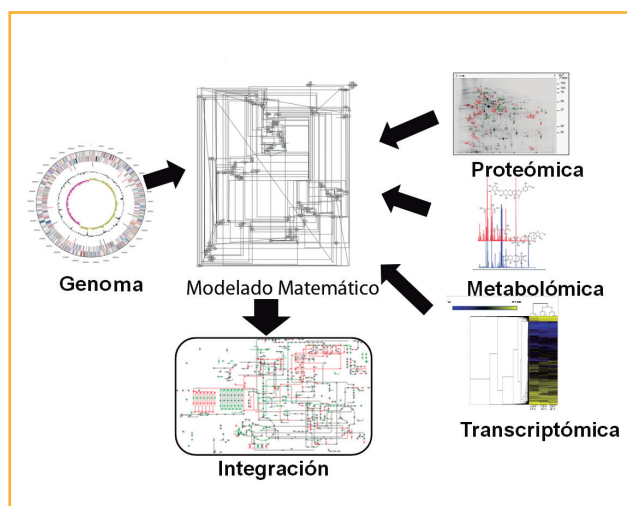


Figura 2. Biología de Sistemas de *C. salexigens*.

Por otro lado, hemos obtenido nuevas cepas mutantes productoras de hidroxiectoína en las que se ha conseguido desacoplar la síntesis de su regulación por temperatura y salinidad, obteniéndose valores de producción de este soluto compatible a 37°C y 0,75 M NaCl similares a los de la cepa silvestre a 45° C y 2,5 M NaCl, lo que supone una gran ventaja desde el punto de vista industrial (resultados que han sido protegidos bajo patente). Por último, por las razones anteriormente expuestas, estamos muy interesados en el estudio molecular del efecto neuroprotector de las ectoínas y su posible aplicación en Biomedicina, para lo cual el Grupo ya cuenta con la colaboración a nivel de proyectos de investigación subvencionados con diversas empresas del sector interesadas en el tema.

PUBLICACIONES RECIENTES DEL GRUPO MÁS RELEVANTES

- Pastor JM, Bernal V, Salvador M, Argandoña M, Vargas C, Csonka L, Nieto JJ y Cánovas M. (2013). Role of central metabolism in the osmoadaptation of the bacterium *C. salexigens*. *J Biol Chem* 288:17769-81.
- Rodríguez-Moya J, Argandoña M, Nieto JJ, Iglesias-Guerra F y Vargas C. (2013). Temperature- and salinity-decoupled overproduction of hydroxyectoine by *C. salexigens*. *Appl Environ Microbiol* 79:1018-1023.
- Reina-Bueno M, Argandoña M, Salvador M, Csonka L, Nieto JJ y Vargas C. (2012). Role of trehalose in tolerance to salinity, temperature and desiccation in *C. salexigens*. *PLoS One* 7(3). 2012e33587.
- Argandoña M, Vargas C, Reina-Bueno M, Salvador M y Nieto JJ. (2012). An extended suite of genetic tools for use in bacteria of the *Halomonadaceae*: an overview. In: P Balbas and A Lorence (eds), *Methods in Molecular Biology, Reviews and Protocols*, 3rd ed, vol. 824, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 167-201.
- Argandoña M, Nieto JJ, Calderón MI, García-Esteva R y Vargas C. (2011). Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic *C. salexigens*. *Appl Environ Microbiol* 76:3575-3589.
- Copeland A, O'Connor K, et al. (2011). Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11T). *Stand Genom Sci* 5:379-88.
- Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Vargas C, Nieto JJ y Cánovas M. (2010). Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv* 28: 782-807.
- Rodríguez-Moya J, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, y Vargas C. (2010). Involvement of a two-component system in the control of the uptake of ectoines by the halophilic bacterium *C. salexigens*. *BMC Microbiol* 10:256-274.
- Vargas C, Argandoña M, García-Esteva R, Reina-Bueno M, Rodríguez-Moya J y Nieto JJ. (2008). Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *C. salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* 4:14-23.
- García-Esteva R, Argandoña M, Reina-Bueno M, Iglesias-Guerra F, Nieto JJ y Vargas C. (2006). The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol* 188:3774-84.

Microbial Biochemistry and Pathogenesis Research Group

Miguel A. Valvano, Mw D. Professor of Microbiology and Infectious Diseases

Centre for Infection and Immunity, Queen's University Belfast, Belfast. United Kingdom

<http://publish.uwo.ca/~mvalvano/index.html>

m.valvano@qub.ac.uk



Foto de grupo. Al frente, de izquierda a derecha, Yasmine Fathy, Kina Patel, Janet Torres, Gonzalo Pradenas, Amy Ford, Cristobal Mujica, Sudeepta Chakravarty, Laura Burns, Bernadette Kevin, Miguel Valvano, Fondo: Tina Schmidt, Lucie Kalferstova, Anna Hanuszkiewicz, Seamus O'Brien, Chris Connolly.

WHAT DO WE DO?

Our research involves an interdisciplinary approach using molecular genetics, biochemistry, cell biology, and structural biology to understand the pathogenesis of Gram-negative bacteria at the molecular level. *Burkholderia cenocepacia*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Shigella flexneri* are the model organisms we use in different aspects of our research program.

WHY IS IT IMPORTANT?

Opportunistic infections pose a significant threat to human health, especially to those patients who benefit most from advancements in the treatment of genetic diseases, cancer, and organ transplantation, but who become immunosuppressed. *Burkholderia cepacia* complex bacteria (Bcc) and *Burkholderia cenocepacia* in particular are our main model organisms to study the pathogenicity of

opportunistic bacteria. Bcc bacteria are a major health risk for children and young adults with genetic conditions like cystic fibrosis and chronic granulomatous disease. These patients commonly suffer from lung and airways infections by these microorganisms, which are very difficult to treat given the extraordinary resistance of these bacteria to clinically useful antimicrobials. Therefore, throughout research we hope to find novel ways to prevent or ameliorate the effect of these infections in susceptible patients.

Enteric bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Shigella* are also important human pathogens, which are particularly endemic in certain parts of the world. Lipopolysaccharide (LPS) is a complex glycolipid molecule located on the surface of Gram-negative bacteria that is also a critical structural component of the bacterial outer membrane. Bacteria with defects in the LPS molecule are more sensitive to a variety of antibiotics and they can be easily killed by host defensive mechanisms such as the serum complement

and antimicrobial peptides. Therefore, by understanding how the LPS is made and assembled on the bacterial cell surface we hope to design inhibitors that will interfere with this process, which may be useful as novel antimicrobials. Also, we are looking at ways to alter LPS biosynthesis at various levels to increase the overall permeability of the outer membrane to antibiotics and antimicrobial peptides. What we learn in *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Shigella flexneri* is also applied to *Burkholderia cenocepacia*.

EXAMPLES OF KEY QUESTIONS WE CURRENTLY INVESTIGATE

We discovered that genetic ablation of LPS synthesis or chemical inhibitors of certain LPS biosynthesis enzymes can «weaken» the bacterial outer membrane and facilitate the entry of conventional antibiotics and antimicrobial peptides, especially in *B. cenocepacia* and other Bcc bacteria. We have also conducted detailed studies on proteins required for the synthesis of core oligosaccharide and O antigen moieties of the LPS molecules. These components are crucial for the virulence of *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*. Now we want to learn:

How LPS components are synthesized?
What are the mechanistic bases of the translocation of O-antigen LPS biosynthesis intermediates across the plasma membrane?
How Bcc bacteria can survive the attack of antimicrobial cationic peptides and other antibiotics?

We discovered that Bcc bacteria survive intracellularly in free-living amoebae and macrophages by altering the maturation of the phagosome, and this research has led to the hypothesis that these cells become a reservoir for the persistence and dissemination of these bacteria in the host. We have also discovered a novel secretory system in *B. cenocepacia* (type VI) that appears to alter the cytoskeleton of infected macrophages and is required for infection in an animal model of chronic lung infection. Now we want to learn:

How does intracellular B. cenocepacia delay phagosome maturation and phagosomal acidification?
What is the role of a novel type 6-secretion system in B. cenocepacia intracellular survival?
How does intracellular B. cenocepacia affect the assembly of the macrophage NADPH oxidase?

We discovered several master regulators that respond to different types of stress. Mutations in the genes encoding these regulators impair the ability of *B. cenocepacia* to survive within macrophages and also in the animal model of chronic lung infection. We have observed that antioxidant bacterial defenses are critical for intracellular survival. Now we want to learn:

How does B. cenocepacia adapt to various environments including macrophage and epithelial cells?
What are the roles of stress regulators in intracellular

survival and in bacterial survival in the rat model of chronic lung infection?

How do bacterial antioxidant mechanisms protect essential bacterial metabolic pathways that are deemed to be critical for adaptation to different environments, including the lung and airways?

Sometimes genetic tools are not available for our specific research needs. Therefore, we place special effort in developing new tools and reagents or modifying those available to our own needs. In particular, our lab has contributed novel molecular tools to handle Bcc bacteria.

BIBLIOGRAFÍA RECIENTE

- Andrade A y Valvano MA. (2014). A *Burkholderia cenocepacia* gene encoding a non-functional tyrosine phosphatase is required for the delayed maturation of the bacteria-containing vacuoles in macrophages. *Microbiology* 160:1332-1345.
- Aubert DF, Hamad MA y Valvano MA. (2014). A markerless deletion method for genetic manipulation of *Burkholderia cenocepacia* and other multi antibiotic resistant Gram-negative bacteria. In *Host-bacteria interactions: Methods and Protocols*, pp. 311-327. Edited by Vergunst A y Callaghan D O: Human Press.
- El-Halfawy OM y Valvano MA. (2014). Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* (in press).
- Hanuszkiewicz A, Pittock P, Humphries F, Moll H, Rosales AR, Molinaro A, Moynagh PN, Lajoie GA y Valvano MA. (2014). Identification of the flagellin glycosylation system in *Burkholderia cenocepacia* and the contribution of glycosylated flagellin to evasion of human innate immune responses. *J Biol Chem* 289:19231-19244.
- Mohamed YF y Valvano MA. (2014). A *Burkholderia cenocepacia* MurJ (MviN) homolog is essential for cell wall peptidoglycan synthesis and bacterial viability. *Glycobiology* 24:564-576.
- Schmerk CL, Welander PV, Hamad MA, Bain KL, Bernards MA, Summons RE y Valvano MA. (2014). Elucidation of the *Burkholderia cenocepacia* hopanoid biosynthesis pathway uncovers functions for conserved proteins in hopanoid-producing bacteria. *Environ Microbiol* doi: 10.1111/1462-2920.12509.
- Aubert DF, O'Grady EP, Hamad MA, Sokol PA y Valvano MA. (2013). The *Burkholderia cenocepacia* sensor kinase hybrid AtsR is a global regulator modulating quorum-sensing signalling. *Environ Microbiol* 15:372-385.
- Khodai-Kalaki M, Aubert DF y Valvano MA. (2013). Characterization of the AtsR hybrid sensor kinase phosphorelay pathway and identification of its response regulator in *Burkholderia cenocepacia*. *J Biol Chem* 288:30473-30484.
- Hamad MA, Di Lorenzo F, Molinaro A y Valvano MA. (2012). Aminoarabinose is essential for lipopolysaccharide export and intrinsic antimicrobial peptide resistance in *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* 85:962-974.
- Patel KB, Toh E, Fernandez XB, Hanuszkiewicz A, Hardy GG, Brun YV, Bernards MA y Valvano MA. (2012). Functional characterization of UDP-Glucose:Undecaprenyl-Phosphate Glucose-1-Phosphate Transferases of *Escherichia coli* and *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 194:2646-2657.
- Rosales-Reyes R, Skeldon AM, Aubert DF y Valvano MA. (2012). The Type VI secretion system of *Burkholderia cenocepacia* targets multiple Rho family GTPases disrupting the actin cytoskeleton and the assembly of NADPH oxidase complex in macrophages. *Cell Microbiol* 14:255-273.
- Marolda CL, Li B, Lung M, Yang M, Hanuszkiewicz A, Roa Rosales A y Valvano MA. (2010). Membrane topology and identification of critical amino acid residues in the Wzx O-antigen translocase from *Escherichia coli* O157:H4. *J Bacteriol* 192:6160-6171.

Grupo de Microbiología Clínica y Molecular

José Ramos Vivas

Laboratorio de Microbiología Celular, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla IDIVAL. Cantabria

jvivas@idival.org

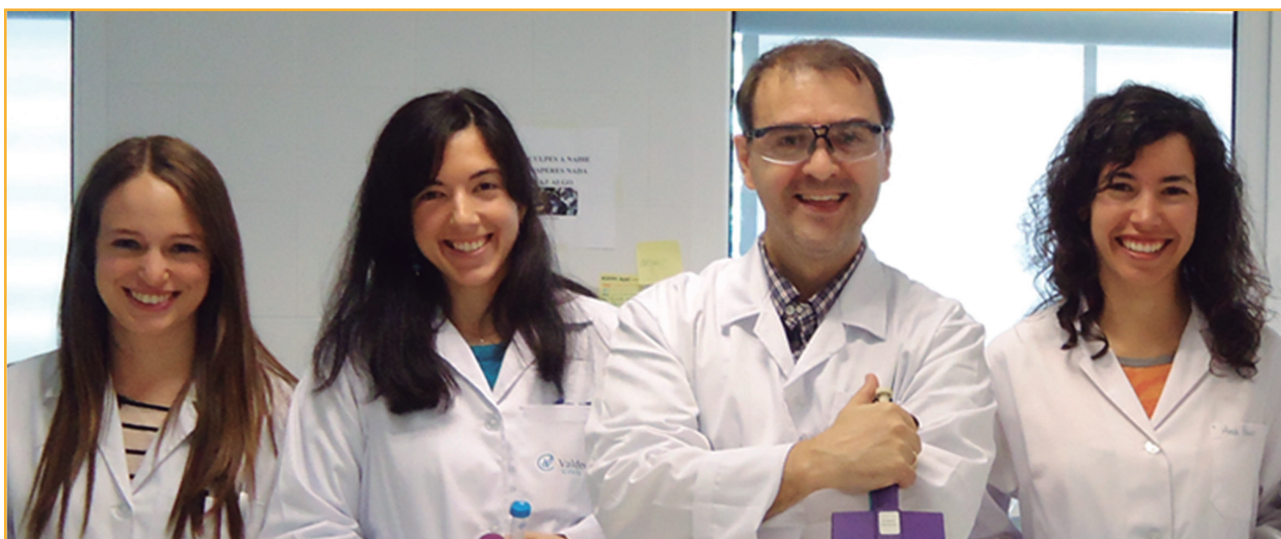


Foto de grupo. De izquierda a derecha: María Lázaró Díez (Predoctoral), Sara Remuzgo Martínez (Postdoc), José Ramos Vivas (Investigador Principal), Ana Franco González de Canales (Predoctoral).

El laboratorio de Microbiología Celular del Instituto IDIVAL tiene una reciente historia. Comenzó verdaderamente en 2009, con la llegada a Santander del Investigador principal, pero fue a finales del año 2012 cuando el grupo completó la equipación de sus 3 pequeños laboratorios, uno de Biología Molecular, otro de Biología Celular y uno de Microbiología, con fondos procedentes de proyectos nacionales e internacionales.

La principal línea de investigación de nuestro grupo se centra en el estudio de interacciones patógeno-hospedador, utilizando modelos en los que intervienen bacterias patógenas y cultivos *in vitro* de células y tejidos (ratón-rata humano).

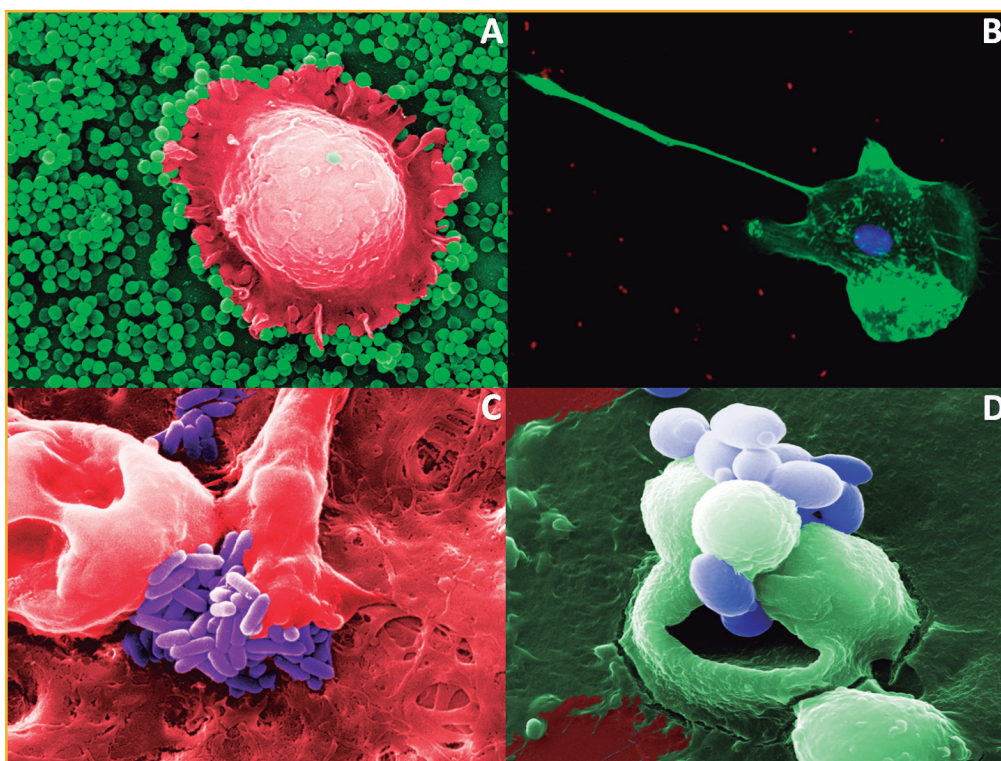
Entre las bacterias patógenas que estudiamos se encuentran *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina, distintas especies del género *Serratia* y también de *Acinetobacter*, como *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*.

En concreto, estas especies de *Acinetobacter* tienen mucha importancia en las infecciones hospitalarias, especialmente en unidades de cuidados intensivos (UCIs) ya que tienen propensión a desarrollar resistencias a múltiples clases de antibióticos, lo que reduce las opciones terapéuticas para combatirlas. Mientras que la epidemiología y la resistencia a antibióticos de la mayoría de estas especies están siendo ampliamente estudiadas, las bases moleculares y genéticas de su virulencia permanecen bastante inexploradas. Además, hay un gran desconocimiento de las respuestas del hospedador a estos patógenos.

Acinetobacter supone en la actualidad un grave problema sanitario en muchos hospitales españoles y por lo tanto es uno de los patógenos de interés para la Red Española de Patología Infecciosa (REIPI) a la que pertenece nuestro grupo.

Respondiendo a la necesidad de estudios sobre los mecanismos implicados en la relación hospedador-pató-

Figura 1. A. Microscopía de barrido (SEM). Macrófago fagocitando un biofilm de *Staphylococcus aureus*. Magnificación $\times 10.000$. B. Microscopía de fluorescencia. Macrófago humano capturando *Acinetobacter baumannii* (rojo). Magnificación $\times 400$. C. Microscopía de barrido (SEM). Macrófagos cerebrales fagocitando *Listeria monocytogenes*. Reproducida con el permiso de John Wiley and Sons Publishers: GLIA, 2013; Vol 61:611-22. Magnificación $\times 20.000$. D. Microscopía de barrido (SEM). Levaduras (azul) invadiendo una célula epitelial humana. Magnificación $\times 10.000$.



geno (H-P), nuestro equipo desarrolla una investigación multidisciplinar sobre interacciones H-P principalmente en esas especies, aunque también hemos comenzado trabajos en el campo de las interacciones H-P con cepas probióticas, iniciando así diferentes colaboraciones. Algunos ejemplos de estas interacciones se pueden ver en la **Figura 1**.

Los objetivos del equipo son: A) Desarrollar nuevas herramientas para el estudio en profundidad de las interacciones bacteria-célula; B) Estudiar el impacto de diferentes antibióticos durante interacciones H-P *in vitro*; C) Realizar un análisis detallado de la expresión de genes de células inmunitarias en respuesta a distintos fenotipos de estas especies multirresistentes o a sus productos bacterianos, así como la expresión de genes de virulencia en las bacterias patógenas.

Al utilizar técnicas de Microbiología, Biología Celular y Microscopía avanzada, los modelos que usamos son muy flexibles y se pueden adaptar al estudio de cualquier patógeno humano. Concretamente, con nuestras colaboraciones nacionales e internacionales estudiamos ya 5 de los 6 patógenos ESKAPE multirresistentes (*Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*).

Por último, decir que nuestro laboratorio se encuentra en el Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla IDIVAL, ligado al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, en Santander.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Remuzgo-Martínez S, Lázaro-Díez M, Padilla D, Vega B, El Aamri F, Icardo JM, Acosta F, Ramos-Vivas J. (2014). New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Pili, motility and adherence to solid surfaces. *Vet Microbiol.* 174:247-254.
- El Aamri F, Remuzgo-Martínez S, Acosta F, Real F, Ramos-Vivas J, Icardo JM, Padilla D. (2014). Interactions of *Streptococcus iniae* with phagocytic cell line. *Microbes Infect.* doi: 10.1016/j.micinf.2014.06.006.
- Remuzgo-Martínez S, Pilares-Ortega L, Alvarez-Rodríguez L, Aranzamendi-Zaldunbide M, Padilla D, Icardo JM, Ramos-Vivas J. (2013). Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Rhodococcus equi* infection. *J Med Microbiol.* 62:1144-1152.
- Remuzgo-Martínez S, Aranzamendi-Zaldunbide M, Pilares-Ortega L, Icardo JM, Acosta F, Martínez-Martínez L, Ramos-Vivas J. (2013). Interaction of macrophages with a cytotoxic *Serratia liquefaciens* human isolate. *Microbes Infect.* 15:480-490.
- Remuzgo-Martínez S, Pilares-Ortega L, Icardo JM, Valdizán EM, Vargas VI, Pazos A, Ramos-Vivas J. (2013). Microglial activation and expression of immune-related genes in a rat ex vivo nervous system model after infection with *Listeria monocytogenes*. *Glia.* 61:611-622.
- Remuzgo-Martínez S, San Segundo D, Santa Cruz C, Beares I, Valdizán E, Icardo JM, Ramos-Vivas J. (2013). Absence of core autophagy gene expression in an ex vivo central nervous system model infected with *Listeria monocytogenes*. *Inmunología.* 32:87-93.
- Padilla D, Remuzgo-Martínez S, Acosta F, Ramos-Vivas J. (2013). *Hafnia alvei* and *Hafnia paralvei*. Taxonomy defined but still far from virulence and pathogenicity. *Vet Microbiol.* 163:200-201.

Grupo de Biología y Genética de la Pared Bacteriana: descubriendo la diversidad y plasticidad del peptidoglicano de las bacterias

Felipe Cava Valenciano

Departamento de Biología Molecular, Universidad de Umeå. SE-90187 Umeå, Suecia

www.mims.umu.se/groups/felipe-cava.html

felipe.cava@molbiol.umu.se

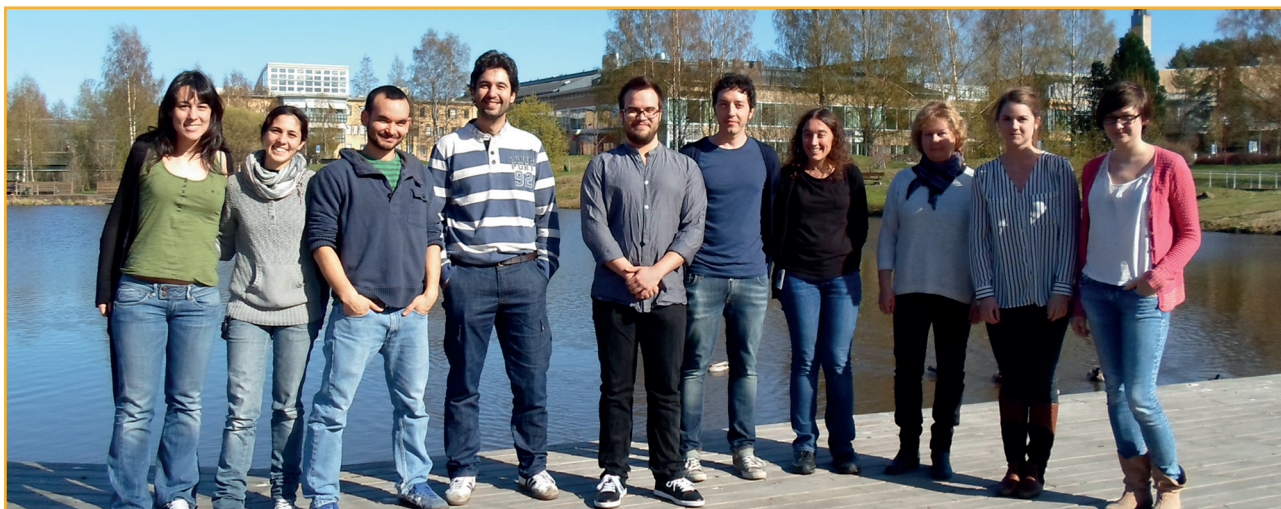


Foto de grupo. Grupo de Biología y Genética de la Pared Bacteriana. De Izquierda a derecha: Laura Álvarez, Sara B. Hernández, Akbar Espailat, Felipe Cava, Oskar Forsmo, Carlos Terriente, Teresa del Peso-Santos, Eleonore Skårfstad, Emilie Nordström y Alena Aliashkevich.

El grupo de Biología y Genética de la Pared Bacteriana (<http://www.mims.umu.se/groups/felipe-cava.html>) es un grupo joven que se inició en el CBMSO (CSIC-UAM) de Madrid en 2011. Hace tan solo un año nos trasladamos a Umeå, Suecia. Nuestro grupo forma parte del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Umeå, del MIMS-EMBL (Laboratory of Molecular Infection Medicine Sweden) y UCMR (Umeå Centre for Microbial Research). MIMS y UCMR proporcionan un ambiente interdisciplinar dotado de tecnologías de vanguardia en microscopía, metabolómica, NMR y análisis bioinformático avanzado. En el campus trabajan investigadores de gran prestigio internacional dentro de las

áreas de microbiología molecular y biología de la infección. Uno de los objetivos principales de nuestro grupo es formar a la siguiente generación de científicos mediante la creación de un ambiente estimulante que impulse el aprendizaje a través de la colaboración.

Nuestro principal interés es el estudio de uno de los principales «talones de Aquiles» de las bacterias: la pared celular. Estudiamos cómo las bacterias modulan su pared para adaptarse a cambios ambientales y a las distintas etapas del proceso infeccioso. Para ello hacemos uso de una gran variedad de técnicas analíticas avanzadas, microscopía de correlación y análisis de imagen, combinadas con genética molecular, bio-

química, bioinformática y biología molecular. Nuestros hallazgos permitirán dar respuestas a aspectos fundamentales en fisiología bacteriana así como desarrollar nuevas estrategias para combatir enfermedades infecciosas emergentes.

Buscamos gente entusiasta que quiera unirse a nuestro grupo como postdoc. Os animamos a que nos enviéis vuestro currículum y una carta de presentación a felipe.cava@molbiol.umu.se.

NUESTROS PROYECTOS

Biología de los D-aminoácidos

En trabajos anteriores hemos descrito el papel de los D-aminoácidos como moduladores del metabolismo de la pared celular y su función como moléculas de señalización/comunicación (Lam *et al.*, 2009). Aunque inicialmente detectamos los D-aminoácidos no canónicos (NCDAAs) en los cultivos de *Vibrio cholerae*, el patógeno causante del cólera, en realidad una gran variedad de bacterias no necesariamente relaciona-

das taxonómicamente pueden liberar altas concentraciones de NCDAAs al medio extracelular. Su acumulación coincide además con la transición a la fase estacionaria y regula negativamente la síntesis de la pared bacteriana, por lo que los NCDAAs podrían estar implicados en coordinar el metabolismo de la pared celular y el citoplasma cuando los nutrientes escasean. Dado que los NCDAAs parecen ser un rasgo común de diversas bacterias y que disponemos de una extensa colección (más de 1000 especies diferentes), actualmente estamos investigando su papel en diversos modelos bacterianos y en diferentes procesos fisiológicos tales como la esporulación, la formación del biofilm y la producción de metabolitos secundarios.

Además hemos caracterizado las rutas de incorporación de los NCDAAs (Cava *et al.*, 2011a), lo cual tiene gran impacto en comunidades polimicrobianas, puesto que bacterias incapaces de producir estas moléculas son sin embargo capaces de incorporarlas a su pared celular. Recientemente hemos llevado a cabo una caracterización bioquímica y funcional de una familia entera de racemasas de amplio espectro, las enzimas multiespecíficas responsables de la producción de NCDAAs en bacterias (Espaillat *et al.*, 2014).

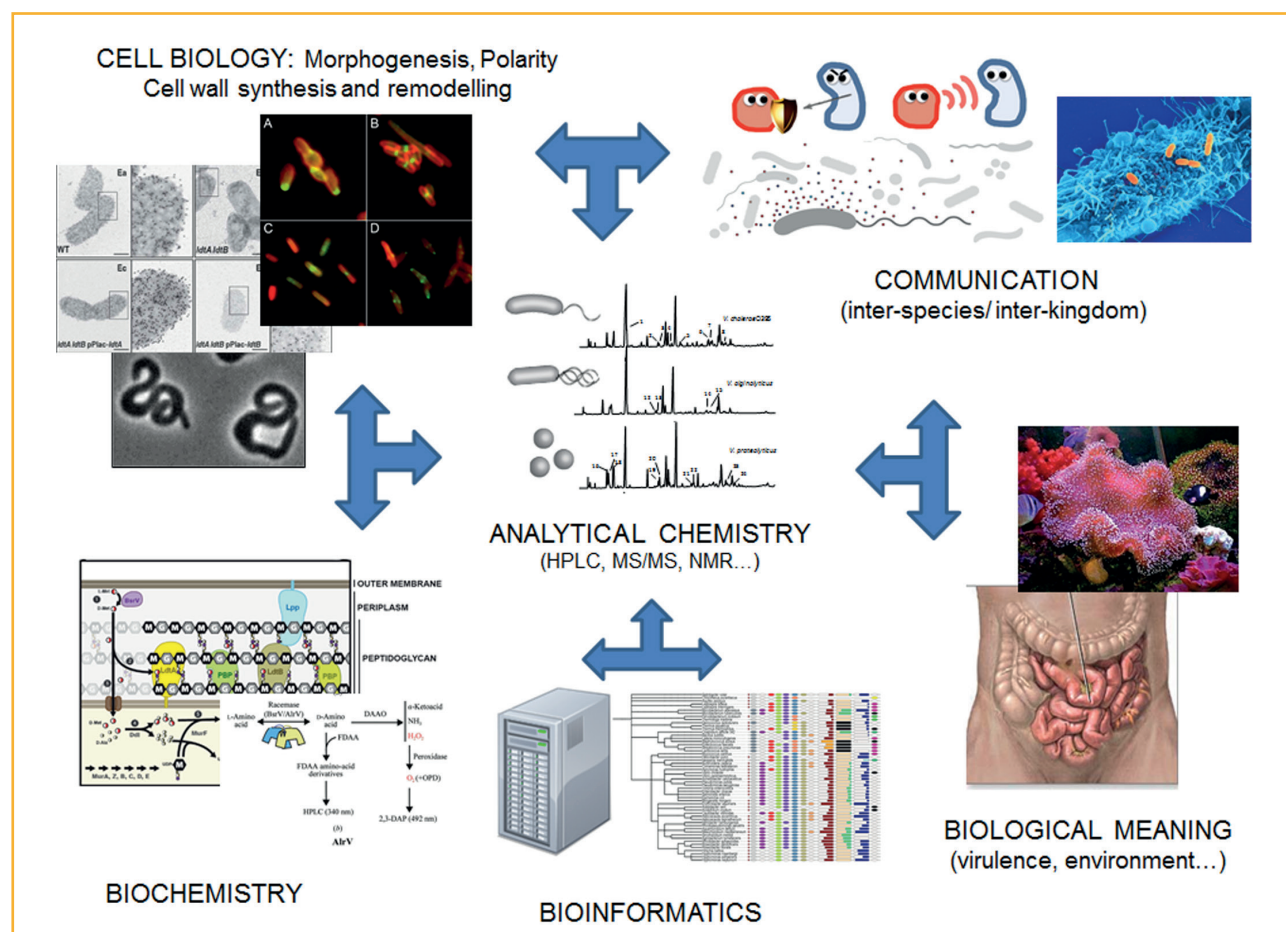


Figura 1. Esquema de las actividades del grupo de Biología y Genética de la Pared Bacteriana. En nuestro laboratorio llevamos a cabo un esfuerzo multidisciplinar para comprender el valor adaptativo/fisiológico que tiene para la bacteria el control sobre la composición y estructura de la su pared.

Nuevos modelos de crecimiento de pared celular en bacteria

Basándonos en la capacidad de las bacterias de incorporar diversos tipos de D-aminoácidos, hemos diseñado estrategias para el seguimiento del crecimiento y dinámica de la pared celular *in vivo* mediante la utilización de D-aminoácidos fluorescentes y química bioortogonal (Kuru *et al*, 2012; Siegrist *et al*, 2013). La universalidad de este método ha revolucionado la forma de realizar estudios del crecimiento y dinámica de la pared celular en el presente (PLoS Biol. 2013:e1001728; Nature 2013 Dec 11; Nat Commun 2013 4:2856). Empleando técnicas avanzadas como la microscopía de correlación, llevamos a cabo un seguimiento espacio-temporal de la dinámica de remodelado del peptidoglicano en células vivas.

Caracterización de la diversidad de la mureína en el reino Bacteria

Recientemente, hemos puesto a punto la tecnología UPLC-MS en línea para el análisis «high throughput» del peptidoglicano que nos permitirá analizar miles de microbios en diversas condiciones. Se trata de un programa de investigación muy ambicioso que pretende descubrir y explotar la variabilidad, tanto diversidad como plasticidad, de la pared celular bacteriana. Esta investigación es crítica para poder comprender la biología de la pared celular en la naturaleza, la relación de las bacterias con otros organismos y su capacidad de adaptación a desafíos medioambientales. Con los datos obtenidos estamos creando la primera base de datos de la pared celular bacteriana: el MUREINOMA. Esta enciclopedia de la pared bacteriana contribuirá al descubrimiento de nuevas rutas metabólicas y de regulación de gran interés en el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas más específicas.

Búsqueda de nuevos metabolitos moduladores de la pared bacteriana

Otra de nuestras líneas de investigación consiste en estudiar el impacto de metabolitos ambientales en la pared celular mediante el uso tanto de librerías de compuestos químicos como de extractos biológicos más complejos (extractos marinos producidos por actinobacterias procedentes del Ártico).

Desarrollo y dispersión del biofilm de *Vibrio cholerae*

La producción de matriz extracelular es una característica común de las comunidades multicelulares, aunque existe gran diversidad en su formación. Estudios recientes sugieren que algunas moléculas de señalización ejercen un papel importante en el desarrollo del *biofilm*. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de la conexión entre la comunicación química y la arquitectura del *biofilm* en comunidades polimicrobianas continúa siendo un mis-

terio. Nuestro laboratorio utiliza la tecnología de RNAseq para descifrar mecanismos moleculares mediante los cuales ciertos estímulos ambientales gobiernan el desarrollo del *biofilm* de *Vibrio cholerae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez L, Espaillet A, Hermoso JA, de Pedro MA y Cava F. (2014). Peptidoglycan remodeling by the coordinated action of multispecific enzymes. *Microb Drug Resist*. 20:190-8.
- Cava F y de Pedro MA. (2014) Peptidoglycan plasticity in bacteria: emerging variability of the murein sacculus and their associated biological functions. *Curr Opin Microbiol*. 18:46-53.
- Cava F, de Pedro MA, Lam H, Davis BM y Waldor MK. (2011a). Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J* 30:3442-53.
- Cava F, Kuru E, Brun YV y de Pedro MA. (2013). Modes of cell wall growth differentiation in rod-shaped bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 16:731-7
- Cava F, Lam H, de Pedro MA y Waldor MK (2011b). Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 68:817-31.
- Desmarais SM, Cava F, De Pedro MA y Huang KC. (2014). Isolation and preparation of bacterial cell walls for compositional analysis by ultra performance liquid chromatography. *J Vis Exp*. 83. doi: 10.3791/51183.
- Desmarais SM, De Pedro MA, Cava F y Huang KC. (2013). Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol Microbiol* 89:1-13.
- Dörr T, Cava F, Lam H, Davis BM y Waldor MK. (2013). Substrate specificity of an elongation-specific peptidoglycan endopeptidase and its implications for cell wall architecture and growth of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 89:949-62.
- Dörr T, Lam H, Alvarez L, Cava F, Davis BM y Waldor MK. (2014). A novel peptidoglycan binding protein crucial for PBP1A-mediated cell wall biogenesis in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet*. 10:e1004433.
- Dörr T, Möll A, Chao MC, Cava F, Lam H, Davis BM y Waldor MK. (2014). Differential requirement for PBP1a and PBP1b in the *in vivo* and *in vitro* fitness of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 82:2115-24.
- Espaillet A, Carrasco-Lopez C, Bernardo-García N, Pietrosemoli N, Otero LH, Alvarez L, de Pedro MA, Pazos F, Davis BM, Waldor MK, Hermoso JA y Cava F. (2014). Structural basis for the broad specificity of a new family of amino acid racemases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 70:79-90.
- Hernández SB, Cava F, Pucciarelli MG, García-Del Portillo F, de Pedro MA, Casadesús J. (2014). Bile-induced peptidoglycan remodeling in *Salmonella enterica*. *Environ Microbiol*. doi: 10.1111/1462-2920.12491
- Horcajo P, de Pedro MA y Cava F. (2012). Peptidoglycan plasticity in bacteria: stress-induced peptidoglycan editing by noncanonical D-amino acids. *Microb Drug Resist* 18:306-313.
- Kuru E, Hughes HV, Brown PJ, Hall E, Tekkam S, Cava F, de Pedro MA, Brun YV y VanNieuwenhze MS. (2012). In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:12519-12523.
- Lam H, Oh DC, Cava F, Takacs CN, Clardy J, de Pedro MA y Waldor MK (2009). D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* 325:1552-1555.
- Möll A, Dörr T, Alvarez L, Chao MC, Davis BM, Cava F y Waldor MK. (2014). Cell separation in *Vibrio cholerae* is mediated by a single amidase whose action is modulated by two non-redundant activators. *J Bacteriol*. 196:3937-48.
- Siegrist MS, Whiteside S, Jewett JC, Aditham A, Cava F y Bertozzi CR. (2013). (D)-amino acid chemical reporters reveal peptidoglycan dynamics of an intracellular pathogen. *ACS Chem Biol* 8:500-5.

Caracterización molecular de pared celular de hongos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas

Adhesinas en *Candida glabrata*

Albert de Boer, Ana Esther Moreno Martínez, Ana Martínez Perez-Romero y Piet de Groot

Micología Médica, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Albacete

piet.degroot@uclm.es



C*andida* y otros hongos patógenos causan, con gran frecuencia, micosis superficiales y en pacientes inmunocomprometidos pueden causar infecciones sistémicas que ponen en peligro la vida del paciente y son difíciles de tratar y diagnosticar. Un estudio epidemiológico multicéntrico reciente en la población española afectada de infecciones diseminadas producidas por *Candida* describe una incidencia anual de 8,1 casos/100.000 habitantes con una mortalidad del 30,6%. La emergencia de la pandemia de SIDA, el tratamiento quimioterápico en cáncer, inmunosupresión en transplantados, el tratamiento de enfermos críticos en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y el

envejecimiento de la población han contribuido a aumentar la población susceptible de adquirir infecciones fúngicas. Los elevados costes derivados de la prevención, diagnóstico y tratamiento de micosis invasivas y el limitado repertorio actual de fármacos disponibles también requieren una investigación urgente para establecer nuevas estrategias terapéuticas antifúngicas. Iniciado por el Investigador INCReCyT Dr. Piet de Groot hace 4 años, nuestro grupo de investigación Micología Médica en Albacete estudia procesos moleculares que provocan el establecimiento de las infecciones fúngicas con un mayor enfoque en la pared celular de *Candida*.

Candida albicans es el agente causal más frecuentemente aislado en infecciones fúngicas, pero durante las pasadas dos décadas se ha descrito un aumento continuo en los casos descritos de infecciones en mucosas y diseminadas producidas por *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. Mundialmente se considera *C. glabrata* como el segundo agente causal más prevalente del género *Candida*. El tratamiento de las infecciones causadas por *C. glabrata* es complicado debido a que los aislados clínicos suelen mostrar una baja susceptibilidad a las terapias antifúngicas más comunes. El establecimiento de las infecciones por *C. glabrata* está mediado por la pared celular del hongo que establece interacciones primarias patógeno-hospedador. Por ejemplo, la pared celular contiene adhesinas que provocan la adhesión del hongo a superficies biomédicas y a la formación de biopelículas (biofilms). Por tanto, estas adhesinas juegan un papel importante en el proceso infeccioso y debido a que proteínas similares se encuentran ausentes en células de mamífero, representan candidatos idóneos para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos, vacunas anti-*Candida* efectivas y métodos más precisos y sistemáticos para diagnosticar las infecciones fúngicas.

Hemos descrito que el genoma de *C. glabrata* contiene una familia excepcionalmente amplia de genes que codifican adhesinas de la pared celular. Entre las (putativas) proteínas de tipo adhesina destacan las proteínas Epa, que

representan una subfamilia de proteínas de tipo lectina. Las funciones biológicas de la mayoría de las adhesinas de pared no se conocen, si exceptuamos las de un número muy limitado de adhesinas de la subfamilia Epa. Un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares fundamentales que regulan la actividad de las adhesinas y su papel en la patogenia de la infección es crucial para desarrollar nuevas estrategias que permitan la prevención y el tratamiento de estas candidiasis.

Las adhesinas de la pared fúngica son proteínas modulares (Figura 1); sus precursores contienen péptidos señal para entrar en el RE y anclajes GPI, y las proteínas maduras comprenden un dominio N-terminal, que generalmente determina la especificidad de unión a ligandos de las adhesinas seguido de un dominio de baja complejidad que en la mayoría de casos contiene repeticiones internas en tandem. Estas repeticiones internas juegan un papel importante en la adhesividad del hongo y en la exposición de los dominios de unión a ligandos modulado por el número de copias repetidas y consecuentemente, por las variaciones de tamaño de los genes que codifican adhesinas de los aislados clínicos.

Nuestros datos muestran que existen grandes variaciones fenotípicas entre los aislamientos clínicos de *C. glabrata* en su capacidad de adhesión a las superficies abióticas de importancia médica. Nuestra hipótesis es que estas cepas

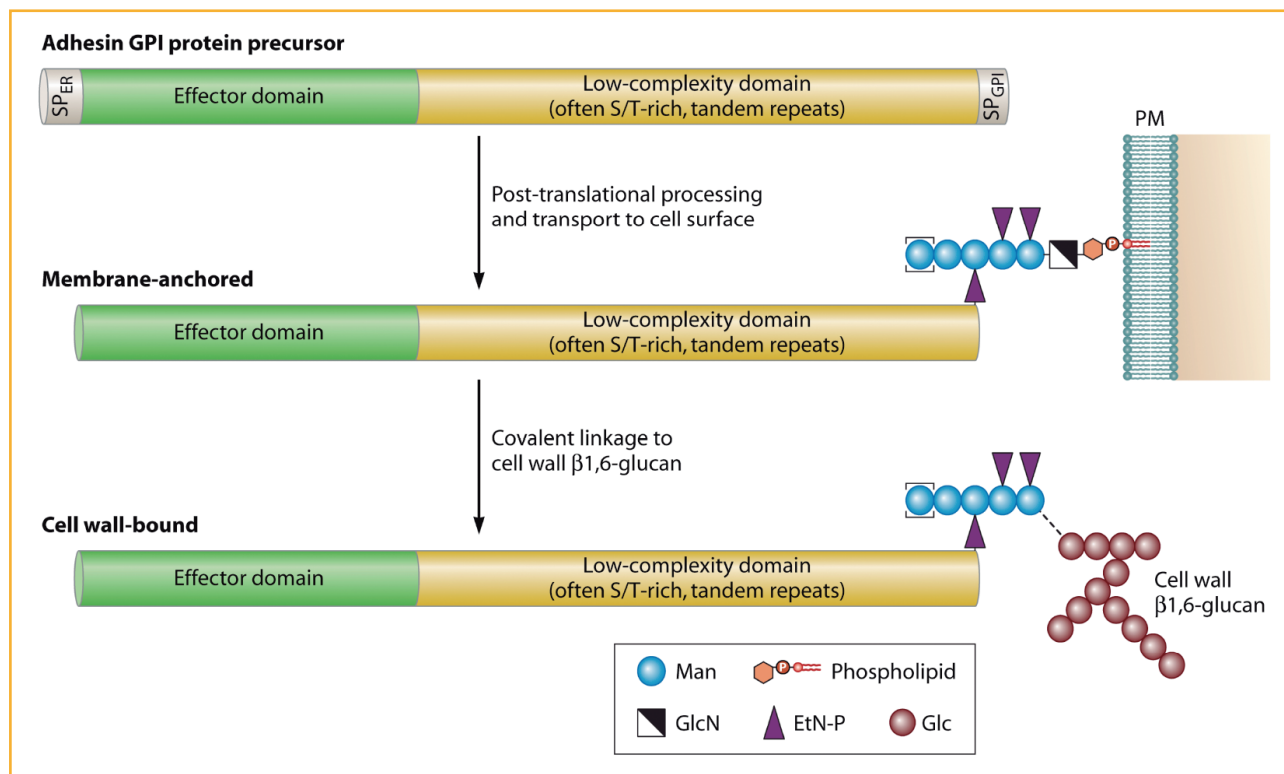


Figura 1. Estructura genérica y procesamiento post-traduccional, que lleva a la incorporación de adhesinas a la pared celular fúngica. No se muestra N- y O-glicosilación de proteínas por motivos de simplicidad.

más adherentes (hiperadherentes) son mejores colonizadoras de los tejidos del huésped que las cepas de referencia y que estos fenotipos hiperadherentes son gobernados por adhesinas de la pared celular aun no caracterizadas. Por lo tanto, el objetivo principal de nuestro trabajo es identificar y caracterizar funcionalmente las adhesinas que gobiernan los fenotipos hiperadherentes de los aislamientos clínicos. Para la identificación de nuevas adhesinas utilizamos protocolos ya establecidos de identificación de proteínas de la pared celular por espectrometría de masas. Con los candidatos más prometedores realizamos estudios más detallados de caracterización por clonación y expresión heteróloga, y estudios que definan sus propiedades de unión al ligando. Estudiamos, *in vivo* e *in vitro*, su relevancia en la virulencia de *Candida* empleando mutantes con deleciones, mediante ensayos fenotípicos. También planeamos estudiar la actividad de diferentes agentes antifúngicos sobre la capacidad de adhesión, formación de biopelícula y virulencia experimental de aislamientos clínicos hiperadherentes y de mutantes con delección de adhesinas específicas.

Estos estudios sobre los adhesinas se llevan a cabo en colaboración con los grupos del Prof. G. Quindós (Universidad del País Vasco, Bilbao), Drs. M. Weig y O. Bader (Göttingen University, Alemania) y Dr. N. Chauhan (Rutgers University, New Jersey, USA). A través de otros estudios, el grupo de Micología Médica también colabora con grupos en la Universidad de Valencia (Prof. E. Valentín), la Universidad de Amsterdam, Holanda (Prof. C. de Koster) y la Universidad de La Serena, Chile (Prof. L. Castillo), entre otras.

BIBLIOGRAFÍA

- Gioti A, et al, De Groot PWJ, Butler G, Heitman J, Scheynius A. (2013). Genomic Insights into the Atopic Eczema-Associated Skin Commensal Yeast *Malassezia sympodialis*. MBio 4: e00572-00512.
- De Groot PWJ, Martínez AI, Castillo L. 2013. A genomic inventory of cell wall biosynthesis in the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. In Mora Montes HM (ed.), The Fungal Cell Wall, vol. In press. Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge (NY).
- De Groot PWJ, Bader O, De Boer AD, Weig M, Chauhan N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. Eukaryot. Cell 12:470-481.
- Wagener J, Weindl G, De Groot PWJ, De Boer AD, Kaesler S, Thavaraj S, Bader O, Mailänder-Sánchez D, Borelli C, Weig M, Biedermann T, Naglik JR, Korting HC, Schaller M. (2012). Glycosylation of *Candida albicans* cell wall proteins is critical for induction of innate immune responses and apoptosis of epithelial cells. PLoS ONE 7:e50518.
- Thevissen K, De Mello Tavares P, Xu D, Blankenship J, Vandenbosch D, Idkowiak-Baldys J, Govaert G, Bink A, Rozental S, De Groot PWJ, Davis TR, Kumamoto CA, Vargas G, Nimrichter L, Coenye T, Mitchell A, Roemer T, Hannun YA, Cammue BPA. (2012). The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 84:166-180.
- Gelis S, De Groot PWJ, Castillo L, Moragues MD, Sentandreu R, Gómez MM, Valentín E. (2012). Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence. Fungal Genet. Biol. 49:322-331.
- De Groot PWJ, Brandt BW. (2012). ProFASTA: A pipeline web server for fungal protein scanning with integration of cell surface prediction software. Fungal Genet. Biol. 49:173-179.
- Bader O, Schwarz A, Kraneveld EA, Tangwattanchuleeporn M, Schmidt P, Jacobsen MD, Groß U, De Groot PWJ, Weig M. (2012). Gross karyotypic and phenotypic alterations among different progenies of the *Candida glabrata* CBS138/ATCC2001 reference strain. PLoS ONE 7:e52218.
- Laforet L, Moreno I, Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Martínez JP, Argüelles J-C, De Groot PWJ, Valentín E. (2011). Pga26 mediates filamentation and biofilm formation and is required for virulence in *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 11:389-397.
- Kraneveld EA, De Soet JJ, Deng DM, Dekker HL, De Koster CG, Klis FM, Crielgaard W, De Groot PWJ. (2011). Identification and differential gene expression of adhesin-like wall proteins in *Candida glabrata* biofilms. Mycopathologia 172:415-427.
- De Boer AD, De Groot PWJ, Weindl G, Schaller M, Riedel D, Diez-Orejas R, Klis FM, De Koster CG, Dekker HL, Groß U, Bader O, Weig M. (2010). The *Candida albicans* cell wall protein Rhd3/Pga29 is abundant in the yeast form and contributes to virulence. Yeast 27:611-624.
- De Groot PWJ, Kraneveld EA, Yin QY, Dekker HL, Groß U, Crielgaard W, De Koster CG, Klis FM, Weig M. (2008). The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. Euk. Cell 7:1951-1964.
- De Groot PWJ, Klis FM. (2008). The conserved PA14 domain of cell wall-associated fungal adhesins governs their glycan binding specificity. Mol. Microbiol. 68:535-537.

Interacciones huésped-parásito en infecciones neumocócicas

Ernesto García y Pedro García

Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones,
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) Madrid

e.garcia@cib.csic.es

pgarcia@cib.csic.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Esther García, Pedro García, Roberto Díez, Mirian Domenech, Eloísa Cano, Susana Ruiz y Ernesto García.

Un primer resumen de las actividades de nuestro grupo apareció el pasado año en estas mismas páginas (http://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/55/21_BMP_55_Garcia.pdf), puesto que también pertenecemos al grupo de «Biología de los microorganismos patógenos». En él se hacía referencia a la historia del grupo, ligado siempre al estudio de *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), uno de los principales patógenos y causa principal de morbilidad y mortalidad en niños y adultos de todo el mundo. La enfermedad neumocócica invasiva (ENI) viene precedida por el establecimiento del llamado «estado de portador», es decir, la colonización de la nasofaringe. Este proceso tiene lugar a través de una relación compleja huésped-parásito en la que también se dan interacciones con otros microorganismos que ocupan el mismo hábitat. La mayoría de estas interacciones implican, por un lado, a proteínas de la superficie bacteriana y, por otro, a los mecanismos de defensa del huésped.

Uno de los temas tradicionales de trabajo en nuestro laboratorio ha sido (y sigue siendo), el estudio de las mureín-hidrolasas que hidrolizan enlaces específicos de la pared celular. Estas enzimas pertenecen a una familia de proteínas de superficie denominada «Choline-binding proteins» o CBPs, que se caracterizan por la unión específica y no covalente al

aminoalcohol colina que forma parte de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la envuelta celular. Las CBPs más estudiadas han sido: a) LytA, la principal autolisina de neumococo; b) LytB, una glucosaminidasa responsable de la separación de las células hijas; c) LytC, una lisozima implicada, entre otras funciones, en la autólisis a 30°C; d) Pce, una fosforilcolinesterasa que degrada los residuos de fosforilcolina de la superficie celular. Estas proteínas se investigaron, inicialmente, desde el punto de vista del papel fisiológico que desempeñan en la célula. Al disponer de suficientes cantidades de estas proteínas se ha podido profundizar en la relación estructura-función de varias de ellas, tanto bacterianas como fágicas (véase más adelante), a través del estudio de sus propiedades físico-químicas y de sus estructuras tridimensionales. Estos trabajos se vienen llevando a cabo en estrecha colaboración con los grupos de Margarita Menéndez y Juan Hermoso del Instituto Rocasolano del CSIC.

Actualmente, determinadas cepas de neumococo han alcanzado la categoría de «*supergermenes*», bacterias cada vez más difíciles de erradicar con antibióticos. Además, las vacunas actuales no cubren todas las necesidades de prevención y se está comprobando un incremento en la incidencia de ENI causada por neumococos de serotipos no vacunales. Es evidente, por tanto, que se necesitan urgen-

temente nuevos fármacos efectivos basados en nuevas dianas terapéuticas. En nuestro laboratorio se está estudiando la implicación de estas CBPs en la colonización, el establecimiento de la ENI y la respuesta inmune del huésped. Para ello, se han puesto a punto diversas técnicas *in vitro* —como los biofilmes o los cultivos celulares— y modelos animales de infección. Hace unos años desarrollamos un modelo experimental de formación de biofilm por neumococo usando placas multipocillo. Se observó que dichos biofilmes eran estructural y funcionalmente complejos ya que en su formación están implicados múltiples genes, algunos de ellos de función desconocida. Asimismo, se demostró que el DNA y determinadas proteínas y polisacáridos son componentes de la matriz extracelular de estos biofilmes.

En cuanto a los compuestos con actividad antibacteriana, se están estudiando diferentes grupos de moléculas que se pueden resumir así:

- a) Ésteres de aminas bicíclicas que se comportan como análogos de colina ya que interactúan fuertemente con el módulo de unión a colina de las CBPs ocupando sitios de unión del aminoalcohol. A concentraciones bajas (mM), algunos de estos compuestos no sólo inhiben la actividad enzimática de LytA y otras mureín-hidrolasas, deteniendo el crecimiento, sino que también son capaces de reducir la viabilidad del cultivo. Este comportamiento puede ser imitado si estos compuestos se cargan en un tipo de nanopartículas denominadas dendrímeros. Este trabajo se está realizando en colaboración con el grupo de Jesús M. Sanz de la Universidad Miguel Hernández de Elche.
- b) A partir de una quimioteca de más de un millar de fármacos aprobados por la FDA, se han seleccionado algunos compuestos con elevada capacidad bactericida sobre neumococo y otras bacterias patógenas, a concentraciones submilimolares. Los compuestos que muestran mejor efecto bactericida se están probando también en su forma encapsulada como nanopartículas.
- c) Las cerageninas (derivados del ácido cólico) son compuestos cuya diana es la membrana bacteriana y que recuerdan a los péptidos antimicrobianos endógenos. En concreto, la ceragenina CSA-13 es muy activa lisando *in vitro* a neumococos (incluso aislados multirresistentes) al disparar la acción autolítica de LytA.
- d) Las lisinas fágicas (endolisinas) son enzimas que se sintetizan en el citoplasma bacteriano durante la fase tardía del ciclo lítico con la finalidad de degradar la pared celular facilitando así la liberación de la progenie. Estas enzimas, también denominadas enzibióticos, muestran un potente efecto bactericida y suelen ser muy específicas ya que, normalmente, sólo matan a las bacterias de las que procede el fago que codifica dicha enzima. En nuestro laboratorio se probaron inicialmente la lisozima Cpl-1 y la amidasa Pal (codificadas por los fagos Cp-1 y Dp-1, respectivamente) que son también CBPs. Los resultados obtenidos *in vitro* se validaron en un modelo murino de sepsis. También se ha demostrado

que la lisozima Cpl-7 —con un dominio catalítico similar al de Cpl-1 pero con el de unión al sustrato totalmente distinto— es activa no sólo contra neumococo (incluidas las cepas multirresistentes) sino contra otros patógenos Gram-positivos como *Streptococcus pyogenes* o *Enterococcus faecalis*. En esta ocasión, la validación de los resultados se hizo en un modelo de embriones de pez cebra. Asimismo, todos los enzibióticos ensayados consiguieron disgregar eficazmente los biofilmes de neumococo con un importante efecto bactericida asociado. Más recientemente se ha construido una enzima quimérica combinando el dominio catalítico de Cpl-7 y el de unión al sustrato de Cpl-7 con el resultado de que la nueva enzima, Cpl-711, es la que demuestra mayor letalidad contra neumococo. Como todas estas endolisinas son modulares, se puede pensar en la posibilidad de diseñar enzimas «a la carta» frente a diferentes patógenos, especialmente los que se muestran más refractarios al actual arsenal de antibióticos.

Éstas y otras líneas de investigación se llevan a cabo, además, en colaboración con los grupos de J. Yuste, A. Fenoll y A. G. de la Campa del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII) y el de C. Ardanuy y J. Liñares del Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL.

PUBLICACIONES

- Ardanuy C, de la Campa AG, García E, Fenoll A, Calatayud L, Cercenado E, Pérez-Trallero E, Bouza E, Liñares J. (2014). Serotype 8 *Streptococcus pneumoniae* multidrug-resistant recombinant clone Sweden^{15A}-ST63: dissemination in Spain. *Emerg Infect Dis* doi:10.3201/eid2011.131215.
- Moscoso M, Esteban-Torres M, Menéndez M, García E. (2014). *In vitro* bactericidal and bacteriolytic activity of ceragenin CSA-13 against planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. *PLoS One* 9: e101037.
- Sotillo A, Pedrero M, de Pablos M, García JL, García E, García P, Pingarrón JM, Mingorance J, Campuzano S. (2014). Clinical evaluation of a disposable amperometric magneto-genosensor for the detection and identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods* 103:25-28.
- Domenech M, Araújo-Bazán L, García E, Moscoso M. (2014). *In vitro* biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* as a predictor of post-vaccination emerging serotypes colonizing the human nasopharynx. *Environ Microbiol* 16:1193-1201.
- Silva-Martín N, Retamosa MG, Maestro B, Bartual SG, Rodes MJ, García P, Sanz JM, Hermoso JA. (2014). Crystal structures of CbpF complexed with atropine and ipratropium reveal clues for the design of novel antimicrobials against *Streptococcus pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta* 1840:129-135.
- Díez-Martínez R, de Paz H, Bustamante N, García E, Menéndez M, García P. (2013). Improving the lethal effect of Cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module. *Antimicrob Agents Chemother*. 57:5355-5365.
- Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. (2013). Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 81:2606-2615.
- Domenech M, García E, Prieto A, Moscoso M. (2013). Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ Microbiol* 15:502-516.

Bustamante N, Rico-Lastres P, García E, García P, Menéndez M. (2012). Thermal stability of Cpl-7 endolysin from the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-7; cell wall-targeting of its CW₇ motifs. PLoS One 7: e46654.

Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. (2011). Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by

the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One 6: e23626.

Pérez-Dorado I, González A, Morales M, Sanles R, Striker W, Vollmer W, Mobashery S, García JL, Martínez-Ripoll M, García P, Hermoso JA. (2010). Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. Nat Struct Mol Biol 17:576-581.

Estudio del Microbioma Humano en Salud y Enfermedad

Pedro Belda, Raúl Cabrera, Anny Camelo, Mariam Ferrer, Arantxa López, Áurea Simón y Alex Mira

Fundación FISABIO, Centro Superior de Investigación en Salud Pública,
Avda Cataluña 21, 46020 Valencia

mira_ale@gva.es



Foto de grupo. Laboratorio para el Estudio del Microbioma Humano, integrado por Luis Alcaraz (actualmente en la UNAM, México), Pedro Belda, Álex Mira, Áurea Simón, Raúl Cabrera (actualmente en el IATA-CSIC) (de izquierda a derecha en la foto principal), Anny Camelo, Arantxa López, Alba Boix, Mariam Ferrer y César Bernabé (fotos inferiores, de izquierda a derecha).

El Laboratorio para el Estudio del Microbioma Humano está dirigido por el Dr. Alex Mira Obrador, y se creó en el año 2009, al integrarse en el Área de Genómica y Salud de la Fundación FISABIO. La investigación del grupo

se centra en caracterizar la microbiota humana comensal y patógena desde una aproximación mixta de bioinformática y trabajo experimental en genómica y metagenómica. Se trata de un equipo multidisciplinar que incluye microbiólogos,

biólogos moleculares, dentistas, farmacéuticos y bioinformáticos. El Dr. Mira ha sido uno de los fundadores de la Red Nacional de Genómica Bacteriana. Su contribución científica a este campo le valió en el año 2009 el Premio Jaime Ferrán de la Sociedad Española de Microbiología. El grupo está integrado por tres estudiantes predoctorales (dos de ellos en su fase final de tesis), dos investigadores post-doctorales y una estudiante de Máster y cuenta cada año con 2-4 estudiantes en prácticas nacionales e internacionales. La formación que se ofrece en el grupo es una aproximación mixta de técnicas experimentales y computacionales. El Laboratorio tiene reuniones semanales de gestión y discusión de artículos científicos, y realiza un curso anual de análisis masivo de secuencias para estudiar biodiversidad.

MICROBIOMA Y DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES

Hemos utilizado técnicas de secuenciación masiva para identificar posibles microorganismos asociados al cáncer colorrectal. Las biopsias de tumores y pólipos mostraron una microbiota claramente distinta de aquella localizada en zonas sanas del colon (Mira-Pascual *et al*, 2014), lo cual es muy prometedor para utilizar la comunidad microbiana como biomarcadores del cáncer antes de la aparición de signos clínicos, lo cual ha sido patentado recientemente en colaboración con la empresa Entrechem SL.

En cuanto a la caries dental, hemos determinado que las bacterias presentes en la saliva no son buenos marcadores de esta patología. Sin embargo, hemos identificado una

serie de metabolitos que cuando se miden en este fluido, nos indican con gran precisión si la persona tiene caries. Este descubrimiento ha sido patentado como test de diagnóstico del riesgo de caries, y al indicar la causa del riesgo, permitirá dar un tratamiento preventivo personalizado a cada paciente.

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN TIEMPO REAL

El grupo ha desarrollado un nuevo modelo de biofilm *in vitro* donde se puede monitorizar el crecimiento de biopeelículas mono-específicas y complejas (como la placa dental) en tiempo real. Este modelo de biofilm está siendo utilizado para identificar moléculas inhibidoras del Quórum Sensing y para medir el crecimiento de las bacterias que causan infecciones en catéteres e implantes médicos en tiempo real, identificando no sólo las dosis inhibitorias necesarias sino también que algunos antibióticos de hecho *estiman* la producción de más biofilm. Todo ello supondrá un enorme ahorro económico en el sistema de salud, pues se podría ver la resistencia a antibióticos de las bacterias causantes de infecciones post-operatorias y decidir un tratamiento efectivo en la mitad de tiempo que en la actualidad.

NUEVAS ESTRATEGIAS CONTRA LAS ENFERMEDADES ORALES

Nuestro equipo ha obtenido el primer metagenoma a nivel mundial de la placa dental humana en voluntarios sanos y con distintos grados de afectación por caries (Belda-Ferre *et al*, 2012), lo que nos valió el Premio Biomedal 2012. Posteriormente hemos obtenido el primer metatranscriptoma de la placa dental humana (Benítez-Páez *et al*, 2013) y el primer metaproteoma. Estas investigaciones tratan de aplicar los conocimientos de la microbiota oral para combatir la caries dental, habiendo descubierto una nueva especie bacteriana de la cavidad oral, bautizada como *Streptococcus dentisani* (Camejo *et al*, 2013) que produce bacteriocinas que aniquilan a las bacterias causantes de la caries (Figura). Este trabajo ha dado lugar a una patente que protege el uso de esta bacteria como probiótico anticaries en todo el mundo. Además, hemos determinado la diversidad bacteriana en distintos micronichos de la boca, propuesto la etiología de la enfermedad en base al RNA (Simón-Soro *et al*, 2014) y desarrollado una nueva hipótesis sobre la formación y avance de la caries dental, basada en el metagenoma de las lesiones de caries (Simón-Soro *et al*, 2013).

LA LECHE CONTIENE MICROORGANISMOS

El grupo ha aplicado las técnicas de secuenciación masiva para descifrar la enorme diversidad de bacterias que contiene el calostro y la leche materna (Cabrera-Rubio *et al*, 2012), trabajo que puede tener una enorme trascendencia en el campo de la nutrición infantil. Hemos encontrado estas bacterias en muestras fecales del bebé, por lo que consideramos que la leche puede ser la solución que la evolución humana ha encontrado para una

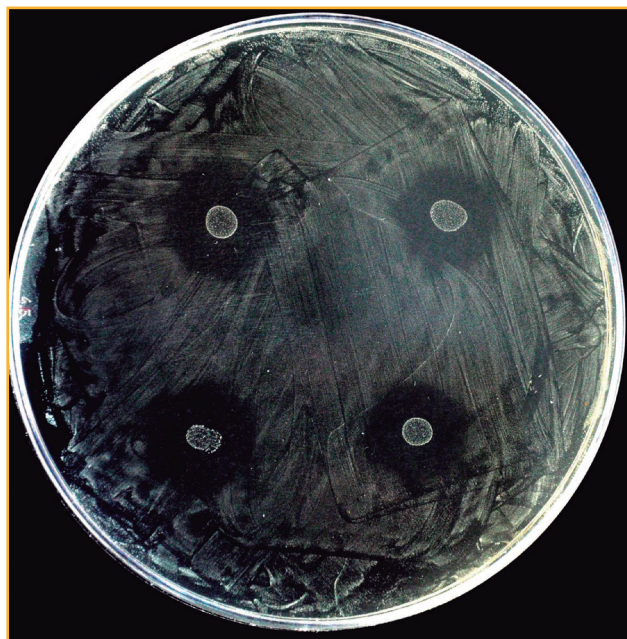


Figura Cultivo en tapiz de la bacteria causante de la caries *Streptococcus mutans*, que se ve inhibida por las bacteriocinas producidas por cuatro colonias de *Streptococcus dentisani*, actualmente desarrollado como probiótico anti-caries.

transmisión controlada de los microorganismos de una generación a la siguiente. La función de la microbiota de la leche materna está aún por determinar, y aunque no podemos descartar una función metabólica, trabajamos con la hipótesis de que estas bacterias sean fundamentales para el correcto desarrollo del sistema inmune del bebé, incidiendo en enfermedades como el asma o las alergias, que epidemiológicamente se encuentran en mayores proporciones en niños alimentados con leche de fórmula.

OTROS MICROBIOMAS

Las vías bajas respiratorias, tradicionalmente consideradas estériles, contienen una enorme diversidad de microorganismos, al menos en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, y esta población bacteriana varía dependiendo de los episodios de estabilidad o crisis del paciente (Galiana *et al*, 2014). También hemos determinado que el esputo, muestra de elección en la mayoría de estudios clínicos por ser no invasiva, no es en absoluto representativa de la diversidad microbiana en la mucosa pulmonar (Cabrera-Rubio 2012b). También hemos colaborado con el IPLA-CSIC y con el Hospital de Elche en estudios de la microbiota del estómago mediante pirosecuenciación, mostrando que éste goza de una enorme diversidad, sobre todo en ausencia de *Helicobacter pylori* (Delgado *et al*, 2013), bacteria en la que además estamos interesados por su posible implicación en enfermedades autoinmunes.

GENÓMICA BACTERIANA

El trabajo más tradicional del grupo estaba centrado en la genómica comparada y evolutiva microbiana y, aunque ya no es nuestra principal línea de investigación, seguimos realizando trabajos en este campo. Por ejemplo, en el concepto del pan-genoma bacteriano (Mira *et al*, 2010), en la identificación de islas de patogénesis mediante reclutamiento metagenómico (Belda-Ferre *et al*, 2011) o en un nuevo método para la caracterización de orígenes de replicación en procariotas. Mediante esta aproximación, basada en la secuenciación masiva, hemos identificado cuatro

orígenes de replicación en la arquea *Pyrobaculum* (Pelve *et al*, 2012).

BIBLIOGRAFÍA RECIENTE

- Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Moya A, Mira A. (2011). Mining virulence genes using metagenomics. *PLoS One* 6:e24975.
- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, Mira A. (2012). The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 6:46-56.
- Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Simón-Soro A, Mira A. (2014). Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics.* 15:311.
- Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. (2012a). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 96:544-551.
- Cabrera-Rubio R, García-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, Mira A. (2012b). Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 50:3562-3568.
- Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. (2014). *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64:60-65.
- Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. (2013). Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol.* 65:763-772.
- Galiana A, Aguirre E, Rodríguez JC, Mira A, Santibañez M, Candela I, Llaveró J, Garcinuño P, López F, Ruiz M, García-Pachón E, Royo G. (2014). Sputum microbiota in moderate versus severe patients with COPD. *Eur Respir J.* 43:1787-1790.
- Mira A, Martín-Cuadrado AB, D'Auria G, Rodríguez-Valera F. (2010). The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *Int Microbiol.* 13:45-57.
- Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, Moris F, Rodrigo L, Mira A, y Collado MC. (2014). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol.*
- Pelve EA, Lindås AC, Knöppel A, Mira A, Bernander R. (2012). Four chromosome replication origins in the archaeon *Pyrobaculum caldifontis*. *Mol Microbiol.* 85:986-995. (en prensa).
- Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. (2013). A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res.* 47:591-600.
- Simón-Soro A, Mira A. (2014). Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* (en imprenta)



Grupo de Genómica Funcional de Levaduras

José Enrique Pérez Ortín, Paula Alepuz, José García Martínez, Vicente Tordera, Vicente Arnau

ERI BIOTECMED (Estructura de Recerca Interdisciplinaria en Biotecnologia i Biomedicina).
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Ciències Biològiques
y Departament de Informàtica; Universitat de València. Burjassot, Valencia

jose.e.perez@uv.es



Foto de grupo. Algunos miembros del grupo GFL en 2013 de izquierda a derecha: arriba, Oreto Antúnez, Daniel Medina, Fany Carrasco, Daniele Salmone; segunda fila: Toni Jordán, José García Martínez, Tianlu Li, Alvaro Castells; sentados: José E. Pérez Ortín, Ana Miguel, Paula Alepuz, Lucas Morales.

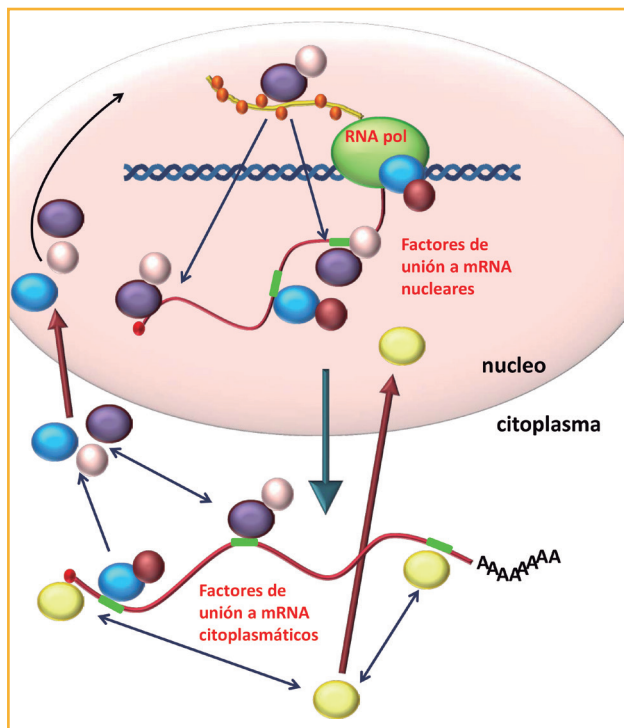
El grupo de Genómica Funcional de Levaduras (GFL, <http://www.uv.es/gfl/>), establecido inicialmente por el Dr. José E. Pérez Ortín en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València (UVEG), comenzó su investigación sobre la biología molecular de levaduras en 1992. A partir de 1995, el trabajo se orientó hacia la genómica de levaduras, participando en proyectos de secuenciación del genoma y de análisis funcional de *Saccharomyces cerevisiae*. En 2000 se incorporó el Dr. José García Martínez; en 2004, la Dra. Paula Alepuz y más recientemente los Drs. Vicente Tordera y Vicente Arnau. Actualmente, el grupo cuenta también con 3 doctorandos y 1 personal técnico de apoyo a la investigación.

Nuestro grupo ha elegido como organismo modelo para el estudio del control de la expresión génica a la levadura *S. cerevisiae*, el eucariota mejor conocido. La disponibilidad de técnicas y herramientas genéticas y genómicas hace de este organismo el más flexible para llevar a cabo experi-

mentos sobre las funciones de genes y proteínas para prácticamente todos los procesos fundamentales de las células eucariotas. En la actualidad, llevamos a cabo el estudio del control de la expresión génica en levaduras a través de tres líneas de investigación principales:

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS GENÓMICAS PARA EL ESTUDIO DEL RECAMBIO DE mRNAs

El control de la expresión génica es un proceso de múltiples niveles que afecta a todas las etapas de la transcripción: desde la iniciación a la estabilidad de los mRNAs. La complejidad de este fenómeno requiere, para ser comprendido, nuevas aproximaciones, incluyendo las de escala genómica. Este enfoque solo puede ser realizado en un organismo modelo que tenga las herramientas necesarias, tal como la levadura *S. cerevisiae*. En nuestro



Modelo de intercambio de factores de unión a mRNA durante las distintas etapas del proceso de expresión génica en eucariotas.

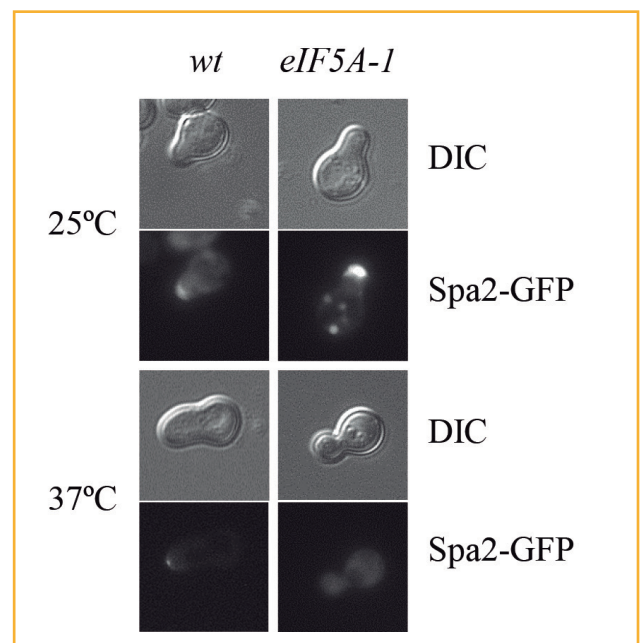
grupo desarrollamos herramientas genómicas en levadura para estudiar la transcripción *in vivo* y clarificar las redes funcionales que controlan los genes y la transcripción a escala global. El objetivo de esta línea de investigación es definir los mecanismos que regulan la expresión génica durante la elongación transcripcional y la relación entre los mecanismos de control de la transcripción y la degradación de mensajeros para el control homeostático de sus niveles. Estas herramientas de estudio las estamos adaptando también en la levadura patógena modelo *Candida albicans*.

MECANISMOS DE COORDINACIÓN ENTRE LA TRANSCRIPCIÓN Y LA ESTABILIDAD DE mRNAs EN LEVADURAS DURANTE LA RESPUESTA AL ESTRÉS

Las respuestas al estrés son complejas y abarcan muchos niveles. Uno de los más relevantes es el de la respuesta transcripcional. Con las herramientas genómicas desarrolladas en nuestro laboratorio abordamos la importancia relativa de la síntesis y la degradación de mRNAs en diferentes situaciones de estrés de importancia práctica en biomedicina o biotecnología: la respuesta al estrés osmótico, la respuesta de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* a la deficiencia de nitrógeno en los mostos o la respuesta de *C. albicans* al estrés oxidativo causado por el hospedador.

MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA A SEÑALES AMBIENTALES: REGULACIÓN DEL «SPLICING», LA ESTABILIDAD Y LA TRADUCCIÓN DE MENSAJEROS EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO EN LA LEVADURA *S. CEREVISIAE*

En los últimos años se ha demostrado que la regulación post-transcripcional ocurre en paralelo a la regulación de la transcripción en respuesta a muchas señales extracelulares y, en muchos casos, especialmente en mamíferos, los mecanismos post-transcripcionales son los que tienen un mayor peso en las respuestas adaptativas. Así, para la regulación de la cantidad de mRNA en la célula se recurre a la variación de la eficiencia de *splicing* del pre-mRNA y de la tasa de degradación de los mRNAs maduros, lo que sumado a la regulación de sus tasas de traducción permite modificar rápidamente los niveles de proteínas en la célula para generar una respuesta adecuada a cada estímulo. El objetivo de esta línea de investigación es descubrir los mecanismos implicados en la regulación postranscripcional de los mRNAs de *S. cerevisiae* en respuesta a estrés osmótico.



El factor de elongación eIF5A, conservado desde levaduras hasta humanos, es necesario para la formación de shmoo y el crecimiento polarizado en la respuesta a feromona de células de *S. cerevisiae*. En la foto se muestra cómo la localización en la punta del shmoo de una proteína del polarisoma, Spa2, fusionada a GFP, se pierde a temperatura restrictiva en un mutante termosensible de eIF5A.

A lo largo de estos años, hemos establecido colaboraciones con investigadores de grupos nacionales e internacionales tales como:

- Dr. Joaquín Moreno, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular (UVEG).
- Dr. Per Sunnerhagen y Dr. Jonas Warringer. (Göteborg University, Suecia).
- Dr. Gustav Ammerer (University of Vienna, Austria).
- Dr. Sebastián Chávez (Universidad de Sevilla).
- Dr. Francisco Navarro (Universidad de Jaén).
- Dr. Enrique Herrero (Universitat de Lleida).
- Dr. Jesús Pla (Universidad Complutense de Madrid).
- Dr. Joachim Ernst (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
- Dr. Joaquín Ariño (Universitat Autònoma de Barcelona).
- Dr. Mordechai Choder (Technion, Israel).
- Dra. Alexandra Mendes-Ferreira (U. Tras-os-Montes e Alto Douro, Portugal).

En los últimos cinco años hemos recibido financiación a través de cuatro proyectos del Plan Nacional de I+D+i, diez ayudas a la investigación de la Generalitat Valenciana y una subvención de la UVEG. El grupo GFL es miembro de ISIC/ERI BIOTECMED, *Instituto Superior de Investigación Cooperativa de la Generalitat Valenciana y Estructura de Investigación Interdisciplinar de la UVEG en Biotecnología y Biomedicina* (<http://www.uv.es/biotecmed>). También forma parte del *Microcluster Biotecnología y Biomedicina con Levaduras Modelo (BBLM)* compuesto por grupos de la UVEG, la Universitat Politècnica de Valencia, el CSIC y el Centro de Investigación Príncipe Felipe, dentro del Campus de Excelencia Internacional «VLC Campus» (<http://www.vlc-campus.com/>).

PUBLICACIONES SELECCIONADAS 2009-14

- Magraner-Pardo L, Pelechano V, Coloma MD, Tordera V.** (2014). Dynamic remodeling of histone modifications in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*.15:247.
- Li T, Belda-Palazón B, Ferrando A, Alepuz P.** (2014). Fertility and polarized cell growth depends on eIF5A for translation of polyproline-rich formins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 197:1191-1200.
- Miguel A, Montón F, Li T, Gómez-Herreros F, Chávez S, Alepuz P, Pérez-Ortín JE.** (2013). External conditions inversely change the RNA polymerase II elongation rate and density in yeast. *Biochim Biophys Acta* 11:1248-55.
- Gomar-Alba M, Alepuz P, del Olmo ML.** (2013). Dissection of the elements of osmotic stress response transcription factor Hot1 involved in the interaction with MAPK Hog1 and in the activation of transcription. *Biochim Biophys Acta*. 1829:1111-25.
- Pérez-Ortín JE, Alepuz P, Chávez S, Choder M.** (2013). Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *J Mol Biol*. 425:3750-3775.
- Pérez-Ortín JE, Medina DA, Chávez S, Moreno J.** (2013). What do you mean by transcription rate?: The conceptual difference between nascent transcription rate and mRNA synthesis rate is essential for the proper understanding of transcriptomic analyses. *Bioessays* 35:1056-1062.
- Haimovich G, Medina DA, Causse SZ, Garber M, Millán-Zambrano G, Barkai O, Chávez S, Pérez-Ortín JE, Darzacq X, Choder M.** (2013). Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell* 153:1000-1011.
- Garre E, Romero-Santacreu L, Barneo-Muñoz M, Miguel A, Pérez-Ortín JE, Alepuz P.** (2013). Nonsense-mediated mRNA decay controls the changes in yeast ribosomal protein pre-mRNAs levels upon osmotic stress. *PLoS ONE* DOI: 10.1371/journal.pone.0061240.
- Alic A, Pérez-Ortín JE, Moreno J y Arnau V.** (2013). mRNASTab—a web application for mRNA stability analysis. *Bioinformatics* 29:813-814.
- Pérez-Ortín JE, De Miguel-Jiménez y Chávez, S** (2012). Genome-wide studies of mRNA synthesis and degradation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 604-615.
- Castells-Roca L, García-Martínez J, Moreno J, Herrero E, Bellí G, Pérez-Ortín JE.** (2011). Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. *PLoS ONE* 6: e17272.
- García-López, MC, Pelechano V, Mirón-García MC, Garrido-Godino AI, Werner M, Pérez-Ortín JE, Navarro F.** (2011). The conserved foot domain of RNA Pol II associates with proteins involved in transcriptional initiation and/or early elongation. *Genetics* 189: 1235-1248.
- Garre E, Romero-Santacreu L, De Clercq N, Blasco-Angulo N, Sunnerhagen P, Alepuz P.** (2012). Yeast mRNA cap-binding protein Cbc1/Sto1 is necessary for the rapid reprogramming of translation after hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell*. 23:137-50.
- Pérez-Ortín JE., De Miguel-Jiménez, Chávez S.** (2012). Genome-wide studies of mRNA synthesis and degradation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 604-615.
- Rodríguez-Gil A, García-Martínez J, Pelechano V, Muñoz-Centeno M.C, Geli V, Pérez-Ortín JE, Chávez S.** (2010). The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors. *Nucleic Acids Res*. 38:4651-64.
- Pelechano V, Chávez S, Pérez-Ortín JE.** (2010). A complete set of nascent transcription rates for yeast genes. *PLoS ONE* 5: e15442.
- Romero-Santacreu L, Orozco H, Garre E, Alepuz P.** (2010). The bidirectional cytomegalovirus immediate/early promoter is regulated by Hog1 and the stress transcription factors Sko1 and Hot1 in yeast. *Mol. Gen. Genom*. 283: 510-518.
- Romero-Santacreu L, Moreno J, Pérez-Ortín JE, Alepuz P.** (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 15:1110-1120.
- Pelechano V, Jimeno-González S, Rodríguez-Gil A, García-Martínez J, Pérez-Ortín JE, Chávez S.** (2009). Regulon-specific control of transcription elongation across the yeast genome. *PLoS Genet*. 5(8):e1000614.

Expresión génica en bacterias de interés medioambiental: de la degradación de contaminantes a la biología de sistemas

E.M. Camacho, I. Canosa, R. de Dios, A. Flores, B. Floriano, I. García-Romero, Y.E. González-Flores, G. Martín, C. Medina, M. Rebollo, F. Reyes-Ramírez y E. Santero

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC, Junta de Andalucía, Universidad Pablo de Olavide. Sevilla

esansan@upo.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: De pie, Marina Rebollo, Yolanda E. González, Ruben de Dios Barranco, Francisca Reyes, Carlos Medina, Amando Flores, Inés Canosa y Eduardo Santero. Agachadas, Inmaculada García, Guadalupe Martín, Eva Camacho y Belén Floriano.

La utilización de bacterias para la degradación biológica de compuestos orgánicos es de gran interés debido a: (i) el incremento paulatino del problema de contaminación en el medio debido a la actividad industrial

y, (ii) la enorme versatilidad catabólica de las bacterias. Sin embargo, la biodegradación bacteriana suele estar limitada por la existencia de una fuerte regulación de la expresión de los genes de degradación, lo que hace que

las rutas estén inactivas en la mayor parte de las condiciones ambientales. Así, el reto para diseñar procesos de biodegradación eficientes es comprender el comportamiento celular de las bacterias y su adaptación a las condiciones ambientales en su conjunto, es decir, como un sistema. Para este tipo de estudios es necesario aplicar tecnologías que generan datos a gran escala (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) e integrar los mismos para entender globalmente los comportamientos bacterianos, poder predecirlos y poder modificarlos. Además, la caracterización del mecanismo molecular de regulación permite el diseño de sistemas de expresión heteróloga más eficientes y de aplicación en un mayor número de hospedadores.

ACTIVIDADES CIENTÍFICAS DEL GRUPO HASTA EL MOMENTO (DE DÓNDE VENIMOS)

Los principales temas de interés de nuestro grupo de investigación en este campo han sido:

1. **Caracterización bioquímica y genética completa de la ruta de degradación de tetralina en bacterias.** Esta caracterización se ha llevado a cabo en dos bacterias, *Sphingopyxis macrogoltabida* estirpe TFA (Gram negativa) (López-Sánchez et al, 2010) y *Rhodococcus* sp. estirpe TFB (Gram positiva) (Tomás-Gallardo et al, 2009). En TFB se han estudiado también la degradación de ftalato y naftaleno (Tomás-Gallardo et al, 2014).
2. **Elucidación de los mecanismos moleculares que regulan los genes de degradación de tetralina (*thn*).** Se ha demostrado la implicación de la tetralina como molécula inductora y las proteínas ThnR y ThnY en la regulación específica de los genes *thn* en TFA (López-Sánchez et al, 2009) y de un sistema de dos componentes (ThnSR) en TFB (Tomás-Gallardo et al, 2009, 2012). Además, en TFA se ha descrito un novedoso mecanismo por el que la ruta de degradación se comunica con el sistema regulador para impedir la expresión gratuita de los genes *thn* en presencia de moléculas similares a la tetralina pero que no son sustrato de la ruta (Ledesma et al, 2011, 2013). En cuanto a la regulación global, los genes de degradación de tetralina están sujetos a represión catabólica (mecanismo que jerarquiza el uso de fuentes de carbono). En TFA se ha estudiado la conexión de la acumulación de gránulos de reserva en el interior celular con la capacidad de expresión de estos genes en presencia de fuentes preferenciales de carbono (Martín-Cabello et al, 2011). En TFB se ha propuesto la implicación de un regulador de la familia CRP/Fnr en dicha regulación (Tomás-Gallardo et al, 2012).
3. Hemos estudiado también la **regulación global del metabolismo del nitrógeno en *Pseudomonas putida*** identificando a NtrC como el regulador global de la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno.

NtrC no solo actúa activando rutas de asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno, cuando este elemento se encuentra limitante en el medio, sino también es capaz de reprimir directamente la expresión de otros genes (Hervás et al, 2009, 2010). Además, se ha estudiado el sistema de dos componentes CbrAB que actúa de manera coordinada con NtrC pero que, además, controla aspectos muy importantes en la relación de la bacteria con el medio tales como la quimiotaxis y la resistencia a tóxicos (Amador et al, 2010). Además, CbrB controla la expresión de pequeños RNA reguladores (CrcZ y CrcY) implicados en represión catabólica (García-Mauriño et al, 2013). Mediante una aproximación metabolómica hemos descrito los cambios clave que revelan la adaptación metabólica de *P. putida* en condiciones de limitación de carbono (Valentini et al, 2014).

4. La utilización de los elementos que dirigen la expresión génica de genes de degradación se ha concretado en el exitoso **desarrollo de una colección de vectores de expresión inducibles por ácido acetilsalicílico** (aspirina) en bacterias patógenas intracelulares atenuadas (Medina et al, 2011) para su utilización como agentes terapéuticos (Mesa-Pereira et al, 2013, 2014). De esta manera, infectando a un hospedador con estas bacterias, podemos controlar la expresión de diferentes proteínas con cantidades terapéuticas de aspirina. Es la parte más aplicada de nuestra ciencia que ha dado lugar a dos patentes.
5. A su vez, hemos desarrollado un **sistema de expresión patentado** que permite expresar heterológicamente los genes de metagenotecas ubicados en fragmentos de gran tamaño, lo que solventa el principal problema del análisis metagenómico funcional. (Terrón-González et al, 2013, 2014).

ACTIVIDADES CIENTÍFICAS DEL GRUPO EN EL FUTURO (HACIA DÓNDE VAMOS)

En los dos últimos años de actividad, venimos aplicado las técnicas ómicas para entender los comportamientos de las bacterias de manera global. Pretendemos seguir avanzando en la caracterización funcional de *Sphingopyxis macrogoltabida* TFA, que incluye estudios transcriptómicos mediante dRNAseq en distintas condiciones, la reconstrucción de su metabolismo aerobio y anaerobio y la regulación por pequeños ARNs y la proteínas Hfq, así como por factores sigma de función extracitoplásmica. A su vez pretendemos completar la caracterización del regulon CbrAB de *Pseudomonas putida*

ADEMÁS, TRABAJAMOS CON EMPRESAS (I+D+I)

En los últimos años hemos desarrollado contratos de I+D+i con empresas como Biomedal, Canagrosa y Abengoa Research. Los trabajos de mayor aplicación han resultado en 3 patentes.

PUBLICACIONES ÚLTIMOS 5 AÑOS

- Amador CI, Canosa I, Govantes F, Santero E.** (2010). Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environ. Microbiol.* 12:1748-1761.
- Hervás AB, Canosa I, Little R, Dixon R, Santero E.** (2009). NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 191:6123-6135.
- Hervás AB, Canosa I, Santero E.** (2010). Regulation of glutamate dehydrogenase expression in *Pseudomonas putida* results from its direct repression by NtrC under nitrogen-limiting conditions. *Mol. Microbiol.* 78:305-319.
- Ledesma-García L, Rivas-Marín E, Floriano B, Bernhardt R, Ewen KM, Reyes-Ramírez F, Santero E.** (2011). ThnY is a ferredoxin reductase-like iron-sulfur flavoprotein that has evolved to function as a regulator of tetralin biodegradation genes expression. *J. Biol. Chem.* 286:1709-1718.
- Ledesma-García L, Reyes-Ramírez F, Santero E.** (2013). The ferredoxin ThnA3 negatively regulates tetralin biodegradation gene expression via ThnY, a ferredoxin reductase that functions as a regulator of the catabolic pathway. *PLoS One*, 8:e73910. doi: 10.1371/journal.pone.0073910.
- López-Sánchez A, Rivas-Marín E, Martínez-Pérez O, Floriano B, Santero E.** (2009). Co-ordinated regulation of two divergent promoters through higher-order complex formation by the LysR-type regulator ThnR. *Mol. Microbiol.* 73:1086-1100.
- López-Sánchez A, Floriano B, Andújar E, Hernández MJ, Santero E.** (2010). Tetralin-induced and ThnR regulated aldehyde dehydrogenase and beta-oxidation genes in *Sphingomonas macroglutabida* strain TFA. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:110-118.
- Martín-Cabello G, Moreno-Ruiz E, Morales V, Floriano B, Santero E.** (2011). Involvement of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in catabolite repression of tetralin biodegradation genes in *Sphingomonas macroglutabida* strain TFA. *Environ. Microbiol. Reports*. 3:627-631.
- Medina C, Camacho EM, Flores A, Mesa-Pereira B, Santero E.** (2011). Improved expression systems for regulated expression in *Salmonella* INFECTING EUKARYOTIC CELLS. *PLoS One*. 6:e23055.
- Mesa-Pereira B, Medina C, Camacho EM, Flores A, Santero E.** (2014). Improved cytotoxic effects of *Salmonella*-producing cytosine deaminase in tumour cells. *Microb. Biotechnol* DOI: 10.1111/1751-7915.12153.
- Mesa-Pereira B, Medina C, Camacho EM, Flores A, Santero E.** (2013). Novel tools to analyze the function of *Salmonella* effectors show that SvpB ectopic expression induces cell cycle arrest in tumor cells. *PLoS One*, 8:e78458. doi: 10.1371/journal.pone.0078458.
- García-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Amador CI, Canosa I, Santero E.** (2013). Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator in *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol.* 89:189-205.
- Terrón-González L, Medina C, Limón-Mortés MC, Santero E.** (2013). Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Sci. Reports*. 3:1107.
- Terrón-González L, Genilloud O, Santero E.** (2014). Potential and limitations of metagenomic functional analyses. Chapter 1. Pp. 1-43. *In: Metagenomics, Methods, Applications and Perspectives*. Benedetti, C. (Ed.). Nova Publishers, New York. ISBN: 978-63321-698-3 (eBook).
- Tomás L, Santero E, Floriano B.** (2009). Molecular and biochemical characterization of the tetralin degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Microb. Biotechnol.* 2:262-273
- Tomás-Gallardo L, Santero E, Floriano B.** (2012). Involvement of a putative cyclic amp receptor protein (CRP)-like binding sequence and a CRP-like protein in glucose-mediated catabolite repression of thn genes in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5460-2
- Tomás-Gallardo L, Gómez-Álvarez H, Santero E, Floriano B.** (2014). Combination of degradation pathways for naphthalene utilization in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Microb. Biotechnol.* 7:100-103
- Valentini M, García-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Santero E, Canosa I, Lapouge K.** (2014). Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B system in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology*. DOI: 10.1099/mic.0.078873-0.

COLILOQUIO by Víctor



Regulación génica en *Streptomyces*

Ramón Santamaría, Margarita Díaz, Hector Rodríguez, Sergio Antoraz y David Sanz

Instituto de Biología Funcional y Genómica. CSIC/USAL. Salamanca

santa@usal.es

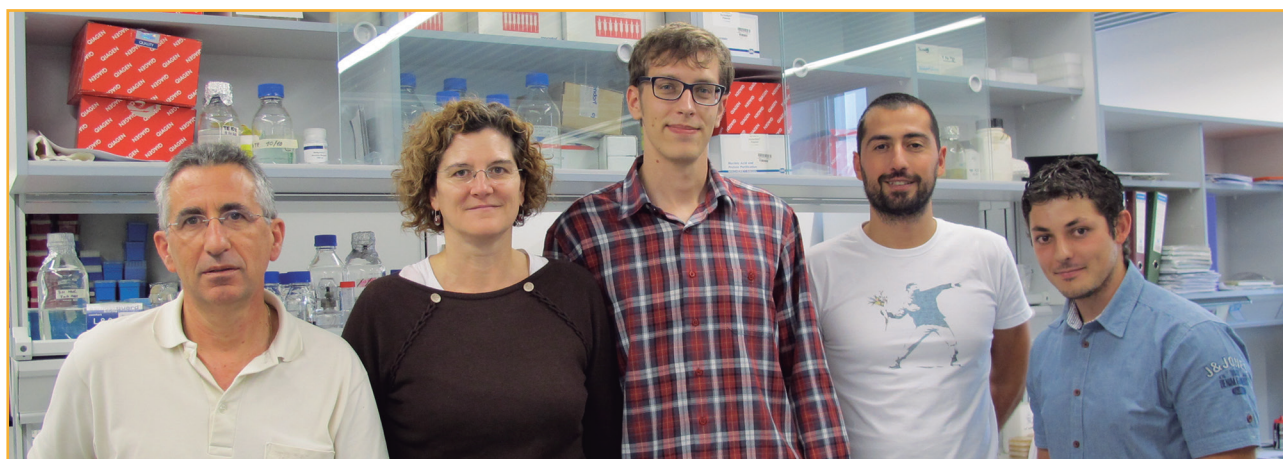


Foto de grupo. De izquierda a derecha: Ramón Santamaría, Margarita Díaz, Sergio Antoraz, Hector Rodríguez y David Sanz.

El grupo de investigación dirigido por los doctores Ramón Santamaría y Margarita Díaz ha centrado su investigación en diferentes aspectos de la biología de las bacterias del género *Streptomyces*. Tres son los aspectos principales que nos atraen de estos microorganismos: 1) producen una amplia variedad de antibióticos y antitumorales; 2) son habitantes normales del suelo donde interactúan con otros organismos y participan en la descomposición de materia orgánica; 3) producen grandes cantidades de enzimas hidrolíticas algunas de ellas con potencial industrial.

Hasta la fecha, el interés más importante de los microorganismos del género *Streptomyces*, con más de 500 especies descritas, es su capacidad para producir antibióticos y antitumorales (producen más del 50% de todos los antibióticos naturales disponibles). Ese potencial se ha visto incrementado tras secuenciar más de 150 especies y observar que todas ellas poseen múltiples *clusters* biosintéticos que, inactivos en las condiciones de laboratorio, están implicados en la síntesis de metabolitos secundarios desconocidos. El conseguir la producción e identificación de estos metabolitos crípticos y conseguir niveles de producción adecuados, incluso de los metabolitos ya conocidos,

es una tarea en la que están implicados multitud de grupos y empresas a nivel mundial utilizando aproximaciones muy variadas. La obtención de nuevos compuestos bioactivos que hagan frente a los problemas de resistencia a antibióticos es uno de los retos más importantes de este siglo.

Nosotros nos estamos enfrentando a este reto utilizando dos estrategias diferentes. Por un lado, nos hemos centrado en el estudio de regulación que ejercen diferentes sistemas de dos componentes sobre la producción de antibióticos con objeto de poder manipular esta regulación y potenciar rutas de producción de antibióticos conocidos y/o activar rutas silenciadas de producción. En este caso, utilizamos *S. coelicolor* como modelo, y ya hemos estudiado el efecto que ejercen seis sistemas de dos componentes sobre la producción de antibióticos mediante la mutación de los genes que los integran (Yepes *et al*, 2011). Actualmente estamos profundizando en el estudio de los tres que más efecto tienen, y hemos descrito que los sistemas que denominamos AbrA1/A2 y AbrB1/B2 ejercen un efecto negativo sobre la producción de antibióticos (Rico *et al*. 2014a, Sanz *et al*, resultados no publicados) mientras que el sistema AbrC1/C2/C3 (sistema atípico, compuesto por dos quinasas y un

regulador) ejerce un efecto positivo sobre la producción de antibióticos (Figura 1). El empleo de las cepas delecionadas en los sistemas negativos como cepas hospedadoras para la expresión heteróloga de distintas rutas de antitumorales nos ha permitido demostrar su utilidad al duplicar su producción respecto a la cepa parental (Rico et al. 2014a). Además, la sobreexpresión del regulador positivo AbrC3 en otras especies de *Streptomyces* induce la producción de metabolitos endógenos en las mismas y puede ayudarnos a descubrir nuevas moléculas bioactivas de interés para la medicina producidas por diferentes especies (Rico et al. 2014b y resultados no publicados).

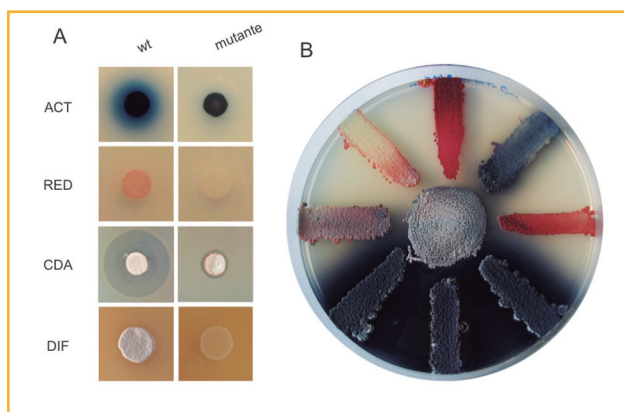


Figura 1. A. Efecto de la mutación de un regulador de respuesta sobre la producción de antibióticos de *Streptomyces coelicolor* y sobre su diferenciación (DIF). Actinorrodina (ACT), undecilprodigiosina (RED), antibiótico dependiente de calcio (CDA). **B.** Efecto de distintas mutaciones en *S. coelicolor* sobre la producción de antibióticos, la cepa silvestre es la central.

Por otro lado, nos hemos centrado en el efecto que ejerce la interacción de microorganismos del género *Streptomyces* con otros microorganismos del suelo sobre la producción de antibióticos conocidos y sobre la activación de rutas silenciadas. Nuestra hipótesis de trabajo, junto con la de otros grupos, es que muchas de las rutas de biosíntesis presentes en los genomas de los *Streptomyces* que están silenciadas en condiciones de laboratorio, podrían activarse en respuesta a la interacción con otros organismos mediante una señalización molecular entre ellos de un modo similar al que debe ocurrir en el hábitat natural. De hecho, el estudio que hemos iniciado muestra que la estimulación de la producción de algunos antibióticos ocurre realmente en co-cultivos de *Streptomyces* con otros microorganismos como *Myxococcus* (Figura 2) o *Bacillus* (Pérez et al. 2011). El identificar las moléculas inductoras de este efecto es de gran interés ya que permitirá su posterior empleo en los medios de producción para la inducción de estas rutas sin necesidad de recurrir a co-cultivos.

La tercera línea de trabajo del grupo se centra en la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas secreta-

das que estos microorganismos poseen y que les permiten degradar la materia orgánica de su nicho biológico principal, el suelo, y utilizar los nutrientes generados para su desarrollo. Esta capacidad secretora, entre otras características, hace de *Streptomyces* una alternativa muy importante como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas de interés.

Nuestro grupo tiene mucha experiencia en el estudio la producción de enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de materiales lignocelulósicos por estas bacterias. Uno de los frutos de ese trabajo ha sido la identificación de varios promotores fuertes regulados por la fuente de carbono presente en los medios de cultivo que han sido empleados en diferentes vectores para la sobreexpresión de diferentes proteínas de interés industrial en *Streptomyces* (Díaz et al. 2008, 2011, Aragón et al. 2013). Este estudio se ha complementado con el desarrollo de vectores de expresión para *Streptomyces* basados en una selección positiva al no requerir la adición de antibióticos para su mantenimiento. Para este fin hemos utilizado el sistema toxina-antitoxina YoeB/YefM de *S. lividans* que hemos descrito recientemente y que ha sido el primer sistema toxina-antitoxina descrito funcionalmente en *Streptomyces* (Sevillano et al. 2012). Durante el desarrollo de este sistema de expresión hemos generado una cepa en la que hemos delecionado todo el sistema YoeB/YefM del genoma y en la que hemos reinsertado el gen de la toxina en el genoma de una cepa que a su vez expresa la antitoxina y el gen que codifica la proteína de interés desde un plásmido. La pérdida de este plásmido provoca la desaparición de la antitoxina y como consecuencia la toxina se activa y la célula muere. El sistema que hemos ensayado con varias proteínas es muy efectivo y prometedor para el escalado a nivel industrial de los productos con el consiguiente ahorro en el proceso y eliminación de la contaminación por antibióticos (Sevillano et al. 2013).

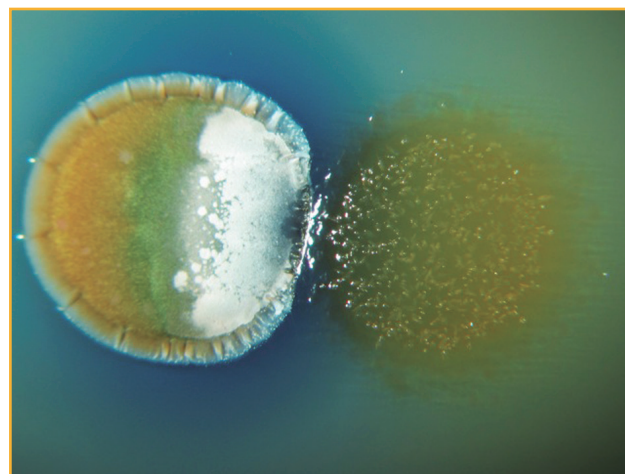


Figura 2. Interacción entre *Streptomyces coelicolor* (izda) y *Myxococcus xanthus* (dcha). En la zona de interacción se estimula la producción de actinorrodina (color azul).

REFERENCIAS

- Rico S, Yepes A, Rodríguez H, Santamaría J, Antoraz S, Krause E, Díaz M, Santamaría RI. (2014 a). Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production. PLoS One 9: e109844.
- Rico S, Santamaría RI, Yepes A, Rodríguez H, Laing E, Bucca G, Smith CP, Díaz M. (2014b). Deciphering the regulon of the *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. Appl. Environ. Microbiology 80:2417-2428.
- Rodríguez H, Rico S, Díaz M, Santamaría RI. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. Microbial Cell Factories 12:127.
- Sevillano L, Díaz M, Santamaría RI. (2013). Stable expression plasmids for *Streptomyces* based on a toxin-antitoxin system. Microbial Cell Factories 12:39.
- Díaz M, Sevillano L, Rico S, Lombo F, Braña AF, Salas JA, Méndez C, Santamaría RI. (2013). High level of antibiotic production in a double polyphosphate kinase and phosphate-binding protein mutant of *Streptomyces lividans*. FEMS letters 342:123-129.
- Sevillano L, Díaz M, Santamaría RI. (2012). Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. PLoS ONE 7: e32977.
- Yepes A, Rico S, Rodríguez A, Santamaría RI, Díaz M. (2011). Novel two-components systems involved in antibiotic regulation in *Streptomyces coelicolor*. PLoS ONE 6: e19980.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, Braña AF, Shinkets LJ, Sevillano L, Santamaría RI. (2011). *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. Microbial Biotechnology 4:175-183.
- Esteban A, Díaz M, Yepes A, Santamaría RI. (2008). Expression of the *pstS* gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator. BMC Microbiology 8:201 doi:10.1186/1471-2180-8-201.
- Díaz M, Ferreras E, Moreno R, Yepes A, Berenguer J, Santamaría RI, (2008). High-level overproduction of *Thermus* enzymes in *Streptomyces lividans*. Applied Microbiology and Biotechnology 79:1001-1008.

Pequeños RNAs reguladores de cianobacterias

Adaptación a estrés nutricional y diferenciación celular

Alicia M. Muro Pastor

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla)

alicia@ibvf.csic.es



Miembros actuales del grupo. De izquierda a derecha: Isidro Álvarez Escribano, Alberto Vázquez Naharro, Alicia M. Muro Pastor, Agustín Vioque Peña y Manuel Brenes Álvarez.

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos utilizado clásicamente como modelo para estudiar distintos aspectos del proceso fotosintético. Más recientemente son objeto de interés biotecnológico como factorías para la producción de distintos compuestos, incluyendo biocombustibles. Las cianobacterias fotosintéticas son microorganismos muy versátiles, con requerimientos nutricionales muy reducidos y una enorme capacidad de adaptación a entornos cambiantes. Basta mencionar que en la naturaleza la disponibilidad de su «nutriente» fundamental, la luz solar, está sometida a alternancia diaria de periodos de luz-oscuridad así como a cambios de intensidad que dependen de la hora del día o la época del año.

La adaptación de las cianobacterias a las situaciones de deficiencia de nitrógeno está orquestada globalmente por NtcA, un regulador transcripcional de la familia FNR/CRP. En ausencia de amonio esta respuesta implica en primera instancia una modificación metabólica encaminada al uso de fuentes de nitrógeno alternativas, incluyendo la reutilización de los aminoácidos de las proteínas que forman parte de los complejos antena fotosintéticos. Pero además, algunas cianobacterias filamentosas exhiben un proceso de transformación morfológica y funcional de algunas células vegetativas en heterocistos (literalmente, células diferentes), especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico (nitrógeno molecular, N_2).

Los heterocistos se diferencian a intervalos semi-regulares a lo largo de los filamentos y contienen un ambiente microaerobio apropiado para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa, que cataliza la fijación del nitrógeno atmosférico. Una vez se ha establecido la fijación de nitrógeno atmosférico, los filamentos se comportan como organismos pluricelulares en los que se establece una división de tareas entre las células vegetativas, en las que se lleva a cabo la fijación fotosintética de carbono, y los heterocistos, en los que se fija el nitrógeno. Células vegetativas y heterocistos son interdependientes, de manera que el

crecimiento de los filamentos depende de las relaciones de transporte que se establecen entre ambos tipos celulares (Figura 1) (Maldener y Muro-Pastor, 2010; Muro-Pastor y Hess, 2012). Se desconoce en gran medida cómo se produce la selección de determinadas células del filamento para su transformación en heterocistos.

Nuestro trabajo se centra en el estudio de los procesos de adaptación al estrés de carencia de nitrógeno (incluyendo la diferenciación de heterocistos), desde la perspectiva de la participación de pequeños RNAs reguladores (small RNAs, sRNAs). Este tipo de moléculas, que ejerce efectos regulatorios a nivel post-transcripcional, está implicado en prácticamente cualquier respuesta adaptativa estudiada en bacterias. En concreto, nos interesa identificar sRNAs que formen parte del regulón NtcA de respuesta a déficit de nitrógeno, así como sRNAs específicamente implicados en la diferenciación de heterocistos.

Con este objetivo hemos llevado a cabo un análisis global del transcriptoma de respuesta a la carencia de nitrógeno en la cianobacteria modelo *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC7120. Utilizando una metodología de RNASeq de extremos 5' primarios hemos podido definir todos los transcritos que se producen en *Anabaena* tanto en condiciones control como en las primeras horas de adaptación a la carencia de nitrógeno. Además, comparando los resultados obtenidos en la estirpe silvestre con los obtenidos en una estirpe mutante *hetR*, que no diferencia heterocistos, hemos podido definir dos categorías de transcritos cuya expresión responde a la disponibilidad de nitrógeno. Por un lado, aquellos transcritos cuya transcripción se induce en la estirpe silvestre pero no en la estirpe mutante *hetR* estarían en principio vinculados con el proceso de diferenciación. Por otro, aquellos transcritos regulados cuya expresión (inducción o represión) tiene lugar de forma similar tanto en la estirpe silvestre como en la estirpe mutante *hetR* formarían parte de una respuesta general a la carencia de nitrógeno (regulón NtcA), no específicamente vinculada con la diferenciación de heterocistos (Mitschke et al, 2011).

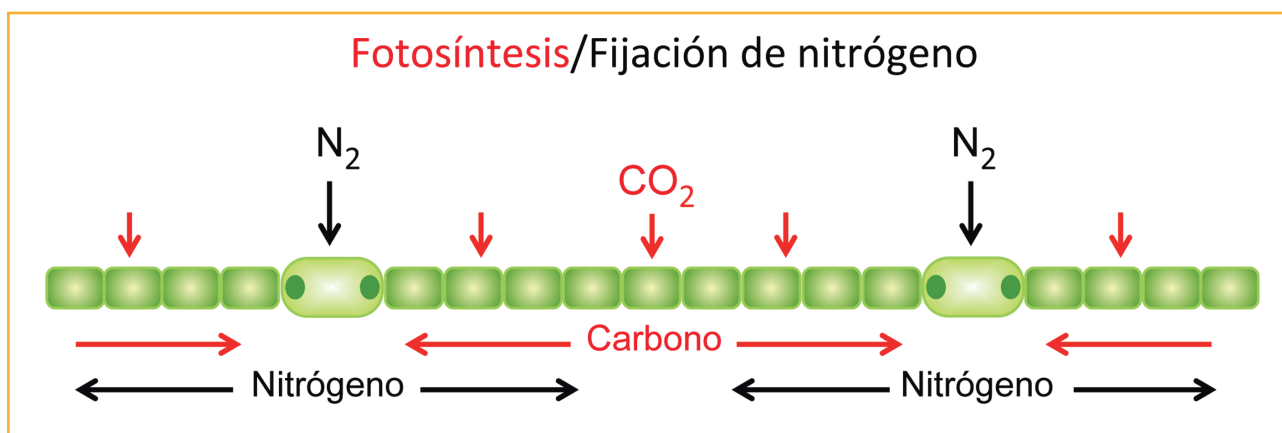


Figura 1. Relaciones funcionales entre heterocistos y células vegetativas. Los heterocistos proporcionan nitrógeno fijado al resto de las células del filamento cianobacteriano, en las que tiene lugar la fijación fotosintética de CO_2 . Ambos tipos celulares son interdependientes.

A partir del conjunto de datos de RNASeq hemos identificado una serie de pequeños RNAs cuya regulación en función de la disponibilidad de nitrógeno sugiere que pudieran estar implicados tanto en la respuesta general de adaptación a la carencia de nitrógeno como específicamente en la diferenciación de heterocistos. Hemos identificado, por ejemplo, sRNAs cuya expresión tiene lugar desde promotores que contienen secuencias para la unión del regulador transcripcional NtcA. Estos sRNAs formarían parte del regulón NtcA proporcionando una vía de regulación indirecta por parte de este regulador transcripcional.

Por otro lado, la diferenciación de heterocistos tiene lugar como consecuencia del establecimiento de un patrón transcripcional exclusivo de algunas células del filamento, de manera que la expresión de muchos de los genes cuyos productos se requieren para la transformación morfológica y metabólica de algunas células vegetativas en heterocistos tiene lugar sólo en estas células. Se desconoce en gran medida cuáles son los determinantes moleculares que conducen a la expresión de los promotores específicos de heterocisto. En este contexto, hemos identificado algunos sRNAs, como NsiR1 (Ionescu et al, 2010), que se expresan exclusivamente en células diferenciadas (Figura 2). El promotor del gen *nsiR1* contiene un motivo de secuencia que hemos demostrado aparece asociado a la expresión diferencial en heterocistos (Mitschke et al, 2011). La expresión de NsiR1 puede considerarse un marcador temprano de diferenciación, dado que permite identificar células que han iniciado el proceso mucho antes de que puedan detectarse otros signos morfológicos característicos, como el aumento de tamaño o la desaparición de pigmentos fotosintéticos (Muro-Pastor, 2014).

En todos los casos hemos seleccionado especies de sRNA cuya conservación filogenética en numerosos genomas cianobacterianos sugiere que se trata de sRNAs funcionales. Actualmente estamos analizando las posibles funciones de estos RNAs utilizando una combinación de estrategias que incluye el análisis global del transcriptoma de estirpes con niveles alterados de los mismos y la predicción computacional de dianas utilizando un algoritmo que implementa criterios de conservación filogenética de las posibles interacciones entre los sRNAs y sus dianas.

Nuestro trabajo se lleva a cabo en colaboración con el laboratorio dirigido por Wolfgang R. Hess (Genetics and Experimental Bioinformatics, University Freiburg) y está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2010-14821), el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2013-48282-C2-1-P) y la Junta de Andalucía (BIO-215).

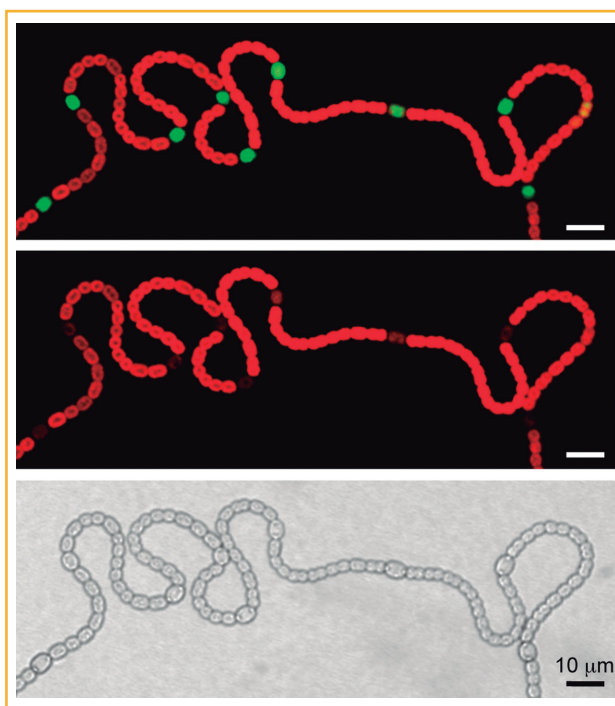


Figura 2. La diferenciación de heterocistos implica patrones transcripcionales exclusivos de este tipo celular. La imagen de microscopía confocal de fluorescencia (arriba) muestra la expresión, específica en heterocistos, de la proteína testigo GFP desde el promotor del gen *nsiR1*. NsiR1 es un pequeño RNA que puede considerarse un marcador muy temprano de diferenciación. La imagen de fluorescencia roja (centro) y la imagen de luz blanca (abajo) ilustran otros aspectos como la disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos o el aumento de tamaño característicos de los heterocistos maduros.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Maldener I, Muro-Pastor AM.** (2010). Cyanobacterial heterocysts. En Encyclopedia of Life Sciences (ELS) (John Wiley & Sons, Ltd).
- Ionescu D, Voss B, Oren A, Hess WR, Muro-Pastor AM.** (2010). Heterocyst-specific transcription of NsiR1, a non-coding RNA encoded in a tandem array of direct repeats in cyanobacteria. *J Mol Biol* 398:177-188.
- Mitschke J, Vioque A, Haas F, Hess WR, Muro-Pastor AM.** (2011). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20130-20135.
- Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol* 20:548-557.
- Muro-Pastor AM.** (2014). The heterocyst-specific NsiR1 small RNA is an early marker of cell differentiation in cyanobacterial filaments. *mBio* 5:e01079-01014.

Desarrollo de un formato estabilizado de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular

A.A. Benito, J.L. Arnal, B. García, J.D. Serrano, L. Pradas, F. Beiloune, G. Chacón y R. Baselga

EXOPOL S. L. Pol. Rio Gállego, D/8, San Mateo de Gállego. Zaragoza

www.exopol.com

abenito@exopol.com



Equipo EXOPOL.

EXOPOL S.L., es una spinoff de la Universidad de Zaragoza con más de 20 años de experiencia en diagnóstico y producción de autovacunas en sanidad animal; áreas a las que dedica más del 50% de su esfuerzo en I+D+i y en las que mantiene colaboraciones con más de 25 grupos de investigación a nivel nacional e internacional.

A lo largo de su trayectoria, la empresa ha obtenido financiación para llevar a cabo diversos proyectos de investigación (CDTI) destinados principalmente a mejorar el diagnóstico actual y la producción de vacunas en el ámbito veterinario.

La gran experiencia de EXOPOL en estas áreas, incluido el diagnóstico molecular mediante PCR en tiempo real (qPCR), ha permitido que la empresa lleve a cabo el diseño y la validación de sus propios ensayos, a los que ha designado como «**EXOone qPCR**» y que cuentan con importantes ventajas comparado a la mayoría de kits comerciales de este tipo disponibles en el mercado. El ensayo **EXOone**

qPCR, hace uso de una nueva tecnología para estabilizar todos los reactivos necesarios de la reacción en los pocillos de una placa o tiras de qPCR, lo que ha permitido obtener un producto «ready to use», con almacenamiento a 4°C, además de otras ventajas.

Actualmente, la empresa continúa diseñando nuevos productos y buscando colaboraciones con grupos de investigación interesados en aplicar esta tecnología en otras áreas del diagnóstico molecular como son salud humana, agro-alimentaria o medio ambiente entre otras.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE EXOone qPCR KIT

La identificación molecular de agentes infecciosos ha incrementado considerablemente debido a la mejor sensibilidad y especificidad de estas técnicas en comparación

con los métodos tradicionales de detección. Sin embargo, aunque numerosas qPCR son utilizadas para este fin, tanto comerciales como de desarrollo propio, la mayoría tiene escasa o nula validación para su utilización como adecuadas herramientas de diagnóstico.

Con la finalidad de cumplir los estándares internacionales de acreditación de laboratorios clínicos, varios países han empezado a implementar normativas para regular el diseño y la validación de las técnicas moleculares como herramientas de diagnóstico, tal como lo han descrito recientemente Burd et al (2010) y Saunders et al (2013). En EXOPOL hemos seguido estos criterios con la finalidad de brindar un producto de calidad y que sea a la vez rápido y sencillo de utilizar.

Los resultados de la validación de ensayos **EXOone qPCR** para la identificación de patógenos relevantes en nuestro sector como son: *Coxiella burnetii* (Villa et al, 2012a), *Leptospira* patógena (Villa et al, 2012b), *Toxoplasma gondii* (Benito et al, 2012), *Mycoplasma agalactiae* (Villa et al 2011), *Mycoplasma bovis* (Villa et al, 2013), etc; han sido presentados en varios congresos nacionales e internacionales de gran relevancia como son el WAVLD, EAVLD, AVEDILA, SEM, entre otros. Adicionalmente, se ha realizado desarrollo de otros ensayos de qPCR para la identificación de patógenos bacterianos, parasitarios o virales de interés veterinario, cuyos resultados se encuentran actualmente en proceso de publicación (para una lista detallada visite: www.exopol.com).

La validación de los ensayos **EXOone qPCR** incluyen la determinación de:

- **Sensibilidad analítica:** El rango reportable de cuantificación fue calculado utilizando controles positivos sintéticos previamente diseñados y validados (Villa et al, 2012c) para cada ensayo, los cuales han permitido determinar unos límites mínimos (LLOQ) y máximos de cuantificación (ULOQ) de entre 10^1 hasta 10^9 copias del patógeno/reacción, con una buena linealidad (Figura 1).
- **Estudios de intra e inter-ensayo para determinar la Precisión:** Encontrándose en estos ensayos, coeficientes de variación (CV) de entre un 0,5% a un 12%, con los mayores niveles de variación en las muestras con concentraciones más bajas (10^1 copias/reacción). Estos resultados demuestran una excelente repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos **EXOone qPCR** (Figura 2).
- **Estudios de concordancia:** Mediante la evaluación de un panel de cepas de referencia, cepas vacunales, cepas de campo y casos clínicos positivos y negativos a cada patógeno; los cuales son evaluados en paralelo con los ensayos comerciales de qPCR más importantes en el mercado (LSI, Adiagen, Ingenuity, etc) para determinar el nivel de concordancia. Los ensayos **EXOone qPCR** han demostrado tener una excelente concordancia (Kappa 0,87 a 1,0) con los kits de qPCR ofrecidos por las empresas relevantes en nuestro sector.
- **Estudios de especificidad:** En un estudio que incluye la evaluación de un panel de entre 25 a 45 microor-

ganismos (bacterias, virus y parásitos) relacionados genéticamente, que causan enfermedades relacionadas o co-infecciones, o que pueden encontrarse como microbiota natural en las muestras seleccionadas.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS EXOone qPCR

La nueva tecnología empleada en los ensayos **EXOone qPCR**, al estabilizar todos los reactivos necesarios en poc-

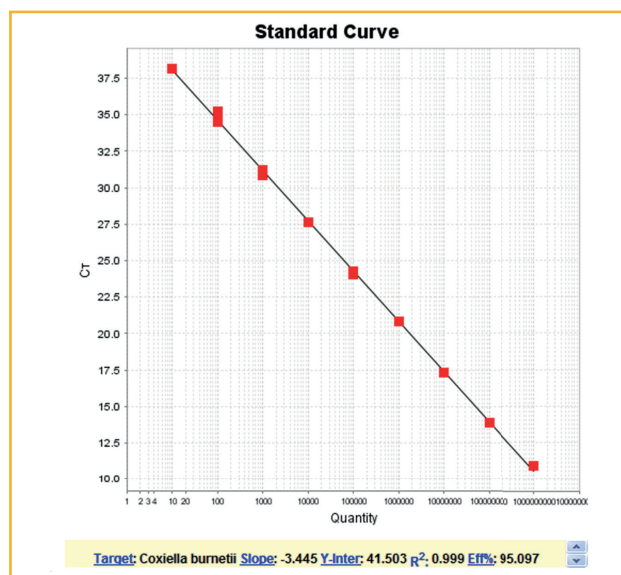


Figura 1. Rango reportable de cuantificación para el ensayo *Coxiella burnetii* EXOone qPCR. El LLOQ determinado fue de 10^1 copias/reacción.

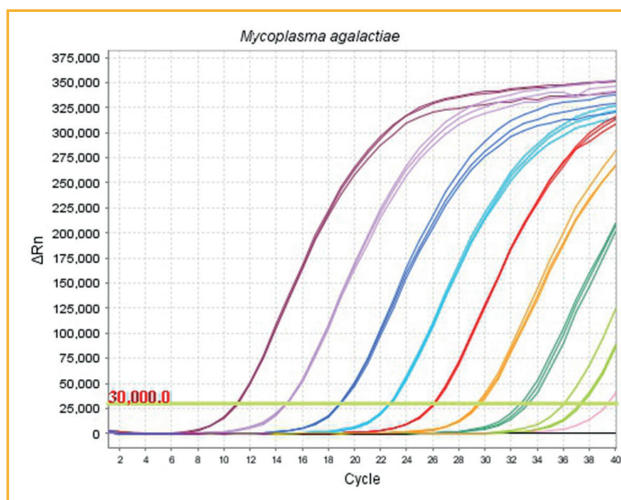


Figura 2. Estudio de intra-ensayo para el *Mycoplasma agalactiae* EXOone qPCR. Cada dilución del standard (CP) fue evaluada por triplicado.

llos, permite una preparación más rápida de la qPCR; puesto que sólo necesita la adición de agua DEPC (suministrada con el kit) y la muestra de ácidos nucleicos, antes de llevar la reacción al termociclador. Esto hace que la labor del técnico sea mucho más sencilla y evita además los posibles errores de pipeteo durante la preparación del ensayo, con la consecuente mejora en la repetibilidad y reproducibilidad del mismo.

El estabilizado permite también almacenar estos kits de qPCR a temperaturas de refrigeración (+4°C a +8°C) sin la necesidad de congelarlos; lo que supone una gran ventaja práctica puesto que facilita el transporte y evita el tedioso proceso de descongelación de los diferentes reactivos necesarios para preparar una mezcla en un ensayo de qPCR habitual.

Otra característica importante de los ensayos **EXOone qPCR** es que todos han sido diseñados para utilizar el mismo protocolo térmico; lo que permite la posibilidad de evaluar en una misma carrera de amplificación varios patógenos, reduciendo costes y recursos. Esta ventaja de nuestros ensayos permite diseñar paneles específicos de diagnóstico al gusto del cliente, tal como el que se aprecia a continuación (Figura 3).

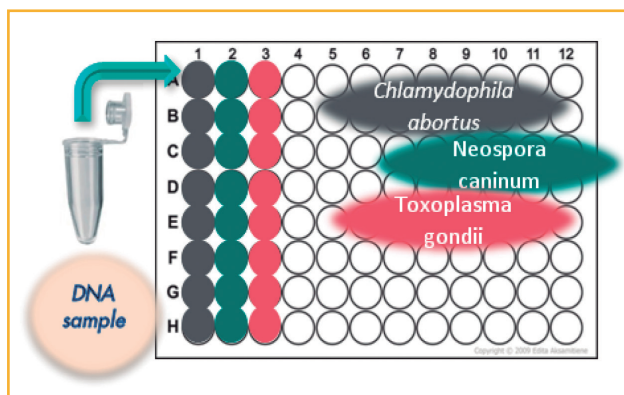


Figura 3. Panel reproductivo para la evaluación simultánea (multiparamétrica) de *Chlamydomophila abortus*, *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*.

La detección de resultados falsos negativos es de gran importancia en cualquier técnica de diagnóstico. Por este motivo, los ensayos **EXOone qPCR**, llevan incluidos para cada reacción un control endógeno (detectado mediante el canal HEX/VIC), el cual ha sido diseñado y validado para la identi-

ficación de un gen constitucional (β -actina) en los diferentes tipos de muestras de las especies animales de mayor relevancia en el diagnóstico veterinario (Benito et al., 2013). La amplificación del control endógeno está ajustada para no interferir con la amplificación específica del patógeno a evaluar. El uso de estos controles endógenos permite verificar el proceso de extracción y la ausencia de posibles inhibidores en la reacción de amplificación. Tal como se viene haciendo en el diagnóstico rutinario realizado en nuestro laboratorio.

Por otro lado, el uso de un control positivo sintético, específico para cada uno de nuestros ensayos, y el cual se suministra en una concentración determinada, permite el uso de estos ensayos para la cuantificación absoluta o relativa del patógeno a evaluar.

En resumen, el ensayo estabilizado **EXOone qPCR**, debido a su formato «ready to use» y su cuidada validación, son una excelente herramienta diagnóstica para la identificación o cuantificación de patógenos de interés veterinario, destacando no sólo por su sensibilidad y especificidad sino también por su facilidad de uso.

BIBLIOGRÁFICA

- Benito AA, Arnal JL, de Tomas E, et al. (2013). Internal controls for reliable results in real-time pcr diagnostic assays. WAVLD, Berlín.
- Benito AA, Villa A, Serrano JD, et al. (2012). Desarrollo de una PCR en Tiempo Real para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*. SEM IX reunión grupo Microbiología Molecular. Mallorca.
- Burd Eileen M. (2010). Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews. 550-576
- Saunders N, Zambon M, Sharop I, et al. (2013). Guidance on the development and validation of diagnostic tests that depend on nucleic acid amplification and detection. Journal of Clinical Virology 56:260-270.
- Villa A, Arnal JL, Serrano DJ, et al. (2012). Development and validation of a Real-Time PCR Zen Gel Mix for the diagnosis and quantification of *Coxiella burnetii*. EAVLD, Polonia.
- Villa A, Benito AA, Bernal JL et al. (2012). Leptospirosis: Diagnóstico mediante PCR en tiempo real y aislamiento microbiológico. AVEDILA, Badajoz.
- Villa A, De Tomás E, Benito AA, Arnal JL, Serrano JD. (2012). Evaluation of cloned genes as quantitative controls in Real-Time assays for infectious diseases with veterinary importance. SEBBM, Sevilla.
- Villa A, Fernández A, JL Arnal, et al. (2011). Desarrollo y validación de una ZEN Real Time PCR Gel Mix para la detección y cuantificación del gen (mp81) de *Mycoplasma agalactiae*. AVEDILA, Tenerife.
- Villa A, Serrano JD, Benito AA, et al. (2013). Targeting *uvrC* gene for *Mycoplasma bovis* Gel Mix Real Time PCR. WAVLD, Berlín.

Unidad de resistencia a antibióticos

Bruno González-Zorn

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y VISAVET,
Universidad Complutense de Madrid

bgzorn@ucm.es

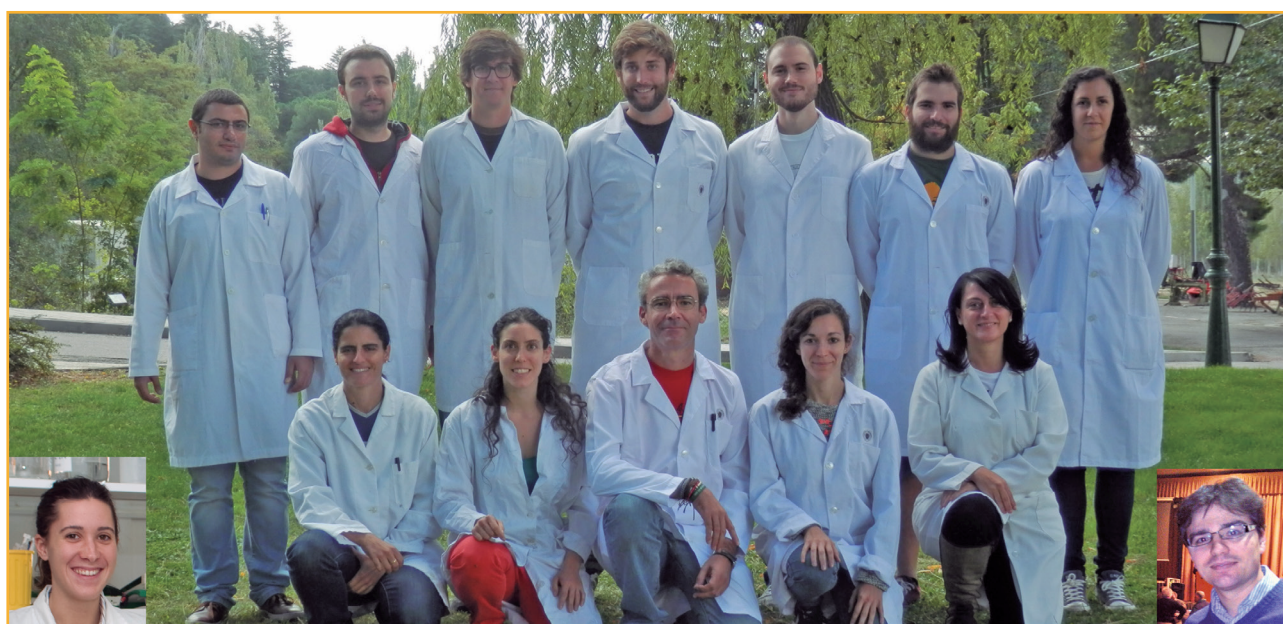


Foto de grupo. Arriba: Elias Dahdouh, Daniel Thomas-López, Gabriel Moyano, Andreas Hoefer, José F. Delgado, Alfonso Santos-López, Cristina Bernabé-Balas. Abajo: Natalia Montero, Laura Carrilero, Bruno González-Zorn, Belén Gutiérrez, Mónica Suárez. Cuadrantes: Cristina Martínez-Ovejero y Rafael Ortega-Huedo.

La resistencia a antibióticos representa actualmente una de las mayores amenazas del siglo **xxi**. Su avance conlleva, no solamente un elevado coste sanitario, sino que supone un coste en vidas humanas que se estima en más de 30.000 muertes anuales en la Unión Europea.

La resistencia a antibióticos, sin embargo, es un fenómeno natural originado por el hecho de que los antibióticos son producidos por microorganismos en el medio ambiente desde hace miles de años, y los mecanismos de resistencia a los mismos vienen existiendo en la naturaleza de forma análoga. Desde que utilizamos los antibióticos clínicamente, entre la Primera y la Segunda Guerra Mundial, estamos seleccionando esos mecanismos allí donde los utilizamos: en granjas, en hospitales y en el medio ambiente, donde acaban mediante su utilización en acuicultura o por las

propias aguas residuales. Aunque la identificación y descripción epidemiológica de los mecanismos de resistencia es interesante y lleva realizándose desde hace varias décadas, nosotros entendemos que la resistencia a antibióticos es un fenómeno ecológico cuyo fundamento abordamos en nuestro grupo (Gonzalez-Zorn y Escudero, 2013). Nuestro objetivo es intentar comprender a nivel básico cuál es el flujo de mecanismos de resistencia a antibióticos en nuestro ecosistema Tierra, utilizando distintas aproximaciones reduccionistas.

Cuando comenzamos nuestra andadura, identificamos un mecanismo de resistencia desconocido hasta ese momento en *Escherichia coli*. Se trataba de *armA* (aminoglycoside resistance methyltransferase), una metiltransferasa del ARN 16S que anula la utilidad de todos los aminoglucósidos en

la práctica clínica (Gonzalez-Zorn *et al*, 2005a). Secuenciando la plataforma genética del mismo advertimos cómo este elemento es capaz de ser transferido por conjugación entre enterobacterias y por transposición entre plásmidos de distinta naturaleza (Gonzalez-Zorn *et al*, 2005b). De de el primer momento decidimos centrar parte de nuestra actividad en este mecanismo, que proviene originalmente de *Streptomyces* ambientales productores de aminoglucósidos, los cuales se protegen de su suicidio por la acción de aminoglucósidos que ellos mismos producen precisamente metilando su ribosoma con una metiltransferasa del ARN16S. En colaboración con compañeros de distintos países hemos identificado que este mecanismo se encuentra en patógenos aislados de alimentos (Granier *et al*, 2011), en animales de producción y de compañía (Hidalgo *et al*, 2013) y en hospitales (Hidalgo *et al*, 2012), lo que nos ha permitido conocer las bases de su diseminación a nivel mundial. En paralelo, hemos estudiado cuáles son las consecuencias para una bacteria de metilar un residuo en su ARN16S, habida cuenta de que las bacterias ya metilan un gran número de residuos en su ribosoma para optimizar su funcionamiento. Mediante espectrometría de masas y técnicas bioquímicas complementarias hemos identificado que esta familia de metiltransferasas metila el residuo m⁷ del nucleótido G1405 del ARN16S (Gutiérrez *et al*, 2012). Este hecho modifica el patrón de metilaciones del ribosoma, reprogramándolo en un nuevo estado de metilación cuyas consecuencias estamos estudiando. Hemos observado cómo el *fitness cost* de estas metiltransferasas es nulo cuando se integran en el cromosoma (Gutiérrez *et al*, 2013), lo que probablemente sea clave para su diseminación actual en *Salmonella* (Hopkins *et al*, 2010).

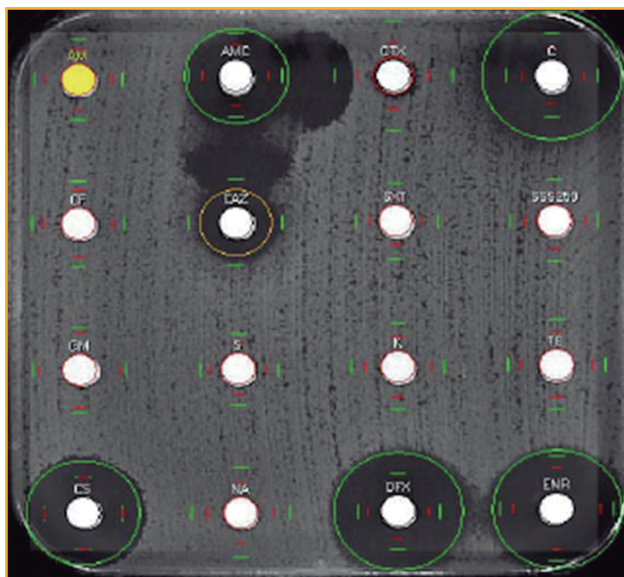
En esta línea, hemos descubierto una nueva metiltransferasa de esta familia, RmtF, ampliamente distribuida en el

Reino Unido y la India (Hidalgo *et al*, 2013), que también metila el residuo m⁷G1405 del ARNr 16S. Hemos secuenciado más de 50 plásmidos conjugativos con esta metiltransferasa procedentes de un mismo Hospital en Lucknow (India) para establecer las bases ecológicas y evolutivas que han determinado su aparición y diseminación entre enterobacterias hospitalarias (Rahman *et al*, 2014 y datos no publicados).

El estudio de las metiltransferasas y su existencia en bacterias ambientales nos llevó a interesarnos por la captación genética y su transmisión (Gutiérrez *et al*, 2009). En colaboración con otros grupos, dimos con la implicación del mecanismo SOS en la captación de cassettes de resistencia en los integrones bacterianos (Cambray *et al*, 2009, Guerin *et al*, 2010). Desde entonces seguimos trabajando en el sistema SOS como mecanismo de regulación de la resistencia a antibióticos y su diseminación.

La tercera línea de trabajo de nuestro laboratorio se basa en el descubrimiento reciente, de que los plásmidos pequeños tienen una relevancia mucho mayor de lo que se pensaba hasta el momento. Los primeros hallazgos se basaron en la identificación de un plásmido pequeño, pB1000, que confería resistencia a beta-lactámicos en *Haemophilus parasuis* (San Millán *et al*, 2007). Poco después determinamos que pB1000 era responsable de esta resistencia también en el patógeno humano *Haemophilus influenzae* (San Millán *et al*, 2010), y que el mismo se combina con mutaciones cromosómicas para conferir resistencia a un amplio rango de beta-lactámicos incluyendo cefalosporinas de 3ª generación (San Millán *et al*, 2010). Posteriormente, identificamos que otros plásmidos pequeños también pueden conferir resistencia a beta-lactámicos en *H. influenzae* (Søndergaard *et al*, 2012). De hecho, en *Pasteurella multocida*, la multiresistencia a antibióticos se determina por la acumulación de plásmidos pequeños, en los que cada uno porta uno, máximo dos genes de resistencia a antibióticos, definiendo una nueva forma de multiresistencia a antibióticos en bacterias (San Millán *et al*, 2009). Cuáles son los motivos por los que para la bacteria es conveniente poseer este nuevo mecanismo de multiresistencia basado en plásmidos pequeños es lo que estamos intentando desentrañar. Hemos visto, además, que prácticamente todos los aislados clínicos de enterobacterias poseen, al menos, un plásmido ColE1. Por lo tanto, estos plásmidos pequeños ubicuos parecen tener un papel biológico relevante, en cuya investigación nos estamos centrando. Una de las aproximaciones de Biología Sintética que estamos llevando a cabo se basa en evolucionar *in vitro* plásmidos de la familia *Pasteurellaceae* en *E. coli*, utilizando esta última bacteria como fábrica de nuevos replicones para su utilización biotecnológica. Esto permitiría ampliar el rango de plásmidos utilizables en diversos procesos, y nos permite a su vez conocer los fundamentos biológicos de la coexistencia y adaptación de plásmidos en bacterias.

Desde que iniciamos el Grupo hemos trabajado en programas de cooperación internacional colaborando con la University for Development Studies en la Región Norte de Ghana. Hemos construido allí un laboratorio de Seguridad Alimentaria que está en funcionamiento actualmente y formado en nuestro laboratorio durante cuatro años a una persona que está



Antibiograma. Una *Escherichia coli* DH5α multiresistente tras la adquisición de un plásmido por conjugación.

actualmente a cargo del mismo (Saba *et al*, 2012 y 2013). Con la ayuda de la OMS y de la International Foundation for Science estamos ahora equipando el laboratorio microbiológico del hospital, para permitir diagnosticar y tratar adecuadamente las principales infecciones bacterianas. Además, impartimos cursos a sus alumnos y personal de Microbiología y Biotecnología. Actualmente colaboramos también con la Facultad de Medicina de la Universidad de Balamand, Líbano.

Lo más importante a lo largo de estos años no han sido nuestros hallazgos ni proyectos o publicaciones. Lo más importante ha sido la confianza que tantos grupos nacionales e internacionales han depositado en nosotros para colaborar, para enviarnos a sus investigadores y para aceptarnos en los suyos. Especialmente, gracias a los primeros que confiaron en un grupo recién creado para realizar sus Tesis o Postdoc: JA Escudero, A San Millán, L Hidalgo, S Matrat y CKS Saba.

REFERENCIAS

- Cambray G, Sánchez-Alberola N, Campoy S, Guerin E, Da Re S, González-Zorn B, Ploy MC, Barbé J, Mazel D, Erill I. (2011). Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob DNA*. 30;2(1):6.
- Escudero JA, San Millán A, Catalán A, G de la Campa A, Rivero E, López G, Domínguez L, Moreno MA, González-Zorn B. (2007). First characterization of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:777-782.
- Escudero JA, San Millán A, Gutiérrez B, Hidalgo L, La Ragione RM, Abuoun M, Galimand M, Ferrándiz MJ, Domínguez L, de la Campa AG, González-Zorn B. (2011). Fluoroquinolone efflux in *Streptococcus suis* is mediated by SatAB and not by SmrA. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5850-5860.
- Escudero JA, San Millán A, Montero N, Gutiérrez B, Ovejero CM, Carrilero L, González-Zorn B. (2013). SatR is a repressor of fluoroquinolone efflux pump SatAB. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 3430-3433.
- González-Zorn B, Escudero JA. (2013). Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int Microbiol* 15:101-109.
- González-Zorn B, Teshager T, Casas M, Porrero MC, Moreno MA, Courvalin P, Domínguez L. (2005a). *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 11:954-956.
- González-Zorn B, Teshager T, Porrero MC, Moreno MA, Domínguez L. (2005b). Genetic basis for the dissemination of *armA*. *J Antimicrob Chemother* 56:583-585.
- Granier SA, Hidalgo L, San Millán A, Escudero JA, Gutiérrez B, Brisabois A, González-Zorn B. (2011). *ArmA* methyltransferase in monophasic *Salmonella enterica* isolated from food. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5262-5266.
- Guerin E, Cambray G, Sánchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, da Re S, González-Zorn B, Barbé J, Ploy MC, Mazel D. The SOS response controls integron recombination. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1034.
- Gutiérrez B, Douthwaite S, González-Zorn B. (2013). Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs. *RNA Biol* 10:1324-1332.
- Gutiérrez B, Escudero JA, San Millán A, Hidalgo L, Carrilero L, Ovejero CM, Santos-López A, Thomas-López D, González-Zorn B. (2012). Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance methyltransferases with the RsmF housekeeping methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2335-2341.
- Gutiérrez B, Herrera-León S, Escudero JA, Hidalgo L, González-Sanz R, Arroyo M, San Millán A, Echeita MA, González-Zorn B. (2009). Novel genetic environment of *qnrB2* associated with TEM-1 and SHAV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in *Salmonella* Bredeney BB1047 from Spain. *J Antimicrob Chemother* 64:1334-1336.
- Hidalgo L, Gutiérrez B, Ovejero CM, Carrilero L, Matrat S, Saba CK, Santos-López A, Thomas-López D, Hoefer A, Suárez M, Santurde G, Martín-Espada C, González-Zorn B. (2013). *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 from companion animals bearing *ArmA* methyltransferase, *DHA-1* Beta-lactamase, and *QnrB4*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4532-4534.
- Hidalgo L, Hopkins KL, Gutiérrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Wodford N, González-Zorn B. (2013). Association of the novel aminoglycoside resistance determinant *RmtF* with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 68:1543-1550.
- Hidalgo L, Hopkins KL, Wareham DW, Gutiérrez B, González-Zorn B. (2012). Association of extended-spectrum Beta-lactamase VEB-5 and 16S rRNA methyltransferase *armA* in *Salmonella enterica* from the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4985-4987.
- Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, González-Zorn B. (2010). 16S rRNA Methyltransferase *RmtC* in *Salmonella enterica* ser. Virchow. *Emerg Infect Dis* 16:712-715.
- Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, Ovejero CM, Pati BK, Tripathi A, Singh A, Srivastava AK, González-Zorn B. (2014). Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo-beta-lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from India. *Int J Antimicrob Agents* 44:30-37.
- Saba CK, Escudero JA, Herrera-León S, Porrero MC, Suárez M, Domínguez L, Demuyakor B, González-Zorn B. (2013). First identification of *Salmonella* Urbana and *Salmonella* Ouakam in humans in Africa. *J Infect Dev Ctries* 7:691-695.
- Saba CKS, González-Zorn B. (2012). Microbial food safety in Ghana: a metha-analysis. *J Infect Dev Ctries* 6: 828-835.
- San Millán A, Escudero JA, Catalán A, Nieto S, Farelo F, Gibert M, Moreno MA, Domínguez L, González-Zorn B. (2007). Beta-lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB1000 bearing *blaROB-1*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2260-2264.
- San Millán A, Escudero JA, Gutiérrez B, Hidalgo L, García N, Llagostera M, Domínguez L, González-Zorn B. (2009). Multiresistance in *Pasteurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3399-3404.
- San Millán A, García-Cobos S, Escudero JA, Hidalgo L, Gutiérrez B, Carrilero L, Campos J, González-Zorn B. (2010). *Haemophilus influenzae* clinical isolates with plasmid pB1000 bearing *blaROB-1*. Fitness cost and interspecies dissemination. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1506-1511.
- San Millán A, Giufre M, Escudero JA, Hidalgo L, Gutiérrez B, Cerquetti M, González-Zorn B. (2011). Contribution of *ROB-1* and *PBP3* mutations to the resistance phenotype of a Beta-lactamase-positive amoxicillin/clavulanic acid-resistant *Haemophilus influenzae* carrying plasmid pB1000 in Italy. *J Antimicrob Chemother* 66:96-99.
- Søndergaard A, San Millán A, Santos-López A, Nielsen SM, González-Zorn B, Nørskov-Lauritsen N. (2012). Molecular organization of small plasmids bearing *blaTEM-1* and conferring resistance to β -lactams in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4958-60.
- Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Jagielski M, Hidalgo L, San Millán A, Gutiérrez B, Rastawicki W, González-Zorn B, Gierczynski R. (2011). Plasmid-borne 16S rRNA methylase *ArmA* in aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland. *J Med Microbiol* 60:1306-11.

Sistema de secreción **tipo III** en la interacción de *Pseudomonas syringae* con la planta

Carmen R. Beuzón y Javier Ruiz-Albert

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora» – Universidad de Málaga – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga

cbl@uma.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha, Juan José González-Plaza, Diego López-Márquez, Alberto Macho, Inmaculada Ortiz-Martín, Carmen Beuzón, Javier Ruiz-Albert, Jose Rufian y Adela Zumaquero.

Pseudomonas syringae es una bacteria Gram-negativa, patógena de plantas, que se clasifica en patovares según su especificidad de hospedador. Este patógeno es capaz de persistir sobre semillas secas y restos vegetales, activándose durante el proceso de germinación. Puede también sobrevivir epifíticamente, en la superficie de las hojas, o penetrar en ellas a través de aperturas naturales como estomas o heridas, y crecer activamente en el apoplasto de

la misma, causando en este caso enfermedad. *P. syringae* se transmite por contacto directo entre plantas y a través del agua de lluvia o riego. La infección por este patógeno determina pérdidas económicas importantes pudiendo afectar gravemente tanto la producción neta como la calidad del producto obtenido. Las estrategias de prevención habituales, a menudo insuficientes, poco eficientes y/o contaminantes, consisten en el uso de tratamientos químicos con base de

cobre, el uso de material vegetal libre de patógeno, la rotación de cultivos, y en el cultivo de variedades tradicionalmente más resistentes. El desarrollo de nuevas estrategias de control de las enfermedades causadas por este patógeno es por tanto necesario y de gran interés económico, y requiere de un mayor conocimiento tanto de los mecanismos de virulencia del patógeno como de los mecanismos de defensa contra el mismo, que distintas especies vegetales hayan podido desarrollar. Nuestro equipo lleva más de 10 años dedicado al análisis de la interacción entre *P. syringae* y la planta, siguiendo diversas aproximaciones experimentales, dirigidas por Carmen R. Beuzón y/o Javier Ruiz-Albert, y habiendo establecido numerosas colaboraciones dentro y fuera del país.

El éxito de *P. syringae* en la colonización y desarrollo de la enfermedad en un determinado hospedador requiere la evasión y/o supresión de las defensas presentadas por la planta infectada. *P. syringae* logra suprimir la respuesta de defensa de su hospedador mediante un conjunto de proteínas conocidas como efectores, que la bacteria introduce en el citosol de la célula hospedadora a través de un sistema de secreción de tipo III (type III secretion system o T3SS). Los T3SS son sistemas complejos cuya estructura básica está muy conservada entre patógenos de animales y de plantas. La expresión de los genes que codifican componentes del T3SS, o sus efectores, se activa tras la entrada de la bacteria en el apoplasto, y está sujeta a una compleja regulación que combina reguladores negativos y positivos. Nuestro laboratorio ha caracterizado dicha regulación en la estirpe de referencia, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a (en adelante *Pph* 1448a), un relevante patógeno de judía (Ortiz-Martín *et al.*, 2006; Ortiz-Martín *et al.*, 2010a; Ortiz-Martín *et al.*, 2010b). En la actualidad tenemos dos líneas de trabajo abiertas en aspectos relacionados: una dedicada al análisis de la regulación del proceso de secreción y su jerarquía, y otra a la variabilidad de su expresión en la planta mediante el uso de fusiones transcripcionales a marcadores fluorescentes y métodos de análisis de células individuales (microscopía confocal y citometría de flujo).

Las estirpes de *P. syringae* codifican entre 15 y 35 efectores, según estirpe y patovar. Nuestro laboratorio ha desarrollado herramientas moleculares con las que hemos contribuido a completar el inventario de efectores de *Pph* 1448a (Macho *et al.*, 2009; Zumaquero *et al.*, 2010), y hemos generado mutantes para la mayoría de ellos, tanto en *Pph* 1448a como en una segunda estirpe de referencia, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (en adelante *Pto* DC3000), un relevante patógeno de tomate. La estirpe *Pto* DC3000 es capaz de causar enfermedad en la planta *Arabidopsis thaliana*, en lo que constituye el modelo más empleado para el estudio de la interacción planta-bacteria a nivel molecular. Nuestro laboratorio ha adaptado para el análisis de *P. syringae* y otras bacterias fitopatógenas (Macho *et al.*, 2007; Macho *et al.*, 2010a) los análisis de virulencia mediante índices de competitividad empleados en patógenos animales (Beuzón y Holden, 2001), lo que nos ha permitido analizar la contribución a la virulencia de todos los mutantes en efectores generados en *Pph* 1448a (Macho *et al.*, 2012).

Trabajos recientes de diferentes laboratorios, destinados a la caracterización funcional de efectores en diferentes patovares de *P. syringae*, han mostrado que muchos de ellos son capaces de suprimir defensas cuando son sobreexpresados en sistemas heterólogos o directamente en la planta.

Las plantas responden al ataque de *P. syringae* siguiendo dos líneas de defensa, según el tipo de moléculas del patógeno que sean detectadas. La planta detecta inicialmente moléculas muy conservadas, denominadas genéricamente PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), cuyo ejemplo más caracterizado es la flagelina. Este reconocimiento está mediado por receptores localizados en la membrana plasmática de la célula vegetal y denominados genéricamente PRRs (Pattern-Recognition Receptors), que disparan una respuesta de defensa conocida como **PTI** (PAMP-Triggered Immunity), habitualmente de baja intensidad. Un microorganismo invasor también puede ser reconocido a través de sus efectores. Este tipo de reconocimiento es indirecto, siendo su base la detección de las modificaciones que el efector lleva a cabo sobre sus dianas en la planta, y lo realizan receptores intracelulares del tipo NB-LRR (Nucleotide-Binding, Leucine-Rich Repeat-containing proteins), conocidos como proteínas de resistencia (proteínas R). Esto da lugar a una respuesta de elevada intensidad denominada **ETI** (Effector-Triggered Immunity) asociada habitualmente al disparo de un proceso de muerte celular programada, conocida como respuesta de hipersensibilidad (Hypersensitive Response o HR).

La activación de la respuesta PTI es lenta, lo cual resulta adecuado en una respuesta de inmunidad que no discrimina entre bacterias patógenas y no patógenas, pero su intensidad se va incrementando con el tiempo. Esta lenta cinética inicial permite a los patógenos adaptados suprimirla mediante la translocación de efectores en la célula hospedadora al inicio de la infección, que previenen la amplificación de la señal hasta niveles suficientes para proteger a la planta frente al patógeno. En contraste con las PAMPs, los efectores son moléculas características de patógenos, cuyo reconocimiento provoca una respuesta de defensa rápida e intensa. La respuesta ETI es más eficaz frente a patógenos adaptados ya que por su mayor rapidez e intensidad, es más difícil de suprimir por el patógeno (Katagiri and Tsuda, 2010). Este tipo de defensa suele además estar asociado al disparo de inmunidad sistémica (Systemic Acquired Resistance o SAR) (Cameron *et al.*, 1994), que protege a regiones distales de la planta frente a nuevas infecciones. Pero los patógenos también parecen haber adquirido la capacidad de suprimir ETI a través de efectores. Nuestro laboratorio ha descrito uno de los ejemplos de dicha capacidad, el efector HopZ1a de *P. syringae* pv. *syringae*, miembro de la familia de efectores caracterizada por el efector de *Yersinia pestis* YopJ. HopZ1a es capaz de suprimir la ETI disparada frente a diferentes efectores, dependientes de diferentes proteínas R, e inducidas a través de todas las diferentes cascadas de señalización conocidas hasta la fecha, incluyendo a las disparadas por el patógeno *Pto* DC3000 durante el desarrollo de la enfermedad (Macho *et al.*, 2010b; Macho

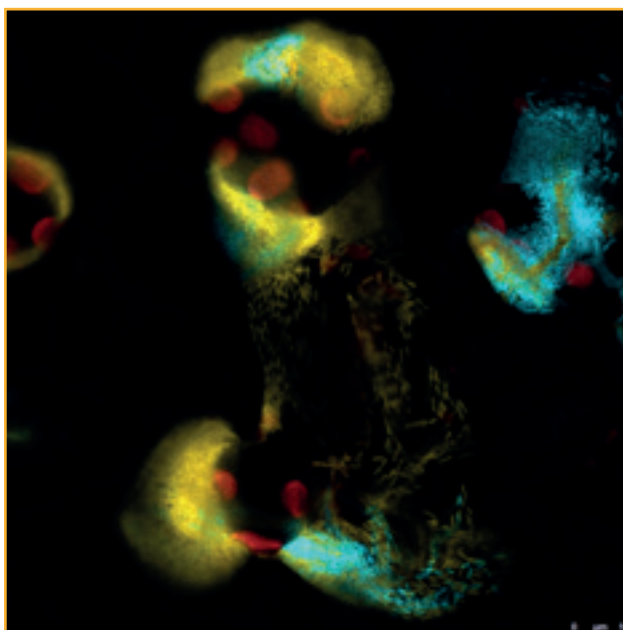


Figura 1. Imagen de microscopía confocal de una hoja de judía 4 días después de su inoculación con una mezcla (1:1) de 5×10^5 cfu/ml de *Pseudomonas syringae* patovar *phaseolicola* 1448a expresando eYFP (amarillo) o eCFP (azul). En rojo se aprecia la autofluorescencia de los cloroplastos de las células vegetales cercanas a la microcolonia, donde se pueden observar en algunas zonas bacterias individuales.

y Beuzón, 2010). HopZ1a es también capaz de suprimir la inmunidad sistémica conocida como SAR. Esto indica un mecanismo de acción generalista e implica su acción sobre un elemento común a todas estas defensas, aún por identificar, y en cuya identificación trabajamos en la actualidad.

Hasta la fecha, la caracterización de actividad supresora de un determinado efector siempre ha sido ensayada frente a la respuesta de defensa tipo ETI disparada por efectores heterólogos bien conocidos, pero que no son expresados de manera natural por el patógeno que expresa el supresor (Rosebrock *et al*, 2007; Ntoukakis *et al*, 2009; Wilton *et al*, 2010). Un elevado número de efectores presentan actividad de supresión de ETI, lo que sugiere que la supresión de este tipo de defensas podría tener un papel determinante en el proceso de adaptación del patógeno a su hospedador. En este sentido, la supresión total o parcial del disparo de ETI

podría representar una estrategia alternativa de adaptación al hospedador, frente a estrategias evolutivas generalmente aceptadas como la pérdida del efector que es detectado por la planta, o su evolución por mutación (patoadaptación). Otra de las líneas de investigación de nuestro laboratorio se centra en la caracterización del impacto que la supresión cruzada de defensas tiene en la adaptación de un patógeno a su hospedador. Dentro de esta línea, hemos generado bacterias marcadas con diferentes fluoróforos que nos permiten el seguimiento del proceso de colonización y proliferación en poblaciones simples y mixtas.

BIBLIOGRAFÍA

- Macho AP, Zumaquero A, Ortiz-Martín I, Beuzón CR.** (2007). Competitive Index: a sensitive and accurate method to quantify growth of *Pseudomonas syringae* in different hosts. *Mol Plant Pathol* 8:437-450.
- Macho AP, Ruiz-Albert J, Tornero P, Beuzón CR.** (2009). Identification of new type III effectors and analysis of the plant response by competitive index. *Mol Plant Pathol* 10:69-80.
- Macho AP y Beuzón CR.** (2010). Insights into plant immunity signaling: The bacterial competitive index angle. *Plant Signal Behav* 5: 1590-1593.
- Macho AP, Guidot A, Barberis P, Beuzón CR y Genin S.** (2010a). A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Mol Plant Microb Interact* 23:1197-1205.
- Macho AP, Guevara CM, Tornero P, Ruiz-Albert J, Beuzón CR.** (2010b). The *Pseudomonas syringae* effector proteína HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New Phytol* 187:1018-1033.
- Macho AP, Zumaquero A, González-Plaza JJ, Ortiz-Martín I, Rufián JS, Beuzón CR.** (2012). Genetic Analysis of the Individual Contribution to Virulence of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *PLoS One* 7:e35871.
- Ortiz-Martín I, Macho AP, Lambersten L, Ramos C, Beuzón CR.** (2006). Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria. *J Microbiol Meth* 67:395-407.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Macho AP, Mansfield JW, Beuzón CR.** (2010a). Positive Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23:665-681.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Mansfield JW, Beuzón CR.** (2010b). Negative Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23:682-701.
- Zumaquero A, Macho AP, Rufián JS, Beuzón CR.** (2010). Analysis of the role of the type III secretion inventory in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a in the interaction with the plant. *J Bacteriol* 192:4474-4488.

Grupo de biofilms bacterianos

La vida en comunidad de las bacterias

Íñigo Lasa

Universidad Pública de Navarra

ilasa@unavarra.es

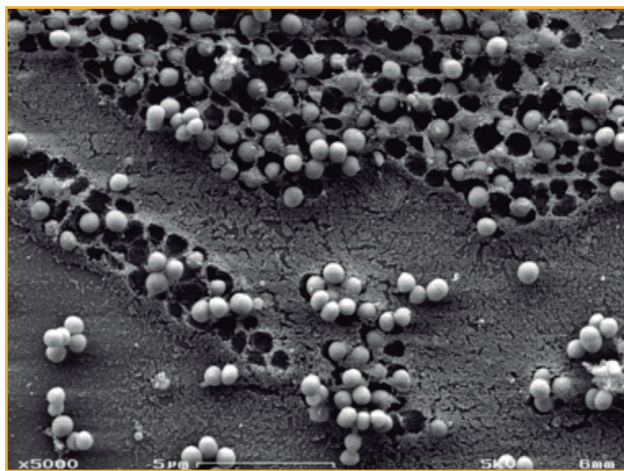


Foto de grupo. De izquierda a derecha: agachados: Igor Ruiz de los Mozos, Begoña García, Maite Villanueva. De pie: Saioa Burgui, Íñigo Lasa, Tana Taglialegna, Sonia Saenz, Carlos Caballero, Maite Villanueva, Cristina Solano, Jaione Valle, Alejandro Toledo, Amaia Sabalza y Juani Prieto.

Al igual que el hombre, las bacterias prefieren vivir en urbes donde la compañía de otras bacterias facilita el desarrollo de una matriz en cuyo interior las bacterias viven protegidas de cambios en las condiciones ambientales y en un entorno donde es más sencillo acumular enzimas degradativas, retener agua o comunicarse. El grupo de Biofilms bacterianos inició su andadura en 1999 y desarrolla su actividad investigadora en el Instituto de Agrobiotecnología, un centro mixto de investigación entre la Universidad Pública de Navarra, el CSIC y el Gobierno de Navarra. Su investigación se centra en las bases moleculares y genéticas del proceso de formación del biofilm de dos bacterias

patógenas: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* ser. Enteritidis. La razón que nos llevó a elegir bacterias filogenéticamente tan alejadas para realizar nuestros estudios fue el convencimiento de que esta estrategia nos permitiría reconocer aquellos elementos que son comunes al proceso de formación del biofilm de aquellos otros elementos que son específicos para cada bacteria. *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias patógenas que mayores problemas sanitarios causa en los países desarrollados. Esto se debe a (i) la enorme cantidad de factores de virulencia que es capaz de producir y que le proporcionan una gran versatilidad como patógeno; (ii) la existencia de cepas multirresistentes

a los antibióticos (las comúnmente denominadas MRSA); y (iii) a su capacidad para adherirse a los implantes médicos y causar infecciones mediadas por biofilms. Esta última característica fue determinante a la hora de decidarnos a utilizarla como modelo de estudio del proceso de formación del biofilm. A lo largo de estos años hemos aprendido que la matriz del biofilm de *S. aureus* puede ser de naturaleza proteica (previamente, existía la idea de que la matriz del biofilm es siempre de naturaleza polisacáridica) y que en la regulación de la síntesis del exopolisacárido interviene una compleja cascada de reguladores cuyas conexiones todavía no entendemos bien (Toledo-Arana et al, 2001; Valle et al, 2003; Toledo-Arana et al, 2005; Valle et al, 2007; Merino et al, 2009; Vergara-Irigaray et al, 2009; Valle et al, 2011; Gil et al, 2014). También hemos estudiado los sistemas de transducción de señal de dos-componentes que conectan los estímulos ambientales con la maquinaria de síntesis de la matriz. Más recientemente, utilizando metodologías de análisis transcriptómico hemos descubierto la existencia de un proceso global de transcripción solapante en bacterias Gram positivas. Según nuestros resultados, que han sido confirmados posteriormente por otros autores, los RNAs solapantes son digeridos por una RNasa específica de RNA de cadena doble, RNasa III, a fragmentos de 19-21 nucleótidos (Lasa et al, 2011; Lybecker et al, 2014). Este proceso de digestión de los RNAs solapantes tiene lugar a lo largo de todo el genoma y proporciona un método muy sencillo para coordinar la expresión de los genes contiguos (Lasa et al, 2012; Sesto et al, 2013; Lasa y Villanueva, 2014). El análisis transcriptómico también nos ha permitido encontrar la existencia de largas regiones no traducidas en el extremo 3' (3' UTR) de muchos genes de *S. aureus*. Estudios dirigidos a investigar la función de la 3' UTR utilizando como modelo de estudio la región 3' UTR del gen *icaR*, un regulador de la síntesis del principal exopolisacárido de la matriz del biofilm, han mostrado que las 3' UTRs bacterianas también pueden contener elementos reguladores de la expresión génica (Ruiz de Los Mozos et al, 2013).



Biofilm de bacterias de *Staphylococcus aureus*.

En el caso de *Salmonella*, nuestros estudios inicialmente se centraron en identificar elementos de la matriz del biofilm, donde contribuimos con la identificación de los operones responsables de la síntesis de celulosa y de una proteína de superficie con homología a una proteína de *S. aureus* (Solano et al, 2002; Latasa et al, 2005). Posteriormente nos focalizamos en el sistema de transducción de señal mediado por c-di-GMP donde realizamos un original abordaje que consistió en la eliminación de los elementos de esta ruta de transducción de señal de esta bacteria (García et al, 2004; Solano et al, 2009; Zorraquino et al, 2013). La utilización de esta cepa nos está permitiendo investigar los procesos regulados por el c-di-GMP en esta bacteria y averiguar los mecanismos de especificidad que permiten al c-di-GMP producido ante un determinado estímulo influir específicamente en sus dianas, sin interferir con las dianas activadas por otros estímulos ambientales.

Aunque la motivación principal de nuestra investigación es responder a preguntas básicas de cuándo, cómo, y para qué las bacterias forman los biofilms, siempre intentamos identificar aplicaciones biotecnológicas en nuestros resultados. Fruto de esa vocación, el grupo cuenta con dos patentes internacionales en explotación, y varios miembros del grupo han constituido una empresa de base tecnológica dedicada al diseño y construcción de microorganismos modificados genéticamente «a la carte».

Nuestro grupo mantiene colaboraciones con muchos grupos para el desarrollo de sus investigaciones. Mantenemos una larga y estrecha colaboración con el grupo del Dr. José R. Penadés, anteriormente en Segorbe, pero que recientemente se ha desplazado a la Universidad de Glasgow. También mantenemos colaboraciones para la caracterización de las proteínas de la matriz del biofilm con el grupo del Dr. Jean Marc Ghigo (Instituto Pasteur), el grupo de la Dra. P. Romby (Universidad de Estrasburgo), la Dra. Cecilia Arraiano (Universidad de Lisboa) y el Dr. F. Vandenesh (Universidad de Lyon) para el análisis del proceso de transcripción solapante. En los aspectos de virulencia y genética de *Salmonella*, siempre hemos contado con el consejo y la ayuda de los grupos del Dr. F. García del Portillo (CNB, Madrid) y el Dr. J. Casadesus (Universidad de Sevilla).

REFERENCIAS

- García B, Latasa C, Solano C, García-del Portillo F, Gamazo C, Lasa I. (2004). Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* 54: 264-277.
- Gil C, Solano C, Burgui S, Latasa C, García B, Toledo-Arana A, et al. (2014). Biofilm Matrix Exoproteins Induce a Protective Immune Response against *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Infect Immun* 82:1017-1029.
- Lasa I, Villanueva M. (2014). Overlapping transcription and bacterial RNA removal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2868-2869.
- Lasa I, Toledo-Arana A, Gingeras T. (2012). An effort to make sense of antisense transcription in bacteria. *RNA biology* 9:1039-1044.
- Lasa I, Toledo-Arana A, Dobin A, Villanueva M, de Los Mozos IR, Vergara-Irigaray M, et al. (2011). Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20172-20177.

- Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penadés JR, Lasa I.** (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 58:1322–1339.
- Lybecker M, Zimmermann B, Bilusic I, Tukhtubaeva N, Schroeder R.** (2014). The double-stranded transcriptome of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:3134–3139.
- Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, et al.** (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 191:832–843.
- Ruiz de Los Mozos I, de Los Mozos I.R, Vergara-Irigaray M, Segura V, Villanueva M, Bitarte N, et al.** (2013). Base pairing interaction between 5'- and 3'-UTRs controls *icaR* mRNA translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genetics* 9:e1004001–e1004001.
- Sesto N, Wurtzel O, Archambaud C, Sorek R, Cossart P.** (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat Rev Micro* 11:75–82.
- Solano C, García B, Latasa C, Toledo-Arana A, Zorraquino V, Valle J, et al.** (2009). Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7997–8002.
- Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I.** (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43:793–808.
- Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Débarbouillé M, Penadés JR, Lasa I.** (2005). *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J Bacteriol* 187: 5318–5329.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al.** (2001). The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 67:4538–4545.
- Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, Penadés JR, Lasa I.** (2011). Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog* 8:e1002843–e1002843.
- Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penadés JR, Lasa I.** (2003). SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 48:1075–1087.
- Valle J, Vergara-Irigaray M, Merino N, Penadés JR, Lasa I.** (2007). sigmaB regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. *J Bacteriol* 189:2886–2896.
- Vergara-Irigaray M, Valle J, Merino N, Latasa C, García B, Ruiz de los Mozos I, et al.** (2009). Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect Immun* 77:3978–3991.
- Zorraquino V, García B, Latasa C, Echeverez M, Toledo-Arana A, Valle J, et al.** (2013). Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose. *J Bacteriol* 195:417–428.

NOTA DEL EDITOR

Queridos socios de la SEM,

En esta etapa editorial hemos abierto en SEM@foro a los Grupos Especializados un espacio sin restricciones en las secciones monográficas, que estuvo más limitado en la etapa anterior. Ello implica que no todos los socios interesados tuvieron la oportunidad en su momento de publicar una reseña de su línea de investigación en Actualidad SEM, mientras que en SEM@foro, que ya lleva 3 años de rodaje, no ha habido limitaciones más allá de las exigidas por los Presidentes co-editores de los números. Ello ha creado una desigualdad de oportunidades y la aparición, esporádicamente, de números más grandes, como este n.º 58 dedicado al prolífico y transversal grupo de Microbiología Molecular. Esto además supone un coste adicional para la SEM en épocas de austeridad en las que hemos tenido que tomar decisiones tan dolorosas como limitar la tirada en papel de la revista a 250 ejemplares.

Como responsable de la edición pido disculpas a los co-editores y socios que se sintieron limitados. Abrir la revista a todos los socios sin restricción de espacio no ha sido una decisión meditada, sino una tendencia improvisada por la demanda sin otra intención de hacer de esta revista un verdadero «foro» de la SEM. Con el SEM@foro en verde, hemos acelerado sin mirar atrás y sin acordarnos de los compañeros que tuvieron que esperar en la luz roja.

En aras del orden público y para evitar embotellamientos, en lo sucesivo vamos a regular el tráfico de artículos. En la próxima e inminente ronda de secciones especiales, pues esta la acabamos en junio de 2015, el SEM@foro estará verde hasta los 10 artículos y en ámbar hasta los 15. Pasarse el SEM@foro en rojo implicará una «multa» para el Grupo, que quizás le interese asumir. Recordad que es cómodo utilizar también el transporte público: NoticiaSEM sale cada mes.

Víctor J. Cid.
Director editorial.

GENÉTICA BACTERIANA

EL CAMBIO DE UN ÚNICO AMINOÁCIDO HA MODELADO EL RANGO PATÓGENO-HOSPEDADOR DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL GÉNERO *MYCOBACTERIUM*

Informa: Jesús Gonzalo Asensio

La tuberculosis sigue siendo, a principios del siglo XXI, una de las enfermedades infecciosas más letales. En los humanos, esta enfermedad está causada por *Mycobacterium tuberculosis* y se transmite por vía aérea. Además, la tuberculosis también afecta a animales, causando no sólo graves problemas económicos en ganado sino además un potencial riesgo de transmisión a humanos principalmente a través del consumo de leche sin pasteurizar. Sorprendentemente, la tuberculosis bovina causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, una vez transmitida al hombre, raramente continúa su transmisión aérea entre los humanos.

Aunque sabemos que ambas especies se engloban dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) y comparten una identidad en su genoma cercana al 99 %, hasta ahora no se habían conseguido establecer determinantes genéticos que expliquen la adaptación patógeno-hospedador dentro del MTBC. La comparación de genomas de varias bacterias de origen humano o animal ha permitido encontrar una explicación a este fenómeno: una mutación que sólo está presente en las bacterias causantes de la tuberculosis en animales y que provoca la pérdida de función de un sistema regulador de la virulencia llamado PhoPR. Así, la introducción del alelo de *M. bovis* en *M. tuberculosis* anulaba la función del sistema PhoPR, mientras que la introducción del alelo de *M. tuberculosis* en *M. bovis*

restauraba su funcionalidad. Además, en este trabajo se estudian mecanismos genéticos compensatorios por los que las bacterias causantes de tuberculosis bovina han mantenido su virulencia en ganado y algunas son capaces de transmitirse entre humanos.

Este trabajo aplica los principios de la teoría Darwiniana sobre el origen de las especies a nivel molecular e ilustra cómo la comprensión de los mecanismos de adaptación al hospedador pueden ser explotados para comprender y prevenir la transmisión de enfermedades. Como ejemplo, la inactivación del sistema *phoPR* en *M. tuberculosis* ha servido como racional para la construcción de MTBVAC una vacuna atenuada contra la enfermedad actualmente en ensayos clínicos.

Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. **Jesús Gonzalo-Asensio, Wladimir Malaga, Alexandre Pawlik, Catherine Astarie-Dequeker, Charlotte Passemar, Flavie Moreau, Françoise Laval, Mamadou Daffé, Carlos Martin, Roland Brosch & Christophe Guilhot. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS).* DOI: 10.1073/pnas.1406693111 <http://www.pnas.org/content/111/31/11491.long>.**

La sección «nuestra ciencia» publica reseñas de artículos científicos producidos por nuestros socios. La extensión máxima es de 250 palabras. Envía tus reseñas a la Dirección de las revistas o al grupo de divulgación D+D SEM.

sem.microbiologia@gmail.com
semaforo@semicrobiologia.org
noticiasem@semicrobiologia.org

Nuevos socios de la SEM

- Agregán Pérez, Rubén
- Brown Jaque, Maryury Andrea
- Caballero Villalobos, Javier
- Calderón Blanco, Julia
- Camelo Castillo, Anny
- Castellano Hinojosa, Antonio
- Compte Port, Sergi
- Cornejo Castillo, Francisco Miguel
- Díez Méndez, Alexandra
- Ferrer Espada, Raquel
- Franco González de Canales, Ana
- Gadea Fernández, Rebeca
- García Fontán, Camino
- González Menéndez, Víctor Manuel
- González Pastor, Rebeca
- González Quiñonez, Nathaly del Valle
- Gonzalez-Acinas, Silvia
- Hernández del Amo, Elena
- Jiménez Gómez, Alejandro
- Laczeski, Margarita Ester
- López Serrano, Daniel
- Mas Lladó, María
- Masachis Gelo, Sara
- Matencio Durán, Adirán
- Montes Briones, Rebeca
- Pellón Rodríguez, Aize
- Pérez Sancho, Marta
- Podadera González, Ana María
- Ramirez Garcia, Andoni
- Rubio Arcos, Sara
- Ruiz Artiga, Virginia
- Salazar Guiral, Guillem
- Sánchez Fernández, Pablo

Altas desde el 20/05/2014 hasta 04/11/2014

CHALLENGES IN MANAGEMENT OF AFLATOXINS AND OCHRATOXIN A IN CONTAMINATED RAW MATERIALS

Autora: Esther García-Cela

Directores: Dr. Antonio J. Ramos Girona y Dra. Sonia Marín Sillué

Centro de realización: Universidad de Lleida

Centro de defensa: ETSEA-Universidad de Lleida

Fecha de defensa: 15 de septiembre 2014

Esta Tesis ha abordado la problemática del muestreo de pistachos para la determinación de aflatoxinas, comparando el método oficial en la UE y uno más sencillo propuesto por una importante industria del sector. Los resultados mostraron que el muestreo oficial presentó una elevada variabilidad asociada a todos los pasos del muestreo, particularmente del submuestreo, mientras que el muestreo alternativo resultó inapropiado comparado con el oficial. El impacto de la incertidumbre muestral sobre los resultados analíticos fue elevado, por lo que se requieren nuevas herramientas de gestión para mejorar este aspecto. Por otra parte, con el tostado industrial de los pistachos (pre-tostado $\approx 135^\circ\text{C}$ + tostado $\approx 165^\circ\text{C}$, durante un tiempo total de 20 min) se alcanzó un 75 % de reducción de las aflatoxinas.

Adicionalmente se estudió el impacto del cambio climático sobre la infección por *Aspergillus ocratoxigenicus* en uva. *Aspergillus tubingensis* parece ser la especie más prevalente en los viñedos españoles. Se observaron diferentes perfiles ecofisiológicos debido al origen de los aislamientos de *Aspergillus carbonarius*, siendo los aislados de las regiones más cálidas los más xerófilos, lo que puede indicar una posible adaptación al medio ambiente. Un hipotético calentamiento del clima podría ocasionar una reducción del riesgo por ocratoxina A y un incremento del riesgo de fumonisina B₂, debido al aumento de otros *Aspergillus* biseñados como *A. niger*. Por otra parte las especies de *Aspergillus* estudiadas mostraron diferente tolerancia a la radiación UV, por lo que un incremento de ésta podría afectar a la presencia de estas especies en campo, favoreciendo a las especies más pigmentadas.

Por último se evaluó el potencial efecto del cambio climático sobre la eficacia de diferentes materias activas con actividad antifúngica, incluyendo el extracto natural de *Equisetum arvense*, habiéndose observado que podría ser necesario un cambio en las materias activas a emplear como resultado de los cambios climáticos.

NUEVAS PERSPECTIVAS MOLECULARES Y AGRONÓMICAS DE LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *PODOSPHAERA FUSCA*

Autor: Davinia Bellón Gómez

Directores: Alejandro Pérez García y Juan Antonio Torés Montosa

Centro de realización: Instituto de Hortofruticultura subtropical y Mediterránea La Mayora, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad de Málaga. (IHSM-UMA-CSIC), Málaga

Centro de presentación: Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga

El oídio (*Podosphaera fusca*) es una de las principales enfermedades que afecta y limita el cultivo de las cucurbitáceas. El abuso en la aplicación de fungicidas para controlar la enfermedad,

ha desarrollado graves problemas de resistencia a estos fungicidas por parte del patógeno. En nuestro trabajo se ha avanzado en el conocimiento molecular de los mecanismos implicados en la resistencia a fungicidas QoI y DMI en *P. fusca* en España, desarrollando habilidades para detectar y monitorizar la presencia de genotipos resistentes.

Hemos descrito que la resistencia a fungicidas QoI en *P. fusca* se produce debido a una mutación puntual en el citocromo *b*, siendo la proporción de mitocondrias mutadas un factor relevante para el desarrollo del fenotipo. También pusimos de manifiesto por primera vez la actividad y la expresión de transportadores de membrana tipo ABC en respuesta a fungicidas QoI y DMI en *P. fusca*, no detectándose coste biológico asociado a la resistencia a estos fungicidas en las condiciones ensayadas. Por último, como alternativa de uso a los dos grandes grupos de fungicidas frente a los cuales existen graves problemas de resistencia, realizamos estudios de sensibilidad frente a otros fungicidas. Detectamos altos niveles de resistencia a metiltiofanato, bajos niveles de resistencia a bupirimato y no se detectó resistencia a miclobutanil ni a quinoxifen. Es importante remarcar la importancia del control integrado para una buena gestión de la enfermedad, donde se combinen las distintas estrategias como el control biológico, control por mejora genética y control químico.

EL CULTIVO ORGANOTÍPICO TRIDIMENSIONAL DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA CEREBRAL FRENTE A *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Autor: Sara Remuzgo Martínez

Director: José Ramos Vivas

Centro de realización: Laboratorio de Microbiología, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla-IDIVAL, Santander

Centro de presentación: Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria

Los cultivos organotípicos tridimensionales (3D-OC) de SNC mantienen las características morfológicas y funcionales del tejido *in vivo* por lo que representan un modelo experimental en biología molecular, neurogénesis, electrofisiología e inmunohistoquímica. Estos cultivos de tejido apenas se han utilizado para el análisis de la interacción patógeno-hospedador, por ello, hemos estudiado por primera vez la infección de 3D-OC obtenidos de cerebros de rata con *Listeria monocytogenes*.

La microscopía electrónica de barrido ha revelado cómo la microglía es reclutada rápida y masivamente a la superficie de los cultivos. Estas células parecen actuar como caballos de Troya, liberando a las bacterias en el interior del cerebro.

Utilizando matrices de PCR en tiempo real, hemos cuantificado a nivel transcripcional los genes implicados en la respuesta inmunitaria y en la autofagia. La mayor parte de los genes sobreexpresados codificaban moléculas involucradas en respuestas Th1, regulación que se mantiene elevada hasta 24 h después de la infección. Por otro lado, la autofagia no parece tener un papel inmunológico relevante, ya que los principales genes de esta ruta no estaban modulados por la infección.

En conclusión, los 3D-OC utilizados constituyen una herramienta versátil para investigar, en condiciones experimentalmente controladas, una gran variedad de vías biológicas relevantes durante la neurolisteriosis, y pueden servir como modelo para el estudio de otros microorganismos neurotrópicos relevantes.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA LISOZIMA CPL-7 DEL BACTERIOFAGO CP-7 DE NEUMOCOCO

Autor: Roberto Díez Martínez

Director: Pedro García González

Centro de realización: Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

Centro de presentación: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid

Streptococcus pneumoniae, o neumococo, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y adultos en el mundo. En las últimas décadas y debido al abuso en el consumo de antibióticos se ha revitalizado, después de muchas décadas de casi total abandono, la denominada terapia fágica, utilizando los viriones enteros o algunos de sus productos para luchar contra las infecciones bacterianas. En esta Tesis, se han estudiado las características enzimáticas de la mureína-hidrolasa Cpl-7, una lisozima codificada por el fago Cp-7 de neumococo, así como el efecto bactericida que esta lisozima posee, cuando actúa exógenamente, frente a diferentes bacterias, incluidas las multi-resistentes. Además, se ha construido una variante sintética de Cpl-7, denominada Cpl-7S, mediante la sustitución de 15 residuos de su módulo de unión a la pared celular, lo que modificó la carga neta desde -14.9 a +3.0 a pH neutro. Cpl-7S mostró un aumento de la actividad lítica frente a diferentes cepas de patógenos Gram-positivos o Gram-negativos, en estos últimos tras combinarse con carvacrol 0.01%. Por otro lado, se han construido varias enzimas quiméricas combinando los diferentes elementos estructurales de la lisozima fágica Cpl-1 y la enzima sintética Cpl-7S, ensayándose sus actividades bactericidas. Por último, se han validado todos los estudios *in vitro* mediante la utilización de tres modelos animales de infección: un modelo de embriones de pez cebra, siendo la primera vez que se emplea este modelo animal con éxito para medir el efecto protector de un compuesto antibacteriano, y dos modelos murinos (colonización nasal y sepsis).

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MALFORMACIÓN DEL MANGO Y SU AGENTE CAUSAL EN ESPAÑA

Autor: María Crespo Palomo

Directores: Antonio de Vicente Moreno y Juan Antonio Torés Montosa

Centro: Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-CSIC-UMA); Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga

El género *Fusarium* comprende un gran número de especies patógenas de plantas. Varias especies de éste género han sido descritas como agentes causales de la malformación del mango (MMD), en la actualidad, la enfermedad más importante a nivel mundial que afecta a este cultivo. Esta tesis doctoral se ha centrado en confirmar la presencia de esta enfermedad en el Sur de España; identificar las especies de *Fusarium* asociadas a esta enfermedad; y por último, analizar la diversidad de las poblaciones de *Fusarium* spp. patógenas de mango del Sur de España. En primer lugar se llevaron a cabo prospecciones en fincas comerciales en diferentes términos municipales de la Axarquía. De

muestras de mango con síntomas de malformación se obtuvieron 134 aislados de *Fusarium*. Un tercio de estos aislados fueron identificados empleando cebadores específicos como *Fusarium mangiferae*. El grupo mayoritario de aislados se identificaron mediante secuenciación génica y el empleo de herramientas genéticas (VCG) como *Fusarium tuiense*. Con aislados representativos de ambas especies se confirmó el papel como agentes causales de la enfermedad en la zona de estudio en experimentos de inoculación de árboles sanos. En segundo lugar se llevó a cabo un estudio de diversidad poblacional mediante el empleo de técnicas genéticas y moleculares (ap-PCR, RAPD-PCR, VCG, multilocus análisis). Los diferentes estudios de diversidad muestran que en el caso de *F. tuiense* aparentemente se trata de una población clonal homogénea, mientras que en el caso de *F. mangiferae* se han observado tres subpoblaciones diferentes.

MODELO DE LEVADURA HUMANIZADA MEDIANTE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ONCOGÉNICA PI3K: APLICACIÓN A LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES Y AL ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN LIPÍDICA

Autor: Teresa Fernández-Acero Bascones

Directores: Víctor Jiménez Cid y María Molina Martín

Centro: Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo de célula eucariótica que permite realizar de manera eficiente estudios moleculares. Mediante la expresión heteróloga de la fosfatidilinositol 3-quinasa de clase I (PI3K) de mamíferos, una importante diana farmacológica dada su implicación en cáncer y otros procesos fisiológicos y patológicos, hemos diseñado un sistema de levadura humanizada que mimetiza mutaciones oncogénicas. En esta tesis hemos puesto a punto un bioensayo que permite la búsqueda de inhibidores de la PI3K *in vivo* y hemos demostrado, mediante un rastreo a escala piloto sobre compuestos naturales en colaboración con la Fundación MEDINA (Granada), que es escalable a formato HTS (*high throughput screening*) para el descubrimiento de posibles nuevos antitumorales.

Por otra parte, la expresión de PI3K causa un efecto drástico en la levadura por eliminación del fosfoinosítido esencial Ptd-Ins(4,5)P₂, de modo que este sistema supone una herramienta para el estudio de este lípido, que actúa como segundo mensajero en señalización celular y es esencial para los procesos de endocitosis y exocitosis. Mediante análisis genéticos y genómicos, como el rastreo de la colección genómica de mutantes delecionados en genes no esenciales, hemos determinado que la pérdida de identidad de la membrana plasmática originada por la eliminación de este lípido causa un bloqueo en el tráfico vesicular y en la polarización del citoesqueleto de actina. Esta situación permite el ensamblaje de módulos de señalización de manera ectópica en endosomas post-Golgi, en concreto el receptor Wsc1, la GTPasa Rho1, su activador Rom2, y su efector, la proteína quinasa Pkc1. Esta última activa la cascada de quinasas MAPK de «integridad de la pared celular», que causa una respuesta transcripcional característica. Esta eliminación persistente de PtdIns(4,5)P₂ mediante expresión heteróloga de PI3K es el primer ejemplo en levadura de activación de una cascada de MAPK desde compartimentos intracelulares.

Querido Presidente,



Foto aérea del nuevo campus construido a partir del 2004 donde se encuentra el Centro de Salud de la Universidad de Colorado. Al fondo se pueden ver las cumbres nevadas de las Montañas Rocosas.

Le agradezco la oportunidad que me brinda, y es para mí un honor dirigirme a los socios de la Sociedad Española de Microbiología en esta sección de «Cartas al Presidente». Este documento es el testimonio de un científico que no solo reside, sino que en buena parte se ha formado fuera de España. Ojalá que esta carta sirva de estímulo a los lectores de la revista, en especial a los estudiantes y jóvenes postdoctores que empiezan sus carreras en investigación. Una oportunidad de estas Cartas es comprobar que la ciencia, siendo una tarea internacional, no tiene que estar limitada a nuestros confines más próximos. Existen oportunidades fuera de nuestras fronteras. Lo único que hace falta es determinación y una pizca de valor. No es fácil dejar atrás amigos, familiares, y cultura –léase gastronomía, lenguaje y fiestas de guardar... ¡Casi nada! Aventurarse en territorio desconocido suele ofrecer multitud de oportunidades que nos hacen crecer en direcciones y profundidades jamás sospechadas.

Soy profesor de Inmunología y Microbiología en la Escuela de Medicina en la Universidad de Colorado, institución en la que llevo dirigiendo mi propio grupo de investigación desde 2001. Actualmente mi grupo de trabajo está formado por seis personas y tengo recursos para contratar dos o tres personas más. Desde que empecé la tesis doctoral, hace ya más de veinte años, he estudiado varios aspectos de la bioquímica del stress oxidativo y nitrosativo producido por macrófagos en respuesta a patógenos intracelulares. En particular, mi grupo investiga mecanismos moleculares por medio de los cuales los reactivos de oxígeno y nitrógeno contribuyen a la inmunidad natural. También estudiamos las respuestas de adaptación a estos reactivos que permiten a las bacterias sobrevivir a la citotoxicidad de los radica-



Andrés Vázquez-Torres

Andrés Vázquez-Torres es profesor de Inmunología y Microbiología en la Escuela de Medicina en la Universidad de Colorado. Es licenciado en veterinaria por la Universidad de Córdoba, España, y recibió su doctorado en microbiología en la Universidad de Wisconsin, Madison en 1996. Tras sus estudios postdoctorales en la División de Enfermedades Infecciosas y en el departamento de Microbiología de la Universidad de Colorado inició su carrera independiente en la Escuela de Medicina, donde formó y cuenta con un grupo de trabajo que desarrolla su investigación. El resultado de su trabajo, entre otros, sobre bacterias patógenas del género *Salmonella* y *Burkholderia* ha puesto de manifiesto que mecanismos básicos de estos microorganismos gram-negativos son en buena medida generalizables a una amplia variedad de bacterias patógenas. Ha recibido diversos premios y menciones honoríficas, entre ellos el Scheppe Career Development Award from the Scheppe Foundation, el Merck Irving S. Sigal Memorial Award por la American Academy of Microbiology, el Burroughs Wellcome Fund Investigators in Pathogenesis of Infectious Diseases, y Excellence in Teaching. Entre los trabajos publicados por su laboratorio se encuentran estudios sobre el control del equilibrio redox por proteínas reguladores de la respuesta astringente, efecto protector del óxido nítrico mediante bloqueo de las fases dependientes de energía en la incorporación de sustancias químicas, análisis de las defensas intracelulares del huésped en patogénesis por *Salmonella*, análisis molecular la respuesta adaptativa a especies reactivas del huésped. A la vez es miembro del Consejo editorial y revisor de diversas publicaciones científicas.

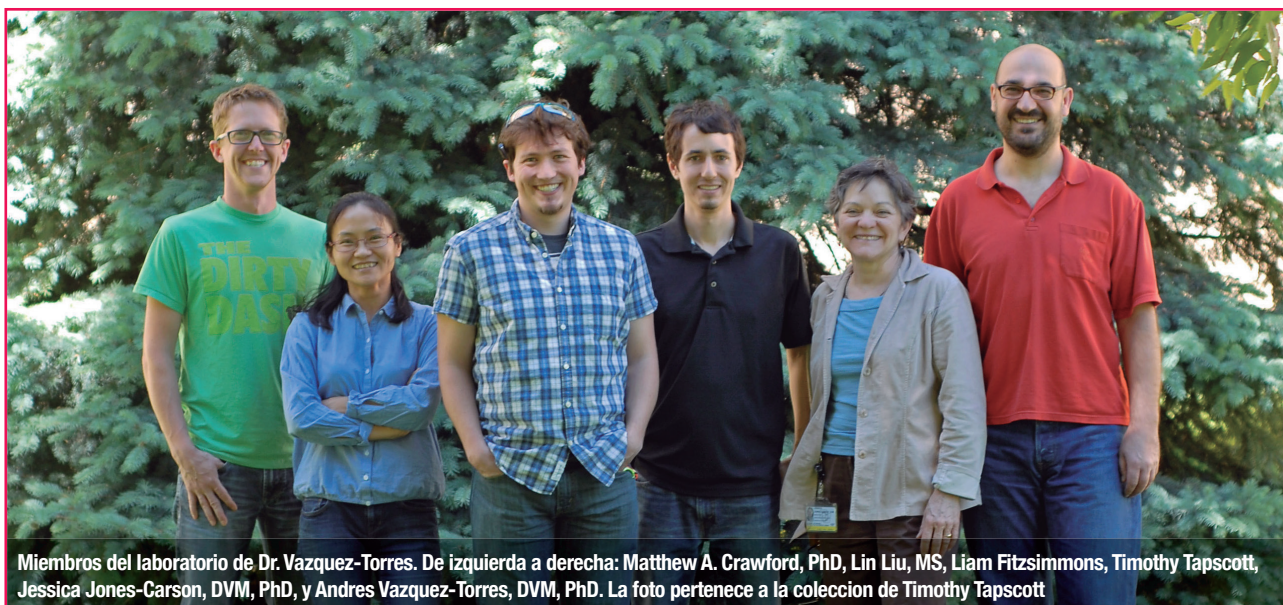
les libres e inducir tolerancia a antibióticos comúnmente utilizados en medicina. Es prioritario que cada uno de mis estudiantes, postdoctorales y técnicos de laboratorio dispongan de la mayor independencia intelectual posible. La investigación en estos días no es una tarea individual. Cada miembro de mi laboratorio debe sentir que los estudios son suyos. Además, es muy importante tener un amplio abanico de colaboradores con quien discutir ideas y utilizar métodos innovadores de trabajo. Con frecuencia nos aferramos a las ideas, como si fuesen nuestras. La experiencia me ha enseñado que la calidad de la investigación aumenta con grupos de trabajo más amplios. Además de los claros beneficios intelectuales, las colaboraciones aportan relaciones personales muy gratificantes y abren horizontes a jóvenes investigadores.

La estructura departamental en una universidad americana suele tener un catedrático y varios profesores «asistentes», «asociados» y «titulares». En el modelo americano no hay oposiciones. La contratación del profesorado es la manera más directa por la que un catedrático puede influir en el funcionamiento del departamento. Aun así, las contrataciones de profesores se llevan a cabo según las recomendaciones de un grupo de trabajo formado por profesores del departamento. Esto garantiza que las contrataciones se ejecuten con el mayor rigor posible. Los puestos de trabajo para nuevos profesores son anunciados nacional e internacionalmente. Los candidatos formados en la propia institución tienen una desventaja en comparación con individuos formados en otras universidades. Como gran parte de la estructura de la universidad americana, incluido el salario de los profesores, está financiada en parte por proyectos individuales, las contrataciones se hacen en base al currículum y al potencial del investigador para conseguir financiación. Este modelo garantiza la contratación de los mejores investigadores en el mercado, sin las trabas de

contratar familiares, conocidos, etc. El resultado es la renovación de departamentos y el continuo flujo de las mejores ideas en el mercado. Una vez contratados, los profesores gozan de total libertad para desarrollar sus programas de investigación. Este sistema me ha permitido acceder a la posición de independencia intelectual de la que gozo en la actualidad en la Universidad de Colorado.

Esta estructura se ve reflejada en los laboratorios. La institución, ya sea la escuela de graduado o los propios departamentos, contratan estudiantes cada año en base a sus credenciales. Después de un año de rotaciones en laboratorios y matriculación en cursos didácticos, los estudiantes seleccionan un grupo de investigación con fondos disponibles. A partir de ese momento, el laboratorio o las becas predoctorales, financian la formación del estudiante. Los laboratorios independientemente contratan postdoctorales, normalmente en búsquedas nacionales e internacionales. Según mi propia experiencia, muy pocos de los que solicitan plazas postdoctorales provienen de España. Esto me ha extrañado sobremedida. Yo creía que la crisis y la falta de oportunidades en universidades españolas haría que nuestros científicos estuvieran dispuestos a considerar oportunidades fuera de la patria. Hay bastantes oportunidades fuera del país. Lo único que hace falta es un poco de iniciativa. Os garantizo que los científicos españoles no tienen que envidiar nada a nadie en el mundo. A nivel técnico e intelectual estamos tan preparados como el mejor.

Yo soy un producto de la Escuela de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. Como toda una generación de biólogos españoles, el naturalista Félix Rodríguez de la Fuente influyó de manera clara en mi interés por la ciencia. Desde que entré en la escuela de veterinaria, tenía claro que mi vida profesional debía de estar ligada al estudio de patología en aves silvestres. En particular, mostré un marcado interés por las enfermedades infecciosas de especies de pájaros en



Miembros del laboratorio de Dr. Vazquez-Torres. De izquierda a derecha: Matthew A. Crawford, PhD, Lin Liu, MS, Liam Fitzsimmons, Timothy Tapscott, Jessica Jones-Carson, DVM, PhD, y Andres Vazquez-Torres, DVM, PhD. La foto pertenece a la colección de Timothy Tapscott

Andalucía. Mis primeros escarceos en ciencia fueron supervisados por la Dra. Isabel Acosta en el Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Era a mediados de los años ochenta y España acababa de entrar en la OTAN y la Comunidad Económica Europea, entidades que crearon oportunidades en investigación, proyectos de colaboración con universidades europeas, y fuentes internacionales de financiación. Además, las recientemente creadas Autonomías estaban interesadas en promover investigaciones en universidades regionales. Santiago Hernández, Catedrático de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, fue beneficiario de algunas de estas oportunidades. Acabando mis estudios en veterinaria, Santiago me ofreció una beca para estudiar enfermedades parasitarias en bóvidos. Aunque la propuesta era interesante, mi deseo por estudiar patología aviar me hizo rechazar esta invitación y decidí probar fortuna en los EE UU. Tenía ganas de aventura y nuevos retos. Al principio, el salto a América fue bastante duro. Los dos primeros años no conseguí un puesto de trabajo. Para sobrevivir, la ayuda económica que aún recibía de mi familia fue suplementada con varios empleos de economía sumergida. El esfuerzo económico que hizo mi familia humilde y la incertidumbre de abrirme paso en América me hicieron pensar con frecuencia en dejarlo todo y volver a España. Quizás mi carácter testarudo me hizo aguantar. Hoy me alegro muchísimo de mi decisión. Sin empleo y con bastante tiempo por delante, trabajé de voluntario en el Wildlife Health Research Center, Madison, Wisconsin (el mayor centro norteamericano dedicado al estudio de animales salvajes migratorios), y en los Departamentos de Poultry Sciences y Veterinary Sciences en la Universidad de Madison, Wisconsin. Estas experiencias únicas me dieron la experiencia necesaria para ser competitivo en el mercado americano. Debido a mi trabajo voluntario con macrófagos en los citados departamentos, Edward Balish, PhD, me ofreció un puesto de estudiante en su grupo de investigación. Al finalizar la tesis doctoral, llegué a la conclusión que mi carrera profesional debía centrarse en entender los procesos básicos por los que reactivos de oxígeno y nitrógeno ejercen citotoxicidad. Posteriormente hice un posdoctorado en el laboratorio de Ferric C. Fang, MD, con quien aprendí a utilizar la genética de *Salmonella* para conseguir mis objetivos. En los laboratorios de Ed Balish y Ferric Fang hice grandes avances en mi formación, aprendiendo a escribir, exponer, pensar, y ejecutar el método científico.

Al mismo tiempo, aprendí la importancia de relacionarse con colegas en la comunidad científica. La abundancia de recursos y el carácter abierto y al mismo tiempo competitivo de la ciencia en EE UU han sido fundamentales en mi formación. En contra de la imagen negativa que se pueda tener de EE UU, yo me he sentido muy querido, protegido y totalmente realizado a nivel profesional.

Mi experiencia indica que los jóvenes españoles pueden incorporarse a la comunidad científica norteamericana desde el principio de su educación. Sin embargo, las leyes de inmigración han cambiado mucho a raíz de los acontecimientos trágicos del 11 de septiembre de 2001. En la actualidad, la manera más simple de venir a investigar a EE UU es el posdoctorado. Tener una base de inglés, publicaciones interesantes durante la tesis, y ganas de salir de España son los requisitos más importantes para que los jóvenes microbiólogos españoles obtengan una experiencia laboral en EE UU. Cuando yo vine, mi inglés hablado era bastante deficiente, pero rápidamente mejoró al sumergirme en la vida universitaria y a través de mi participación voluntaria como entrenador de fútbol base para niños. Muchas veces los candidatos tan solo buscan un empleo. Esta estrategia no suele ser fructífera. Los profesores evaluamos positivamente a quienes nos contacta con las ideas claras de que nuestro laboratorio es el lugar idóneo para hacer un postdoctorado. Os recomendaría que estéis atentos a anuncios, pero muchas veces los empleos no son ni siquiera anunciados. Entonces, contactad a los laboratorios que mejor se ajusten a vuestras inquietudes científicas. Una vez fuera, la capacidad de trabajo y el intelecto del individuo son los elementos que en gran medida dictan el éxito de la experiencia. A largo plazo, la cantidad e impacto de las publicaciones son las que finalmente contribuyen al éxito. Aunque la crisis mundial también ha afectado a la universidad estadounidense, las universidades norteamericanas siguen contratando profesores, estudiantes y posdoctorales. En los próximos años, sin ir más lejos, ¡nuestro departamento tiene programado contratar diez nuevos profesores! Lo bueno del sistema norteamericano es que nacionalidad, raza, género, religión, ideas políticas o parentesco no influyen en la contratación de investigadores en los distintos niveles de formación. No veo razón alguna por la que microbiólogos españoles no puedan competir en el mercado internacional por un puesto digno de trabajo.

Centro de la Salud de la Universidad de Colorado

En 2004, el Centro de la Salud de la Universidad de Colorado se trasladó desde su antigua localización en Denver a un campus donado por el ejército en la cercana ciudad de Aurora. El Centro de la Salud de la Universidad de Colorado es el campus construido más recientemente en EE UU. La Universidad de Colorado combina nuevas instalaciones y tecnologías punteras para lograr máximos beneficios en educación, investigación y servicios clínicos. Nuestro campus aloja las Escuelas de Medicina, Farmacia, Enfermería, Higiene y Medicina Dental, así como varios hospitales universitarios, pediátricos y de veteranos. Un Parque de Ciencia y Tecnología, y una zona residencial para alumnos forman parte del campus. La Escuela de Medicina, donde trabajo, es un hervidero intelectual. Y, además, el marco geográfico es realmente incomparable, ya que las Montañas Rocosas, con sus monumentos naturales de belleza inigualable, están a solo 30 minutos en coche.

<http://www.ucdenver.edu/academics/colleges/medicalschool/departments/ImmunologyMicrobiology/faculty/departmental/Pages/VAZQUEZ-TORRES.aspx>



Congreso Nacional de Microbiología

Sociedad Española
de Microbiología

Logroño, La Rioja
Del 7 al 10 de julio de 2015



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**



www.unirioja.es/congresosem2015