

# Temas de actualidad

## ***Fusarium oxysporum*: un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos**

Antonio Di Pietro y M<sup>a</sup> Isabel González Roncero

Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Gregor Mendel, 14071 Córdoba.

E-mail: ge2dipia@uco.es

### Interés de la patogénesis fúngica

Los hongos filamentosos constituyen un grupo de microorganismos ubicuo y extremadamente versátil. La gran mayoría de las especies viven como saprofitos sobre materia orgánica en descomposición, sin embargo, algunas son capaces de colonizar organismos vivos y provocar enfermedad. A pesar de tratarse de un número restringido de especies, los patógenos fúngicos tienen un gran impacto en la economía mundial. Según estimaciones de la FAO, la agricultura mundial pierde cada año el 12% de su producción por daños causados por hongos fitopatógenos, más que por cualquier otro agente. Estos daños se producen a pesar de la masiva utilización de fungicidas cuyo mercado global supera anualmente los 20.000 millones de dólares.

Por otro lado, los patógenos oportunistas de humanos se han convertido en una creciente amenaza por provocar infecciones sistémicas en individuos inmunodeprimidos. El mercado global de antifúngicos de aplicación médica asciende ya a 3.000 millones de dólares y se prevé un incremento rápido durante la próxima década. Debido a los escasos principios activos disponibles (la mayoría de los productos antifúngicos se basan en solo unos pocos mecanismos de acción diferente), la aparición de estirpes patógenas resistentes representa una amenaza continua. El desarrollo

de antifúngicos más eficaces y que cumplan los requisitos toxicológicos y ambientales cada vez más estrictos, es por tanto, una necesidad vital para las empresas agro-químicas y farmacéuticas (Steffens *et al.*, 1996). Desde el punto de vista de la investigación básica, el reto es la identificación de aquellos genes fúngicos que resulten esenciales en patogénesis, siendo por tanto las proteínas codificadas por estos genes potenciales dianas para la próxima generación de agentes antifúngicos.

### El patógeno *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* pertenece a los Ascomycetos y comprende especies que se caracterizan por la presencia de macroconidios fusiformes. Algunas de ellas son importantes patógenos de plantas o productores de micotoxinas contaminantes de alimentos. *F. oxysporum* es la especie más común de este género. No tiene fase sexual conocida pero el grupo teleomórfico más cercano es *Gibberella* que está clasificado dentro de los Pyrenomycetos. *F. oxysporum* es un habitante del suelo temido por los agricultores en todo el mundo como causante de la fusariosis vascular. Dentro de la especie hay más de 120 *formae speciales* descritas que afectan a una gran variedad de cultivos como algodón, tomate, tabaco, melón, garbanzo, plátano, caña de azúcar, café entre otros (Agrios, 2001). Los síntomas característicos de la fusariosis vascular son epinastia, retraso del crecimiento, amarilleamiento y marchitez progresiva de las hojas y del tallo, llevando con frecuencia a la muerte de la planta. En cortes de tallos se observa una coloración marrón en la zona de los vasos del xilema. Dentro de una determinada forma *specialis* se diferencian diferentes razas fisiológicas que se distinguen por su patrón de virulencia frente a distintos cultivares de la planta. La interacción se rige por un clásico sistema gen por gen caracterizado por resistencia monogénica, como en el caso del gen *I-2* de tomate que confiere resistencia a la raza 2 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. En la actualidad, el uso de culti-



**Figura 1.** Hifas de *F. oxysporum* teñidas con blanco calcoflúor, fluorocromo de unión específica a quitina (izq.) o DAPI para la visualización de los núcleos (der.).

vares resistentes representa la única medida eficaz y económicamente rentable para el control de la fusariosis vascular en el campo (Agrios, 2001).

El proceso de infección de *F. oxysporum* es complejo y requiere una serie de mecanismos bien regulados: (1) el reconocimiento de señales aún desconocidas provenientes de la raíces de la planta, (2) la adhesión a la superficie de la raíz y la diferenciación de hifas de penetración, (3) la invasión del cortex de la raíz y la degradación de barreras físicas tales como la endodermis hasta llegar al tejido vascular, (4) la adaptación al entorno adverso del tejido vegetal, por ejemplo, la tolerancia a compuestos antifúngicos, (5) la proliferación de las hifas y, posiblemente la producción de conidios en los vasos del xilema y, (6) la secreción de factores de virulencia tales como péptidos o fitotoxinas. Estudios recientes basados en técnicas de inactivación génica dirigida, han aportado nuevos datos acerca del proceso de infección en *F. oxysporum* (Tabla 1). En esta revisión presentamos algunos de los avances obtenidos y examinamos el potencial de *F. oxysporum* como modelo general para el análisis de la patogénesis fúngica.

### Papel de las enzimas líticas

Para que el hongo pueda infectar la planta debe penetrar degradando las barreras constituidas por varios polímeros como son la pectina, el xilano, la celulosa y proteínas estructurales como las extensinas. Los fitopatógenos secretan un amplio número de enzimas líticas capaces de despolimerizar cada uno de estos componentes (Walton, 1994). Hace más de 50 años ya se asumía que las enzimas líticas pudieran estar implicadas en el desarrollo de la fusariosis vascular. Uno de nuestros objetivos ha sido corroborar o desechar esta hipótesis mediante un análisis genético molecular. En nuestros primeros trabajos purificamos y caracterizamos algunas enzimas líticas de *F. oxysporum*: una endo- y dos exopoligalacturonasas (PGs), una pectato liasa (PL) y una xilanasa (XYL). Utilizando la técnica de los zimogramas, mediante la visualización de la actividad enzimática en gel tras una separación por isoelectroenfoque, logramos detectar la presencia de la endoPG y la PL en plantas de tomate infectadas por *F. oxysporum* (Di Pietro y Roncero, 1996). Este resultado inicial apoyaba la posible implicación de estas enzimas en la patogénesis. Por ello, tras el escrutinio de una genoteca de *F. oxysporum* disponible en nuestro grupo, se clonaron los genes *pg1* y *pg5* responsables de sendas endoPGs, *pgx4* (exoPG), *pl1* (PL), *xyl2*, *xyl3*, *xyl4* y *xyl5* responsables de sendas xilanasas, y *prt1* de una proteasa de la clase

**M**a Isabel González Roncero es Licenciada en Ciencias y Doctora en Biología por la Universidad de Sevilla. Realizó su Tesis Doctoral sobre la Genética de la carotenogénesis en el hongo zigomiceto *Phycomyces blakesleeanus* bajo la dirección del Profesor Enrique Cerdá Olmedo. Desde 1985 es Profesora del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, donde actualmente es catedrática y responsable del grupo de Ingeniería Genética de hongos filamentosos. Su grupo de investigación estudia los mecanismos moleculares que intervienen en la patogénesis del hongo causante de marchitez vascular *Fusarium oxysporum*.

**A**ntonio Di Pietro es Licenciado y Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Basilea. Realizó su Tesis Doctoral sobre el agente de biocontrol *Chaetomium globosum* bajo la dirección de los Dres. F.J. Schwinn y T. Boller, y una estancia postdoctoral en el laboratorio del Dr. G. Harman en la *Cornell University*, EEUU, donde estudió el papel de las quitinasas en el micoparásito de *Trichoderma*. En 1992 se incorporó al Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba donde es Investigador del Programa Ramón y Cajal desde el año 2001. Su investigación actual se centra en la disección de una cascada de señalización MAPK esencial en la patogénesis fúngica y en la identificación de mecanismos de infección de *Fusarium oxysporum* conservados en plantas y mamíferos.

de las subtilisinas. Mediante análisis *northern* detectamos que la mayoría de estos genes se inducen en presencia del sustrato específico para cada enzima, como es la pectina en el caso de *pg1*, *pg5* y *pl1* o el xilano para *xyl2*, *xyl3*, *xyl4* y *xyl5*. (Di Pietro y Roncero, 1998; Huertas-González *et al.*, 1999, Ruiz-Roldán *et al.*, 1999). También se determinó la expresión de cada gen *in planta* mediante la técnica de la RT-PCR, observándose que algunos de ellos como *pg5*, *pgx4* o *xyl2* se expresan en tiempos o lugares definidos de la infección mientras otros como *pg1*, *pl1*, *xyl3*, *xyl4* y *prt1* se transcriben a lo largo de todo el ciclo infeccioso.

Con el fin de determinar el papel biológico de las enzimas líticas se construyeron mutantes de *F. oxysporum* deficientes en cada uno de los genes, mediante la inactivación génica dirigida (*gene knockout*). Dicha técnica permite la sustitución del alelo silvestre de interés, mediante transformación y recombinación homóloga, por un alelo que haya sido interrumpido con un marcador seleccionable. Debido a la especificidad de la mutación, cualquier cambio observado en los mutantes puede atribuirse

**Tabla 1.** Genes de *Fusarium oxysporum* analizados mediante interrupción génica

Gen	Producto/Función	Efecto de la interrupción	Referencia
<i>arg1</i>	argininosuccinato liasa	virulencia muy reducida, auxótrofo de arginina	Namiki <i>et al.</i> , 2001
<i>chsV</i>	quitina sintasa clase V	virulencia muy reducida, hipersensible a $\alpha$ -tomatina y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Madrid <i>et al.</i> , 2003
<i>fga1</i>	subunidad G	virulencia y conidiación muy reducidas	Jain <i>et al.</i> , 2002
<i>fgb1</i>	subunidad G	virulencia muy reducida, crecimiento hiperelongado	Jain <i>et al.</i> , 2003
<i>fmk1</i>	MAP quinasa	no patógeno, adhesión a raíz y crecimiento invasor afectados	Di Pietro <i>et al.</i> , 2001a
<i>fow1</i>	transportador mitocondrial	virulencia muy reducida, incapaz de colonizar la planta	Inoue <i>et al.</i> , 2002
<i>pacC</i>	factor de transcripción	aumento de la expresión de genes "ácidos" y de la virulencia	Caracuel <i>et al.</i> , 2003
<i>six1</i>	proteína rica en cisteínas	rompe la resistencia de tomate mediada por gen <i>I-3</i>	Rep <i>et al.</i> , 2004
<i>pg1</i>	endopoligalacturonasa	virulencia normal, crecimiento reducido en pectina	Di Pietro & Roncero 1998
<i>pg5</i>	endopoligalacturonasa	virulencia normal	García-Maceira <i>et al.</i> , 2001
<i>pgx4</i>	exopoligalacturonasa	virulencia normal	García-Maceira <i>et al.</i> , 2000
<i>pl1</i>	pectato liasa	virulencia normal	Huertas-González <i>et al.</i> , 1999
<i>prt1</i>	subtilisina	virulencia normal	Di Pietro <i>et al.</i> , 2001
<i>xyl3</i>	endoxilanase familia 10	virulencia normal	Gómez-Gómez <i>et al.</i> , 2002
<i>xyl4</i>	endoxilanase familia 11	virulencia normal	Gómez-Gómez <i>et al.</i> , 2002
<i>xyl5</i>	endoxilanase familia 11	virulencia normal	Gómez-Gómez <i>et al.</i> , 2001

buirse directamente a la pérdida de función del gen inactivado. Algunos de los mutantes obtenidos de *F. oxysporum* que carecían de determinadas enzimas líticas presentaban claras deficiencias de crecimiento saprofitico en el sustrato correspondiente a la enzima inactivada, sin embargo ninguno de ellos mostró alteración en su virulencia sobre plantas de tomate (Di Pietro y Roncero 1998; García-Maceira *et al.*, 2000; Di Pietro *et al.*, 2001; Gómez-Gómez *et al.*, 2002). Concluimos por tanto que ninguno de los genes analizados es esencial por sí mismo para la patogénesis de la especie. Es muy probable que ello se deba a la existencia de múltiples genes de cada tipo de enzima, capaces de complementar la función de los genes inactivados, un fenómeno denominado redundancia funcional.

### Mecanismos de regulación génica: los factores de transcripción

Una alternativa a la inactivación de genes estructurales individuales es el análisis de aquellos factores que regulan la expresión coordinada de un conjunto de genes durante la interacción patógeno-planta. Entre ellos se encuentra PacC, un factor de transcripción con tres dedos de

zinc que controla la expresión génica en respuesta al pH ambiental. PacC se activa a pH alcalino mediante proteólisis de la proteína precursora, para convertirse en la forma activa capaz de entrar en el núcleo donde activa la expresión de genes "alcalinos" y reprime la de genes "ácidos" (Peñalva y Arst, 2002). Para estudiar el papel de la respuesta a pH en la patogénesis fúngica, clonamos el gen *pacC* de *F. oxysporum* y construimos dos tipos de mutantes: los primeros portadores de un alelo nulo por interrupción de su fase codificante mostraron un fenotipo de mimesis a condiciones de acidez, los segundos portadores de un alelo truncado que determina una proteína PacC constitutivamente activa, mostraron mimesis de alcalinidad independientemente del pH ambiental (Caracuel *et al.*, 2003a, Caracuel *et al.*, 2003b). El efecto más claro de la mutación *pacC* nula en cultivo axénico fue escaso crecimiento a pH alcalino con hifas muy vacuolizadas, además se pudo observar un aumento en la producción de fosfatasas y proteasas ácidas como correspondía a sus fenotipos de mimesis de acidez y una mayor sensibilidad a las especies reactivas de oxígeno y a cationes tóxicos. Los mutantes *pacC* dominantes activos mostraron el fenotipo opuesto: escaso crecimiento a pH ácido, producción reducida de fos-

fatasas y proteasas ácidas, aumento de producción de proteasas alcalinas, mayor resistencia al agua oxigenada y a cationes tóxicos. Los ensayos de infección de raíces de plántulas de tomate mostraron que el mutante *pacC* nulo era más virulento que el silvestre mientras el mutante dominante activo mostraba un retraso claro en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad (Caracuel *et al.*, 2003a). Estos resultados indican que PacC actúa como regulador negativo de la virulencia sobre plantas de *F. oxysporum*, posiblemente reprimiendo la expresión de genes "ácidos" importantes durante el proceso de infección.

### Rutas de señalización: una cascada MAPK esencial en patogénesis

Durante las fases iniciales de la infección, los hongos patógenos deben percibir los estímulos de la planta y, a través de cascadas de señalización, responder con cambios morfogénicos y bioquímicos tal como la adhesión a la superficie del hospedador, la diferenciación de estructuras de infección, la secreción de enzimas líticas y toxinas, o la activación de mecanismos protectores frente al arsenal defensivo de la planta. Actualmente se desconoce la naturaleza de las señales y de los receptores que activan la respuesta patogénica en los hongos. Entre las rutas de señalización implicadas en la patogénesis fúngica destaca una cascada MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos; Lengeler *et al.*, 2000). Las cascadas MAPK son rutas de señalización muy conservadas en organismos eucariotas, se caracterizan por un módulo con tres proteínas quinasas secuenciales, una MAPKKK (MEKK) activadora de una MAPKK (MEK), que a su vez activa la MAPK fosforilando los residuos conservados tirosina y treonina. La principal función biológica de las cascadas MAPK es la transducción de señales desde la superficie celular al núcleo, controlando así procesos tan vitales como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Chang y Karin, 2001). Las células poseen múltiples cascadas MAPK que les permiten responder de forma diferencial a estímulos variados. En los hongos se han descrito tres cascadas MAPK universalmente conservadas: la primera (Fus3/Kss1) responde a señales extracelulares, la segunda (Slf2) controla la integridad celular, y la tercera (Hog1) se activa por diferentes tipos de estrés.

La primera enzima MAPK caracterizada en un hongo filamentoso fue Pmk1 (*Pathogenicity MAP Kinase*), ortóloga de Fus3/Kss1, perteneciente al patógeno *Magnaporthe grisea* (Xu y Hamer, 1996). La delección del gen *pmk1* originó mutantes inca-

paces de infectar hojas de arroz, sin embargo, no mostraron cambios significativos en su crecimiento en cultivo axénico. El papel esencial de dicha cascada MAPK para el crecimiento del hongo *in planta*, pero no *in vitro*, suscitó un gran interés entre la comunidad científica, que condujo al aislamiento e identificación de numerosos genes ortólogos en otras especies fúngicas. Nuestro grupo ha sido el primero en identificar un ortólogo (denominado *fmk1*) en un hongo patógeno del suelo, *F. oxysporum* causante de la marchitez vascular (Di Pietro *et al.*, 2001). La inactivación dirigida de *fmk1* demostró que dicha cascada MAPK es esencial para la penetración de las raíces y la colonización de la planta y que, además, los mutantes están afectados en múltiples funciones relacionadas con la patogénesis como la expresión de genes pectinolíticos, la hidrofobicidad de las hifas, la capacidad de proliferar sobre tejido vegetal y, sorprendentemente, la fusión vegetativa de las hifas (anastomosis). Nuestros datos junto con los de otros grupos confirman el papel esencial y específico de esta cascada MAPK durante la infección en todas las especies fitopatógenas estudiadas hasta la fecha, incluyendo hongos con diversos mecanismos de infección, estilos de vida y rangos de hospedadores. Se trata de uno de los ejemplos más destacados de un componente molecular para la patogénesis, altamente conservado a lo largo de la evolución en hongos.

A pesar de la importancia y el alto grado de conservación de esta cascada MAPK en la patogénesis fúngica, los conocimientos actuales sobre los componentes que integran la ruta están aún muy incompletos. Algunos aspectos clave donde se requiere información adicional son:

**1) Señales activadoras.** Se desconoce la naturaleza química de las señales que activan la ruta MAPK *in planta* durante la infección. Existen al menos dos hipótesis: la primera propone que las señales son moléculas de origen vegetal, la otra sostiene que se trata de compuestos del propio hongo producidos durante la infección. Hasta la fecha ninguna de las dos hipótesis se ha podido confirmar.

**2) Receptores.** No se conocen las proteínas fúngicas encargadas de la percepción de las señales activadoras y de su transducción hasta el módulo de la MAPK.

**3) Genes efectores.** Sólo se han identificado unos pocos genes regulados por la cascada, en hongos patógenos, y ninguno de ellos ha resultado esencial para la infección de la planta.

En la actualidad, nuestros esfuerzos y los de otros grupos interesados en el tema están encaminados hacia la identificación de las señales y los

receptores implicados en la activación de la cascada MAPK y la caracterización de los genes regulados durante la infección.

### Genes implicados en la biogénesis de la pared

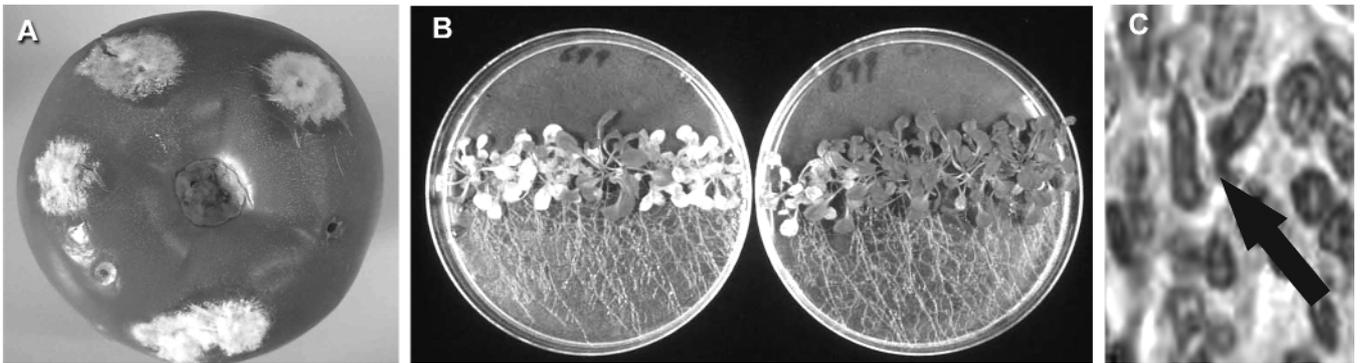
El principal componente de las paredes celulares fúngicas es polisacárido, entre ellos están la quitina, el quitosano (sólo presente en los zigomicetos) y el  $\beta$ -glucano. La quitina componente importante de la pared de hongos filamentosos es un polímero no ramificado de residuos N-acetilglucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 (Ruiz-Herrera et al, 1992). Las cadenas de quitina se disponen de forma antiparalela formando largas microfibrillas unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno. Se han descrito numerosas enzimas sintasas de quitina (Chs) en hongos filamentosos, clasificadas en cinco clases (I, II, III, IV y V), pudiendo presentar a su vez cada una de ellas varios genes representativos de la misma en una especie determinada (Roncero 2002). Aunque las razones de esta redundancia de genes *chs* en un organismo ha sido muy debatida aún se desconocen con certeza. Puede que su gran diversidad se deba a la especialización de cada enzima en procesos singulares, que podrían estar regulados tanto temporal como espacialmente. Recientemente hemos identificado en *F. oxysporum*, por mutagénesis al azar mediada por el DNA transformante, un gen responsable de una sintasa de quitina de clase V (*chsV*) que ha resultado ser esencial para la virulencia del hongo sobre frutos y en infecciones de raíces de tomate (Madrid et al., 2003). La función de ChsV en la integridad de la pared celular y en el crecimiento del hongo se determinó mediante observación al microscopio de fluorescencia y el análisis de su crecimiento en distintas condiciones de cultivo. Éstos producen 30% menos microconidias, que son de mayor tamaño y algunas presentan una forma semejante a la de un limón, anormal comparada con la típica forma oval de las conidias del silvestre. Otro tipo de aberraciones estructurales es que las hifas del mutante  $\Delta$ *chsV* presentan estructuras con forma de bola, infladas, que se tiñen intensamente con blanco calcoflúor (CFW), fluorocromo de unión específica a quitina. Probablemente debido a que el contenido de quitina en los mutantes  $\Delta$ *chsV* es aproximadamente el 35% menor que en la estirpe silvestre, el efecto inhibitorio de compuestos que afectan a la pared o la membrana celular como el rojo o el SDS resultó ser mucho mayor. La implicación ChsV en la patogénesis se analizó determinando el comportamiento de los mutantes de *F. oxysporum* portadores del gen inactivo. Estos mutantes demostraron incapaci-

dad total para colonizar el tejido vascular de las plantas de tomate. Asimismo manifestaron mayor sensibilidad que la estirpe silvestre a los extractos acuosos del fruto, del tejido vascular o de raíces de tomate, y a compuestos vegetales antifúngicos como la fitoanticipina del tomate  $\alpha$ -tomatina o el peróxido de hidrógeno. Nuestros resultados indican que ChsV contribuye de manera esencial en la defensa estructural de la pared celular del patógeno, evitando el acceso de los compuestos antifúngicos de la planta a sus dianas celulares.

Recientemente hemos identificado otros tres genes estructurales responsables de sintasas de quitina pertenecientes a la familia I, denominados *chs1*, *chs2*, *chs3*, y otro codificante para una chaperona sintasa, *chs7*, en *F. oxysporum* (Martín-Urdiroz et al., sin publicar). La caracterización fisiológica, morfológica y molecular de los mutantes portadores de cada uno de los alelos deficientes ha mostrado una ligera reducción en la virulencia de los deficientes  $\Delta$ *chs2* y ninguna en los mutantes  $\Delta$ *chs1* y  $\Delta$ *chs7* en comparación con el silvestre. La imposibilidad de obtener mutantes  $\Delta$ *chs3* podría ser indicativa de la no viabilidad de dicho fenotipo. Los estudios fisiológicos y celulares indicaron que las condiciones de estrés afectan al desarrollo normal de los mutantes  $\Delta$ *chs2* pero no de los  $\Delta$ *chs1* o  $\Delta$ *chs7*. En general, el estudio de la biogénesis de la pared celular en un hongo patógeno como *F. oxysporum* podría ayudar a la elucidación de su mecanismo de patogénesis, y en términos más aplicados para el diseño de moléculas fungicidas con dianas de acción más específicas.

### *F. oxysporum* como modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y animales

Los hongos infectan un amplio rango de especies Leucariotas que incluyen tanto plantas como animales. Actualmente se desconoce hasta que punto están conservados los mecanismos de infección en estos grupos de hospedadores. Una de las principales causas de esta falta de conocimiento es la ausencia de modelos fúngicos que permitan el análisis simultáneo de la virulencia en ambas clases de organismos. Estudios previos en bacterias han demostrado la gran utilidad de disponer de una cepa patógena capaz de infectar tanto plantas como animales. La principal ventaja de este tipo de modelo (conocido en inglés como *multihost pathogenesis model*), es poder utilizar los mismos mutantes en múltiples sistemas de infección, sin tener que recurrir a dos especies patógenas diferentes. Este potencial ha quedado demostrado en el caso de la cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*: el desarrollo de protoco-



**Figura 2.** (A) *F. oxysporum* como modelo de patogénesis "multihost". Ensayo de infección en fruto de tomate con diferentes mutantes de *F. oxysporum*. (B) Fusariosis vascular en plantas de *Arabidopsis* provocada por *F. oxysporum* (centro; foto cortesía de A. Molina, Universidad Politécnica de Madrid). (C) Conidios germinados de *F. oxysporum* cepa 4287 en tejido de bazo de un ratón inmunodeprimido (Ortoneda *et al.*, 2004).

los de infección con dicha cepa para *Arabidopsis* y ratón ha permitido la identificación de nuevos mecanismos de virulencia conservados en la patogénesis vegetal y animal (Rahme *et al.*, 1995).

Resulta por tanto deseable poder aplicar un abordaje similar al estudio de los patógenos fúngicos. *F. oxysporum* reúne, en principio, todas las características patogénicas necesarias para ello. Además de ser el causante de la fusariosis vascular en plantas, *F. oxysporum* es un emergente patógeno oportunista de humanos. Junto con *F. solani* y *F. verticillioides*, *F. oxysporum* es responsable de prácticamente todos los casos clínicos de fusariosis diseminada en humanos (Gupta *et al.*, 2003). El creciente interés de *F. oxysporum* como patógeno humano no se debe solamente al incremento en el número de infecciones, muchas de las cuales con fatal desenlace, sino también a su resistencia generalizada a los antifúngicos clínicos actualmente disponibles en el mercado (Guarro *et al.*, 1999).

Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado el primer modelo de patogénesis *multihost* en plantas y mamíferos descrito en hongos, utilizando la cepa 4287 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, patógena de tomate (Figura 2). Experimentos llevados a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Josep Guarro de la Universidad Rovira i Virgili, han demostrado que la inyección de microconidios de esta cepa en la vena lateral de la cola de ratones inmunodeprimidos causa la infección diseminada y la muerte del animal (Ortoneda *et al.*, 2004). Este efecto no se observa con microconidios inactivados previamente por altas temperaturas, lo que sugiere la existencia de un proceso activo en el patógeno. El análisis histopatológico de los animales infectados confirma la presencia de conidios e hifas del hongo en múltiples órganos del hospedador, como hígado, bazo, cerebro, pul-

món y corazón. Con el fin de validar la utilidad del modelo *multihost* para comparar los mecanismos de virulencia sobre plantas y mamíferos, se han analizado los mutantes de *F. oxysporum*, que previamente habían mostrado un cambio de virulencia sobre plantas de tomate. Los resultados de estos experimentos resultan muy llamativos, ya que indican que algunos de los genes estudiados tienen funciones opuestas en la infección de plantas y en la de animales. Como ejemplos indicativos, los mutantes deficientes en la MAPK Fmk1, incapaces de colonizar el tejido vegetal y de provocar enfermedad en tomate, resultan tan virulentos sobre ratón como la estirpe silvestre. Por otro lado, los mutantes *pacC* nulos, cuya virulencia en tomate no está afectada, muestran una virulencia claramente reducida en ratones (Ortoneda *et al.*, 2004). Cabe destacar también que el comportamiento de estos mutantes en el modelo del ratón se asemeja al descrito en mutantes ortólogos de otros patógenos humanos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* o *Cryptococcus neoformans*. (Davidson *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2000). Nuestros resultados apoyan, por tanto, la utilidad de *F. oxysporum* en la disección de la virulencia fúngica en plantas y mamíferos.

### Aplicación de herramientas genómicas en *F. oxysporum*

La genómica funcional es una herramienta poderosa en la búsqueda de nuevas dianas antimicrobianas (Jiang *et al.*, 2002). Su objetivo es analizar las funciones génicas mediante la aplicación de aproximaciones experimentales a gran escala, basadas en la información obtenida de la genómica estructural (Hieter y Boguski, 1997). Como ejemplos cabe citar la inactivación dirigida de miles de genes, la creación de colecciones de

mutantes mediante mutagénesis insercional y el análisis global de la expresión génica utilizando microarrays.

Para que la genómica funcional alcance su máxima eficacia, se requieren organismos modelo que permitan su fácil manipulación en el laboratorio y que dispongan de excelentes herramientas experimentales, moleculares y genómicas. Actualmente, el modelo por excelencia en la genómica funcional de eucariotas es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, su utilidad para el estudio de la patogénesis fúngica es limitada, ya que carece de mecanismos fundamentales de virulencia. Es por tanto imprescindible, desarrollar herramientas de genómica en patógenos "reales", que poseen un arsenal de mecanismos adaptados a la infección de sus respectivos organismos hospedadores (Sweigard y Ebbole, 2001).

*F. oxysporum* reúne requisitos esenciales para convertirse en uno de los principales modelos de estudio de la patogénesis fúngica. Se trata de una especie "

histórica" en Fitopatología, según se refleja en los numerosos estudios publicados en los últimos 50 años (Beckman, 1987). Otra característica destacada es presentar un rango de hospedadores extremadamente amplio que incluye más de cien especies vegetales y, como patógeno oportunista, la especie humana. Además, en *F. oxysporum* ya se dispone de numerosas herramientas moleculares desarrolladas tales como genotecas de ADN genómico o de cDNA, sistemas eficientes de transformación genética y de interrupción génica, identificación de genes por mutagénesis insercional y cepas marcadas con la proteína verde fluorescente que facilitan el seguimiento de la infección (Di Pietro *et al.*, 2003). Disponemos también de protocolos rápidos y reproducibles de infección de plantas modelo como tomate o *Arabidopsis*.

Además de las características arriba mencionadas, en la era post-genómica es imprescindible conocer la secuencia del genoma completo del organismo modelo. Recientemente (mayo 2003) se ha hecho disponible la secuencia del genoma de *F. graminearum*, especie estrechamente relacionada con *F. oxysporum* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>, <http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/>). Esta información genómica está resultando de gran utilidad para *F. oxysporum*, ya que el análisis comparativo de las secuencias codificantes muestra un elevado grado de identidad entre ambas especies. Actualmente, existe una iniciativa coordinada entre varios grupos estadounidenses, europeos y japoneses cuyo objetivo es la secuenciación del

genoma completo de la cepa 4287 de *F. oxysporum*. La colaboración internacional entre los laboratorios implicados ha sido, hasta el presente, una de las principales razones del éxito de la iniciativa genómica en *F. graminearum*. Dicha colaboración se está extendiendo también a *F. oxysporum* y ello permitirá utilizar al máximo su potencial para ampliar nuestros conocimientos sobre las bases moleculares de la patogénesis fúngica.

## Bibliografía

- Agrios G (1997) Plant Pathology 4<sup>th</sup> Ed., Academic Press, San Diego, USA
- Beckman CH (1987) The nature of wilt diseases in plants. APS Press, St. Paul, USA
- Caracuel Z, Roncero MIG, Espeso EA, Gonzalez-Verdejo CI, García-Maceira FI, Di Pietro A (2003a) Mol Microbiol 48:765-779
- Caracuel Z, Casanova C, Roncero MIG, Di Pietro A, Ramos J (2003b) Eukaryot Cell 2:1246-1252
- Chang L, Karin M (2001) Nature 410:37-40
- Davidson RC, Nichols CB, Cox GM, Perfect JR, Heitman J (2003) Mol Microbiol 49:469-85
- Davis D, Edwards JE Jr, Mitchell AP, Ibrahim AS (2000) Infect Immun 68:5953-5959
- Di Pietro A, Roncero MIG (1996) Phytopathology 86:1324-1330
- Di Pietro A, Roncero MIG (1998) Mol Plant-Microbe Interact 11:91-98
- Di Pietro A, García-Maceira FI, Męglecz E, Roncero MIG (2001a) Mol Microbiol 39:1140-52
- Di Pietro A, Huertas-González MD, Gutiérrez-Corona JF, Martínez-Cadena G, Roncero MIG (2001b) Mol Plant-Microbe Interact 14:653-662
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG (2003) Mol Plant Pathol 4:315-326
- García-Maceira FI, Di Pietro A, Roncero MIG (2000) Mol Plant-Microbe Interact 13:359-365
- Gómez-Gómez E, Ruiz-Roldan MC, Roncero MIG, Di Pietro A, Hera C (2002) Fungal Genet Biol 35:213-222
- Guarro J, Pujol I, Mayayo E. (1999) J Med Microbiol 48:363-366
- Gupta AK, Ryder JE, Baran R, Summerbell RC (2003) Dermatol Clin 21:257-268
- Hieter P, Boguski M (1997) Science 278:601-602
- Huertas-González MD, García-Maceira FI, Roncero, MIG, Di Pietro A (1999) Curr Genet 35:36-40
- Jiang B, Bussey H, Roemer T (2002) Curr Opin Microbiol 5:466-71
- Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J (2000) Microbiol Mol Biol Rev 64:746-785
- Madrid MP, Di Pietro A, Roncero MIG (2003) Mol Microbiol 47:257-66

- Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Mayayo E, Roncero MIG, Di Pietro A (2004) *Infect Immun* 72:1760-1766
- Peñalva MA, Arst HN Jr (2002) *Microbiol Mol Biol Rev* 66:426-446
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM (1995) *Science* 268:1899-1902
23. Roncero C (2002) *Curr Genet* 41:367-378
- Ruiz-Roldán MC, Huertas-González MD, Di Pietro A, Roncero MIG (1999) *Mol Gen Genet* 261:530-536
- Ruiz-Herrera J, Sentandreu R, Martínez JP (1992). *Handbook of Applied Mycology, Vol 4, Fungal Biotechnology.* pp. 281-312. Eds. DK Arora, RP Elander, KG Mukerji. Marcel Dekker Inc, NY, USA
- Steffens JJ, Pell EJ, Tien M (1996) *Curr Opin Biotechnol* 7:348-55
- Sweigard JA, Ebbole DJ (2001) *Curr Opin Microbiol* 4:387-392
- Xu J-R, Hamer JE (1996) *Genes Dev* 10:2696-2706
- Walton JD (1994) *Plant Physiol* 104:1113-1118
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A *et al.* (1999) *Science* 285:901-906

## Biofilms bacterianos

Íñigo Lasa Uzcudun

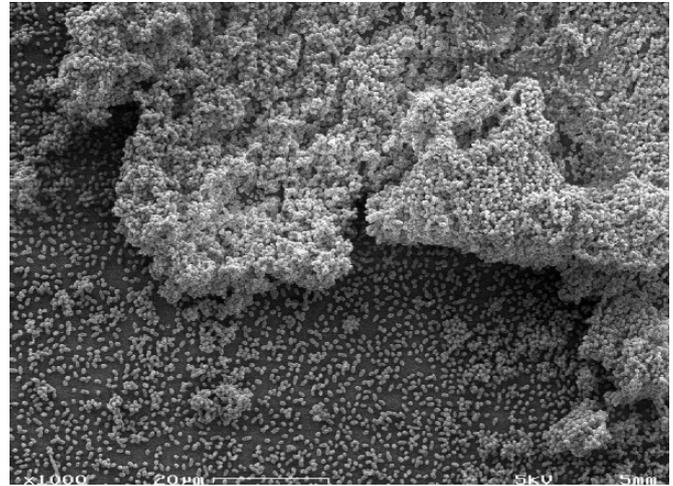
Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria.  
Universidad Pública de Navarra.

E-mail: [ilasa@unavarra.es](mailto:ilasa@unavarra.es)

Ahora mismo, si se consultase a la comunidad de microbiólogos sobre cuál es el ámbito de la microbiología más influyente en el inicio del nuevo milenio, al margen de preferencias individuales, existiría un amplio consenso en uno de estos dos temas: el análisis de los genomas bacterianos y el proceso de formación de biofilms. No cabe duda que la disponibilidad de la secuencia completa de cientos de genomas microbianos está influyendo enormemente sobre todos los aspectos de estudio de la microbiología. Sin embargo, no es menos cierto que el convencimiento general, sorprendentemente reciente, de que las bacterias en su medio natural se desarrollan formando comunidades de microorganismos afecta a nuestro concepto de las bacterias como seres unicelulares individuales y justifica el desarrollo de una nueva disciplina dedicada a estudiar cómo se forman estas comunidades y qué nuevos fenotipos diferenciales presenta la comunidad con respecto a cada bacteria individual.

### Definición

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Figura 1). La primera reflexión que surge respecto a los biofilms es por qué han pasado desapercibidos durante tanto tiempo para las excelentes generaciones de microbiólogos que hemos tenido. Alguno de los lectores quizás este pensando que probablemente los biofilms se encuentran en ambientes muy reducidos que hasta ahora no han llamado demasiado la atención del mundo científico. Nada más lejos de la verdad. La presencia de biofilms es ubicua en la naturaleza, convivimos cotidianamente con ellos, tanto que quizás sea precisamente su ubicuidad la que les ha restado protagonismo. Quién no ha observado el material mucoso que recubre un jarrón en el que hemos tenido depositadas flores, el material resbaladizo que recubre las piedras de los lechos de los ríos, los cascos de los barcos o la superficie interna de una tubería. Otro ejemplo cotidiano de biofilm lo constituye la placa dental, cada día nos esforzamos por combatir la película de bacterias que recubre la superficie de los dientes para evitar un desarrollo excesivo de microor-



**Figura 1.** Fotografía de microscopia de barrido de un biofilm de *Salmonella enteritidis*.

ganismos que puede provocar un deterioro del esmalte dental. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms.

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias.

En los primeros trabajos sobre la estructura del biofilm, una de las cuestiones que surgía con mayor reiteración era cómo las bacterias del interior del biofilm podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno. Estudios realizados utilizando microscopia confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes

en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio.

**Biofilms bacterianos e infección**

Las enfermedades infecciosas agudas que han ocupado la atención de los microbiólogos durante el siglo pasado estaban causadas por bacterias patógenas especializadas con mecanismos específicos de patogenicidad, como la difteria, la tuberculosis, el cólera o la tos-ferina. Los antibióticos y vacunas desarrollados frente a estas bacterias han tenido una eficacia remarcable en su control. En la actualidad, el primer plano que ocupaban estas bacterias patógenas especializadas ha sido usurpado por bacterias ubicuas, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante

inmunización. Ejemplos de estas infecciones son las relacionadas con los implantes médicos y otras infecciones crónicas como otitis media, neumonía en pacientes con fibrosis quística, infecciones urinarias crónicas, infecciones de próstata y osteomielitis (Tabla 1). El análisis directo de los implantes y tejidos de estas infecciones muestra claramente que la bacteria responsable de la infección crece adherida sobre el tejido o el implante produciendo biofilms. Dentro del biofilm, las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos.

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes y la mayoría de las veces deben resolverse sustituyendo el

**Tabla 1.** Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucrados biofilms bacterianos (Costerton *et al.*, 1999)

<b>Infección o enfermedad</b>	<b>Especie bacteriana formadora de biofilm</b>
Caries dental	Cocos gram-positivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i> )
Periodonitis	Bacterias anaeróbicas orales gram-negativas
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esqueleto	Cocos gram-positivos (ej. <i>Staphylococcus</i> )
Fascitis necrotizante	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas, generalmente mezcladas
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias gram-negativas
Endocarditis de la válvula nativa	<i>Streptococcus</i> del grupo "viridans"
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Infecciones nosocomiales:	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gram-negativos
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Bucles esclerales	Cocos gram-positivos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos gram-positivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos gram-negativos
Peritonitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
DIU	<i>Actinomyces israeli</i> y muchos otros microorganismos
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Catéteres hickman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos gram-positivos
Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

implante. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido. ¿Cuáles son las razones de esta mayor resistencia a los antibióticos? Entre los mecanismos responsables de la resistencia se incluyen: (i) la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos; (ii) el crecimiento ralentizado de las bacterias del biofilm debido a la limitación de nutrientes; (iii) la existencia de microambientes que antagonizan con la acción del antibiótico; y (iv) la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico del biofilm que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (Mah y O'Toole, 2001). Por otro lado, hay que tener en cuenta que los antibióticos que utilizamos rutinariamente han sido seleccionados por su actividad frente a bacterias planctónicas. Así mismo, los ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos (antibiogramas) que se realizan rutinariamente en la clínica están diseñados para medir la susceptibilidad frente al antimicrobiano de la bacteria crecida de forma planctónica, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de un biofilm. Parece urgente que se introduzcan nuevos métodos de selección de antimicrobianos y se desarrollen protocolos sencillos diseñados para medir la susceptibilidad de una bacteria en biofilm a los antimicrobianos.

### **Crecimiento planctónico frente a crecimiento en biofilm**

Dependiendo de las condiciones ambientales, una misma bacteria puede crecer sésil, adherida a una superficie o crecer de forma planctónica nadando libremente en el medio líquido. Con un mismo genotipo, la bacteria expresa un distinto patrón de genes y presenta un distinto fenotipo. En los últimos cinco años muchos grupos de investigación han orientado sus esfuerzos a identificar tanto los genes responsables de la transición biofilm↔planctónica como de los genes necesarios para mantener la estructura del biofilm. Para la identificación de estos genes, casi todos los grupos han utilizado un ensayo de biofilm en placa de ELISA inicialmente descrito por el grupo de Christensen, pero que fue popularizado por el grupo de Roberto Kolter (O'Toole y Kolter, 1998). En este ensayo se produce una colección de mutantes en una cepa formadora de biofilm de la

**Íñigo Lasa Uzcudun** fue premio extraordinario de la licenciatura en Biología por la Universidad de Navarra. Realizó su trabajo de Tesis doctoral en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid desarrollando herramientas de manipulación genética para bacterias termófilas. Ha realizado estancias postdoctorales en el Instituto Max-Planck de Colonia y el Instituto Pasteur de París, donde realizó un estudio sobre el proceso de movilidad intracelular mediado por actina de *Listeria monocytogenes*. Desde 1998, es Profesor Titular de Microbiología y realiza su actividad investigadora en el Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales (UPNA-CSIC) sobre el análisis genético del proceso de formación de biofilms bacterianos.

especie que se este estudiando y se identifican los mutantes que han perdido la capacidad de producir biofilm sobre los pocillos de una placa de ELISA. El ensayo se puede automatizar de forma muy fácil y permite el análisis de un gran número de mutantes de una forma rápida y sencilla. Más recientemente, el desarrollo de la genómica y proteómica ha hecho que muchos grupos estén utilizando técnicas de *microarrays* o proteómica para identificar los genes que se expresan de forma diferente en condiciones planctónicas o de biofilm. Alternativamente, otros grupos han optado por utilizar nuevos métodos de selección de mutantes deficientes en la formación de biofilm como son las placas de calcofluor, la morfología colonial en placas con rojo congo, etc. (Solano *et al.*, 2002). Aunque existe una variación considerable entre los distintos ensayos, estos estudios muestran que hasta el 30% de los genes pueden estar diferencialmente expresados entre una bacteria crecida en condiciones planctónicas o de biofilm. Entre estos genes, de forma reiterada se encuentra una gran proporción de genes cuya función es desconocida, lo que indica que hay genes específicos del estilo de vida en biofilm, cuyo fenotipo hasta ahora no había podido ser visualizado.

### **La adherencia primaria y el desarrollo del biofilm**

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie. En bacterias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los *curli* son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad pare-

ce que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias gram-positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilm. En el caso de las bacterias gram-positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia primaria (Cucarella *et al.*, 2001; Toledo-Arana *et al.*, 2001). Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas (*mushrooms*) entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poli-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir, además de alginato, un polisacárido rico en glucosa que forma un película en la interfase medio aire, al que se ha denominado "*pellican*".

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. La liberación de las bacterias desde el biofilm es el proceso que menos se conoce. En el caso de *S. aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón (*icaADBC*) responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm. El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de  $10^{-6}$  y produce bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación del biofilm. Esto permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y poder escapar del biofilm. Como la inserción es un proceso reversible, el salto de la secuencia de inserción desde el

operón *ica* provocará una nueva variación de fase. Otra alternativa descrita en *S. aureus*, consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para este proceso de biosíntesis (Ubeda *et al.*, 2003). Algunos autores sostienen que en algunas bacterias el proceso de liberación desde el biofilm se produce gracias a la producción de enzimas que degradan de forma específica el exopolisacárido del biofilm. La presencia en distintos genomas de genes codificantes de hipotéticas proteínas (endoglucanasas) que podrían ser responsables de esta función avala esta hipótesis, pero es necesario confirmarla experimentalmente en el laboratorio.

### Regulación del proceso de formación del biofilm

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Entre ellos, un trabajo pionero con *P. aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biofilm está regulado por un proceso de "*quorum sensing*" o autoinducción. El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias gram-negativas el autoinductor es principalmente acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias gram-positivas el autoinductor son péptidos. Cuando se acumula en el medio una suficiente cantidad del autoinductor este activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. En relación con el *quorum sensing*, se ha identificado una molécula denominada "furanona", producida por el alga *Delisea pulchra*, con una estructura similar a las acilhomoserina lactonas. Estas moléculas en lugar de inducir la respuesta, bloquean el sistema de *quorum sensing* y la consiguiente formación de biofilm. En la actualidad se está intentando desarrollar inhibidores de la formación del biofilm basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica. De forma similar en *S. aureus* se ha descrito un péptido denominado RIP, que inhibe un sistema de *quorum sensing* y el proceso de formación del biofilm.

Aparte del *quorum sensing*, se ha demostrado que otros reguladores globales, como CsrA en *E. coli* y CytR en *V. cholerae*, son también determinantes importantes para el desarrollo de biofilm

de estas bacterias. En *S. aureus*, nuestro grupo ha demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo del biofilm de esta bacteria. Este trabajo encuentra por primera vez un nexo de unión entre la virulencia de la bacteria y el proceso de formación del biofilm (Valle *et al.*, 2003).

Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biofilm. Así, la activación de la síntesis de celulosa en *S. typhimurium* se produce por el activador alostérico c-diGMP. La concentración de este activador depende de dos actividades enzimáticas, diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, asociadas a enzimas que contienen los dominios GGDEF y EAL. En *S. typhimurium* existen al menos 18 proteínas que contiene estos dominios, y se desconoce si todas estas proteínas afectan a la regulación del proceso de síntesis de celulosa en distintas condiciones ambientales o si son responsables de otras funciones.

Finalmente, parece lógico que la formación de biofilm se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia de dos componentes que transmitan la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental.

### Cuestiones abiertas para el futuro

A pesar de lo mucho que hemos aprendido sobre los biofilms bacterianos en los últimos años, todavía es necesario definir con precisión cuál es el fenotipo "Biofilm". Sólo en ese momento se podrá determinar cuales son los cambios fisiológicos que tienen lugar en el mismo y cuáles son los requerimientos genéticos y los mecanismos de regulación de dicho proceso. Además, esto permitirá unificar los resultados experimentales obtenidos, porque en la actualidad parte de la confusión

existente puede deberse a que estamos incluyendo dentro del paraguas "Biofilm" distintos fenotipos que probablemente no en todos los casos, se ajustan exactamente a la misma definición de biofilm.

### Bibliografía

- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I.I., and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183: 2888-2896.
- Mah, T.F., and O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34-39.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43: 793-808.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R., and Lasa, I. (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 67: 4538-4545.
- Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49: 193-210.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.M., Amorena, B., Penades, J.R., and Lasa, I. (2003) SarA and not  $\sigma^B$  is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 48: 1075-1087.