

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 ≈ 135 °C + tostado ≈ 165 °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 ocratoxigénicos* 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* biseriados 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 quinoxifén. 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 mureín-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.