

Tesis Doctorales

Tecnologías limpias para el blanqueo libre de cloro de pastas de papel: Modificación enzimática de la lignina residual.

David Ibarra Trejo

Directores: **Profesor Angel T. Martínez Ferrer** y **Dra. Susana Camarero Fernández.**

Grupo de Investigación "Biodegradación de lignina y compuestos recalcitrantes", Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Las ligninas residuales de pastas kraft de eucalipto pueden ser aisladas satisfactoriamente y con alta pureza mediante hidrólisis con celulasas seguida de una purificación combinada utilizando proteasa y dos solventes de lignina (DMAC y NaOH 0,5 M). El proceso fue optimizado mediante un seguimiento de la composición de las diferentes fracciones utilizando FTIR y Py-GC/MS, y la pureza de las preparaciones finales fue confirmada mediante 2D-NMR. La lignina de madera de eucalipto (MWL) y las ligninas residuales de las pastas muestran un predominio de unidades S y subestructuras β -O-4'. Las ligninas residuales tienen una composición más similar a la MWL que a la lignina kraft, que presenta una relación S/G muy elevada, un alto contenido fenólico (estimado tras acetilación) y un predominio de subestructuras de tipo siringaresinol (analizadas mediante HSQC-NMR). Esto indica que la lignina modificada durante la cocción es liberada e incorporada a las lejías negras, mientras que la lignina residual en la pasta permanece escasamente alterada. Durante el blanqueo TCF se produce una modificación oxidativa de la lignina residual, que se traduce en un aumento de carbonilos (asignados a estructuras terminales de tipo muconato y acetosiringona en experimentos HSQC y HMBC) y eliminación de subestructuras de tipo siringaresinol dando lugar a un fuerte predominio de las subestructuras β -O-4' (casi 90% del total). Las alcaliligninas de cáñamo y lino analizadas mediante Py-GC/MS y FTIR presentan un predominio de unidades G frente a unidades S, mientras que en las de yute, sisal y abacá ocurre lo contrario, siendo su composición más semejante a la lignina de eucalipto. En la lignina de abacá existe una cantidad significativa de ácido *p*-cumárico. Éste se encuentra asociado a la lignina a través de enlaces éster, mientras que el ácido ferúlico está predominantemente enlazado por enlaces éter. Esta planta contiene además gran cantidad de ácido

p-cumárico no unido a la lignina, como se muestra por termoquimiolisis de las fibras.

Para el blanqueo TCF de pasta kraft se seleccionó una lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con alta estabilidad térmica y su capacidad para oxidar el HBT. La eficiencia del sistema lacasa-HBT deslignificando (y blanqueando) la pasta de eucalipto se demostró sobre pasta cruda y deslignificada con oxígeno, aunque en esta última los efectos fueron menos marcados. Las mejoras más significativas de las propiedades de la pasta tienen lugar durante las dos primeras horas del tratamiento y la temperatura del mismo puede incrementarse hasta 65°C sin que se inactive el sistema enzimático. El tratamiento lacasa-HBT se escaló a reactores de laboratorio presurizados y se investigaron diferentes posiciones para incorporar la etapa enzimática dentro de una secuencia de tipo industrial para el blanqueo TCF de pasta kraft de eucalipto. Las mejores propiedades finales de la pasta se obtienen utilizando una secuencia O-O-L-Q-PoP, en la que la etapa lacasa-mediador se incluye entre el doble oxígeno y quelato. Esta secuencia permite obtener unos valores de índice kappa y blancura significativamente superiores a los obtenidos en la secuencia TCF estándar, y mejora la porosidad al aire del papel sin alterar otras propiedades mecánicas y ópticas. La etapa enzimática dentro de la secuencia O-O-L-Q-PoP da lugar a una fuerte modificación de la lignina extraída de la pasta. Esta lignina residual está básicamente constituida por subestructuras β -O-4' y presenta un gran contenido en carbonilos conjugados por la oxidación de las cadenas laterales de la lignina durante el tratamiento lacasa-mediador. La etapa final de peróxido elimina la mayor parte de esta lignina alterada. Esto se debe principalmente a las condiciones alcalinas empleadas en esta etapa, como se demuestra al analizar la lignina residual y la lignina soluble tras un tratamiento alcalino. La disponibilidad de mediadores baratos y seguros para el medioambiente es uno de los requerimientos para la implementación industrial de los sistemas lacasa-mediador. Diferentes compuestos fenólicos derivados de la lignina (como siringaldehído y acetosiringona) representan una alternativa a los mediadores sintéticos (incluyendo los de tipo -NOH- como el HBT). Estos compuestos naturales pueden actuar como mediadores a concentraciones más bajas y, en el *screening* realizado sobre diferentes colorantes, resultaron superiores tanto en términos de eficiencia como de velocidad de oxidación.

Caracterización molecular y genética de la proteína P47 de *Neisseria meningitidis*: una alternativa para el desarrollo de una vacuna antimeningocócica universal.

Jesús Arenas Busto.

Directores: **Carlos Ferreirós Dominguez** y **Sandra Sánchez Poza.**

Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

El principal problema en la prevención de la meningitis meningocócica sigue siendo el desarrollo de una vacuna eficaz contra el serogrupo B. Las vacunas basadas en el polisacárido capsular, aunque han sido exitosas contra el resto de los serogrupos, no han podido dar respuesta a la prevención de la enfermedad causada por dicho serogrupo, por lo que en la actualidad las investigaciones se centran en el estudio de otras moléculas como las proteínas de membrana externa. No obstante, las exigentes características que debe cumplir un antígeno ideal, como una reducida variabilidad antigénica, exposición y expresión en la superficie o generación de anticuerpos funcionales son requerimientos difíciles de cubrir por los candidatos propuestos hasta el momento. En estudios previos hemos detectado, entre diferentes antígenos comunes al género *Neisseria*, un antígeno de 47 kDa (P47) capaz de generar anticuerpos en humanos tras la invasión del meningococo. En esta Tesis Doctoral nos hemos planteado identificarlo y estudiar sus características moleculares, genéticas y antigénicas en gran número de cepas, así como realizar una valoración preliminar de su posible utilización en una vacuna universal contra dicha enfermedad.

El antígeno P47 se correspondió con una lipoproteína ubicada en la membrana externa de la envuelta del patógeno bacteriano y también presente en *N. lactamica*, *N. sicca* y *N. subflava* (gen NMA0281, según cepa MC58 de *N. meningitidis*). Aunque no utilizamos ninguna cepa de *N. gonorrhoeae* en el estudio, dicho gen también está presente en una cepa secuenciada de esta especie (FA1090). El uso de diferentes medios de cultivo, el contexto genómico donde se ubica el gen y la similitud de dominios con otras proteínas conocidas nos indicó que se trata de una molécula implicada en el metabolismo de metales. La obtención de un suero específico contra la proteína desnaturalizada y los ensayos de reactividad cruzada realizados mediante las técnicas de *western-blotting*, *dot-blotting* y FCM (citometría de flujo) permitieron valorar su elevada expresión en *N. meningitidis*.

Mediante el empleo de estas técnicas también observamos que es accesible a los anticuerpos en estudios *in vitro* aunque muestra variabilidad inter- e intra- poblacional, posiblemente por la presencia o no de estructuras de la envuelta externa, su asociación a otras OMPs o la conformación de la molécula en la membrana. Sus epítomos lineales son altamente conservados entre todas las cepas incluidas en este estudio (33) y antigénicos tanto en humanos como en distintos animales de experimentación y tanto si se inmuniza en su condición nativa (vesículas de membrana externa) como desnaturalizada. La secuenciación completa del gen que la codifica y el uso de herramientas bioinformáticas, indicaron que la molécula está muy bien conservada estructuralmente y por lo tanto cumple algunas características genético-moleculares de un antígeno ideal. Los anticuerpos generados por la lipoproteína P47 han sido capaces de activar la vía clásica del complemento contra la cepa homóloga. La realización de nuevos ensayos permitirá valorar definitivamente su inclusión en una vacuna antimeningocócica universal, quedando así abierto el estudio de esta nueva alternativa contra la enfermedad.

Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos

Enrique Rodríguez Sánchez.

Directora: **María Jesús Martínez.**

Grupo de Investigación "Biodegradación de lignina y compuestos recalcitrantes", Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Los hongos de podredumbre blanca constituyen un interesante grupo de organismos con gran potencial biotecnológico debido a su habilidad para degradar el polímero de lignina y compuestos aromáticos estructuralmente relacionados. Esta potencialidad se basa principalmente en el sistema extracelular implicado en la degradación de lignina, compuesto por diferentes tipos de enzimas (peroxidasas y oxidasas extracelulares) y compuestos de baja masa molecular.

En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la capacidad de los hongos de podredumbre blanca del género *Pleurotus* para transformar y mineralizar los compuestos aromáticos 2,4-diclorofenol, compuesto organoclorado de naturaleza fenólica, y benzo(a)pireno, hidrocarburo aromático

policíclico de naturaleza no fenólica. Estos compuestos aromáticos están relacionados con problemas de contaminación en ecosistemas terrestres. Los resultados presentados en esta tesis muestran que los hongos del género *Pleurotus* son capaces de transformar y mineralizar estos compuestos, lo que confirma su potencial aplicación en estrategias de biorremediación.

Estudios anteriores mostraban ciertas dudas sobre la implicación de enzimas ligninolíticas en la degradación de este tipo de contaminantes medioambientales por hongos del género *Pleurotus*. Sin embargo, los estudios *in vitro* realizados en esta tesis con las enzimas ligninolíticas lacasa y peroxidasa versátil purificadas del hongo *Pleurotus eryngii*, así como la detección de estas actividades durante los procesos de transformación en cultivo, sugieren su implicación en la degradación de 2,4-diclorofenol y benzo(a)pireno y confirman los resultados obtenidos con otros basidiomicetos de podredumbre blanca.

Finalmente, se ha llevado a cabo una aproximación molecular al estudio de las actividades ligninolíticas secretadas por el hongo *P. eryngii*. En este sentido, se han identificado, clonado y secuenciado dos nuevos genes de lacasa en este hongo. Como complemento a la caracterización molecular, se han descrito los modelos estructurales de las enzimas codificadas por estos genes. Por último, se ha desarrollado un sistema de expresión heteróloga de uno de estos genes, aportándose nuevos datos acerca de la caracterización bioquímica y cinética de la enzima expresada, así como una herramienta en el estudio de las propiedades catalíticas de las lacasas.

Aplicación de la proteómica a la caracterización de mecanismos de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas.

Francisco Javier Fernández Acero.

Directores: **Jesús Manuel Cantoral Fernández e Inmaculada Vallejo Fernández de la Reguera.**

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz.

La proteómica ha venido siendo una de las tecnologías que mayor interés está despertando en los últimos años. Son numerosos los estudios realizados en distintos microorganismos, pero aún son escasos los estudios realizados en hongos

filamentosos. Por este motivo nos propusimos realizar una aproximación al proteoma de *Botrytis cinerea*, uno de los hongos fitopatógenos más importantes ya que afecta a una gran variedad de cultivos, en cualquier órgano de la planta y en cualquier estadio de desarrollo. En primer lugar se realizó la optimización del protocolo para la obtención y estudio del proteoma de *B. cinerea* con el objetivo de determinar un perfil proteómico de referencia que nos permitiera caracterizar las proteínas mayoritarias presentes en el hongo en condiciones de cultivo estándar, determinar si alguna de estas proteínas están relacionadas con la patogenicidad y buscar aquellas proteínas susceptibles de convertirse en dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fungicidas. Para ello se compararon distintos protocolos de extracción y solubilización de las proteínas del hongo. La solubilización de proteínas en tampón fosfato y posterior precipitación mediante acetona y ácido tricloroacético resultó ser el mejor de los métodos ensayados. Los geles 2-D teñidos con Coomassie revelaron entre 380-400 manchas proteicas (*spots*), comprendidos entre los 14 y 85 kDa y entre 5,4 y 7,7 de pI. Se seleccionaron 22 proteínas para su identificación, mediante MALDI-TOF o ESI-Trampa iónica. Entre estas proteínas se encontraron distintas formas de Malato deshidrogenasa (MDH) y Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GADPH).

En segundo lugar se realizó un estudio de proteómica de expresión diferencial, comparando el proteoma de dos cepas de *B. cinerea* con distinta virulencia. Los extractos proteicos fueron analizados mediante 2-DE, revelándose diferencias cuantitativas y cualitativas entre los perfiles proteicos de ambas cepas. Se identificaron 27 *spots*, 17 de los cuales fueron identificados como MDH, todas ellos específicos o sobreexpresados en la cepa más virulenta, lo que indicaría el posible papel de dichas enzimas en los procesos infectivos. La GADPH también es expresada de forma específica en la cepa más virulenta. Además se identificaron otras proteínas de interés como la ciclofilina o el factor transcripcional metE/metH. La diferencia de expresión proteica entre cepas pueden adscribirse a las diferencias de virulencia entre las cepas.

Una de las aplicaciones de la proteómica en determinar aquellas proteínas sobre las que diseñar fungicidas de bajo impacto ambiental. El trabajo finalizó determinando la eficacia de 7 nuevos fungicidas racionales contra dos especies de *Phytophthora* spp. para determinar la eficacia de estos compuestos y ampliar su espectro de actuación. En general, todos estos compuestos demostraron

su actividad fungistática, con porcentajes de inhibición del crecimiento por encima del 46% a 100 ppm. Estos datos indicarían un buen comportamiento de estos compuestos a escala terapéutica.

Las tres partes de las que consta esta Tesis Doctoral se han materializado en tres publicaciones: *Proteomics* (Fernández-Acero et al, 2006, 6, S88-S96), *Archives of Microbiology* (Fernández-Acero et al, 2006, enviado) y *Journal of Phytopathology* (Fernández-Acero et al, 2006, 154, 1-6).

Análisis genético del sistema de captación de hemo en *Vibrio anguillarum*: caracterización estructural y funcional

Susana Mouriño López

Directores: **Manuel Luis Lemos Ramos** y **Carlos Rodríguez Osorio**.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura y Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.

Vibrio anguillarum está considerado como uno de los patógenos bacterianos más importantes dentro de la acuicultura marina, siendo responsable de numerosos brotes de vibriosis en especies de gran valor comercial. Uno de sus principales factores de virulencia reside en la capacidad para obtener hierro del hospedador, pudiendo utilizar distintos compuestos de hemo como fuentes de hierro. Debido a su abundancia en el organismo hospedador, la existencia de mecanismos específicos para la captación y utilización de hemo, posiblemente, juegan un papel relevante en la supervivencia y multiplicación de este microorganismo durante el proceso infeccioso.

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de un *cluster* génico que codifica la captación y transporte de la molécula de hemo hasta el interior celular. Dicho sistema incluye genes homólogos a sistemas similares caracterizados en otras especies bacterianas. Los genes identificados codifican un receptor de membrana externa, HuvA, una proteína de transporte periplásmica, HuvB, y un sistema de transporte ABC formado por la proteína canal, HuvC, y una proteína con actividad ATPasa, HuvD. El proceso de transporte activo desde el medio extracelular hasta el espacio periplásmico depende de un sistema TonB de transducción de energía codificado por los genes *tonB1*, *exbB1* y *exbD1*, los cuales se transcriben

como un único operón junto con los genes *huvB*, *huvC* y *huvD*. Finalmente, el sistema se completa con un operón formado por los genes *huvX* y *huvZ*, cuyos productos, posiblemente citoplasmáticos, carecen hasta el momento de una función conocida. Todos estos genes, a excepción de *huvX*, resultaron esenciales para la utilización de compuestos de hemo como fuentes de hierro. La expresión de todo este sistema está regulada, al nivel transcripcional, por la concentración de hierro intracelular a través de la intervención del regulador negativo Fur. La organización espacial del sistema posee características únicas que lo diferencian de sistemas homólogos descritos en otras especies de la familia *Vibrionaceae* y constituye una posible evidencia de los reordenamientos genéticos derivados de procesos de evolución y diferenciación entre especies. Asimismo, la detección de los determinantes genéticos del *cluster* génico descrito en distintas cepas de *V. anguillarum* pertenecientes a los serotipos O1 al O10, confirma que la capacidad de utilización de hemo es una característica propia de la especie. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto una notable variabilidad genética intraespecífica en el sistema de utilización de hemo, ya que únicamente los genes *tonB1*, *exbB1* y *exbD1* están presentes en todas las cepas estudiadas.

La identificación de un segundo receptor de membrana externa, HuvS, con una baja similitud en la secuencia aminoacídica, aunque funcionalmente intercambiable con HuvA, sugiere también la posible existencia de dos líneas filogenéticas dentro de *V. anguillarum*, o bien la aparición de eventos de transferencia génica horizontal. La presencia universal del sistema TonB1 en todas las cepas y la identificación de secuencias nucleotídicas específicas de *V. anguillarum* sugiere su posible utilidad en el diseño de métodos de diagnóstico basados en la PCR. Los resultados obtenidos demuestran la existencia en *V. anguillarum* de dos complejos TonB denominados sistemas TonB1 y TonB2. A través del análisis de dos cepas pertenecientes al serotipo O1 y O2, respectivamente, se confirmó la participación de ambos sistemas en distintos mecanismos de obtención de hierro, siendo funcionalmente intercambiables en lo referente a la utilización de la molécula de hemo y ferricromo. Sin embargo el sistema TonB2 participa específicamente en el transporte de determinados complejos Fe-sideróforo y su mutación influye en el tiempo necesario para el completo desarrollo de la infección poniendo de manifiesto el papel que el mecanismo de captación y transporte de hemo juega en la evolución de la infección causada por *V. anguillarum*.

Caracterización bioquímica y molecular de una esterasa fúngica. Aplicación en la industria papelera.

Olga Calero Rueda

Directora: **María Jesús Martínez.**

Grupo de Investigación "Biodegradación de lignina y compuestos recalcitrantes", Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

En este trabajo se describe una nueva esterasa fúngica producida en cultivos líquidos del hongo *Ophiostoma piceae*. Los preparados enzimáticos comercializados hasta la fecha, aunque son eficaces en el control biológico del *pitch* en coníferas, no rinden buenos resultados en las maderas de frondosas. Este hecho motivó la búsqueda de una enzima capaz de degradar los compuestos involucrados en la formación de depósitos en estas especies vegetales. Estudios preliminares pusieron de manifiesto la actividad enzimática del hongo *O. piceae* sobre ésteres de *p*-nitrofenol y oleato de colesterilo. Éste último fue escogido como modelo de los ésteres de esteroides presentes en los extraíbles de la madera de *Eucalyptus globulus*, especie empleada mayoritariamente en España para la producción de pasta de papel.

Inicialmente se estudiaron varias actividades enzimáticas, utilizando un medio basal que contenía glucosa, como fuente de carbono y aceite de oliva, como inductor. En estas condiciones, se purificó y caracterizó una única enzima. Ésta mostraba una elevada afinidad sobre triglicéridos y ésteres de esteroides. La degradación de mezclas complejas de estos compuestos, presentes en los extraíbles y pastas de papel de diferentes especies vegetales, evidenciaron la posible aplicación de la esterasa en el control biológico del *pitch* en madera de frondosas y coníferas.

La determinación del extremo N-terminal de la proteína y péptidos internos, resultado de la hidrólisis de la misma, permitieron obtener una sonda de DNA específica. De esta forma, se pudo llevar a cabo la secuenciación del gen de la esterasa de *O. piceae*. La comparación con los genes de otras esterases mostró una homología de aproximadamente un 40% con los que codifican las lipasas de *Candida rugosa* y *Geotrichum candidum*. A partir de estos estudios, se pudieron identificar los residuos implicados en la catálisis de la enzima. El modelo estructural de la esterasa, construido a partir de las estructuras cristalográficas de las lipasas CRL1 y CRL3 de *C. rugosa*, permitió englobar a la enzima en la familia de las α/β hidrolasas, así como identificar algunos de los

aminoácidos responsables de su especificidad de sustrato.

Estudio de la respuesta del macrófago tras su interacción con *Candida albicans*. Análisis diferencial del proteoma y subproteomas.

Laura Martínez-Solano González

Directores: **Gloria Molero Martín-Portugués, Concha Gil García y César Nombela Cano.**

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Los macrófagos son células del sistema inmunitario cuyo papel en la lucha frente a las candidiasis sistémicas es fundamental. Por un lado, actúan como célula fagocítica y por otro, secretan citoquinas que son capaces de activar a otras células y de dirigir la respuesta inmunitaria. Además, pueden actuar como células presentadoras de antígenos. Con el fin de profundizar en el papel de dichas células, hemos realizado un estudio proteómico de la respuesta de una línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) frente a células de una cepa silvestre de *Candida albicans* (SC5314) tanto vivas como inactivadas por calor, ya que se ha descrito que ejercen efectos diferentes sobre la activación de los macrófagos y sobre células epiteliales.

Se ha estudiado la fagocitosis sobre ambos tipos celulares a 45 minutos, y se ha podido observar una condensación de F-actina alrededor de la levadura viva. A este mismo tiempo de interacción se ha estudiado la expresión diferencial de las proteínas del macrófago y se han detectado muchas diferencias de expresión, no sólo entre el estado basal de los macrófagos control (mapa 2D de referencia) y aquellos enfrentados, bien a las células inactivadas por calor o bien a las células vivas, sino que también se han observado muchas diferencias de expresión de proteínas entre ambos estímulos.

Hemos podido identificar 50 proteínas, de las cuales 30 son de expresión diferencial. Estas 30 proteínas tienen funciones diversas: morfogénesis, transducción de señales, destino celular, síntesis de proteínas, metabolismo, homeostasis del hierro y un canal de cloro. Si atendemos a las funciones de estas proteínas de expresión diferencial, en conjunto, podemos decir que, tras 45 minutos de interacción, tanto las células vivas como inactivadas de *C. albicans* provocan en el macrófago un aumento de las proteínas implicadas en la reorganización del citoesqueleto y de algunas posiblemente implicadas en protección frente a la

apoptosis. Sin embargo, las células vivas provocan una reacción fundamentalmente pro-inflamatoria, a diferencia de las inactivadas por calor, frente a las cuales la respuesta es fundamentalmente anti-inflamatoria. Por otro lado, estas células inactivadas por calor estimulan rutas metabólicas como la glicólisis o la ruta de los ácidos tricarbóxicos.

Con el fin de profundizar en la reacción de los macrófagos frente a *C. albicans*, hemos puesto a punto la metodología para realizar el estudio de cuatro fracciones subcelulares: citosol, organela, núcleo y citoesqueleto y hemos aumentado el tiempo de interacción a tres horas. El estudio de expresión diferencial de las proteínas de los diferentes subproteomas se está realizando con tecnología DIGE. Se han estudiado tres de ellas, observándose que la fracción de citoesqueleto es la que aparece más profundamente alterada a las tres horas de interacción.

Este trabajo abre grandes perspectivas en el estudio de la interacción macrófago-*C. albicans*, pudiendo permitir el descubrimiento de nuevas estrategias en la terapia de las candidiasis sistémicas y de nuevos factores de virulencia de la levadura y, por tanto, de nuevas dianas antifúngicas.

Parte de este trabajo ha sido publicado en: Martínez-Solano *et al.*, Proteomics. 2006 Apr;6 Suppl 1:S133-44.

Caracterización genómica y proteómica del estrés nitrosativo en *Candida albicans*. Importancia de la mitocondria.

Rosa Hernández Barbado

Directoras: **Rosalía Diez-Orejas** y **Concha Gil García**.

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

La importancia que han adquirido las candidiasis invasivas, junto a las limitaciones de los fármacos actuales y la ausencia de métodos de diagnóstico rápido y específico hace necesario profundizar en las investigaciones sobre la patogenicidad de *Candida albicans*. Datos presentes en la bibliografía han demostrado la importancia de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) liberadas por los fagocitos en el control de las infecciones causadas este hongo. Es este sentido, el principal objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de los mecanismos que emplea *C. albicans* para adaptarse al estrés nitrosativo

para sobrevivir en el hospedador, así como las dianas moleculares más afectadas que van a causar la muerte del hongo. Para ello se han empleado distintas aproximaciones genómicas (*microarrays* de DNA) y proteómicas (2D-PAGE y espectrometría de masas).

En primer lugar se ha elaborado un mapa de referencia (2D-PAGE) de extractos totales de hifas de *C. albicans* crecidas en condiciones similares a las que se dan en el hospedador, disponible en la base de datos COMPLUYEAST-2DPAGE (Hernández *et al.* 2004). En dichas condiciones de crecimiento se ha establecido un modelo de estrés nitrosativo en *C. albicans* basado en estudios de toxicidad utilizando el compuesto SIN1 como donador de peroxinitrito (exposición de 2.5 mM de SIN1 durante 6 h, 70% de mortalidad).

Una de las principales dianas moleculares de daño del peroxinitrito son las proteínas. En este aspecto se ha analizado la presencia y niveles de proteínas oxidadas y nitradas en las células de *C. albicans* tras el tratamiento con SIN1, cuya identificación condujo al establecimiento de unos biomarcadores del daño.

Se han estudiado las alteraciones en la expresión de genes y proteínas causadas por este modelo de estrés para conocer en mayor profundidad los grupos funcionales más afectados en respuesta a dicho estrés. La integración de los resultados de expresión diferencial genómicos y proteómicos, apoyados por las observaciones microscópicas y el estudio de la mitocondria, destacan como más afectados los procesos de morfogénesis y diferenciación celular, metabolismo y energía, control de la transcripción, síntesis de proteínas, defensa frente a estrés oxidativo y respiración mitocondrial.

Los estudios realizados sobre la respiración celular y sobre el efecto inhibitorio del peroxinitrito sobre los complejos de la cadena respiratoria, corroboran la alteración de la mitocondria en presencia de especies reactivas de nitrógeno. El aumento detectado en la expresión de la oxidasa alternativa (a nivel genómico y proteómico AOX2/Aox2p), responsable del componente alternativo de la respiración, demuestra el empleo de esta ruta alternativa por la célula en estas condiciones de estrés. Esta inducción en condiciones de demanda energética, apoya su posible función antioxidante al contribuir al control de la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria, pudiendo suponer un factor de protección fundamental para *Candida* para sobrevivir al estrés nitrosativo en el hospedador.