

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

## Tesis doctoral

# Identificación inmunoproteómica de antígenos de *Lomentospora prolificans* con interés diagnóstico y terapéutico

Idoia Buldain Garriz

### Directores

Dr. Fernando L. Hernando Echevarría

Dr. Andoni Ramírez García



Leioa, Enero 2020



## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este trabajo de Tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador No Doctor concedida por Gobierno Vasco en 2015. El trabajo presentado aquí ha sido parcialmente financiado por los proyectos de investigación “Mimogen-microbiología molecular y genómica: desarrollo de metodologías para el estudio genómico, proteómico, epidemiológico y de diagnóstico de bacterias y hongos basadas en técnicas moleculares y herramientas bioinformáticas” (GIU12/44), “Biomica de hongos y bacterias” (GIU15/36) y “Microbiomics-Biomica de hongos y bacterias: implicaciones en el medioambiente” (PPG17/41) de la universidad del País Vasco (UPV/EHU).



## Índice

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
Abreviaturas .....	1
Laburdurak.....	3
Introducción .....	5
1.1. Morfología .....	7
1.2. Taxonomía .....	8
1.3. Epidemiología .....	9
1.3.1. Epidemiología ambiental.....	9
1.3.2. Epidemiología clínica .....	11
1.4. Población de riesgo .....	12
1.4.1. Inmunodeprimidos .....	12
1.4.2. Inmunocompetentes .....	13
1.5. Manifestaciones clínicas.....	14
1.5.1. Colonización.....	14
1.5.2. Infección localizada .....	15
1.5.3. Infección diseminada.....	16
1.6. Tratamiento y mecanismos de resistencia de <i>L. prolificans</i> .....	16
1.6.1. Tratamiento de las infecciones causadas por <i>L. prolificans</i> .....	18
1.6.2. Mecanismos de resistencia de <i>L. prolificans</i> .....	20
1.6.3. Tratamientos alternativos frente a <i>L. prolificans</i> .....	21
1.6.4. Desarrollo de vacunas y de anticuerpos monoclonales .....	22
1.7. Diagnóstico e Identificación .....	24
1.7.1. Diagnóstico de las enfermedades causadas por <i>Scedosporium/Lomentospora</i> .....	24
1.7.2. Identificación de las especies del complejo <i>Scedosporium/Lomentospora</i> .....	28
1.8. Respuesta inmune del hospedador .....	30
1.9. Factores de virulencia.....	34
Justificación y objetivos .....	37
Material y métodos .....	41

3.1. Microorganismos y condiciones de cultivo .....	43
3.2. Identificación de <i>Scedosporium boydii</i> .....	43
3.2.1 Extracción de ADN .....	43
3.2.2 Selección de la secuencia nucleotídica y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	44
3.3. Recogida de muestras humanas.....	45
3.4. Desarrollo de modelos murinos de infección diseminada y recogida de muestras.....	45
3.4.1. Animales .....	45
3.4.2. Supervisión de los animales .....	45
3.4.3. Modelos de infección murina.....	46
3.4.3.1. Desarrollo de un modelo de infección murina diseminada por <i>L. prolificans</i> .....	46
3.4.3.2. Desarrollo del modelo de inmunización frente a <i>L. prolificans</i> .....	46
3.4.3.3. Estudio comparativo de infecciones murinas intravenosas producidas por <i>L. prolificans</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	46
3.4.4. Procesamiento de las muestras animales .....	47
3.5. Obtención de extractos proteicos .....	47
3.5.1. Extracción de proteínas de conidios de <i>L. prolificans</i> .....	47
3.5.2. Extracción de proteínas asociadas a la pared celular de los conidios de <i>L. prolificans</i> .....	47
3.5.3. Recogida del extracto proteico total .....	48
3.5.4. Estudio del secretoma de <i>L. prolificans</i> .....	48
3.5.4.1. Recogida de las proteínas secretadas .....	48
3.5.4.2. Comprobación integridad celular y ausencia de proteínas citoplasmáticas .....	49
3.5.4.3. Comparación de las metodologías .....	49
3.6. Detección de IgA salivar por ELISA .....	49
3.7. Electroforesis .....	50
3.7.1. Electroforesis unidimensional (1DE) .....	50
3.7.2. Electroforesis bidimensional (2DE).....	50
3.7.2.1. Precipitación de las proteínas .....	50

3.7.2.2. Isoelectroenfoque (IEF) y 2DE .....	51
3.8. Detección de proteínas y de antígenos .....	52
3.8.1. Detección de proteínas.....	52
3.8.2. Detección antigénica .....	52
3.8.2.1. Detección de antígenos reconocidos por saliva humana.....	52
3.8.2.2. Detección de antígenos reconocidos por ratones infectados .....	53
3.9. Identificación de proteínas inmunorreactivas.....	53
3.10. Electroelución de la proteína de choque térmico 70 kDa (Hsp70).....	54
3.11. Análisis de la localización, función y homología de antígenos de <i>L. prolificans</i> mediante herramientas bioinformáticas.....	54
3.12. Reactividad cruzada de IgA salivar entre <i>A. fumigatus</i> y <i>L. prolificans</i> .....	55
3.13. Análisis estadístico.....	55
Resultados .....	57
4.1. Identificación de los antígenos de conidios de <i>L. prolificans</i> reconocidos por IgA salivar de donantes sanos. Estudio de su prevalencia, localización y reactividad cruzada con <i>A. fumigatus</i> .....	59
4.1.1. Prevalencia y estudio de la reactividad de antígenos de <i>L. prolificans</i> reconocidos por IgA salivar de donantes sanos .....	59
4.1.2. Estudio de la localización y la funcionalidad de los antígenos de <i>L. prolificans</i> .....	59
4.1.3. Análisis comparativo del reconocimiento de las IgA salivares frente a <i>L. prolificans</i> , <i>S. boydii</i> y <i>S. aurantiacum</i> en una población sana.....	63
4.1.4. Estudio de la reactividad cruzada entre <i>A. fumigatus</i> y <i>L. prolificans</i> .....	66
4.2. Desarrollo de un modelo murino de infección diseminada por <i>L. prolificans</i> y comparación de su patogenicidad frente a <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	67
4.2.1. Estudio de la infección desarrollada en ratones tras la administración de diferentes dosis de conidios de <i>L. prolificans</i> .....	67
4.2.2. Estudio comparativo de infecciones murinas intravenosas producidas por <i>L. prolificans</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	71
4.3. Estudio de la respuesta humoral de ratones infectados por <i>L. prolificans</i> .....	76
4.3.1. Optimización de la recogida del secretoma de <i>L. prolificans</i> para su posterior análisis mediante 2DE.....	76

4.3.2. Estudio de la intensidad de la respuesta humoral de ratones inoculados con la dosis de contacto e infectiva de <i>L. prolificans</i> frente al secretoma y el extracto total del hongo.....	78
4.3.3. Identificación de los antígenos inmunodominantes del secretoma de <i>L. prolificans</i> reconocidos por ratones inoculados con dosis de contacto e infectiva ....	79
4.3.4. Identificación de los antígenos inmunodominantes del extracto proteico total de <i>L. prolificans</i> reconocidos por ratones inoculados con dosis de contacto e infectiva .....	83
4.3.5. Estudio de la localización, función y homología de los antígenos de <i>L. prolificans</i> .....	88
4.4. Estudio de la respuesta humoral de ratones infectados con <i>L. prolificans</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	89
4.4.1. Identificación de los antígenos del secretoma de <i>L. prolificans</i> reconocidos por sueros de ratones infectados con <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	90
4.4.2. Identificación de los antígenos del extracto total de <i>L. prolificans</i> reconocidos por sueros de ratones infectados con <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	94
4.4.3. Estudio de la prevalencia del reconocimiento de la Hsp70.....	96
4.5. Desarrollo de un modelo de inmunización frente a las infecciones producidas por <i>L. prolificans</i> .....	97
Discusión.....	101
5.1. Identificación de los antígenos más prevalentes de conidios de <i>L. prolificans</i> reconocidos por IgA salivar de donantes sanos, estudio de su localización y su reactividad cruzada con <i>A. fumigatus</i> .....	103
5.2. Desarrollo de un modelo de infección murina diseminada por <i>L. prolificans</i> y comparación de su patogenicidad frente a <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> ..	106
5.3. Identificación de los antígenos inmunodominantes del secretoma y del extracto total de <i>L. prolificans</i> reconocidos por ratones inoculados con la dosis de contacto e infectiva .....	108
5.4. Estudio de la respuesta humoral de ratones tras una infección intravenosa con <i>L. prolificans</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	114
5.5. Desarrollo de un modelo de inmunización frente a las infecciones producidas por <i>L. prolificans</i> .....	117
Conclusiones.....	119
Sarrera .....	123



1.1. Morfologia .....	125
1.2. Taxonomia .....	126
1.3. Epidemiologia .....	127
1.3.1. Ingurumen-epidemiologia .....	127
1.3.2. Epidemiologia klinikoa.....	129
1.4. Arriskuko biztanleria.....	130
1.4.1. Immunogutxituak .....	130
1.4.2. Immunokonpetenteak.....	131
1.5. Manifestazio klinikoak .....	132
1.5.1. Kolonizazioa .....	132
1.5.2. Infekzio lokalizatua .....	132
1.5.3. Infekzio barreiatua.....	133
1.6. <i>L. proliferans</i> en tratamendua eta erresistentzia-mekanismoak .....	134
1.6.1. <i>L. proliferans</i> ek eragindako infekzioen tratamendua .....	135
1.6.2. <i>L. proliferans</i> en erresistentzia-mekanismoak .....	137
1.6.3. <i>L. proliferans</i> en aurkako tratamendu alternatiboak.....	138
1.6.4. Txertoen eta antigorputz monoklonalen garapena.....	140
1.7. Diagnostikoa eta identifikazioa .....	141
1.7.1. <i>Scedosporium/Lomentosporak</i> eragindako gaixotasunen diagnostikoa .....	141
1.7.2. <i>Scedosporium/Lomentospora</i> konplexuko espezieen identifikazioa .....	145
1.8. Ostalariaren erantzun immunea .....	147
1.9. Birulentzia-faktoreak .....	151
Justifikazioa eta helburuak .....	153
Material eta metodoak.....	157
3.1. Mikroorganismoak eta hazkuntza-baldintzak .....	159
3.2. <i>Scedosporium boydi</i> ren identifikazioa.....	159
3.2.1 DNA eskuratzea .....	159
3.2.2 Sekuentzia nukleotidikoa hautatzea eta polimerasaren kate-erreakzioa (PCR)	
.....	160
3.3. Giza laginak biltzea .....	160

3.4. Saguetan Infekzio barreiatuen garapena eta laginen bilketa.....	161
3.4.1. Animaliak .....	161
3.4.2. Animaliaen gainbegiratzea .....	161
3.4.3. Infekzio murinoen ereduak .....	161
3.4.3.1. Saguen <i>L. prolificansen</i> infekzio barreiatuaren garapena .....	161
3.4.3.2. <i>L. prolificanse</i> eragindako infekzioendako immunizazio-eredu baten garapena.....	162
3.4.3.3. <i>L. prolificans</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> eta <i>A. fumigatus</i> onddoek saguetan eragindako infekzio barreiatuen azterketa konparatiboa.....	162
3.4.4. Animalia laginen prozesatzea .....	162
3.5. Proteina aterakinak .....	163
3.5.1 <i>L. prolificansen</i> konidioen proteinen erauzketa.....	163
3.5.2 <i>L. prolificans</i> konidioen zelula-paretako proteinen erauzketa.....	163
3.5.3 Proteina aterakin totalaren erauzketa .....	163
3.5.4 <i>L. prolificansen</i> sekretomaren azterketa.....	164
3.5.4.1 Sekretomaren bilketa .....	164
3.5.4.2 Osotasun zelularra eta proteina zitoplasmaticoen absentsia egiaztatzea .....	164
3.5.4.3 Metodologiaren alderaketa .....	165
3.6. ELISA bidezko listuko IgAren detekzioa .....	165
3.7. Elektroforesia .....	165
3.7.1. Dimentsio bateko elektroforesia (1DE) .....	165
3.7.2.1. Proteinen prezipitazioa .....	166
3.7.2.2. Isoelektroenfokea (IEF) eta 2DEa .....	166
3.8. Proteina eta antigenoen detekzioa .....	167
3.8.1. Proteinen detekzioa .....	167
3.8.2. Antigenoen detekzioa.....	167
3.8.2.1. Giza-listuek ezagututako antigenoen detekzioa .....	168
3.8.2.2. Infektatutako saguek ezagututako antigenoen detekzioa .....	168
3.9. Proteina immunoerreaktiboaren identifikazioa .....	168
3.10. Shock termikoaren proteina 70 kDa-aren elektroeluzioa (Hsp70).....	169

3.11. <i>L. proliferans</i> antigenoen kokapena, funtzioa eta homologiaren analisi bioinformatikoa .....	170
3.12. <i>A. fumigatus</i> eta <i>L. proliferans</i> arteko giza-listuko IgAren erreaktibilitate gurutzatuaren azterketa .....	170
3.13. Analisi estatistikoa .....	170
Emaitzak .....	173
4.1. Emaila osasuntsuen listuko IgAk ezagututako <i>L. proliferans</i> konidioen antigenoen identifikazioa. Hauen prebalentziaren, kokapenaren eta <i>A. fumigatus</i> ekin daukaten erreaktibilitate-gurutzatuaren azterketa .....	175
4.1.1. Emaila osasuntsuen listuko IgAk ezagututako <i>L. proliferans</i> antigenoen prebalentzia eta erreaktibotasunaren azterketa .....	175
4.1.2. <i>L. proliferans</i> antigenoen kokapena eta funtzioen azterketa .....	175
4.1.3. Listuko IgAaren <i>L. proliferans</i> , <i>S. boydii</i> eta <i>S. aurantiacum</i> espezieen ezagutze-konparatiboa populazio osasuntsu batean .....	179
4.1.4. <i>A. fumigatus</i> eta <i>L. proliferans</i> arteko erreaktibilitate gurutzatuaren azterketa .....	182
4.2. <i>L. proliferans</i> ek eragindako infekzio barreiatuaren garapena saguetan eta patogeniaren alderaketa <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> eta <i>A. fumigatus</i> espezieekin .....	183
4.2.1. Saguei <i>L. proliferans</i> konidioen dosi desberdinak administratu ondoren garatutako infekzioen azterketa .....	183
4.2.2. <i>L. proliferans</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> eta <i>A. fumigatus</i> espezieek saguetan eragindako zain barneko infekzioen azterketa konparatiboa .....	186
4.3. <i>L. proliferans</i> ekin infektatutako saguen erantzun humoralaren azterketa .....	191
4.3.1. <i>L. proliferans</i> sekretomaren bilketaren optimizazioa, ondoren 2DE bidez aztertzeke .....	191
4.3.2. Kontaktu-dosiarekin eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguek ezagututako <i>L. proliferans</i> sekretomaren eta proteina aterakin totalaren antigeno immunodominanteen identifikazioa .....	193
4.3.3. Kontaktu-dosia eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguek ezagututako <i>L. proliferans</i> sekretomaren antigeno immunodominanteen identifikazioa .....	194
4.3.4. Kontaktu- eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguek ezagututako <i>L. proliferans</i> aterakin totalaren antigeno immunodominanteen identifikazioa .....	198
4.3.5. <i>L. proliferans</i> antigenoen kokapena, funtzioa eta homologiaren azterketa	203

4.4. <i>L. proliferans</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> eta <i>A. fumigatus</i> ekin infektatutako saguen erantzun humoralaren azterketa .....	204
4.4.1. <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> eta <i>A. fumigatus</i> espezieekin infektatutako saguen serumek ezagututako <i>L. proliferans</i> en sekretomaren antigenoen identifikazioa .....	206
4.4.2. <i>S. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> eta <i>A. fumigatus</i> espezieekin infektatutako saguen serumek ezagututako <i>L. proliferans</i> en aterakin totalaren antigenoen identifikazioa .....	209
4.4.3. Hsp70aren aurkako erreatibitatearen prebalentziaren azterketa .....	211
4.5. Immunizazio-eredu baten garapena <i>L. proliferans</i> ek eragindako infekzioen aurrean .....	212
Eztabaida (laburtuta) .....	215
Ondorioak .....	219
Bibliografia .....	223
Material suplementario .....	253
Material osagarria .....	259

# Abreviaturas

1DWB	Western Blot unidimensional
2DWB	Western Blot bidimensional
1DE	electroforesis unidimensional
2DE	electroforesis bidimensional
ADN	ácido desoxirribonucleico
ACN	acetonitrilo
AF	ácido fórmico
ANOVA	análisis de varianza
APD	agar patata dextrosa
ARN	ácido ribonucleico
CBB	Coomassie azul brillante
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMI <sub>50</sub>	concentración mínima inhibitoria necesaria para inhibir el 50% de los aislamientos
CPD	caldo patata dextrosa
CPY	carboxipeptidasa Y
BG	1,3-β-D-glucano
Dpp	dipeptidil-peptidasa
ECMM	Confederación Europea de Micología Médica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ESCMID	Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas
FQ	fibrosis quística
GH16	glicosil hidrolasa perteneciente a la familia GH16
HAD	haloácido dehalogenasa
Hp	proteína hipotética
HRP	peroxidasa de rábano picante
Hsp70	proteína de choque térmico 70 kDa
IEF	isoelectroenfoque
ISHAM	Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal
ITS	espaciadores internos transcritos
LC-MS/MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
LDH	lactato deshidrogenasa
mAb	anticuerpos monoclonales
MALDI	desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
MDH	malato deshidrogenasa
MEP	cys-gly metalopeptidasa
Mr	masa molecular relativa
NCBI	Centro Nacional para la Información en Biotecnología
NCT	N-clorotaurina

NUDC	proteína de migración nuclear nudC
NFU1	proteína andamio del grupo hierro-azufre NFU1
PBS	tampón fosfato salino
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pI	punto isoeléctrico
PMN	polimorfonuclear
PRM	peptidomannano
PVDF	difluoruro de polivinilideno
RanBP1	proteína con dominio de unión a la proteína Ran
ROS	especies reactivas de oxígeno
SAHH	S-adenosilhomocisteína hidrolasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema Nervioso Central
ss-Tween 20	solución salina-Tween 20 (0,9% NaCl, 0,02% Tween 20)
TBS	solución salina tamponada con Tris
TBST	solución salina tamponada con Tris con 0,05% (v/v) Tween 20
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampón de elución
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TOF	tiempo de vuelo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Vps28	proteína de clasificación vacuolar 28
WB	Western Blot

# Laburdurak

1DWB	dimensio bateko Western Blota
2DWB	bi dimensioko Western Blota
1DE	dimensio bateko elektroforesia
2DE	bi dimentsioko elektroforesia
ACN	azetonitriloa
AF	azido formikoa
ANOVA	bariantzaren analisia
APD	agar patata dextrosa
ARN	azido erribonukleikoa
BG	1,3- $\beta$ -D-glukanoa
CBB	Coomassie urdin distiratsua
CECT	Espainiako Kultibo-tipoen Bilduma (Colección Española de Cultivos Tipo)
CHAPS	3- [(3-kolamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonatoa
CPY	karboxipeptidasa Y
DNA	azido desoxierribonukleikoa
Dpp	dipeptidil-peptidasa
EDTA	azido etilendiaminotetraazetikoa
ECMM	Mikologia Medikoko Europako Konfederazioa
ESCMID	Mikrobiologia Klinikoaren eta Gaixotasun Infekziosoen Europako Elkarte
FK	fibrosi kistikoa
GH16	GH16 familiako glikosil hidrolasa
GKI	Gutxieneko Kontzentrazio Inhibitoria
GKI <sub>50</sub>	isolamenduen % 50a inhibitzeko beharrezkoa den gutxieneko kontzentrazio inhibitoria
gs-Tween 20	gatz soluzio-Tween 20 (% 0,9 NaCl, % 0,02 Tween 20)
HAD	haloazido dehalogenasa
HIES-a	hartutako immunoeskasiaren sindromea
Hp	proteina hipotetiko
HRP	errefau pikantearen peroxidasa
Hsp70	shock termikoaren proteina 70 kDa
IEF	isoelektroenfokea
ISHAM	Giza eta Animalien Mikologiaren Nazioarteko Elkarte
ITS	transkribatutako barne-tarteak
LC-MS/MS	kromatografia likidoa -masen espektrometria tandemean
LDH	laktato deshidrogenasa
mAb	antigorputz monoklonalak
MALDI	laserraren bidezko desortzio-ionizazio matrizez lagundua
MDH	malato deshidrogenasa
MEP	cys-gly metalopeptidasa
Mr	masa molekular erlatiboa

NCBI	Bioteknologiako Informaziorako Zentro Nazionala
NCT	N-klorotaurina
NFU1	NFU1 burdin-sufrearen taldeko andamio-proteina
NUDC	nudC migrazio nuklearreko proteina
NSZ	nerbio-sistema zentrala
PBS	tanpoi fosfato gatzduna
PCR	polimerasaren kate-erreakzioa
PDS	patata dextrosa salda
PCNA	ugalketa zelularren nukleoko antigenoa
pI	puntu isoelektrikoa
PMN	polimorfonuklearra
PRM	peptidoramnomananoa
PVDF	polibinilideno difluoruroa
RanBP1	Ran proteinari lortzeko domeinua duen proteina
ROS	oxigeno-espezie erreaktiboak
SAHH	S-adenosilhomozisteina hidrolasa
SDS	sodio dodezilsulfatoa
TBS	Tris duen gatz-soluzioa
TBST	Tris duen gatz-soluzioa % 0,05 (b/b) Tween 20rekin
TCA	azido trikloroazetikoa
TE	eluzio tanpoia
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TOF	hegal-di-denbora
UKE	Unitate Kolonia Eratzaile
Vps28	saillkapen bakuolarraren proteina 28
WB	Western Blot



---

## **Introducción**

---



*Lomentospora prolificans*, anteriormente conocido como *Scedosporium prolificans*, es un hongo filamentoso patógeno principalmente aislado en el suelo de zonas con alta actividad humana [1]. Ha sido catalogado como patógeno emergente debido al aumento de casos clínicos que se han detectado en las últimas décadas [2].

Esta especie se clasifica en la familia *Microascaceae*, orden *Microascales*, phylum *Ascomycota*. Dentro de la familia *Microascaceae*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii*, *Scedosporium aurantiacum* y *L. prolificans* son las especies más relevantes en la clínica. Entre ellas, *L. prolificans* se caracteriza por generar infecciones diseminadas en pacientes gravemente inmunodeprimidos, en particular en aquellos con neoplasias malignas, con una elevada mortalidad de hasta el 87,5% [3]. Por otro lado, mientras que las infecciones generadas por *S. apiospermum* y *S. boydii* se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo, la distribución global de los casos clínicos provocados por *L. prolificans* es muy limitada, habiéndose detectado principalmente en España y Australia, y más recientemente en otros países Europeos, EEUU, Corea, Japón, India y Brasil [4–9].

### **1.1. Morfología**

En cuanto a su morfología, microscópicamente *L. prolificans* se caracteriza por producir hifas hialinas septadas y conidióforos con forma de matraz de los cuales emerge un pequeño grupo de conidios unicelulares. Estos conidióforos basalmente hinchados representan una importante característica taxonómica de esta especie. Los conidios son de color hialino a marrón pálido, de forma ovoide a piriforme, con la base truncada y estrecha, y con un tamaño de 2 a 5 por 3 a 13  $\mu\text{m}$ . Al contrario que las especies relacionadas filogenéticamente, no se ha descrito que este hongo presente otras formas asexuales, como conidióforos de tipo *Graphium*, ni formas de reproducción sexual [10].

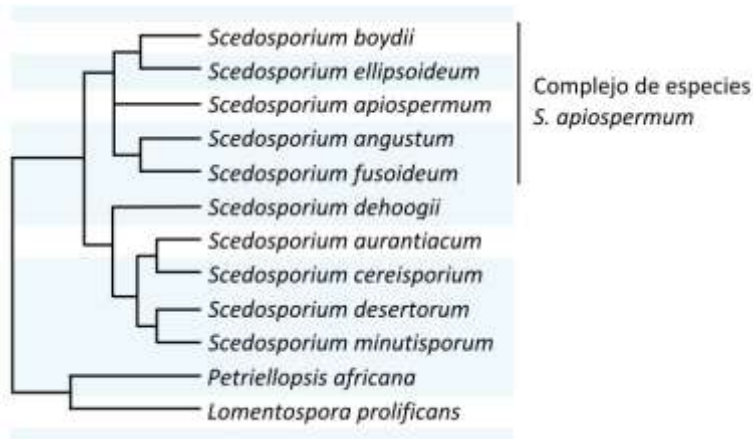
Por otro lado, las colonias de este hongo crecen de moderado a rápido a 25°C en medio Sabouraud y maduran en 5 días, pudiendo medir hasta 3 cm en una semana. Estas colonias son planas, con una superficie suave y húmeda, con color blanco que posteriormente torna del verde-oliva parduzco al negro cuando la conidiación se convierte evidente. El reverso torna a marrón oscuro [10].

## 1.2. Taxonomía

El hongo *L. prolificans* fue aislado y descrito por primera vez en 1974 por Hennebert y Desai en el suelo de un invernadero [11]. Una década después, Malloch y Salkin describieron una nueva especie de *Scedosporium* aislada de una muestra de biopsia de hueso de un niño inmunocompetente, especie que fue denominada como *S. inflatum* debido a sus características células conidiógenas infladas. Posteriormente, otros autores sugirieron una sinonimia entre *S. inflatum* y *L. prolificans* debido a sus características morfológicas y moleculares similares. Estos hallazgos dieron como resultado la propuesta de combinar *S. inflatum* y *L. prolificans* en el nuevo binomio *Scedosporium prolificans* [10,12].

En la última década, la nomenclatura del grupo comprendido en los géneros *Pseudallescheria* y *Scedosporium* ha sufrido numerosos cambios como consecuencia directa del desarrollo de la taxonomía y la introducción de la filogenética molecular. Hasta julio de 2011 la nomenclatura de hongos permitía el uso de múltiples nombres que describían las etapas asexuales (anamorfo) y sexuales (teleomorfo) de un mismo hongo. Sin embargo, en 2011 la comunidad científica logró un acuerdo general para eliminar gradualmente esta doble nomenclatura, tal y como se establece en la "Declaración de Ámsterdam en Nomenclatura Fúngica" [13].

Tras el movimiento *One Fungus = One Name* y de estudios de secuenciación, los miembros del grupo de trabajo de la ECMM/ISHAM sobre las infecciones de *Pseudallescheria/Scedosporium* reorganizaron la taxonomía de la familia *Microascaceae* y, en particular, del complejo de especies *Pseudallescheria/Scedosporium*. Estos autores encontraron inconveniente el uso de dos nombres, *Pseudallescheria* y *Scedosporium*, para referirse a las diferentes etapas del ciclo de vida de un mismo hongo, sexual y asexual, respectivamente. Por ello, propusieron el uso de *Scedosporium* como nombre único para el género, ya que es el término más antiguo [14]. Actualmente, el género *Scedosporium* contiene las siguientes 10 especies *S. aurantiacum*, *S. minutisporum*, *S. desertorum*, *S. cereisporum* y *S. dehoogii*, además del complejo *S. apiospermum* que comprende *S. angustum*, *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. ellipsoideum* y *S. fusarium* (Figura 1.1) [15]. La especie *Scedosporium prolificans* fue rebautizada como *Lomentospora prolificans*, recuperando el nombre más antiguo para esta especie y formando un género de una sola especie [14].



**Figura 1.1.** Árbol filogenético de especies de *Scedosporium/Lomentospora* basado en secuencias del gen de la  $\beta$ -tubulina. Imagen adaptada de Ramirez-Garcia *et al.* (2018) [15].

La separación de *L. prolificans* del género *Scedosporium* se apoya tanto desde una perspectiva evolutiva como desde una perspectiva médica, ya que, a diferencia de las especies del género *Scedosporium*, *L. prolificans* es altamente resistente al voriconazol, y genera un espectro de enfermedades diferentes. Concretamente, *L. prolificans* se caracteriza por causar infecciones diseminadas principalmente en personas inmunodeprimidas mientras que las especies del complejo *S. apiospermum* están asociadas al síndrome del casi ahogamiento [16], y como agente causal de los eumicetomas. Además, su importante distancia filogenética con respecto a las demás especies de *Scedosporium* queda subrayada por su morfología microscópica, ya que, como se ha comentado anteriormente, presenta células conidiógenas infladas frente a las células tubulares en disposición verticilada de *Scedosporium*, y una diferente textura y coloración de las colonias [14].

### 1.3. Epidemiología

#### 1.3.1. Epidemiología ambiental

El estudio del hábitat natural de los patógenos es esencial para una mejor comprensión del modo de transmisión y la potencial identificación del foco de infección. Sin embargo, la distribución ambiental de las especies de *Scedosporium/Lomentospora* no está del todo bien caracterizada debido al reducido número de estudios ecológicos que se han realizado hasta el momento. Se ha detectado la presencia de estas especies en una variedad de hábitats con influencia antropogénica, como zonas industriales, parques infantiles, suelos empapados de petróleo, estiércol de ganado, suelos agrícolas y aguas residuales [1,17,18]. Estos estudios han

confirmado que la abundancia de las especies de *Scedosporium/Lomentospora* se ve fuertemente incrementada por el impacto humano en el ambiente. De hecho, en las zonas con menor impacto humano se ha detectado menor prevalencia o incluso ausencia de estas especies [17,18]. Esta distribución ambiental podría estar asociada a la capacidad de *Scedosporium* spp. para sobrevivir a presiones de oxígeno muy bajas y tolerar un alto contenido salino (5%), lo que les permite sobrevivir en ambientes contaminados, donde hay poca aireación y altas presiones osmóticas [10]. Además, estas especies pueden utilizar gas natural y compuesto aromáticos como fuente de carbono y su abundancia presenta una correlación positiva con el aumento de la concentración de amonio y la disminución del pH dentro de un rango de pH de 6,1-7,5 [17].

La presencia de las especies *Scedosporium/Lomentospora* varía dependiendo de la región estudiada. Concretamente, en un estudio realizado en Austria por Kaltseis *et al.* (2009) *S. apiospermum* fue la especie más prevalente del complejo *Scedosporium/Lomentospora* (58,7-77,7% de los aislamientos), seguida por *S. dehoogii* (13,8-28,8%), y con menor prevalencia por *S. aurantiacum* (4,8-7,7%), *S. minutisporum* (5,8%) y *S. boydii* (1,9-2,3%) [17]. Por otro lado, en un estudio realizado en Francia *S. dehoogii* fue la especie más prevalentemente aislada dentro del complejo (39,4%), seguida por *S. aurantiacum* (21,6%), *S. apiospermum* (18,9%), y *S. boydii* (19,7%), y con una presencia mínima de *L. prolificans* y *S. minutisporum* [18]. La distribución de estas especies en el medio ambiente difiere en gran medida de la distribución de las especies en entornos clínicos, lo que sugiere que estas especies tienen diferentes grados de virulencia. Cabe destacar la elevada prevalencia ambiental de *S. dehoogii*, ya que esta especie raramente ha sido identificada como agente causal de infecciones, pese a haber mostrado una elevada virulencia en modelos murinos infectados por vía intravenosa [17–19].

Los estudios ambientales realizados en Europa contrastan con el realizado por Harun *et al.* (2010) en Australia, ya que en este último se detectaron *S. aurantiacum* (54,6%) y *L. prolificans* (43%) como las especies más prevalentes de *Scedosporium/Lomentospora*, y poca abundancia de *S. boydii* (2,1%) y *S. dehoogii* (0,3%) [1]. Estos resultados concuerdan con la superior prevalencia clínica observada en Australia para *S. aurantiacum* y *L. prolificans* respecto a la detectada en otras regiones [20–22].

Por último, se han observado preferencias ecológicas para cada especie, detectando mayor abundancia de *S. dehoogii* en áreas con altos índices de actividad humana como las

industriales [17,18]. Por otro lado, *S. aurantiacum* se ha asociado a áreas agrícolas del oeste de Francia [18].

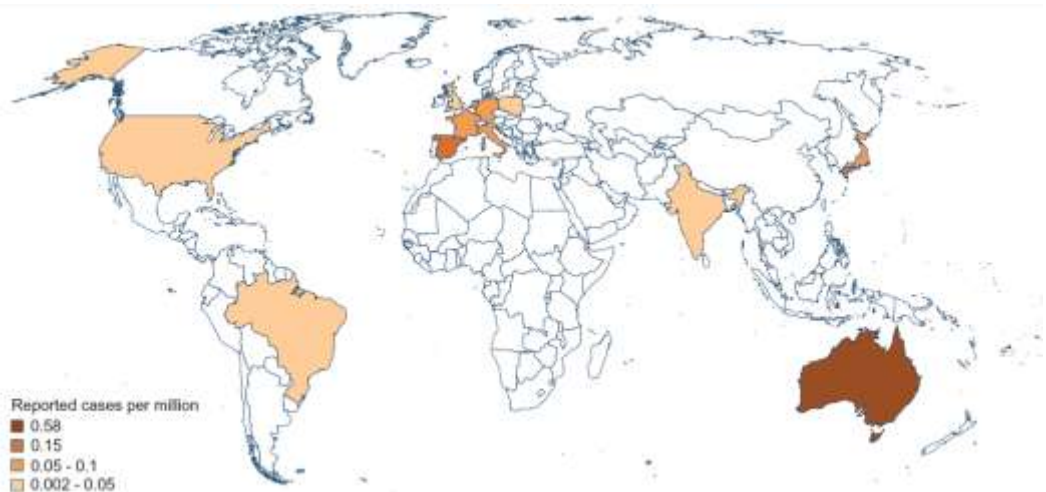
### 1.3.2. Epidemiología clínica

Los datos epidemiológicos de las infecciones fúngicas son notoriamente pobres debido al diagnóstico erróneo de las infecciones y a la falta de sistemas de vigilancia eficaces. Pese a ello, se estima que la mayoría de las personas sufrirán a lo largo de su vida infecciones fúngicas superficiales que generalmente son fáciles de curar, y que, millones de personas en todo el mundo contraerán infecciones invasivas potencialmente mortales que son mucho más difíciles de diagnosticar y de tratar. Estas infecciones invasivas se asocian con tasas de mortalidad inaceptablemente altas, que a menudo superan el 50%, y son causantes de cerca de un millón y medio de muertes cada año a nivel mundial. La actual incidencia de estas infecciones es en gran medida el resultado de un aumento sustancial en las últimas décadas de las infecciones inmunosupresoras, como el VIH/SIDA, así como de las intervenciones médicas modernas inmunosupresoras e invasivas [23].

Más del 90% de todas las muertes declaradas asociadas con hongos son causadas por especies que pertenecen a uno de estos cuatro géneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* [23]. Sin embargo, en las últimas décadas se ha producido un aumento en la prevalencia clínica de las especies fúngicas raras, crípticas y emergentes, en las que la resistencia a antifúngicos es más común [24].

En esta línea, los patógenos *Scedosporium/Lomentospora* han sido considerados patógenos emergentes, debido al aumento de casos clínicos detectados en las últimas décadas. Sin embargo, presentan una baja prevalencia con un promedio de tan solo 16 casos declarados al año [8]. Desafortunadamente, los datos sobre la incidencia de las infecciones producidas por *Scedosporium/Lomentospora* son escasos y podrían no reflejar la verdadera epidemiología de estas infecciones. Existen diferencias regionales, con una incidencia superior de estas infecciones en países como Australia, que podría deberse a la presencia de condiciones climáticas y ambientales que favorecen el crecimiento de estos hongos. De hecho, las especies del complejo *Scedosporium/Lomentospora* han sido detectadas como la segunda causa de infecciones por hongos filamentosos no-*Aspergillus* tanto en Australia como en España [24,25].

Por otro lado, dentro del complejo *Scedosporium/Lomentospora*, la distribución geográfica de los casos clínicos varía dependiendo de la especie. Mientras que las infecciones generadas por *S. apiospermum* y por *S. boydii* tienen una distribución mundial, las generadas por *S. aurantiacum* y *L. prolificans* están geográficamente más restringidas, habiéndose detectado para *L. prolificans* una mayor prevalencia en Australia y España (Figura 1.2) [20–22,26,27]. Concretamente, en un estudio realizado en Australia, Heath *et al.* (2009) declararon un mayor número de aislamientos clínicos de *L. prolificans* (40,8%), que de *S. apiospermum* (35%) y de *S. aurantiacum* (24,2%) [21]. Así mismo, en un hospital del norte de España, *L. prolificans* fue el hongo filamentoso más frecuentemente aislado de hemocultivos en la década de los 90 [22]. Además, recientemente también se han detectado casos clínicos por *L. prolificans* en otros países Europeos, EEUU, Corea, Japón, India y Brasil [4–9].



**Figura 1.2.** Distribución geográfica de las infecciones generadas por *Lomentospora prolificans* diagnosticados entre 2000 y 2017 y mostradas como número de casos por millón de habitantes. Extraída de Seidel *et al.* (2009) [8].

## 1.4. Población de riesgo

### 1.4.1. Inmunodeprimidos

Las infecciones causadas por *L. prolificans* afectan principalmente a pacientes inmunodeprimidos, especialmente a aquellos con neutropenia prolongada, los cuales tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones invasivas asociadas con un peor pronóstico. Es por ello que esta especie se considera un patógeno oportunista. Concretamente, *L. prolificans* afecta



mayoritariamente a pacientes con neoplasia maligna subyacente y a pacientes con trasplante de órgano sólido, representando el 45,7% y el 8,6% de los pacientes afectados por dicho hongo, respectivamente (Tabla 1.1) [3]. Entre las enfermedades malignas destacan las hematológicas, principalmente la leucemia y el linfoma, y entre los trasplantes, el de pulmón [8]. Así mismo, individuos con otras inmunodeficiencias, como los afectados por el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, también presentan riesgo de padecer infecciones por *L. prolificans* [3].

**Tabla 1.1. Características clínicas de 162 pacientes infectados o colonizados por *Lomentospora prolificans*.** Extraída de Rodríguez-Tudela *et al.* (2009) [3].

Características	Número de pacientes (%)	Número de pacientes que fallecieron (%)
<i>Ninguna afección subyacente en el momento de la infección, causa de la infección</i>		
Trauma	18 (11,1)	0 (0)
Cirugía	5 (3,1)	0 (0)
Ninguna	11 (6,8)	0 (0)
<i>Condición subyacente en el momento de la infección</i>		
Cáncer	74 (45,7)	63 (85,1)
Fibrosis quística	19 (11,7)	0 (0)
Trasplante de órgano sólido	14 (8,6)	7 (50)
SIDA	8 (4,9%)	3 (37,5)
Otros*	13 (8)	3 (23,1)

\*Incluye trastornos inmunológicos (4); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (2); uso de drogas inyectables (2); bronquiectasia (1); fibrosis pulmonar (1); diabetes (1); prematuridad (1); e infarto de miocardio (1).

#### 1.4.2. Inmunocompetentes

Los pacientes inmunocompetentes también pueden ser infectados por *Scedosporium/Lomentospora* tras sufrir un procedimiento quirúrgico o un trauma físico. En estos casos, los síntomas y la progresión de la enfermedad son menos severos en comparación con los pacientes que sufren de cualquier inmunodeficiencia subyacente (Tabla 1.1) [3,8].

Por otro lado, la fibrosis quística (FQ) se ha descrito como importante factor de riesgo para el desarrollo de una infección por *L. prolificans*. La FQ es la enfermedad hereditaria letal más frecuente en los caucásicos con una prevalencia estimada en Europa y en los Estados Unidos de 20 y 50 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente [28,29]. Está causada por un defecto en la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR), cuya función es la secreción de iones de cloruro en las glándulas exocrinas humanas. Debido a la falta de iones de

cloruro, las secreciones de las glándulas tienen una viscosidad aumentada lo que conduce a una enfermedad multiorgánica, siendo la afección pulmonar la principal causa de la morbimortalidad. El engrosamiento de la mucosa y la creciente destrucción de la mucosa de las vías respiratorias provocan la pérdida de la limpieza mucociliar y la colonización crónica del espacio endobronquial por bacterias y hongos [30]. La colonización bacteriana ha sido extensamente estudiada y asociada con una disminución más rápida de la función pulmonar [31]. Sin embargo, pese a haber detectado una elevada presencia de especies fúngicas como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Scedosporium/Lomentospora* en muestras de esputo de pacientes con FQ, la patogenicidad de estos hongos en pacientes con FQ es variable y no se comprende completamente [32,33]. Concretamente, las especies de *Lomentospora/Scedosporium* colonizan frecuentemente las vías respiratorias de estos pacientes en un rango de 0-21%. En relación a la prevalencia de las especies del grupo, esta varía dependiendo de la región. Así, mientras que en Francia y en Alemania las especies *S. boydii* y *S. apiospermum* fueron las especies del complejo más frecuentemente aisladas [34,35], en España, *L. prolificans* fue la más prevalente [36]. Sin embargo, *S. aurantiacum* fue la especie más habitualmente aislada en un estudio realizado en Australia, seguida de *L. prolificans* y *S. apiospermum* [37].

## 1.5. Manifestaciones clínicas

Las especies de *Scedosporium/Lomentospora* causan una amplia gama de manifestaciones clínicas asociadas a la vía de infección y al estado inmunitario del paciente, causando desde la colonización de las vías respiratorias e infecciones superficiales, hasta micosis invasivas severas localizadas o diseminadas [15].

### 1.5.1. Colonización

Como se ha comentado anteriormente, las especies del complejo *Scedosporium/Lomentospora* se encuentran entre los hongos que más habitualmente colonizan las vías respiratorias de pacientes con FQ [32,38]. La colonización de estos pacientes puede ser persistente, llegando a detectarse la misma cepa predominante a lo largo de los años [36,39]. Pese a que las colonizaciones generalmente son asintomáticas, pueden dar lugar a una patología. Concretamente, la colonización bronquial puede derivar en una inflamación crónica y en caso de inmunosupresión severa, como en pacientes con trasplante de pulmón, puede producirse una infección invasiva potencialmente mortal [38,40–43]. Por esta razón, la colonización por

*Scedosporium/Lomentospora* está contraindicada para el trasplante en algunos programas de trasplante de pulmón [44].

### 1.5.2. Infección localizada

Las infecciones localizadas incluyen aquellas en las que el hongo claramente daña el tejido del huésped, destacando las infecciones pulmonares, cutáneas y de tejido blando, articulares y óseas, y oculares. De todas ellas, la infección pulmonar es la forma clínica más común, ya que es el tipo de infección más prevalente causada por *L. prolificans* tras la infección diseminada (Tabla 1.2) [3]. Siguiendo la vía de entrada más habitual, el tracto respiratorio, y sin control debido a una respuesta inmune deprimida, los conidios pueden germinar e invadir el tracto respiratorio ocasionando infecciones que presentan una mortalidad del 21,3% y de hasta del 63,6% en pacientes con una enfermedad maligna como enfermedad subyacente [3,10]. Cabe destacar que a menudo en el momento de diagnóstico de la infección pulmonar los pacientes presentan manifestaciones de infección diseminada, como las cutáneas, subyacentes a la rápida diseminación hematogena del hongo desde la localización pulmonar [10].

**Tabla 1.2. Patrón de infección en 162 pacientes con infección por *Lomentospora prolificans*.** Extraída de Rodríguez-Tudela *et al.* (2009) [3].

Tipo de infección por localización	Número de pacientes (%)	Número de pacientes fallecidos (%)
Infección diseminada	72 (44,4)	63 (87,5)
Pulmonar	47 (29,0)	10 (21,3)
Osteomielitis y artritis	17 (10,4)	0 (0)
Cutánea	7 (4,3)	0 (0)
Ocular	7 (4,3)	0 (0)
Otitis	6 (3,7)	0 (0)
Cerebral	2 (1,2)	2 (100)
Sinusitis	2 (1,2)	0 (0)
Peritonitis	1 (0,6)	1 (100)
Onicomycosis	1 (0,6)	0 (0)
Todas	162 (100)	76 (46,9)

En cuanto a las infecciones extrapulmonares, pueden ser la presentación inicial de la infección ocasionada tras un trauma o cirugía, o generadas tras la diseminación de la infección en pacientes inmunodeprimidos [15]. Las infecciones extrapulmonares presentan un mejor pronóstico (Tabla 1.2), y generalmente requieren de tratamientos antifúngicos y cirugía para su curación, siendo necesario en algunos casos amputar la zona infectada, incluyendo la enucleación ocular en el caso de infecciones oculares [3].

### 1.5.3. Infección diseminada

La diseminación del hongo se produce a través del torrente sanguíneo desde los pulmones, la piel o cualquier otra fuente de infección localizada. Cuando como consecuencia de este proceso se detecta un hemocultivo positivo o una infección de dos sitios no contiguos se diagnostica una infección diseminada. Esta manifestación clínica afecta a pacientes con enfermedades subyacentes, principalmente a aquellos con neoplasias hematológicas, y es la más característica de *L. prolificans*, ya que representa el 44,4% de las infecciones generadas por dicho hongo, y la que peor pronóstico tiene, con una tasa de mortalidad del 87,5% [3]. La tendencia de generar infecciones diseminadas es superior para *L. prolificans* que para las especies de *Scedosporium* spp., hecho que está asociado a su capacidad de producir conidios en los fluidos y tejidos corporales, facilitando su diseminación a través del torrente sanguíneo [8]. Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de la infección diseminada destaca la neutropenia, mientras que la recuperación de la aplasia se ha asociado con una reducción del riesgo [3].

Una vez diseminado el hongo puede causar graves endocarditis y aneurismas micóticos, e infecciones fatales del Sistema Nervioso Central (SNC). En la literatura está ampliamente descrito el neurotropismo de *Scedosporium/Lomentospora*, y las manifestaciones clínicas descritas incluyen abscesos cerebrales únicos o múltiples, meningitis y ventriculitis [15,45].

### 1.6. Tratamiento y mecanismos de resistencia de *L. prolificans*

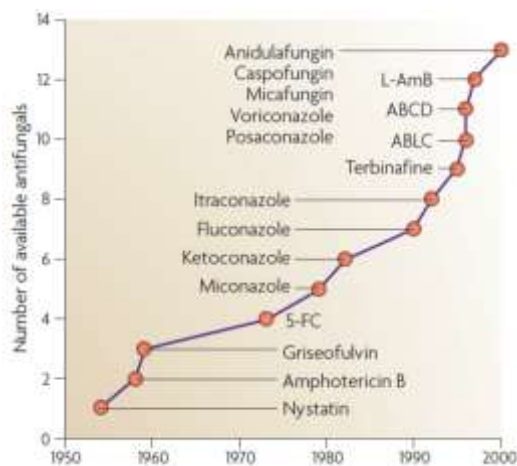
Uno de los principales problemas en el desarrollo de los antifúngicos ha sido la propia biología de los hongos ya que se trata de microorganismos eucariotas que comparten muchos procesos metabólicos y estructuras celulares con los mamíferos, ofreciendo pocas dianas específicas fúngicas. En consecuencia, numerosos medicamentos antifúngicos pueden reaccionar de forma cruzada con las células huésped, causando toxicidad [46]. Las dianas terapéuticas de los antifúngicos actuales, directa o indirectamente, están concentradas en la envoltura celular, tanto en la pared como en la membrana plasmática, siendo la pared celular uno de los orgánulos más prometedores, ya que está accesible para los agentes terapéuticos, y es una estructura ausente en mamíferos [47].

En los años 50 se comercializaron los primeros antifúngicos sistémicos (Figura 1.3), entre los cuales, la anfotericina B, del grupo de los polienos, se convirtió en el principal antifúngico para el tratamiento de muchas infecciones fúngicas invasivas. Este fármaco actúa uniéndose al

ergosterol, formando poros en la membrana por los que se liberan los componentes intracelulares. Pese a su mayor afinidad por el ergosterol frente al colesterol, este fármaco puede afectar a las células de los mamíferos y por ello, generar toxicidad, pero su reformulación con compuestos lipídicos la redujo considerablemente [48].

Tras décadas sin un desarrollo sustancial de antifúngicos, en los 80 se desarrollaron los triazoles, que podían ser administrados por vía oral e intravenosa, y presentaban eficacia frente a patógenos fúngicos refractarios a los polienos [48]. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima fúngica lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa, involucrada en la biosíntesis del ergosterol [46].

Posteriormente, se introdujeron las equinocandinas, el grupo de antifúngicos más recientemente comercializado. Se trata de lipopéptidos que actúan inhibiendo las proteínas involucradas en la síntesis del (1,3)- $\beta$ -D-glucano, componente específico de la pared celular de los organismos fúngicos. Ante estos compuestos se inhibe la formación de la pared celular y las células fúngicas se vuelven sensibles al shock osmótico. Dado que la diana de esta clase de fármacos antifúngicos no está presente en las células de mamíferos, su nivel de toxicidad es muy bajo [48].



**Figura 1.3. Cronología del desarrollo de fármacos antifúngicos sistémicos.** La gráfica muestra el año del primer uso de cada antifúngico sistémico y el número de compuestos disponibles en cada momento. 5-FC, flucitosina; ABCD, anfotericina B en dispersión coloidal; ABLC, complejo lipídico de anfotericina B; L-Amb, anfotericina B liposomal. Extraída de Ostrosky-Zeichner *et al.* (2010) [48].

Con todo ello, actualmente solo existen estas tres clases principales de medicamentos antifúngicos sistémicos disponibles con licencia para su uso terapéutico, los polienos, los azoles y las equinocandinas. Aunque se han desarrollado otros tipos de fármacos, como las sordarinas, o el inhibidor de la quitina sintasa nikomicina Z, con actividad antifúngica prometedora y sin informes de efectos secundarios evidentes, hasta el momento no se han llevado a cabo ensayos clínicos avanzados [48].

#### 1.6.1. Tratamiento de las infecciones causadas por *L. prolificans*

El tratamiento de las infecciones causadas por las especies del género *Scedoporium* spp. y especialmente por *L. prolificans* presentan grandes dificultades debido a las resistencias asociadas a estos hongos. Las especies del género *Scedosporium* spp. son resistentes a la anfotericina B, a la 5-flucitosina, y a los triazoles de primera generación, itraconazol y fluconazol, y al isavuconazol, y además muestran reducida sensibilidad a las equinocandinas [15].

En esta línea, *L. prolificans* es particularmente resistente a prácticamente todos los antimicóticos actualmente disponibles, obteniendo valores Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *in vitro* superiores a 8 µg/ml para la mayoría de ellos [8,10]. De los antifúngicos actualmente disponibles, el voriconazol es el que mayor actividad antifúngica ha demostrado *in vitro*. Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria media de este fármaco necesaria para inhibir el 50% de los aislamientos (CMI<sub>50</sub> = 4 µg/ml) rara vez se obtiene de forma libre en los pacientes [10]. Este hecho puede ser la explicación de la pobre respuesta al voriconazol de los pacientes infectados con *L. prolificans*, frente a los infectados con *S. apiospermum* [49].

A pesar de su resistencia *in vitro*, en modelos experimentales murinos, las formulaciones liposomales de anfotericina B y la caspofungina han mostrado actividad frente a *L. prolificans* [50,51]. Sin embargo, se requiere de más estudios que corroboren los resultados obtenidos en estas investigaciones. Así mismo, se ha detectado actividad antifúngica *in vivo* para el albaconazol. Desafortunadamente, las dosis empleadas para este último fármaco fueron más altas que las aplicadas contra otros hongos, lo que puede producir mayor toxicidad o efectos secundarios [52].

Actualmente, las guías europeas recomiendan el voriconazol como tratamiento de primera elección para el tratamiento de las infecciones generadas por *Scedosporium/Lomentospora* [53]. Sin embargo, debido a la multiresistencia asociada a *L. prolificans*, el pronóstico de las infecciones generadas por este hongo es muy negativo, con una

mortalidad general de 46,9% y del 87,5% en pacientes con infección diseminada. De hecho, el tratamiento de las infecciones diseminadas es desalentador, observando una ausencia de reducción del riesgo de mortalidad en pacientes que reciben quimioterapia antimicótica [3]. Hasta el momento, el desbridamiento quirúrgico del tejido infectado y la recuperación de la inmunosupresión parecen ser los principales medios para detener la progresión de esta micosis [53]. Sin embargo, la intervención quirúrgica rara vez es una opción debido al mal estado general de los pacientes y a las complejas infecciones diseminadas que se desarrollan en la mayoría de los casos [8]. Por ello, resulta imprescindible la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento de estas micosis.

Una de las estrategias terapéuticas más prometedoras estudiadas hasta el momento es la combinación de antifúngicos, ya que otorga eficacia terapéutica a concentraciones más bajas, reduce los efectos adversos, aumenta la seguridad y la tolerabilidad, y a su vez evita el fracaso terapéutico ante la sospecha de resistencias antimicrobianas. Sin embargo, hasta el momento, existen pocos estudios de la eficacia de combinaciones terapéuticas frente a *L. prolificans* [15]. La combinación de la terbinafina con triazoles (itraconazol, miconazol o voriconazol) es una de las combinaciones más prometedoras. Esta combinación resultó ser sinérgica *in vitro* para más del 85% de los aislamientos analizados, reduciendo las CMI hasta concentraciones clínicamente alcanzables. La interacción sinérgica de estos dos fármacos se basa en el bloqueo de diferentes pasos de la misma vía de biosíntesis del ergosterol [10,54]. Sin embargo, el uso de esta combinación en la clínica ha mostrado resultados variables [55–60]. Por otro lado, se ha detectado efecto sinérgico *in vitro* tras la combinación de micafungina y voriconazol [61] o anfotericina B [62], y caspofungina y ravuconazol [63]. Por otro lado, los escasos datos obtenidos hasta el momento de la combinación del fármaco antiprotozoario mitelfosina con antifúngicos han sido prometedores, tanto *in vitro* [64] como en la clínica [65–67].

Hasta el momento únicamente se han realizado dos estudios acerca de la combinación de más de dos antifúngicos frente a *L. prolificans*. Rodríguez *et al.* (2009) evaluaron la eficacia de micafungina, anfotericina B y voriconazol, solos y en combinaciones dobles y triples, en un modelo murino de infección sistémica por *L. prolificans*. La micafungina combinada con voriconazol o anfotericina B fue la más efectiva, siendo estos los únicos tratamientos capaces de prolongar la supervivencia y reducir la carga fúngica en los riñones y el cerebro. Las combinaciones triples de estos fármacos no mejoraron los resultados obtenidos con combinaciones dobles [68]. Posteriormente, en un estudio realizado por Martín-Vicente *et al.* (2017) analizaron la interacción

*in vitro* de anfotericina B, voriconazol y anidulafungina en combinaciones dobles y triples. El mayor porcentaje de sinergia se observó en la combinación de anfotericina B y anidulafungina (72,7%) frente a la combinación de los tres antifúngicos (63,6%) [69].

Con los estudios realizados hasta el momento se puede concluir que la combinación de dos antifúngicos es más eficaz que la monoterapia. Entre los medicamentos antifúngicos, se continúa recomendando el uso del voriconazol como fármaco de primera línea y su potencial administración concomitante con la terbinafina [15].

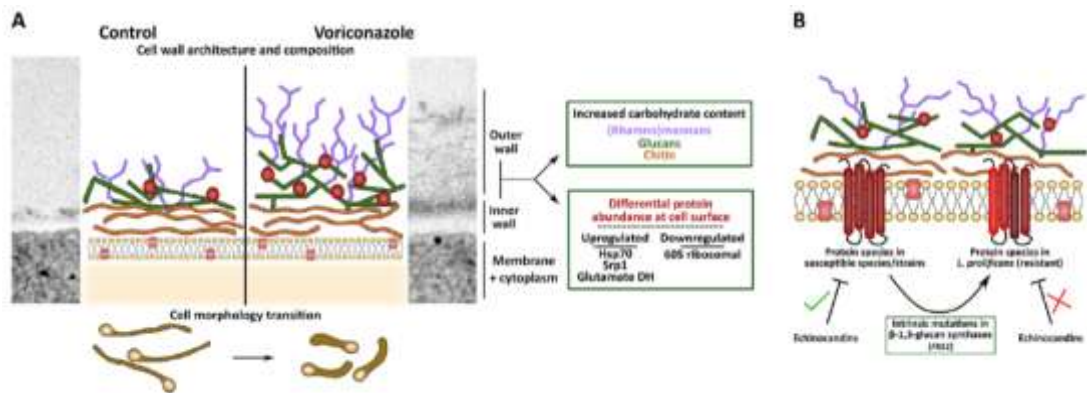
#### 1.6.2. Mecanismos de resistencia de *L. prolificans*

Hasta el momento, se han descrito dos mecanismos moleculares asociados a la resistencia a antifúngicos de *L. prolificans* (Figura 1.4). Concretamente, se han descrito mutaciones en el gen *Fks1* que codifica la subunidad catalítica de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa de *L. prolificans* y *S. apiospermum*. El mecanismo de acción de las equinocandinas se basa en la inhibición de esta enzima, y por ello, estas mutaciones podrían explicar la reducida susceptibilidad de estos hongo a las equinocandinas [70].

Por otro lado, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación se detectaron cambios moleculares y celulares en *L. prolificans* tras la exposición del hongo al voriconazol. Concretamente, se observaron cambios drásticos en la morfología celular, con hifas de *L. prolificans* más cortas y más anchas. Así mismo, se describieron modificaciones en la arquitectura y en la composición de carbohidratos de la pared celular en presencia del fármaco, con mayor presencia de glucanos y de mananos.

Además, se identificaron la *Srp1* y la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) como las proteínas más sobreexpresadas en condiciones de estrés inducidas por la exposición al voriconazol. Todos estos cambios podrían estar involucrados con la resistencia del hongo al antifúngico [71].





**Figura 1.4.** Representación esquemática de los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a los fármacos antifúngicos de *Lomentospora prolificans*. Cambios celulares y moleculares desarrollados por *L. prolificans* tras la exposición al voriconazol (A) y mutaciones intrínsecas del hongo asociadas con la resistencia a la equinocandinas (B). Extraída de Pellon *et al.* (2018) [72].

### 1.6.3. Tratamientos alternativos frente a *L. prolificans*

En los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos que han mostrado eficacia frente a *Scedosporium/Lomentospora*. Concretamente, compuestos inhibidores del eje calcinerurina-Hsp90 han demostrado resultados prometedores frente a diversos patógenos y entre ellos, el inhibidor de las desacetilasas de lisina Tricostatina A ha demostrado buena actividad antifúngica frente a *L. prolificans in vitro*. Este compuesto bloquea la función de la Hsp90 al inducir la acetilación de esta chaperona [73]. Así mismo, el compuesto F901318 (olorofim) representa una nueva familia de antifúngicos y actúa inhibiendo la enzima fúngica dihidroorotato dehidrogenasa de la biosíntesis de pirimidina. Este compuesto actualmente está en desarrollo clínico y ha demostrado excelente actividad antifúngica frente a un amplio rango de hongos [74], entre ellos frente a especies de *Scedosporium/Lomentospora* [8,75,76]. En el estudio realizado por Wiederhold *et al.* (2017) emplearon 66 aislamientos de *Scedosporium spp.* y 7 de *L. prolificans*, obteniendo un rango de valores CMI de 0,079 a 0,5 mg/l [76]. En la misma línea, Biswas *et al.* (2018) testaron la actividad antifúngica del F901318 frente a 30 aislamientos de *L. prolificans* y 20 aislamientos de *Scedosporium spp.*. El compuesto mostró actividad antifúngica frente a todos los aislamientos de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* y *S. aurantiacum*, con valores CMI que oscilaron entre 0,125 y 0,5 mg/L [75]. Más recientemente, en un estudio realizado por Seidel *et al.* (2019) obtuvieron

valores CMI de 0,0039 mg/L para los 8 y 7 aislamientos de *Scedosporium* spp. y *L. prolificans*, respectivamente [8].

Por otro lado, el nuevo fármaco de amplio espectro E1210 (APX001) fue aprobado en Junio del 2016 por la FDA para el tratamiento de candidiasis, aspergilosis invasivas y coccidioidomicosis [15]. Este compuesto actúa bloqueando la acilación del inositol en la biosíntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI), lo que genera defectos en la biosíntesis de la pared celular fúngica [77]. Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *L. prolificans* revelaron valores MIC para el compuesto E1210 al menos 10 veces más bajos que los obtenidos con antifúngicos empleados actualmente, incluido voriconazol [15,77].

Uno de los fármacos más prometedores por su eficacia frente a *L. prolificans* y su buena tolerabilidad es el N-cloro derivado del aminoácido taurina, N-clorotaurina (NCT). Es un antioxidante de larga vida, generado por leucocitos humanos [78] que actúa como microbicida de amplio espectro y que ha demostrado muy buena tolerabilidad en los estudios clínicos tras su inhalación y administración tópica al 1% [79,80]. A esta misma concentración la NCT presenta actividad fungicida frente a *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. boydii*. La destrucción de estos microorganismos por el NCT está acompañada por una mayor permeabilidad de la pared y de la membrana celular [81].

Debido a la excelente tolerabilidad del NCT en comparación a otros antisépticos, la inhalación de este fármaco puede emplearse para el tratamiento de las vías respiratorias inferiores [82]. Esta aplicación sería de particular interés para la erradicación de patógenos del tracto respiratorio de pacientes con FQ. Cabe destacar que recientemente se ha destacado el papel de los hongos en la disminución de la función pulmonar y como agentes alérgicos del tracto respiratorio de estos pacientes [83,84]. Además, se ha observado un aumento de la actividad microbicida del NCT *in vitro* en medio de esputo artificial que simula la composición del moco en la FQ. Este hecho es especialmente pronunciado en los hongos y podría deberse a la formación de monocloramina por transhalogenación, que debido a su mayor lipofilicidad penetra con mayor rapidez los patógenos [85].

#### 1.6.4. Desarrollo de vacunas y de anticuerpos monoclonales

El estado del sistema inmunitario es crucial en la evolución de las infecciones producidas por *L. prolificans*. Por ello, numerosas investigaciones han tenido como objetivo la búsqueda de

moléculas que mejoren la respuesta inmune y sean de utilidad frente a estas micosis. En esta línea, ya en 1996 se publicó la resolución clínica de una fungemia producida por *L. prolificans* en un paciente neutropénico tras la administración del factor estimulante de colonias de granulocitos junto con anfotericina B [86]. Posteriormente se demostró que el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) aumentan el daño de hifas inducido por los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) humanos, efecto que se ve potenciado cuando estos compuestos se emplean conjuntamente [87]. Así mismo, la interleucina-15 (IL-15) aumenta el daño de hifas y promueve la liberación de citocinas de leucocitos PMNs en presencia de *L. prolificans* [88]. Por otro lado, se ha observado que las combinaciones de leucocitos PMNs y antifúngicos (voriconazol, posaconazol, itraconazol o anfotericina B) tienen efectos aditivos o sinérgicos en el daño celular generado en *L. prolificans* [89,90].

Sin embargo, uno de los campos más prometedores y en el que durante las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos, es en la búsqueda de tratamientos alternativos a través del desarrollo de vacunas y de anticuerpos monoclonales (mAb). Pese a que estas investigaciones no se han centrado hasta el momento en *L. prolificans*, los resultados obtenidos para otros hongos patógenos han sido muy esperanzadores [91–94]. Entre ellos, destaca la protección obtenida en ratones tras la vacunación con el antígeno específico de *Coccidioides* (CSA) y con la proteína de la pared celular rica en prolina de *Coccidioides* (Ag2/pRA<sub>1-106</sub>) [95–98], y con las adhesinas de *Candida* (Als1 y Als3) [99–103] frente a las infecciones letales provocadas por dichos hongos .

Así mismo, se han identificado mAbs protectores frente a polisacáridos de la capsula [104–106], lípidos de la pared celular [107] y melanina [108] de *Cryptococcus neoformans*, y frente a polisacáridos de la pared celular [109] y proteínas de la superficie celular [110] de *Candida albicans*. De todos ellos, dos mAbs llegaron a ser incluso testados en humanos, el desarrollado contra el glucuronoxilomanano capsular [93] de *C. neoformans* y el dirigido frente a la Hsp90 [111] de *C. albicans*. Este segundo mAb, Mycograb, fue comercializado por Novartis hasta el 2006, año en el que se desaconsejó su uso en Europa, por una opinión negativa del Comité de Medicamentos de Uso Humano, debido a algunas preocupaciones sobre la seguridad y la calidad [112].

Por otro lado, numerosos estudios han tenido como objetivo el desarrollo de vacunas y mAbs panfúngicos que prevengan la infección de diversos hongos patógenos. Concretamente, en un estudio realizado por Torosantucci *et al.* (2005) se observó que la vacuna conjugada de

laminarina, una preparación de  $\beta$ -glucanos derivada del alga *Laminaria digitata*, y la toxina diftérica, induce protección eficaz frente a los hongos patógenos más importantes, *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus* [113]. Así mismo, se ha descrito que la vacunación subcutánea de ratones con la levadura *S. cerevisiae* muerta por calor (HKY) ofrece protección frente a las aspergilosis [114], coccidioidomicosis [115], mucormicosis [116], candidiasis [117] y criptococosis [118].

Pese a que la mayoría de los anticuerpos protectores detectados hasta el momento son patógeno-específicos, hay algunos ejemplos de mAbs protectores frente a diversas micosis [48]. Concretamente, el anticuerpo desarrollado frente a la proteína de choque térmico, Mycograb, ha demostrado actividad frente a varias *Candida* spp. [119] y a *C. neoformans* [120]. Todos estos datos sugieren que el desarrollo de una terapia de amplio espectro para las enfermedades fúngicas es una posibilidad real.

## 1.7. Diagnóstico e Identificación

### 1.7.1. Diagnóstico de las enfermedades causadas por *Scedosporium/Lomentospora*

El diagnóstico de las infecciones generadas por *Scedosporium/Lomentospora* presenta grandes dificultades asociadas a la inespecificidad de los signos y de las manifestaciones clínicas [3]. Los métodos de diagnóstico convencionales que se emplean actualmente presentan baja sensibilidad y especificidad, requieren de mucho tiempo y de expertos capacitados (ref) y a menudo no permiten diferenciar los procesos de colonización de la infección. En este contexto, la demora en el diagnóstico certero puede retrasar la instauración del tratamiento apropiado, con consecuencias potencialmente fatales, especialmente en pacientes inmunodeprimidos o con infecciones diseminadas [10].

Cabe destacar la importancia que podría tener la identificación a nivel de especie del complejo *Scedosporium/Lomentospora* debido a la heterogeneidad intrínseca entre especies en cuanto a la virulencia [19,121–123], o a la susceptibilidad antifúngica [124]. Con todo ello, los investigadores y clínicos han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de varias metodologías para determinar el agente etiológico causante de la enfermedad.

El diagnóstico de laboratorio de estas infecciones incluye métodos convencionales como el cultivo, la microscopía directa y la histopatología. De hecho, este conjunto de técnicas son las más recomendadas por el grupo de expertos de ESCMID y ECMM (Tabla 1.3), ya que están bien estandarizadas y disponibles en la mayoría de los entornos clínicos [53]. Desafortunadamente, en

el examen histopatológico de las biopsias resulta difícil distinguir los tejidos infectados con *Scedosporium/Lomentospora* de los infectados por *Aspergillus* o *Fusarium*, ya que todos ellos presentan hifas regularmente septadas y ramificaciones dicotómicas [15]. Pese a ello, varias características únicas pueden ayudar a diagnosticar las micosis causadas por *L. prolificans*, como patrones de ramificación irregulares, conidios en forma de limón, y la conidiación intravascular e intratisular [125]. Además, la tinción histoquímica con colorantes fluorescentes, como el blanco de calcofluor, facilita la visualización, pero no discrimina entre los diversos ascomicetos filamentosos. Por lo tanto, aunque estas técnicas están muy difundidas en los laboratorios clínicos y son muy recomendadas [53], los patólogos deben estar muy bien preparados para determinar correctamente la causa de la infección.

**Tabla 1.3. Resumen de recomendaciones para el diagnóstico de *Scedosporium/Lomentospora* de expertos de ESCMID y ECMM.** Extraída de Tortorano *et al.* (2014) [53].

Test	SoR	QoE	Comentario
Microscopía directa	A	III	Investigación básica
Cultivo (identificación mediante morfología y características fisiológicas)	A	III	Investigación básica. Empleo de medios selectivos
Métodos de identificación moleculares	C	III	La asignación precisa de especies es importante para guiar el manejo clínico
Histopatología	A	III	Hifas septadas de paredes delgadas, de 2 a 5 µm de ancho, similares a las que se observan en aspergilosis y otras hialohifomicosis. Ramificación irregular
PCR panfúngica	C	III	Los test moleculares podrían emplearse junto con los test de laboratorio convencionales
PCR múltiple	C	III	Los test moleculares podrían emplearse junto con los test de laboratorio convencionales
Hibridación <i>in situ</i>	C	III	Baja sensibilidad. Sin validar
Identificación de especies (MALDI-TOF y PCR)	C	III	Sin validar
Tipado fisiológico	C	III	En caso de brote
Test de susceptibilidad <i>in vitro</i>	C	III	Ofrece una visión general de la actividad de los medicamentos y, por lo tanto, puede apoyar la elección de los antifúngicos

SoR grado de recomendación; QoE nivel de evidencia. \* MALDI-TOF desorción/ionización mediante láser asistida por matriz- tiempo de vuelo.

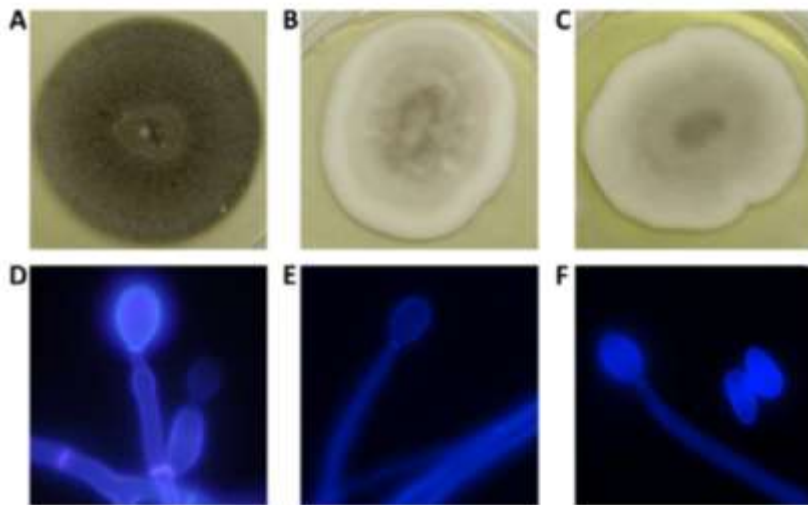
Ante esta situación, se han desarrollado diferentes técnicas que faciliten la detección específica de *Scedosporium/Lomentospora*. Entre ellas, la hibridación *in situ* utiliza sondas de ADN dirigidas contra secuencias de ARNr en muestras de tejidos fijadas con formalina e insertadas en parafina. Pese la menor sensibilidad de esta técnica frente al examen morfológico, permite la

identificación definitiva de *Scedosporium* sp. [126]. Así mismo, se han desarrollado anticuerpos policlonales [127] y monoclonales para la detección de *Scedosporium/Lomentospora*. Concretamente, en los últimos años se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos para *S. apiospermum/S. boydii* [128] y *L. prolificans* [129] que podrían facilitar la detección específica de estos patógenos en las muestras clínicas.

Las técnicas de cultivo son actualmente uno de los métodos más importantes en el diagnóstico de infecciones microbianas, incluyendo las micosis. Para ello, es fundamental la recogida adecuada de la muestra clínica, así como su correcta manipulación, conservación y transporte al laboratorio. Los hongos de los géneros *Scedosporium/Lomentospora* crecen bien en medios de rutina como el agar Sabouraud dextrosa, el agar de sangre y el agar de chocolate. En los últimos años se han desarrollado medios selectivos que permiten el crecimiento de *Scedosporium/Lomentospora* sobre otros hongos filamentosos. Estos medios se recomiendan para el aislamiento a partir del líquido broncoalveolar u otras secreciones respiratorias, que a menudo contienen *Aspergillus* spp. y *Candida* spp. de crecimiento más rápido [10]. Concretamente, el medio SceSel + desarrollado por Rainer *et al* (2008) que contiene antibióticos, dicloran y benomilo, facilita el aislamiento de los hongos pertenecientes al complejo *Scedosporium/Loemntospora* [130] y ha sido ampliamente empleado para detectar estas especies en muestras respiratorias de pacientes con FQ [35,131]. Por otro lado, cabe destacar la alta tasa de cultivos positivos obtenidos en las infecciones generadas por *L. prolificans*, obteniendo el 70% de los hemocultivos positivos en pacientes con infecciones diseminadas. A pesar de esta aparente facilidad diagnóstica, la mayoría de estos cultivos resultan positivos cerca de la muerte del paciente, lo que limita su utilidad diagnóstica y aumenta la necesidad de nuevos procedimientos que permitan un diagnóstico más rápido [3].

Una vez recuperado el hongo, también se pueden realizar otros análisis para su identificación, su tipificación epidemiológica o estudiar su susceptibilidad antifúngica. Morfológicamente y fisiológicamente, *L. prolificans* se diferencia fácilmente de las especies de *Scedosporium* por su susceptibilidad a la cicloheximida, ausencia de teleomorfo, el color negro de sus colonias y sus característicos conidióforos basalmente hinchados (Figura 1.5). Por el contrario, *Scedosporium* spp. forma colonias de color blanco a gris o marrón, presenta células conidiógenas tubulares, y en algunos casos pigmentos amarillos difusibles o teleomorfos. Así mismo, existen otras características fisiológicas, como la asimilación de azúcares y el crecimiento a 40 y 45°C, que permiten diferenciar las especies de *Scedosporium/Lomentospora*. Sin embargo, los métodos de

identificación morfológica y bioquímica llevan mucho tiempo y requieren expertos capacitados [10,15,132].



**Figura 1.5.** Imágenes macroscópicas y microscópicas de las especies de *Lomentospora/Scedosporium* utilizadas en este trabajo. *Lomentospora prolificans* (A, D), *Scedosporium boydii* (B, E) y *Scedosporium aurantiacum* (C, F). Fotografías de las colonias tras el crecimiento en agar patata dextrosa durante 7 días (A-C) y micrografías empleando blando de calcofluor (D-F). Extraída de la tesis doctoral de Aize Pellon (2015) [133].

La baja sensibilidad del cultivo micológico ha promovido el desarrollo de métodos alternativos basados en la detección de componentes estructurales (1,3- $\beta$ -D-glucano; BG), de anticuerpos producidos por el propio paciente o de ADN del hongo en muestras clínicas. El BG es un componente de la pared celular fúngica que se libera con el desarrollo de la infección y es un biomarcador panfúngico detectable en el suero de los pacientes con infección fúngica invasiva, con la excepción de la mucormicosis y la criptococosis [134], por lo que no permite diferenciar entre las especies fúngicas. Las especies de *Scedosporium/Lomentospora* liberan muy poca cantidad de este polisacárido en comparación con otros hongos filamentosos [135]. Por otro lado, ciertas moléculas secretadas de *Scedosporium* spp. han sido señaladas como interesantes marcadores de infección, como las pseudaciclinas, péptidos cíclicos no ribosomales, y los sideróforos ácido dimerómico y *N*( $\alpha$ )-metil coprogeno B. Concretamente, Bertrand *et al.* (2010) demostraron la especificidad del *N*( $\alpha$ )-metil coprogeno B para *Scedosporium* spp. y lo detectaron en muestras de esputo de pacientes con FQ colonizados por *S. apiospermum*, demostrando su utilidad como

marcador de la colonización de las vías respiratorias producida por las especies del complejo *S. apiospermum* [136].

Además, se han realizado varios estudios con la finalidad de desarrollar una técnica serológica para el diagnóstico de las infecciones producidas por *Scedosporium/Lomentospora*. Entre ellas, la técnica contraelectroforesis (CIE) en la que se utiliza un extracto antigénico crudo, ha sido empleada para el diagnóstico de las infecciones producidas por *Scedosporium* spp. en pacientes con FQ. Lamentablemente, se ha detectado una elevada reactividad cruzada con *Aspergillus* [137]. Por otro lado, el peptidomannano (PRM) y la catalasa A1 de *S. boydii* han sido seleccionadas como interesantes candidatos para el desarrollo de técnicas serológicas, obteniendo resultados prometedores al emplear la catalasa A1 en la detección de pacientes con FQ infectados con *Scedosporium* spp. [138,139].

#### 1.7.2. Identificación de las especies del complejo *Scedosporium/Lomentospora*

Actualmente, el análisis basado en la amplificación y posterior secuenciación de nucleótidos es el estándar de oro para la identificación de hongos [15]. Se han estudiado diversas regiones genéticas para identificar los grupos y especies fúngicas, incluyendo el DNA ribosomal, genes que codifican para la ARN polimerasa, el factor de elongación 1- $\alpha$ , la  $\beta$ -tubulina (regiones BT2 y TUB), la calmodulina, y las regiones de espaciadores internos transcritos (ITS) [132,140,141]. Entre ellas, la región de ITS ha sido seleccionada como la región estándar para la identificación fúngica o “*standard barcoding*”, ya que permite el empleo de cebadores universales compatibles con la mayoría de especies y muestra suficiente variabilidad genética para la identificación a nivel de especie [141]. Su secuenciación identifica apropiadamente las principales especies de *Scedosporium/Lomentospora*, pero se requiere del gen parcial de la  $\beta$ -tubulina (BT2) para diferenciar especies estrechamente relacionadas [142].

Así mismo, en los últimos años se han desarrollado otros métodos moleculares para la identificación y tipificación de las especies *Scedosporium/Lomentospora* basados en la amplificación y el análisis de secuencias de ADN como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) [143–146], los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) [20], la amplificación de Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSR PCR) [147], los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) [20,142], o la tipificación de secuencias multilocus (MLST) [39,148].



Entre estas técnicas, destaca el interés de aquellas que permiten la detección e identificación directa de los hongos a partir de muestras clínicas. Concretamente, Castelli *et al.* (2008) desarrollaron dos ensayos de PCR a tiempo real (RT-PCR) para el diagnóstico de *L. prolificans* y *S. apiospermum* a partir de muestras procedentes de un modelo murino de infección invasiva. Obtuvieron un 100% de especificidad y un límite de detección de 10 fg de ADN, y sensibilidades del 95,5% para los tejidos pulmonares, del 85% para el suero y del 83,3% para la sangre [149]. Así mismo, la PCR múltiple desarrollada por Harun *et al.* (2011) permitió identificar *Lomentospora/Scedosporium* a partir de secreciones respiratorias de pacientes con FQ con una sensibilidad y especificidad del 62,1% y el 97,2%, respectivamente [150]. Por último, la técnica de hibridación inversa (PCR-RLB) desarrollada por Lu *et al.* (2011) y dirigida al fragmento de ADN de la BT2 también se aplicó con éxito en muestras de esputo de pacientes con FQ para la detección e identificación de miembros de *Scedosporium/Lomentospora*, obteniendo una sensibilidad muy superior frente al cultivo de las muestras clínicas [151].

Las limitaciones de todas estas técnicas basadas en PCR es el riesgo de resultados falsos positivos, causados por la contaminación de las muestras antes de la PCR, por la amplificación inespecífica o por la amplificación del ADN de células muertas, y la necesidad de cultivo previo para la mayoría de las técnicas.

Por otro lado, la espectrometría de masas MALDI-TOF está disponible para la identificación de primera línea. Es más económico y su precisión de identificación es comparable a la de la secuenciación de ADN [15]. En los estudios realizados hasta el momento se ha señalado como método fiable, rápido y preciso para la identificación rutinaria del complejo *Lomentospora/Scedosporium*, diferenciando con claridad *L. prolificans* de las especies de *Scedosporium* spp. [152,153]. La calidad de los espectros de referencia es decisiva para una identificación fiable. Desafortunadamente, las bases de datos actualmente disponibles en el mercado para la identificación mediante MALDI-TOF son inadecuadas para *Scedosporium/Lomentospora*. Por ello, resulta necesario el desarrollo de una base de datos de referencia de espectros de masas MALDI-TOF, especializada en la identificación de hongos, y curada por expertos micólogos [15].

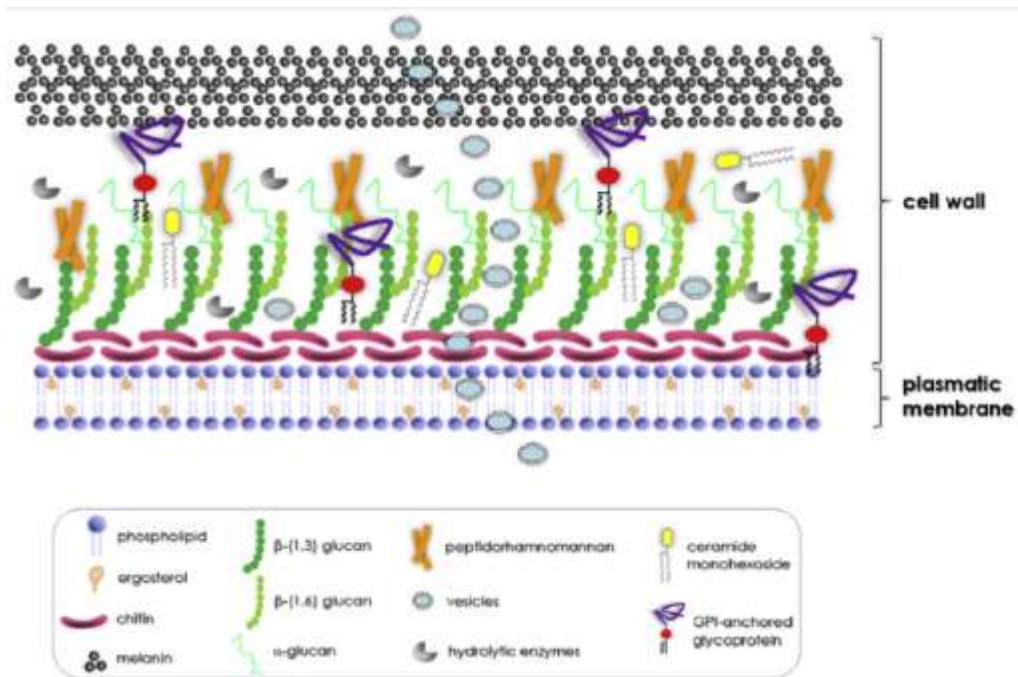
Por lo tanto, pese a haberse desarrollado nuevos métodos moleculares muy prometedores para la identificación de *Scedosporium/Lomentospora*, existe una falta de validación y de estandarización de los métodos, y de bases de datos adecuadas. Ante esta situación, los

expertos actualmente aconsejan la utilización de las pruebas moleculares en combinación con las pruebas de laboratorio convencionales [53].

### **1.8. Respuesta inmune del hospedador**

La respuesta inmune frente a los hongos es un complejo entramado formado por mecanismos celulares y moleculares. Las barreras generales como el epitelio, el sistema mucociliar, las células inmunes residentes en los tejidos, y la secreción de proteínas y péptidos citotóxicos tienen un papel esencial en la inmunidad innata generada ante estos patógenos [154].

El reconocimiento innato de los patógenos se logra a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que detectan estructuras conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como mananos, glucanos o ADN [155]. La pared celular de los hongos es especialmente importante en este proceso de reconocimiento, ya que está en contacto con el ambiente extracelular. Pese a que la composición de la pared celular varía dependiendo de la especie, y como resultado de las condiciones ambientales, el esqueleto de la pared celular fúngica está principalmente compuesta por  $\beta$ 1,3/ $\beta$ 1,6 glucanos ramificados unidos a quitina (Figura 1.6). Esta estructura contiene a su vez otros carbohidratos, como mananos, y proteínas, pudiendo estar estas últimas directamente unidas a los polisacáridos o ancladas mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) [47]. Concretamente, los PRMs, ramnomananos y  $\alpha$ -glucanos son especialmente relevantes en la arquitectura de la pared celular de *Scedosporium/Lomentospora*, y junto a las glucosilceramidas, están involucrados en el reconocimiento de las células fúngicas y/o en la regulación de la respuesta inmune del hospedador [156–160].



**Figura 1.6. Representación de la pared celular de las especies de *Scedosporium/Lomentospora*.**

Se muestran los principales componentes de la pared descritos en estos hongos, así como sus posibles interconexiones basadas en trabajos publicados con otros hongos filamentosos como *Aspergillus* spp.. Extraída de Mellon *et al.*, (2019) [161].

Los PRR se expresan principalmente en la superficie de las células fagocíticas y de las células presentadoras de antígenos, incluidos neutrófilos, macrófagos y células dendríticas [162]. Entre ellos, los receptores tipo Toll (TLR) y los de lectina tipo C, como los receptores de manosa y las dectinas, han demostrado ser muy importantes en el reconocimiento de las células fúngicas [155,163] y, concretamente, los TLR y la dectina-1 han sido señalados como receptores determinantes en el reconocimiento de *Scedosporium/Lomentospora* (Figura 1.7) [158,164–166].

Tras el reconocimiento fúngico mediado por los PRR, las células fagocíticas promueven la muerte del hongo, el retraso en el crecimiento o su inhibición y el reclutamiento de leucocitos PMNs mediante la síntesis de citocinas proinflamatorias [15,167]. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que los conidios de *L. prolificans* y de *S. apiospermum* son fagocitados de una manera muy comparable a los de *Aspergillus*, al menos por los macrófagos derivados de monocitos, a pesar del mayor tamaño de los sus conidios [168,169]. Por el contrario, estas células fagocíticas inhiben la germinación de los conidios de *L. prolificans* de manera menos eficaz que los de *A.*

*fumigatus* [169]. Por otro lado, Pellon *et al.* (2018) observaron una menor capacidad fagocítica de la microglía frente a *L. prolificans* en comparación a otros fagocitos y otros hongos, incluidos los del género *Scedosporium*. También se detectó una menor liberación de citocinas proinflamatorias y una menor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Así mismo, demostraron que *L. prolificans* es capaz de germinar dentro de las células microgliales y de provocar la muerte celular, evitando la actividad antifúngica de estas células [166].

En lo referente a las citocinas, *L. prolificans* induce significativamente mayor liberación de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) en monocitos humanos que *A. fumigatus*. Esto podría atribuirse a la composición específica de la pared celular de *L. prolificans*, que pese a desconocerse detalladamente, podría contener moléculas estimulantes más potentes [170]. Por otro lado, se ha demostrado que IFN- $\gamma$  y GM-CSF aumentan la actividad antifúngica de los leucocitos PMNs frente a *Scedosporium/Lomentospora* [87]. Así mismo, la IL-15 aumenta el daño inducido por leucocitos PMNs a las hifas de *L. prolificans*, así como el estallido oxidativo y la liberación de IL-8 desde leucocitos PMNs expuestos al hongo [88].

Cuando los conidios de *Scedosporium/Lomentospora* logran germinar fuera de los fagocitos, la función de los neutrófilos reclutados al lugar de infección se vuelve esencial. En esta situación los neutrófilos comienzan a degranularse, liberando grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) y atrapando las células fúngicas en las trampas extracelulares de neutrófilos (NET), matriz compuesta principalmente por ADN y proteínas con actividad antimicrobiana. Los NETs tienen más bien un efecto fungistático que fungicida, previniendo la diseminación de hongos y reteniendo las células fúngicas mientras otras células inmunitarias son reclutadas [15,162].

Por otro lado, las células presentadoras de antígenos, principalmente las células dendríticas, digieren y presentan los potenciales antígenos a las células T, promoviendo la diferenciación de las células T colaboradoras ( $T_H$ ), citotóxicas ( $T_c$ ) y reguladoras ( $T_{reg}$ ) dependiendo del estímulo y PRR involucrado. Concretamente, las células  $T_H1$ ,  $T_H2$  y  $T_H17$  conforman la principal respuesta frente a los hongos, aunque se desconoce el papel específico que tienen frente a *Scedosporium/Lomentospora* [15,155].

Finalmente, un papel esencial de las células  $T_H$  es la activación de a las células B, encargadas de la producción de anticuerpos. Hasta 1990 se consideraba que la inmunidad mediada por anticuerpos era irrelevante en la respuesta del hospedador frente a los hongos, ya

que los métodos empleados hasta ese momento, como la transferencia pasiva de suero inmune, no permitían demostrar su eficacia. Sin embargo, la tecnología de producción de mAbs ha proporcionado pruebas sobre el papel de anticuerpos específicos en beneficio o en detrimento del huésped [171]. De esta forma, se han descrito anticuerpos protectores frente a una gran variedad de patógenos fúngicos, como *C. neoformans*, *C. albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *A. fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Sporothrix shenkii* [48]. En cuanto a los mecanismos de acción clásicos de los anticuerpos, incluyen la opsonización, la activación del complemento, la neutralización de toxinas y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Sin embargo, estudios recientes sugieren mecanismos adicionales, como la modulación de la respuesta inflamatoria, y la inhibición de la germinación y de la formación de biopelículas [171].

Además, en los estudios realizados de inmunoproteómica con *L. prolificans*, se ha demostrado una fuerte y compleja respuesta humoral en individuos inmunocompetentes frente a este hongo, mediada tanto por IgA salivar como por IgG sérica [138,172–174]. Estos resultados difieren de los obtenidos con otros hongos patógenos en los que se ha detectado una respuesta humoral muy baja en el suero de pacientes no infectados [175]. Algunos de estos anticuerpos podrían ser protectores y estar involucrados en la protección de los individuos inmunocompetentes frente a una posible infección por *L. prolificans*. Además, en estos estudios se ha observado que si bien la IgA reconoce casi exclusivamente los conidios del hongo, la IgG sérica reconoce tanto los conidios como las hifas. Este hecho va acorde con el escenario de una invasión fúngica de las vías respiratorias en la que el huésped inhala la morfología utilizada por el hongo para la dispersión, los conidios, en lugar de hifas [173].

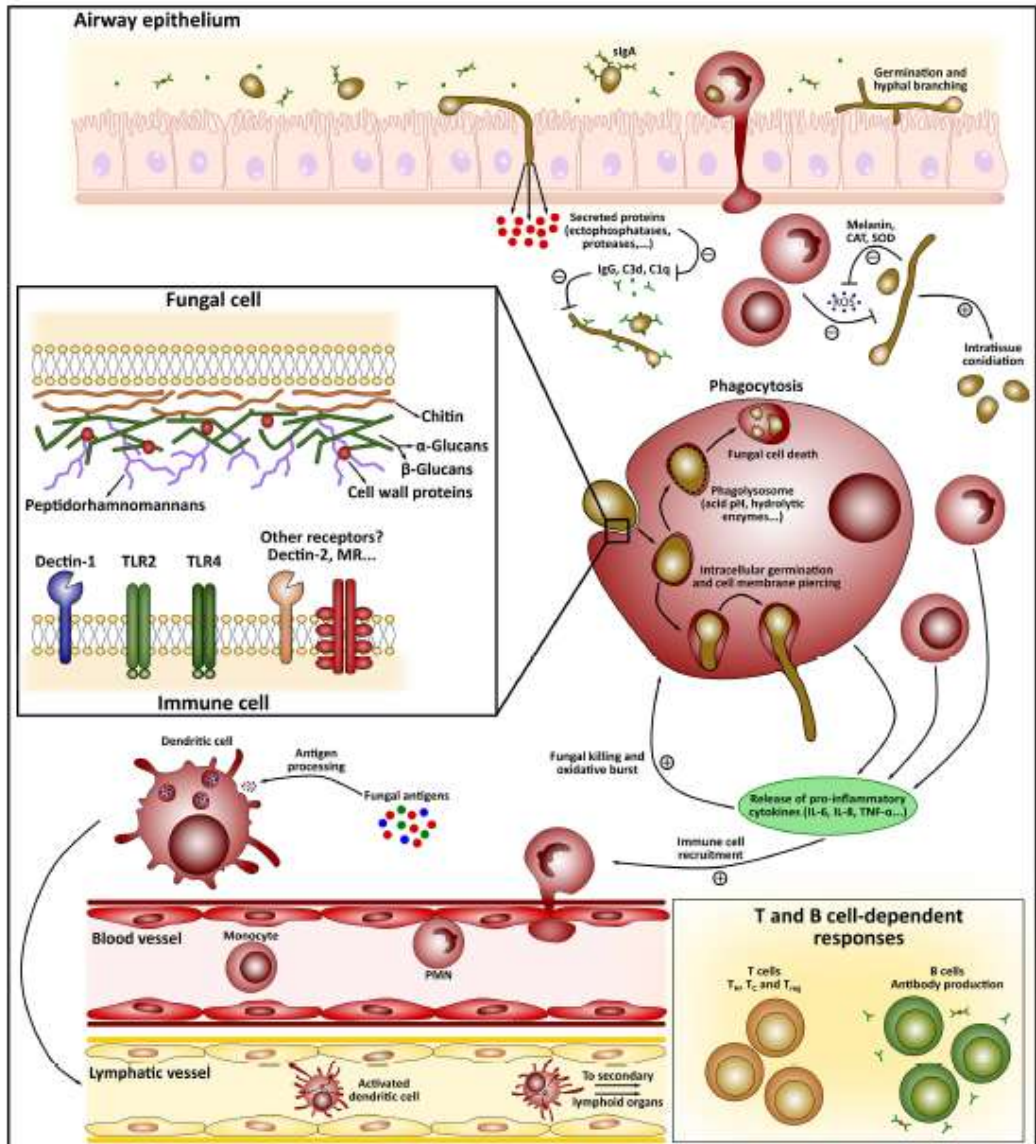


Figura 1.7. Esquema general de la inmunidad frente a *Scedosporium/Lomentospora*. Extraída de Ramirez-García *et al.* (2018) [15].

### 1.9. Factores de virulencia

La patobiología de *L. prolificans* ha sido poco estudiada hasta el momento, pese a tratarse de una de las especies más virulentas del complejo *Scedosporium/Lomentospora* [121,123]. Entre los factores de virulencia de *L. prolificans* destaca su capacidad de esporular *in vivo*, que facilita su diseminación y la rápida progresión de la enfermedad [15].

Además, la pared celular es un órgano fundamental para la virulencia de *L. prolificans*. De hecho, contiene melanina (Figura 1.6), que confiere protección al hongo frente al estrés ambiental (radiación UV) y frente a las ROS ( $H_2O_2$ ) producidas por las células fagocíticas durante el estallido oxidativo [10,176]. Además, este pigmento ha sido asociado a la evasión fúngica de la respuesta inmune del hospedador, enmascarando los PAMPs e interfiriendo en la fusión del fagolisosoma [161,177]. Otro factor de virulencia asociado a la pared celular de *Scedosporium/Lomentospora* que merece especial mención es el PRM (Figura 1.6). El PRM participa en la adhesión fúngica a las células epiteliales y en la endocitosis por las células epiteliales y macrófagos [157,178], y reduce la respuesta inmune del hospedador frente a *L. prolificans*, pudiendo facilitar la colonización, virulencia y diseminación del hongo [179].

Por otro lado, se han descrito numerosas enzimas de *Scedosporium* spp. involucradas en la invasión del hospedador (Figura 1.7), entre las que destacan la proteasa de serina [180], metaloproteasas [181] y enzimas encargadas de degradar compuestos del sistema del complemento [182]. Estas enzimas proteolíticas son componentes clave para la invasión de los tejidos, ya que eliminan mecanismos de defensa y facilitan la adquisición de nutrientes [15]. Se han identificado enzimas importantes en la evasión de la respuesta inmune del huésped en *Scedosporium* spp., la enzima citosólica Cu/Zn superóxido dismutasa [183] y la catalasa [184], así como ectofosfatasa. Estas últimas enzimas han sido previamente asociadas con la adhesión y la endocitosis de *Candida*, sin embargo, se desconoce el papel que tienen en la patogénesis de *Scedosporium* spp. [15]. Por último, los sideróforos detectados en *Scedosporium/Lomentospora* podrían estar involucrados en la patogénesis, permitiendo la adquisición del hierro libre presente en el SNC y, con ello, facilitando la infección de este órgano [10,185]. Concretamente, se han identificado dos sideróforos en *Scedosporium* spp., el ácido dimerómico y el *N*( $\alpha$ )-metil coprogeno B, y este último ha sido estudiado como marcador para la detección de la colonización de las vías respiratorias por *S. apiospermum* [136].





---

## **Justificación y objetivos**

---



*Lomentospora prolificans*, es un patógeno emergente con una gran capacidad para diseminarse a través del torrente sanguíneo y causar infecciones diseminadas en pacientes severamente inmunodeprimidos, particularmente en aquellos con neoplasias hematológicas. A pesar de la prevalencia relativamente baja de estas infecciones, presentan una problemática en la clínica debido su pronóstico negativo, con tasas de mortalidad de hasta el 87,5%. Este hecho está asociado con la tendencia del hongo a infectar a huéspedes debilitados, la falta de métodos de diagnóstico rápidos y su resistencia intrínseca a prácticamente todos los antifúngicos disponibles en la actualidad.

En consecuencia, en este trabajo desarrollamos un estudio inmunoproteómico con el **objetivo principal** de conocer la respuesta humoral mediada por el hospedador y así poder identificar nuevas dianas terapéuticas y diagnósticas que ayuden a hacer frente a estas micosis.

Para la consecución de dicho objetivo, se propusieron los siguientes objetivos **parciales**:

1. Identificación de los antígenos más prevalentes de conidios de *L. prolificans* reconocidos por IgA salivar de donantes sanos, estudio de su localización y su reactividad cruzada con *A. fumigatus*
2. Desarrollo de un modelo de infección murina diseminada por *L. prolificans* y comparación de su patogenicidad frente a *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*
3. Estudio de la respuesta humoral de ratones infectados por *L. prolificans* e identificación y caracterización de los antígenos fúngicos más inmunorreactivos.
4. Estudio comparativo de la respuesta humoral de ratones infectados por *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus* e identificación de los principales antígenos reconocidos en extractos proteicos de *L. prolificans*
5. Desarrollo de un modelo de inmunización frente a las infecciones producidas por *L. prolificans*



---

## **Material y métodos**

---



### 3.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

En este estudio se han empleado la cepa de *Lomentospora prolificans* CECT 20842, aislada de un paciente con infección diseminada, y la cepa de *S. boydii* CECT 21169, ambas recogidas en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). Además, se han empleado la cepa *S. aurantiacum* CBS 116910 aislada de un exudado de herida de un paciente en el Hospital Clínico Universitario de Santiago (Santiago de Compostela) y la cepa de referencia de *A. fumigatus* Af293.

Todas las cepas fueron criopreservadas a -80°C y cultivadas en agar patata dextrosa (APD) (Pronadisa, Madrid, España) a 37°C durante 7 días antes de su uso. Para la obtención de los conidios de *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* las placas se lavaron por duplicado con solución salina estéril (0.9% NaCl) y la suspensión fue filtrada con una gasa y centrifugada. La concentración se ajustó con un hemocitómetro para inocular  $5 \times 10^5$  conidios/ml en caldo patata dextrosa (CPD) (Pronadisa) y se incubó a 37°C durante 7 días. Finalmente, la recogida de los conidios se realizó mediante filtración con gasa y centrifugación (11.400 g, 5 min, 4°C). Los conidios de *A. fumigatus* se recogieron desde tubos de APD incubados a 28°C durante 7 días empleando solución salina-Tween 20 (0,9% NaCl, 0,02% Tween 20) (ss-Tween 20) y se lavaron por duplicado mediante centrifugación.

### 3.2. Identificación de *Scedosporium boydii*

#### 3.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se empleó el método previamente descrito por Liu *et al.* (2000) [186]. En primer lugar, *S. boydii* fue cultivado en CPD a 37°C, 120 rpm, durante 3 días. El micelio se recuperó por centrifugación, y se realizaron 3 lavados con solución salina estéril. Posteriormente, al micelio se le añadió 1 ml de tampón de lisis (400 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 1% (p/v) SDS) y 150-200 mg de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. La ruptura celular se llevó a cabo en el Millmix 20 *bead beater* (Tehtnica, Eslovenia) a 30 Hz durante 5 min. Después se añadieron 300 µl de tampón acetato potásico (60% 5 M acetato potásico pH 4,8, 0,115% (v/v) ácido acético glacial), se mezcló mediante varias inversiones y se realizaron dos centrifugaciones (8.000 g, 5 min), recuperando los sobrenadantes. Se añadió un volumen de isopropanol, se mezclaron las muestras por 8 inversiones, y se centrifugaron a 14.000 g durante 15 min. Finalmente, las pastillas obtenidas se lavaron con 300 µl de etanol frío, y se centrifugaron (14.000 g, 15 min), descartando los sobrenadantes. Las muestras se dejaron secar al aire y

finalmente las pastillas de ADN se resuspendieron en 50 µl de tampón de elución (TE) (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). Para cuantificar la cantidad de ADN, se midió la absorbancia 260/280 en el nanofotómetro (Implen, Munich, Alemania).

### 3.2.2 Selección de la secuencia nucleotídica y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificaron dos regiones del gen de la β-tubulina, BT2 y TUB, empleadas anteriormente para la identificación de las especies del género *Scedosporium* spp.. Para la región BT2 se emplearon los cebadores descritos por Giraldo *et al.* (2005) [140] y para la región TUB los descritos por Luplertlop *et al.* (2016) [187] (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1. Secuencia de los cebadores directos e inversos empleados para la amplificación de los genes diana.**

Gen	Cebadores	
BT2	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Directo
	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Inverso
TUB	CTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC	Directo
	ACCCTCACCAGTATACCAATGCAAGAAAGC	Inverso

Las mezclas para las reacciones de PCR (50 µl) contenían BioMix™ (Bioline, Memphis, EEUU), 400 ng de ADN molde, 0,3 uM de cada cebador y H<sub>2</sub>O hasta 50 µl. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador MJ-Mini (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) empleando el siguiente protocolo precalentamiento a 96°C durante 6 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 2 min, y un paso final de 72°C durante 10 min. Posteriormente, 5 µl de los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón de Tris Acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,3) en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad) a 110 V durante 40 min. Finalmente, se reveló el gel en un transiluminador UV U Genius (Syngene, Cambridge, Reino Unido) detectando la fluorescencia emitida por el colorante fluorescente Gel Red10000X (Biotium, Hayward, CA, EEUU). Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados se llevó a cabo en los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Las secuencias obtenidas se editaron y se alinearon utilizando el software BioEdit, y se compararon con secuencias existentes en GenBank empleando BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



### **3.3. Recogida de muestras humanas**

Se recogieron muestras de saliva de donantes sanos inmunocompetentes del País Vasco, 20 para el estudio antigénico y 40 para ELISA. Tras la recogida, las muestras fueron centrifugadas para eliminar restos celulares. Para el estudio antigénico, se mezcló 1 ml de cada una de las muestras de saliva para obtener una mezcla de salivas. Finalmente, todas las muestras de saliva se conservaron a -20°C hasta su uso. Los procedimientos empleados fueron aprobados por el Comité de Ética de la UPV/EHU.

### **3.4. Desarrollo de modelos murinos de infección diseminada y recogida de muestras**

#### *3.4.1. Animales*

Se emplearon ratones hembras *Swiss* de 8 semanas de edad, que fueron criados y mantenidos en el Animalario del SGIker de la UPV/EHU. Los animales se mantuvieron con agua y comida ad libitum en jaulas esterilizadas con filtros y ventilación de presión negativa. Todos los procedimientos llevados a cabo en el ensayo fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) de la UPV/EHU (M20/2016/235, M20/2016/323).

#### *3.4.2. Supervisión de los animales*

El protocolo de supervisión se inició 24 h después de la administración del primer inóculo y se realizó cada 24 h hasta el final del experimento. Se realizó la observación de signos externos evidentes, dándole a cada alteración una puntuación del 1 al 4 dependiendo de la gravedad, siendo el 4 de máxima gravedad. En caso de detectar un signo con una puntuación de 4 puntos, se procedió a la eutanasia. Así mismo, la suma de alteraciones de menor gravedad también se consideró signo de probable sufrimiento significativo y criterio de punto final. Concretamente, en caso de que la suma de la puntuación de las alteraciones observadas fuera igual o superior a 10 se precedió al punto final humanitario.

Para realizar el seguimiento del bienestar animal se empleó una tabla basada en el trabajo “Animal Models in Cancer Reserch Assessment of Severity and the Application of Humane Endpoints” escrito por JM Orellana-Muriana [188] a la que se le añadieron signos característicos de la infección por *L. prolificans* descritos previamente [121,189]. Dicha tabla está adjuntada como material suplementario.

### 3.4.3. Modelos de infección murina

Todas las infecciones se realizaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola bajo anestesia intraperitoneal con ketamina/xilacina (100/5 mg/kg). Para ello, se prepararon suspensiones de conidios en ss-Tween 20 administrando en cada caso 0,2 ml/animal.

#### 3.4.3.1. Desarrollo de un modelo de infección murina diseminada por *L. proliferans*

Se emplearon 24 ratones que fueron divididos en cinco grupos a los que se les administraron  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  o  $10^5$  conidios/animal y ss-Tween 20 al grupo control. Todos los grupos contenían 4 ratones/grupo, excepto el grupo con la dosis más alta que debido a la elevada mortalidad detectada requirió de 8 individuos. Finalmente, 28 días después de la administración del inóculo se procedió al sacrificio de los animales que sobrevivieron a la infección, a los que se les extrajeron los órganos y la muestra de sangre total.

#### 3.4.3.2. Desarrollo del modelo de inmunización frente a *L. proliferans*

El ensayo contó con 10 ratones que se separaron en 2 grupos (5 individuos/grupo). A un grupo se le administraron dosis no infecciosas de conidios de *L. proliferans* por vía intravenosa (grupo inmunizado) y al otro grupo se le administró ss-Tween 20 en lugar de dichos inóculos (grupo control). De esta forma, al grupo inmunizado se le administraron 2 inóculos no infecciosos, el primero de  $10^2$  conidios/animal al inicio del estudio y el segundo de  $10^3$  conidios/animal a los 28 días. A los 56 días, se les administró a los dos grupos por vía intravenosa una dosis infectiva de conidios de *L. proliferans* ( $2 \times 10^5$  conidios/animal). Finalmente, al transcurso de 28 días tras la administración de la dosis infectiva, 84 desde el inicio del ensayo, los ratones que sobrevivieron fueron sacrificados y se les extrajo la sangre total y los órganos para su posterior estudio.

#### 3.4.3.3. Estudio comparativo de infecciones murinas intravenosas producidas por *L. proliferans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*

Se emplearon 48 ratones a los que se les administraron por vía intravenosa ss-Tween 20 (grupo control) o la dosis indicada de conidios de *L. proliferans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* o *A. fumigatus*. A los ratones infectados con *L. proliferans*, *S. boydii* o *S. aurantiacum* se les administraron  $10^5$  conidios/animal de dichos hongos. En el caso de *A. fumigatus* se utilizaron 3 dosis diferentes de conidios  $10^5$ ,  $10^6$  y  $5 \times 10^6$  conidios/animal. Todos los grupos de ratones estaban compuestos por 6 ratones/grupo, excepto los infectados con *L. proliferans* y  $5 \times 10^6$

conidios/animal de *A. fumigatus* que debido a la elevada mortalidad observada contaron con 12 ratones/grupo. Transcurridos 28 días desde la administración de los inóculos, todos los ratones que sobrevivieron fueron sacrificados para llevar a cabo la extracción de los órganos y las muestras sanguíneas.

#### *3.4.4. Procesamiento de las muestras animales*

En el punto final del experimento, aquellos animales que sobrevivieron a la infección fueron sacrificados para extraer la sangre total y los siguientes órganos riñones, pulmones, bazo, hígado y cerebro. Las muestras de sangre se coagularon, centrifugaron (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), y almacenaron a -80°C hasta su uso. Los órganos fueron divididos en dos mitades, una de ellas se empleó para determinar la carga fúngica mediante el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y la otra para su estudio histológico.

Para la evaluación de la carga fúngica se procedió al pesaje de los órganos y su posterior homogenización mecánica mediante varillas de vidrio en 1 ml de ss-Tween 20. Finalmente, 0,1 ml del homogenizado diluido se sembró por extensión en placas de APD con 10 ug/ml cloranfenicol y 25 ug/ml gentamicina por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C y las UFC se contaron tras 2-3 días. Las otras mitades de los órganos se fijaron en formalina al 10% y posteriormente se sumergieron en parafina. Se realizaron al menos cinco cortes diferentes, de cuatro micrómetros de grosor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina y metenammina de plata de Grocott.

### **3.5. Obtención de extractos proteicos**

#### *3.5.1. Extracción de proteínas de conidios de L. prolificans*

Los conidios se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,5) con 1% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (v/v) anfolitos pH 3–10 (GE Healthcare, Friburgo, Alemania). La ruptura mecánica de las células se llevó a cabo con microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro en el MillMix 20 *bead beater* a 30 Hz durante 20 min. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación (14.100 g, 5 min) y el sobrenadante se conservó a -20°C hasta su uso.

#### *3.5.2. Extracción de proteínas asociadas a la pared celular de los conidios de L. prolificans*

La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo anteriormente descrito por Pitarch *et al.* (2002) [190]. Brevemente, los conidios se mantuvieron a 100°C en un tampón de extracción (50

mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M EDTA, 2% (p/v) SDS, 10mM DTT) durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron (4.500 g, 5 min) y se recogió el sobrenadante que se conservó a -20°C hasta su uso. Una vez extraídas las proteínas asociadas a la pared celular, los conidios se tiñeron con blanco de calcofluor (40 ng/ml) e ioduro de propidio (10 µg/ml) en oscuridad durante 30 min y se visualizaron con el microscopio de epifluorescencia para verificar que los conidios estaban intactos y que no se habían liberado proteínas citoplasmáticas. Se emplearon como control positivo células autoclavadas (121°C, 30 min) [174].

### *3.5.3. Recogida del extracto proteico total*

Se inocularon  $5 \times 10^5$  conidios/ml en 150 ml de CPD (Pronadisa) a 37°C, 120 rpm, durante 24 h. Posteriormente, se centrifugó el cultivo (11.400 g, 5 min, 4°C), y se lavó por duplicado con PBS. Las pastillas de células se resuspendieron en PBS con 1% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (v/v) anfolitos pH 3–10 (GE Healthcare). La ruptura celular se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento detallado en el apartado 5.1

### *3.5.4. Estudio del secretoma de L. prolificans*

#### *3.5.4.1. Recogida de las proteínas secretadas*

Con el fin de establecer el método adecuado para la extracción y posterior caracterización del secretoma de *L. prolificans* mediante electroforesis bidimensional (2DE) se probaron dos metodologías distintas.

- *Secretoma obtenido por filtración del sobrenadante del cultivo*

Se inocularon  $10^6$  conidios/ml en 300 ml de caldo Sabouraud dextrosa (Panreac, Barcelona, España), CPD (Pronadisa) y medio de extracto de levadura y glucosa (0,5% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) glucosa; filtrado con un poro de 5 kDa). Se incubaron los conidios a 37°C con 120 rpm de agitación y se recogieron los cultivos a los 3, 7, 14, y 21 días.

Con el fin de descartar las células, los cultivos se filtraron con papel de filtro con la ayuda de una bomba de vacío, el filtrado se esterilizó mediante filtros de 0,22 µm (Merck Millipore, Cork, Irlanda). Posteriormente, y se concentró 6 veces mediante un aparato de ultrafiltración de Sartorius (Gottinga, Alemania) a una velocidad de 500 ml/min, empleando una membrana de 5 kDa de tamaño de poro. Después el concentrado se dializó a 4°C en agitación en PBS utilizando una

membrana de 6-8 kDa de tamaño de poro (Orange Scientific, Bélgica) y se centrifugó con el fin de retirar los polisacáridos insolubles y los restos celulares (11.400 g, 30 min, 4°C).

- *Secretoma obtenido en PBS-glucosa*

Se empleó la metodología descrita por da Silva *et al.* (2012) para el hongo *S. boydii*, con pequeñas modificaciones. Se inocularon  $10^6$  conidios/ml en 300 ml de CPD (Pronadisa) durante 24 h (37°C, 120 rpm). Posteriormente, los cultivos se filtraron con papel de filtro y se lavaron por duplicado con PBS estéril. Se recogió el hongo y se cultivó en PBS-glucosa 2% a una concentración de 1 g micelio/ml a 37°C (120rpm) durante 20 h. Finalmente, se centrifugó (2.500 g, 20 min, 4°C), se recogió el sobrenadante, y se esterilizó mediante filtros de 0,22  $\mu$ m (Merck Millipore).

#### 3.5.4.2. Comprobación integridad celular y ausencia de proteínas citoplasmáticas

Una vez recogidos los sobrenadantes se procedió al estudio de la integridad celular del hongo para confirmar la ausencia de proteínas citoplasmáticas. Para ello, las muestras del hongo fueron analizadas al microscopio óptico. Así mismo, se realizó un ensayo de la actividad enzimática de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de los medios recogidos. Para el estudio de la actividad enzimática de la LDH, el sustrato (10  $\mu$ l 1M piruvato, 770  $\mu$ l 100 mM Tris-HCl (pH 7,1)) se preincubó a 30°C durante 5 min. Transcurrido ese periodo, 20  $\mu$ l de 15 mM NADH y 200  $\mu$ l de muestra se añadieron al sustrato y se realizó la medida de la absorbancia a 340 nm cada 60 segundos durante 5 min. Como control positivo del estudio se empleó LDH pura.

#### 3.5.4.3. Comparación de las metodologías

La recogida de los extractos se llevó a cabo por triplicado. La concentración de proteínas se cuantificó mediante Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) y la calidad del extracto de proteínas se analizó mediante electroforesis, en geles de acrilamida al 12,5%. Los geles se tiñeron con CBB G-250 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) y se digitalizaron empleando ImageScanner III (GE Healthcare).

### 3.6. Detección de IgA salivar por ELISA

El test de ELISA se llevó a cabo por triplicado empleando 40 muestras de saliva de individuos sanos y conidios inactivados por calor o extractos proteicos de conidios como antígenos. Para ello, se añadieron  $8 \times 10^5$  conidios o 5  $\mu$ g de proteínas a los pocillos de las placas de ELISA y se incubaron a 4°C durante la noche. Posteriormente, estos pocillos se bloquearon con

solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 5% (p/v) leche en polvo y 0,05% (v/v) Tween 20 durante 1 h. Las muestras de saliva diluidas 1/4 en TBS con 0,05% (v/v) Tween 20 (TBST) se incubaron durante 1 h. Después los pocillos se lavaron por triplicado con TBST y se incubaron con anti-IgA humana marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluida 1/50.000 en TBST (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Los pocillos se lavaron de nuevo por triplicado con TBST y se incubaron con TMB (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Finalmente, las reacciones se detuvieron añadiendo 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la lectura de las placas se realizó a 450 nm empleando el lector de placas BioTek SynergyHT (BioTek Instruments, Winooski, VT, EEUU). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente salvo que se indique otra cosa.

### **3.7. Electroforesis**

#### *3.7.1. Electroforesis unidimensional (1DE)*

Se mezclaron tres volúmenes de muestra de proteínas en uno de tampón de carga 4x (20% (p/v) SDS, 0,5 M Tris (pH 6,8), 2 M DTT, 60% (v/v) glicerol). La electroforesis se llevó a cabo a 70 mA en la Miniprotean II (Bio-Rad) utilizando geles de acrilamida del 12,5%. Se emplearon como marcadores de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, AEB).

#### *3.7.2. Electroforesis bidimensional (2DE)*

##### **3.7.2.1. Precipitación de las proteínas**

La precipitación de las proteínas se llevó a cabo en cuatro volúmenes de acetona con 10% (p/v) ácido tricloroacético (TCA) y 0,07% (v/v) 2-mercaptoetanol a -20°C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron durante 20 min a 14.100 g, y las pastillas se lavaron con acetona, se secaron al aire y se resuspendieron en tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 20 mM Tris, 4% (p/v) CHAPS, 1% (v/v) anfolitos, 1% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0,002% (p/v) bromofenol azul).

En el caso del extracto del secretoma, la precipitación de las proteínas se llevó a cabo en un volumen de acetona con 20% (p/v) TCA y 0,07% (v/v) 2-mercaptoetanol a -20°C durante 1 h. Una vez transcurrida la hora se centrifugaron (11.400 g, 45 min, 4°C), se descartó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se lavaron por triplicado con acetona fría, se secaron al aire y se resuspendieron en tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 20 mM Tris, 4% (p/v) CHAPS,

0,5% (v/v) anfolitos, 20 Mm de DTT, 0,002% (p/v) bromofenol azul). Las muestras se sonicaron por triplicado con 2 pulsos a una amplitud de 40 durante 2 min y, con enfriamiento en hielo de 2 min entre ciclos. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

#### 3.7.2.2. Isoelectroenfoque (IEF) y 2DE

El proceso de IEF se llevó a cabo en tiras de dos tamaños diferentes, de 7 cm y de 18 cm, empleando el Ettan IPGphor (GE Healthcare) y llevando a cabo protocolos diferentes para cada tamaño de tiras. En ambos casos se emplearon como marcadores de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) y PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). La concentración de las proteínas se determinó mediante Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific).

##### ▪ *Geles de 7 cm*

Para realizar el IEF, se cargaron 180 µg de proteínas en las tiras Immobiline DryStrip pH 3–10 (GE Healthcare) y se llevó a cabo el siguiente protocolo 10 h de rehidratación, 500 V a 2.000 Vhr, 1.000 V a 3.000 Vhr, 5.000 V a 10.000 Vhr, y 5.000 V a 40.000 Vhr; 50 µA por tira. Una vez finalizado, las tiras se incubaron por duplicado durante 15 min en tampón de equilibrado (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 6,8, 25,5% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 0,002% (p/v) bromofenol azul), primero con 1% (p/v) DTT y después con 2,5% (p/v) iodoacetamida. Finalmente, la segunda dimensión se llevó a cabo en el sistema Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) a 70 mA empleando geles de poliacrilamida del 12,5%.

##### ▪ *Geles de 18 cm*

El IEF se llevó a cabo en las tiras Immobiline DryStrip pH 3–10 (GE Healthcare).y en las tiras ReadyStrip™ IPG Strips pH 3-6 (Bio-Rad) que se cargaron con 400 µg de proteína. Se empleó el siguiente protocolo 12 h de rehidratación, 500 V a 2.000 Vhr, 1.000 V a 9.000 Vhr, 8.000 V a 20.000 Vhr, 8.000 V a 100.000 Vhr, y 8.000V a 10.000 Vhr; 50 µA por tira. Posteriormente, las tiras se incubaron durante 15 min por duplicado en tampón de equilibrado (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 6,8, 25,5% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 0,002% (p/v) bromofenol azul), primero con 1% (p/v) DTT y después con 2,5% (p/v) iodoacetamida. Finalmente, la 2DE se llevó a cabo en PROTEAN II xl Cell (Bio-Rad) a 45 mA por gel, en condiciones de refrigeración, empleando geles de poliacrilamida del 12,5%.

Para las muestras del secretoma se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito con pequeñas modificaciones. Las muestras se centrifugaron (14.100 g, 20 min) previamente al proceso de IEF y se recogió el sobrenadante. Al protocolo del IEF se le añadió un paso inicial de 150 V a 300 Vhr. Una vez finalizado el proceso de IEF las tiras se trataron siguiendo el protocolo anterior, empleando en este caso geles de poliacrilamida del 13% para la 2DE.

### **3.8. Detección de proteínas y de antígenos**

#### *3.8.1. Detección de proteínas*

Los geles se tiñeron con CBB G-250 (Sigma-Aldrich) [191] y posteriormente se digitalizaron empleando ImageScanner III. Todas las 2DE se realizaron por triplicado y sólo los geles más representativos se muestran en los resultados. El análisis de imagen se llevó a cabo mediante el ImageMaster 2D Platinum Software (GE Healthcare).

#### *3.8.2. Detección antigénica*

En primer lugar, las proteínas de los geles se electrotransfirieron a membranas de Hybond-P PVDF (GE Healthcare) mediante el Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Los geles de 2DE realizados con tiras de IEF de 7 cm y los obtenidos tras la 1DE se electrotransfirieron a 400 mA durante 20 min, y los geles de 2DE obtenidos tras el IEF en tiras de 18 cm a 400 mA durante 2 h. En ambos casos, para confirmar la correcta transferencia de las proteínas las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (0.2% (p/v) Rojo Ponceau, 1% (v/v) ácido acético). Las proteínas inmunorreactivas se detectaron empleando ECL Plus (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante en el G BOX Chemi system (Syngene). El análisis de los Western Blots (WB) se llevó a cabo mediante análisis de imagen empleando ImageMaster 2D Platinum Software (GE Healthcare).

##### *3.8.2.1. Detección de antígenos reconocidos por saliva humana*

En primer lugar, las membranas se bloquearon durante 1 h en TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) con 7% (p/v) leche en polvo (TBSL). Posteriormente, las membranas se incubaron con saliva humana suplementada con 7% (p/v) leche en polvo y 0,25% (v/v) Tween 20. Las membranas se lavaron 3 veces en TBS, durante 10 min cada vez. Se empleó como anticuerpo secundario un anti-IgA humana marcado con HRP diluida 1/100.000 en TBSL con 0,25% (v/v)



Tween 20. Finalmente, las membranas se lavaron nuevamente por triplicado con TBS, 10 min cada vez. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Para el estudio de prevalencia de los antígenos de *L. proliferans*, se realizó una réplica para cada una de las 20 muestras de saliva analizadas, y para el estudio comparativo interespecífico, los experimentos se realizaron por triplicado para cada especie. El volumen relativo de los antígenos se representó en un mapa de calor (*heatmap*) empleando GraphPad Prism (versión 7; Graph Prism Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

#### 3.8.2.2. Detección de antígenos reconocidos por ratones infectados

Para detectar las proteínas inmunorreactivas, en primer lugar, las membranas se bloquearon durante 2 h en TBS con 5% (p/v) leche en polvo y 0,1% (v/v) Tween 20 (TBSL). Posteriormente, las membranas se incubaron con suero de ratón diluido en TBSL a 4°C durante la noche. Transcurrido ese tiempo, el exceso de anticuerpo se retiró realizando cuatro lavados con TBS de 5 min. Después las membranas se incubaron con un anti-IgG murino marcado con HRP a una dilución de 1/100.000 en TBSL. Las incubaciones de los WBs se realizaron a temperatura ambiente, excepto cuando se ha indicado lo contrario. Todos los WBs bidimensionales (2DWBs) se realizaron por triplicado, mostrando únicamente las imágenes más representativas en el apartado de resultados.

### 3.9. Identificación de proteínas inmunorreactivas

Los antígenos más prevalentes fueron manualmente extraídos de geles teñidos con CBB G-250 e identificados con LC-MS/MS en los SGiker de la UPV/EHU. Los trozos de gel extraídos se sumergieron en tampón de digestión (50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 12,5 ng/ $\mu\text{L}$  tripsina (Roche, Basilea, Suiza)) y se incubaron a 37°C durante la noche. Después los péptidos fueron extraídos, primero con 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  y acetonitrilo (ACN), y segundo con 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético y ACN. Los sobrenadantes recogidos se mezclaron, se secaron en una SpeedVac (Thermo Electron, Waltham, MA, EEUU), se disolvieron en 10  $\mu\text{L}$  de 0,1% (v/v) ácido fórmico (AF) y se sonicaron durante 5 min.

La LC-MS/MS se llevó a cabo en el espectrómetro de masas SYNAPT HDMS (Waters, Milford, MA, EEUU) interconectado con un nanoAcquity UPLC System (Waters). Para ello, 8  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras se cargaron en una Symmetry 300 C18, precolumna 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm (Waters) y se lavaron con 0,1% (v/v) AF a un caudal de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante 3 min. La precolumna se conectó a un BEH130 C18, 75  $\mu\text{m}$  x 200 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters), equilibrado en 3% (v/v) ACN y 0,1%

(v/v) AF. Los péptidos fueron eluidos con un gradiente lineal de 30 min de 3-60% (v/v) ACN directamente en un NanoEase Emitter (Waters). El voltaje capilar se ajustó a 3.500 V y las adquisiciones de MS/MS dependientes de datos se realizaron en precursores con estados de carga de 2, 3 o 4 en un rango de m/z de 350-1.990.

El procesamiento de los espectros obtenidos se realizó utilizando VEMS [192], y la búsqueda se realizó en la base de datos no redundante (nr) del NCBI restringida a hongos (versión 20150309) utilizando el servidor en línea MASCOT (Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido; <http://www.matrixscience.com>). Para la identificación de las proteínas, la carbamidometilación de las cisteínas se adoptó como una modificación fija y la oxidación de las metioninas como una modificación variable. Se permitió hasta un punto de escisión perdido, y se fijaron valores de 50 ppm y de 0,1 Da para tolerancias de masa de péptidos y de fragmentos, respectivamente. En los casos en los que se obtuvo más de un resultado para el mismo punto, únicamente se mostraron las proteínas con una puntuación MASCOT superior al 60% respecto al valor obtenido para la proteína mejor identificada en el punto, y con una cobertura de  $\geq 5\%$ .

### **3.10. Electroelución de la proteína de choque térmico 70 kDa (Hsp70)**

Se extrajeron manualmente los puntos correspondientes a la Hsp70 de los geles de 2DE del extracto proteico total de *L. prolificans* teñidos con Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich). Las proteínas del fragmento de gel extraído se electroeluyeron con el sistema 422 Electro-eluter (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el fin de aumentar la eficiencia del proceso, en cada uno de los tubos del aparato de electroelución se añadieron dos puntos correspondientes a dos réplicas del gel que contenían la Hsp70 y cada uno de los puntos se seccionó en tres partes. Las proteínas se eluyeron a 10 mA/tubo (60 mA en total) durante 5 h. Posteriormente, se realizó una 1DE con las muestras electroeluidas en geles de 12% de acrilamida.

### **3.11. Análisis de la localización, función y homología de antígenos de *L. prolificans* mediante herramientas bioinformáticas**

El análisis de la localización y funcionalidad de los antígenos se llevó a cabo mediante el análisis bioinformático de las secuencias. Concretamente, se empleó el software TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) para predecir la localización y el SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) para la vía de secreción. Los resultados se consideraron positivos, cuando la puntuación era  $\geq 0,5$  para TargetP y  $\geq 0,6$  para SecretomeP 2.0. Además, para

predecir las adhesinas se empleó FaaPred (<http://bioinfo.icgeb.res.in/faap/>), utilizando un umbral de puntuación de -0,8. Por último, para estudiar la funcionalidad, la familia y los dominios de las proteínas se empleó la base de datos Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Las proteínas se clasificaron manualmente en grupos funcionales.

Se estudió la homología de las proteínas mediante Blastp en el sitio web del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) frente a todas las proteínas no redundantes de *Homo sapiens*, *Scedosporium spp.*, *A. fumigatus* y *C. albicans*. La homología de los antígenos se representó en un *heatmap* empleando GraphPad Prism.

### **3.12. Reactividad cruzada de IgA salivar entre *A. fumigatus* y *L. prolificans***

Se recogieron  $10^{10}$  conidios de *A. fumigatus* que fueron incubados en 40 ml de una mezcla de salivas a temperatura ambiente durante 1 h. Esta suspensión se centrifugo (4.500 g, 20 min), se descartó el sobrenadante y los conidios se lavaron por triplicado con 20 ml de TBS. Para liberar los anticuerpos unidos a las células los conidios se incubaron con 20 ml de tampón 0,1 M glicina-HCl (pH 2,5) durante 3 h. Finalmente, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación (4.500 g, 20 min) y se dializó en TBS. La reactividad cruzada entre *A. fumigatus* y *L. prolificans* se estudio por triplicado mediante 2DWB. Para detectar los antígenos reconocidos por las IgAs anti-*A. fumigatus* purificadas se emplearon membranas con extractos de conidios.

### **3.13. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS (versión 17.0 para Windows; Chicago, IL, EE.UU.). Las diferencias en las absorbancias obtenidas en el ELISA para las tres especies fueron analizadas mediante el test ANOVA en una vía con un intervalo de confianza del 95%.

Las cargas fúngicas de los órganos de los ratones se compararon utilizando el test T-student para dos grupos y la prueba ANOVA de dos vías seguida de comparaciones múltiples corregidas con la prueba de Dunnett para más de dos grupos. Los datos se mostraron en gráficos mediante GraphPad Prism. El criterio de significación se fijó en  $p \leq 0,05$ , 0,01 y/o 0,001 para todas las comparaciones.



---

## **Resultados**

---



#### **4.1. Identificación de los antígenos de conidios de *L. prolificans* reconocidos por IgA salivar de donantes sanos. Estudio de su prevalencia, localización y reactividad cruzada con *A. fumigatus***

##### *4.1.1. Prevalencia y estudio de la reactividad de antígenos de *L. prolificans* reconocidos por IgA salivar de donantes sanos*

La detección de proteínas inmunorreactivas de *L. prolificans* reconocidas por IgA salivar humana se llevó a cabo mediante 2DWB. Los inmunomas obtenidos empleando 20 muestras de saliva fueron comparados con el obtenido empleando una mezcla de todas las muestras. De esta forma, se estudiaron 104 puntos antigénicos, la mayoría de ellos localizados entre el pI 4 y 7 y un Mr superior a 25 kDa. De todos ellos, 10 puntos fueron detectados por más del 50% de las muestras de saliva empleadas, siendo la ciclofilina y la enolasa las más prevalentes, detectadas en un 85 y 80% de los WBs, respectivamente (Tabla 4.1, Figura 4.1A-B). Además, la ciclofilina se identificó en tres puntos con un Mr parecido pero diferente pI.

El volumen relativo de cada uno de los antígenos se representó en un mapa de calor (*heatmap*), en el que se observaron grandes diferencias entre los individuos (Figura 4.2A). A pesar de no detectar una relación directa entre el volumen relativo y la prevalencia de los puntos, la ciclofilina y la enolasa fueron detectadas, como era de esperar, entre los antígenos con mayor valor de volumen relativo (Figura 4.2B).

##### *4.1.2. Estudio de la localización y la funcionalidad de los antígenos de *L. prolificans**

Para estudiar la localización de los antígenos más prevalentes de *L. prolificans* identificados en este estudio se emplearon dos métodos bioinformático y empírico. Los análisis bioinformáticos predijeron una localización mitocondrial para el 40% de los antígenos, concretamente, las tres isoformas de la ciclofilina y la cys-gly metalopeptidasa (MEP). Sin embargo, no se predijo la secreción de ninguno de los antígenos. Por otro lado, únicamente se detectaron propiedades de adhesina para la malato deshidrogenasa (MDH) (Figura 4.2C).

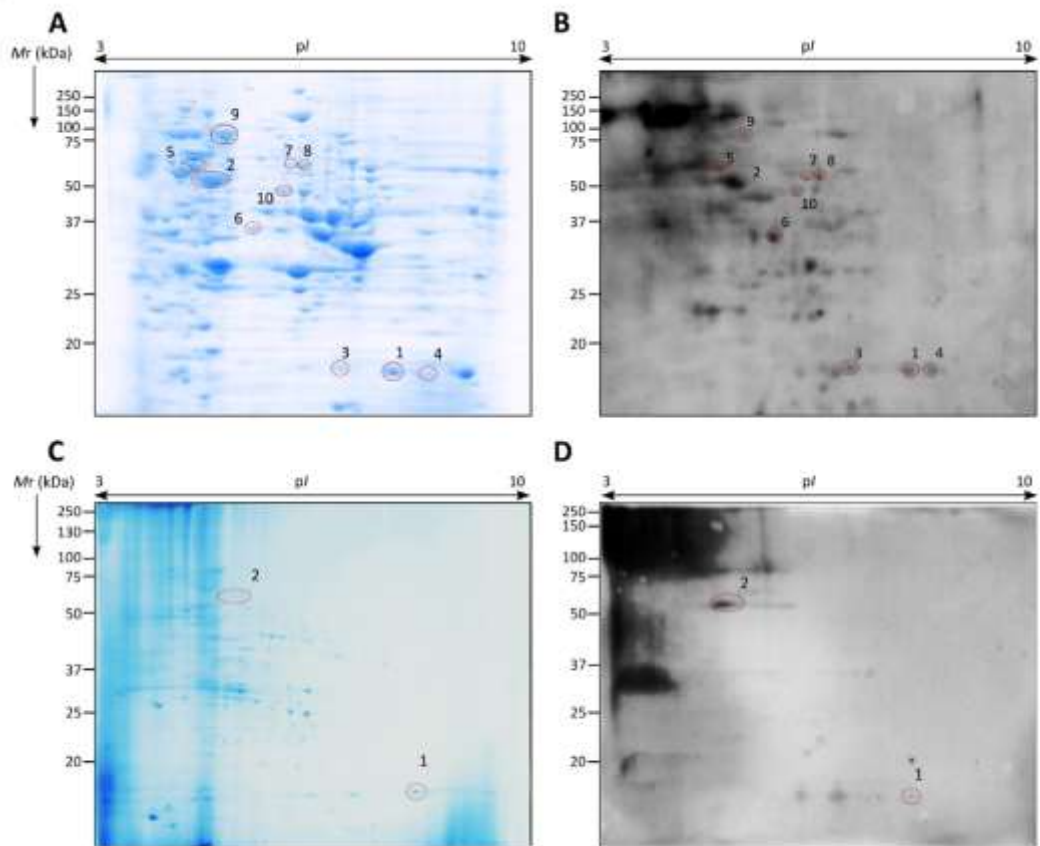
La caracterización del proteoma y el inmunoma de las proteínas asociadas a la pared celular mostró hasta 119 puntos, de los cuales hasta 34 fueron reconocidos por las IgAs (Figura 4.1C-D). Entre ellos, dos puntos se detectaron con el mismo Mr y pI que la enolasa y la ciclofilina más prevalente del extracto completo de conidio analizado previamente. Este resultado fue corroborado mediante la identificación de las proteínas por LC-MS/MS (Tabla 4.1).

El análisis de funcionalidad de los antígenos identificados permitió la clasificación de las proteínas en grupos funcionales, mostrando que la mayoría ellas estaban relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y con el plegamiento de proteínas (Figura 4.2D).

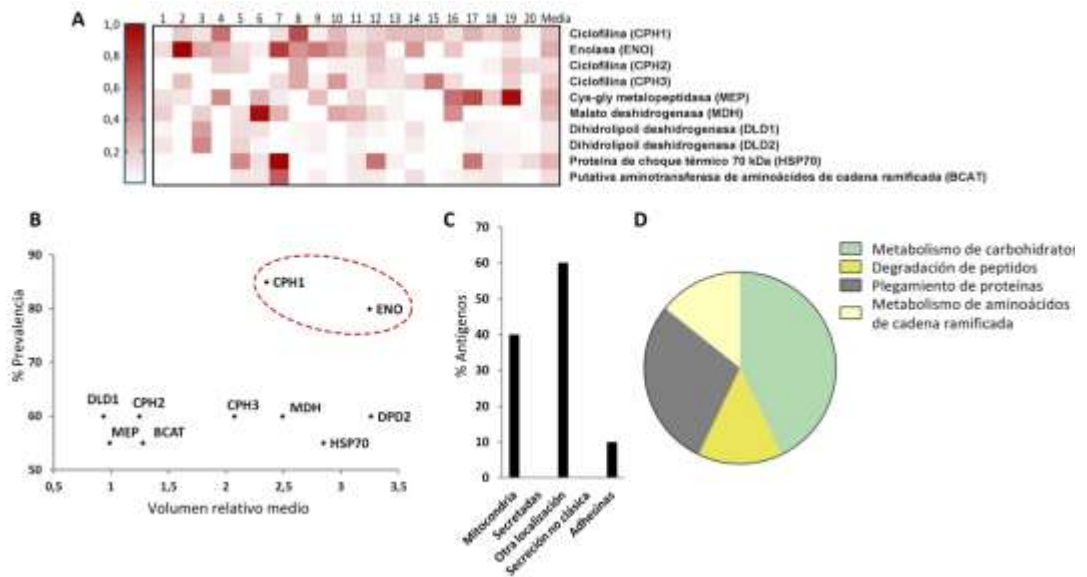


**Tabla 4.1. Identificación mediante LC-MS/MS de los antígenos reconocidos por IgA humana más prevalentes de conidios y de pared de *Lomentospora prolificans*.**

n.º punto	Prevalencia (%)	n.º acceso	Nombre proteína	Microorganismo	Péptidos (n.º)	Cobertura (%)	Puntuación MASCOT	pI/Mr (kDa) teóricos	pI/Mr (kDa) experim.
<b>Antígenos prevalentes de conidios de <i>L. prolificans</i> (Figura 4.1A)</b>									
1	85	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	5	26	352	9,79/27,09	8,22/19,11
2	80	PKS06586.1	Enolasa (hp_jhhlp_007334)	<i>L. prolificans</i>	13	42	1415	5,20/47,46	5,38/55,33
3	60	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	7	34	276	9,79/27,09	7,49/18,32
4	60	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	4	21	258	9,79/27,09	8,76/16,24
5	60	PKS07553.1	Cys-gly metalopeptidasa dug1 (hp_jhhlp_006157)	<i>L. prolificans</i>	9	23	482	5,87/61,40	4,63/53,19
		PKS11975.1	Tubulina alfa (hp_jhhlp_001271)		5	19	479	4,91/50,79	
6	60	PKS11886.1	Malato deshidrogenasa (hp_jhhlp_001180)	<i>L. prolificans</i>	14	58	924	5,87/34,74	5,89/36,02
7	60	PKS07073.1	Dihidrolipoil deshidrogenasa (hp_jhhlp_005670)	<i>L. prolificans</i>	11	13	972	5,88/129,04	6,42/60,10
8	55	PKS07073.1	Dihidrolipoil deshidrogenasa (hp_jhhlp_005670)	<i>L. prolificans</i>	9	10	372	5,88/129,04	6,63/56,11
9	55	PKS12794.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp_jhhlp_001005)	<i>L. prolificans</i>	19	53	2663	5,61/68,51	5,25/69,84
		PKS08780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp_jhhlp_003389)		20	45	2490	5,91/72,39	
		PKS08876.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp_jhhlp_003489)		20	45		5,82/72,44	
10	55	PKS06327.1	Aminotransferasa (putativa) de aminoácidos de cadena ramificada TOXF (hp_jhhlp_007075)	<i>L. prolificans</i>	9	37	644	5,89/42,19	6,08/43,97
<b>Proteínas de la pared celular de conidios de <i>L. prolificans</i> (Figura 4.1C)</b>									
1	-	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	3	15	147	9,79/27,09	8,22/16,60
2	-	PKS06586.1	Enolasa (hp_jhhlp_007334)	<i>L. prolificans</i>	6	22	325	4,20/47,46	5,38/52,01



**Figura 4.1. Análisis mediante electroforesis bidimensional del proteoma e inmunoma de conidios de *Lomentospora prolificans*.** Imágenes representativas del proteoma completo (A) y del inmunoma frente a IgA salivar humana (B). Los puntos antigénicos detectados por más del 50% de las muestras están marcados. Imágenes representativas del proteoma de proteínas asociadas a la pared celular (C) y del inmunoma frente a IgA salivar humana (D). Los puntos marcados corresponden a la ciclofilina (1) y la enolasa (2).



**Figura 4.2. Prevalencia, volumen relativo, localización y función de los antígenos más prevalentes de *Lomentospora prolificans* reconocidos por IgA de donantes sanos.** Representación del volumen relativo (A) y gráfica de la prevalencia y del volumen relativo (B). Estudio bioinformático de la localización celular y de las propiedades adhesivas (C), y la clasificación funcional de los antígenos (D).

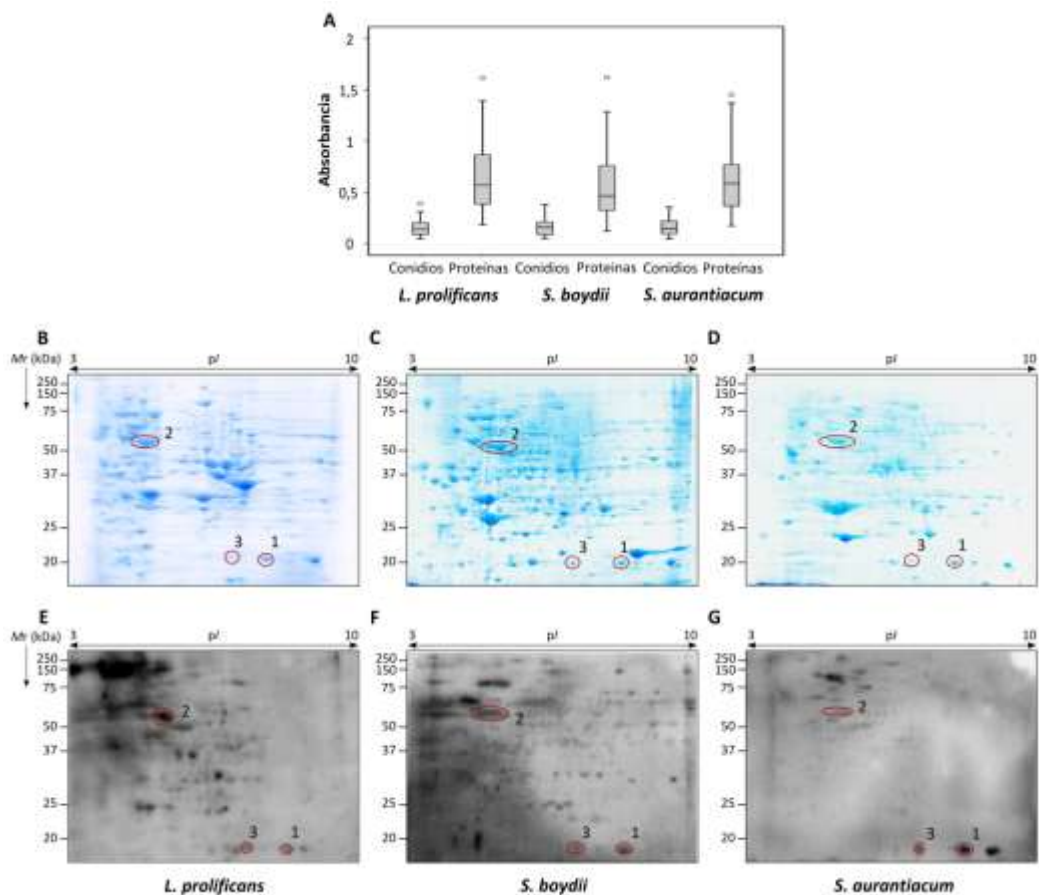
#### 4.1.3. Análisis comparativo del reconocimiento de las IgA salivares frente a *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* en una población sana

Debido a que *L. prolificans* está filogenéticamente estrechamente relacionado al género *Scedosporium*, el reconocimiento de las IgA salivares frente a *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* se comparó mediante ELISA empleando como antígenos tanto conidios enteros como extractos proteicos. Los dos estudios mostraron un nivel de reactividad similar entre las tres especies y una elevada dispersión de los datos (Figura 4.3A). Además, cabe destacar que en el ELISA que se llevó a cabo con el extracto total de proteínas se obtuvieron señales muy superiores en comparación a los resultados obtenidos con los conidios enteros.

Por otro lado, se realizó un segundo estudio mediante 2DE y WB para determinar si los antígenos más prevalentes de *L. prolificans* estaban también presentes en *S. boydii* y *S. aurantiacum*. Los resultados mostraron patrones proteómicos e inmunómicos muy diferentes, con

mayor similitud entre las dos especies del género *Scedosporium*. Sin embargo, se observaron patrones comunes en las tres especies entre 4-6 pI con un *Mr* superior a 50 kDa (Figura 4.3B-G).

En el estudio de los inmunomas se detectaron al menos tres antígenos en común en las tres especies. De acuerdo a la comparación del *Mr* y pI frente al inmunoma de *L. prolificans*, estos antígenos correspondían a la enolasa y a dos ciclofilinas (Figura 4.3E-G). Dos de ellos, la enolasa y la ciclofilina con mayor prevalencia, fueron identificadas mediante LC-MS/MS (Tabla 4.2).



**Figura 4.3. Resultados obtenidos del test ELISA, y proteomas e inmunoma representativos de *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium boydii* y *Scedosporium aurantiacum*.** Comparación mediante ELISA de la concentración de IgA frente a conidios enteros y extracto de proteínas de *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* empleando 40 muestras de saliva (A). Proteomas (B-D) e inmunomas salivares (E-G) de *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum*. Se han marcado las ciclofilinas (1, 3) y la enolasa (2).

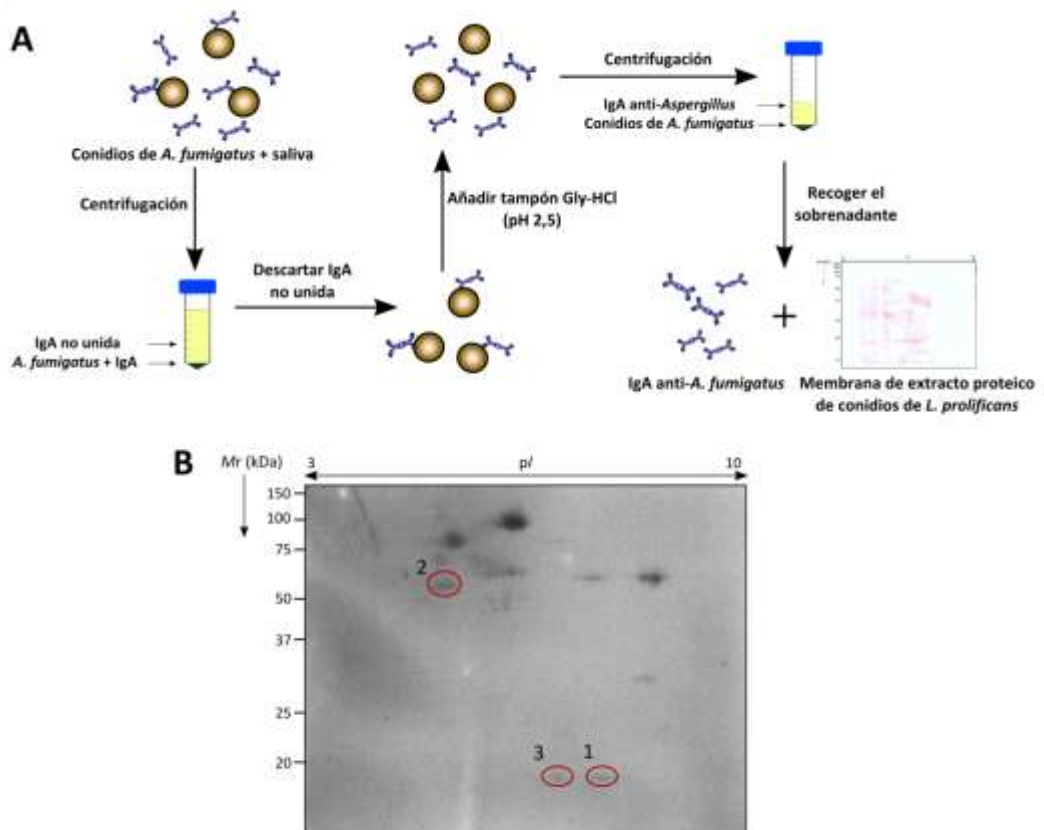
**Tabla 4.2. Identificación mediante LC-MS/MS de los antígenos reconocidos por IgA humana en los de conidios de *Scedosporium boydii* y *Scedosporium aurantiacum* que también son reconocidos en *Lomentospora prolificans*.**

n.º punto	Prevalencia (%)	n.º acceso	Nombre proteína	Microorganismo	Péptidos (n.º)	Cobertura (%)	Puntuación MASCOT	pI/Mr (kDa) teóricos	pI/Mr (kDa) experim.
<b>Conidios de <i>Scedosporium boydii</i> (Figura 4.3C)</b>									
1	-	ATY62045.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina)	<i>Cordyceps militaris</i>	2	13	156	9,69/24,94	8,28/16,84
2	-	XP_016644254.1	Enolasa	<i>S. boydii</i>	21	60	2390	5,19/47,50	5,32/48,71
<b>Conidios de <i>Scedosporium aurantiacum</i> (Figura 4.3D)</b>									
1	-	KZL81228.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina)	<i>Colletotrichum incanum</i>	5	20	460	9,66/25,90	8,04/16,13
2	-	XP_016644254.1	Enolasa	<i>S. boydii</i>	10	34	1396	5,19/47,50	5,24/52,59

#### 4.1.4. Estudio de la reactividad cruzada entre *A. fumigatus* y *L. prolificans*

Con el objetivo de estudiar la reactividad cruzada entre *A. fumigatus* y *L. prolificans*, las IgA que se unieron específicamente a los conidios de *A. fumigatus* fueron purificadas y empleadas para detectar los antígenos de *L. prolificans* mediante WB.

Los resultados obtenidos mostraron que 16 antígenos de *L. prolificans* eran reconocidos por anticuerpos purificados por su capacidad de unión a conidios de *A. fumigatus*. Entre ellos se detectaron los antígenos reconocidos con mayor prevalencia por IgA salivar humana, la enolasa y la ciclofilina (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Estudio de reactividad cruzada de la IgA salivar entre *Aspergillus fumigatus* y *Lomentospora prolificans*. Los conidios de *A. fumigatus* se incubaron con saliva durante 1h a 37°C y posteriormente se recogieron y se incubaron en tampón glicina-HCl (pH 2,5) para liberar los anticuerpos unidos a *Aspergillus* (A). Finalmente, las IgA anti-*A. fumigatus* purificadas y

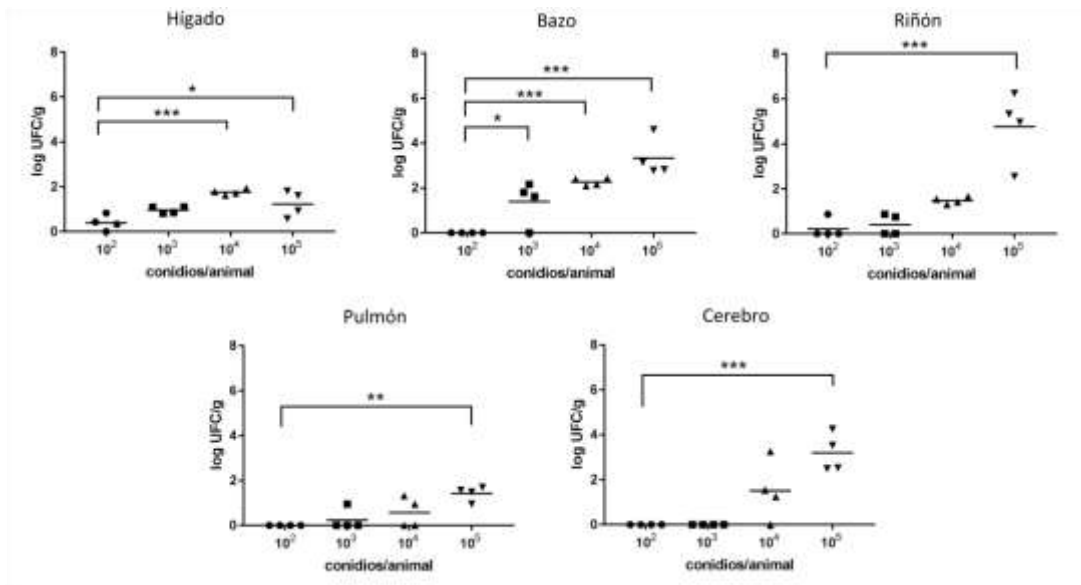
dializadas se emplearon para detectar proteínas de conidios de *L. prolificans* mediante WB (B). Las ciclofilinas (1, 3) y la enolasa (2) están marcadas en el inmunoblot.

## **4.2. Desarrollo de un modelo murino de infección diseminada por *L. prolificans* y comparación de su patogenia frente a *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus***

### *4.2.1. Estudio de la infección desarrollada en ratones tras la administración de diferentes dosis de conidios de *L. prolificans**

Para el ensayo se utilizaron diferentes dosis de conidios de *L. prolificans*, que fueron administradas a ratones por vía intravenosa. Para ello, se emplearon 5 grupos de ratones de 4 individuos por grupo (excepto el grupo con la dosis más alta que debido a la mortalidad requirió de 8 individuos). Al grupo control se le administró ss-Tween 20 y al resto de grupos se les administraron las siguientes dosis de conidios en ss-Tween 20  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , y  $10^5$  conidios/animal.

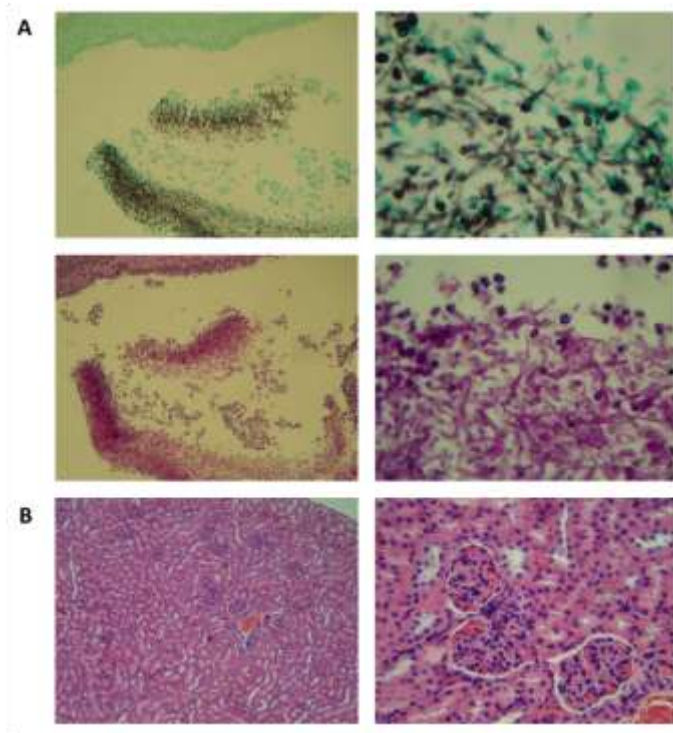
Tal y como se observa en la Figura 4.5, en los grupos infectados con  $10^2$  y  $10^3$  conidios/animal se contaron un reducido número de UFCs, principalmente detectadas en órganos asociados a la circulación sanguínea (bazo, riñón, hígado). En el grupo de ratones infectados con  $10^4$  conidios/animal, además de recoger un número superior de UFCs cabe destacar la presencia del hongo en el cerebro. Por último, en el grupo infectado con la dosis más elevada ( $10^5$  conidios/animal) se observó un número muy elevado de UFCs, detectando diferencias estadísticamente significantes en todos los órganos. Los riñones, el bazo y el cerebro fueron los órganos más afectados, obteniendo  $4,77 \pm 1,58$ ,  $3,34 \pm 0,86$  y  $3,20 \pm 0,86$  log UFC/g, respectivamente.



**Figura 4.5.** Carga fúngica de los órganos tras la administración intravenosa de 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> conidios/animal de *Lomentospora prolificans*. Se empleó el test ANOVA de dos vías, tomando como referencia el grupo infectado con 10<sup>2</sup> conidios/animal; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 y \*\*\* p < 0,001.

En el estudio histológico de los órganos se observó la presencia del hongo solamente en los riñones de los ratones infectados con la dosis de 10<sup>5</sup> conidios/animal (Figura 4.6A), detectando una elevada presencia de conidios. Sin embargo, en el resto de grupos no se observó ninguna afectación. En la Figura 4.6B se muestran, como ejemplo, los cortes histológicos de los riñones del grupo control.

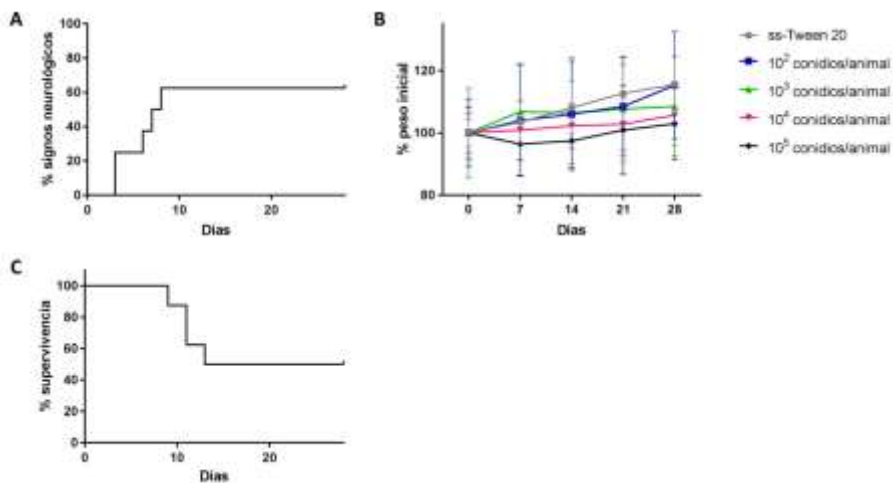




**Figura 4.6. Secciones de riñones de ratones infectados por vía intravenosa con *Lomentospora prolificans*.** Secciones representativas de riñones de ratones infectados por vía intravenosa con  $10^5$  conidios/animal de *L. prolificans* teñidas con metenammina-plata de Grocott (arriba) y hematoxilina-eosina (abajo) (A). Secciones representativas de riñones del grupo control teñidas con hematoxilina-eosina (B).

A lo largo de los 28 días de duración del experimento se realizó un seguimiento diario del bienestar animal, anotando la aparición de los signos asociados a la infección. Se detectaron signos de infección solamente en los ratones infectados con la dosis de  $10^5$  conidios/animal. Concretamente, los más comúnmente observados fueron abdomen encorvado, pelo erizado, aislamiento, letargo persistente, pérdida severa de peso, y alteraciones neurológicas. Además, en algunos casos se observó ausencia de movimientos inducidos y de respuesta a sonidos inesperados, y la realización de movimientos repetitivos. El signo neurológico principal detectado fue la inclinación hacia un lado, signo que en ciertas ocasiones apareció acompañado de la pérdida total del equilibrio y/o ataxia. Dicho signo se observó desde tres días después de la administración del inóculo y llegó a afectar al 62,5% de los individuos infectados (Figura 4.7A).

El seguimiento del peso de los ratones mostró una relación inversa entre el peso adquirido y el número de conidios administrados (Figura 4.7B). De esta forma, la pérdida de peso más pronunciada se observó en el grupo de ratones infectados con la dosis de  $10^5$  conidios/animal. Por último, el único grupo que presentó muertes asociadas a la infección fue el infectado con  $10^5$  conidios/animal. La primera muerte se recogió el día 9 tras la infección con el inóculo, obteniendo una tasa de supervivencia del 50% a los 28 días después de su administración (Figura 4.7C).



**Figura 4.7. Monitorización del bienestar animal tras la administración intravenosa de  $10^2$ - $10^5$  conidios/animal de *Lomentospora prolificans*.** Detección de signos neurológicos en ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal (A). Pesaje semanal de los ratones inoculados con *L. prolificans* y del grupo control (B). Curva de supervivencia de los ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal (C).

Con los resultados obtenidos, se seleccionó la dosis de  $10^5$  conidios/animal como la dosis mínima para producir una infección diseminada (dosis infectiva) de *L. prolificans*. Por otro lado, debido a la reducida cantidad de UFCs recogidas en los ratones inoculados con  $10^2$  conidios/animal, y a la falta de signos clínicos asociados a la infección, dicha dosis fue seleccionada como dosis de contacto no infectiva.

4.2.2. Estudio comparativo de infecciones murinas intravenosas producidas por *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*

Teniendo en cuenta los resultados observados en el apartado anterior y la cercanía filogenética entre *Lomentospora* spp. y *Scedosporium* spp., para ambos géneros se empleó la dosis de  $10^5$  conidios/animal con el objetivo de producir una infección diseminada. En el caso de *A. fumigatus*, con el objetivo de seleccionar la dosis infectiva adecuada se emplearon 3 grupos de ratones a los que se les administró  $10^5$ ,  $10^6$  o  $5 \times 10^6$  conidios/animal, respectivamente.

En los ratones infectados con *A. fumigatus* se observó una correlación positiva entre el número de conidios administrados y las UFCs recogidas, detectando un número significativamente superior de UFCs en los riñones de los ratones infectados con la dosis elevada (Figura 4.8A). Los ratones inoculados con  $10^5$  conidios/animal no mostraron signos asociados a la infección, ni pérdida de peso tras la administración del inóculo (Figura 4.8B), y en los inoculados con  $10^6$  conidios/animal únicamente el 16,67% mostró signos, frente al 83,3% de los inoculados con  $5 \times 10^6$  conidios/animal. Por último, en los grupos inoculados con las dosis de  $10^5$  y  $10^6$  conidios/animal la tasa supervivencia fue del 100%, frente al 50% obtenida con la dosis más elevada. Con todo ello, la dosis de  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *A. fumigatus* se seleccionó como dosis infectiva al ser la única que mostró claros resultados asociados a un proceso de infección y mortalidad.

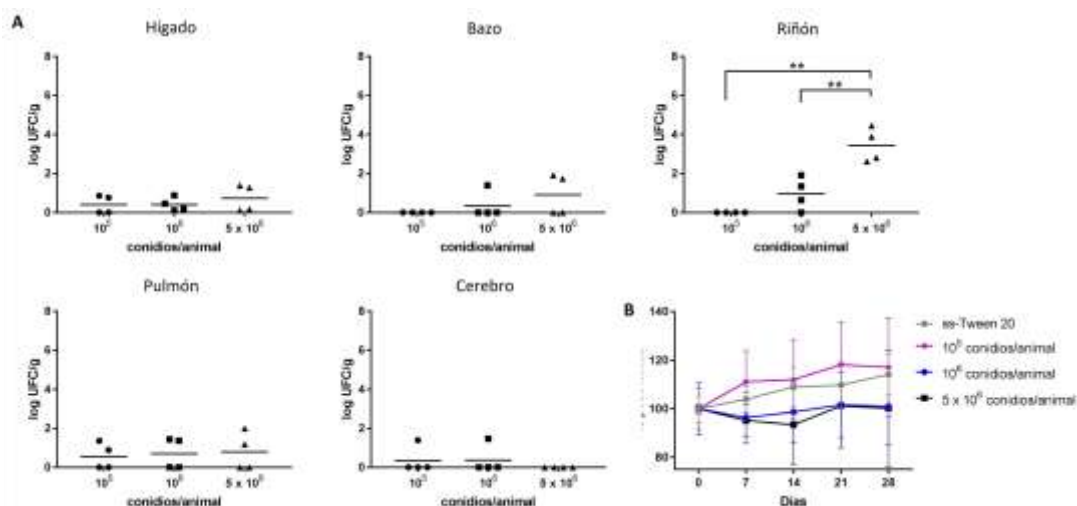
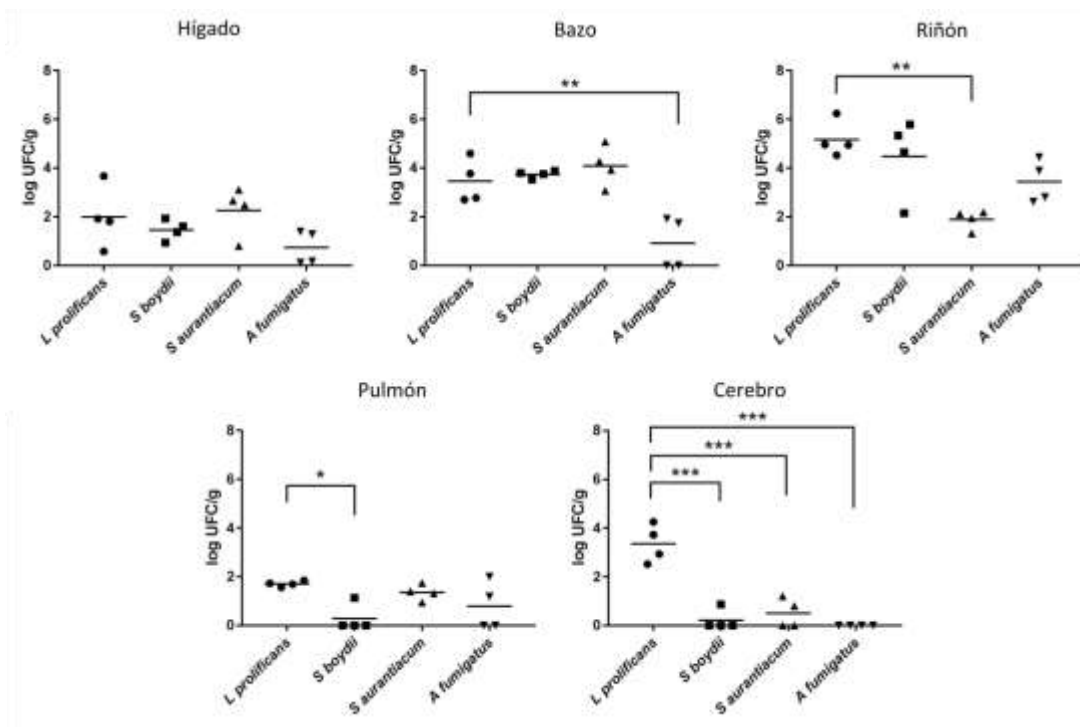


Figura 4.8. Carga fúngica y evolución del peso en ratones tras infección intravenosa con *Aspergillus fumigatus*. Resultados de la carga fúngica de los órganos (A) y pesaje semanal de los ratones (B) tras la administración intravenosa de ss-Tween 20 o de  $10^5$  -  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *A. fumigatus*. La carga

fúngica fue comparada empleando el test ANOVA de dos vías; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

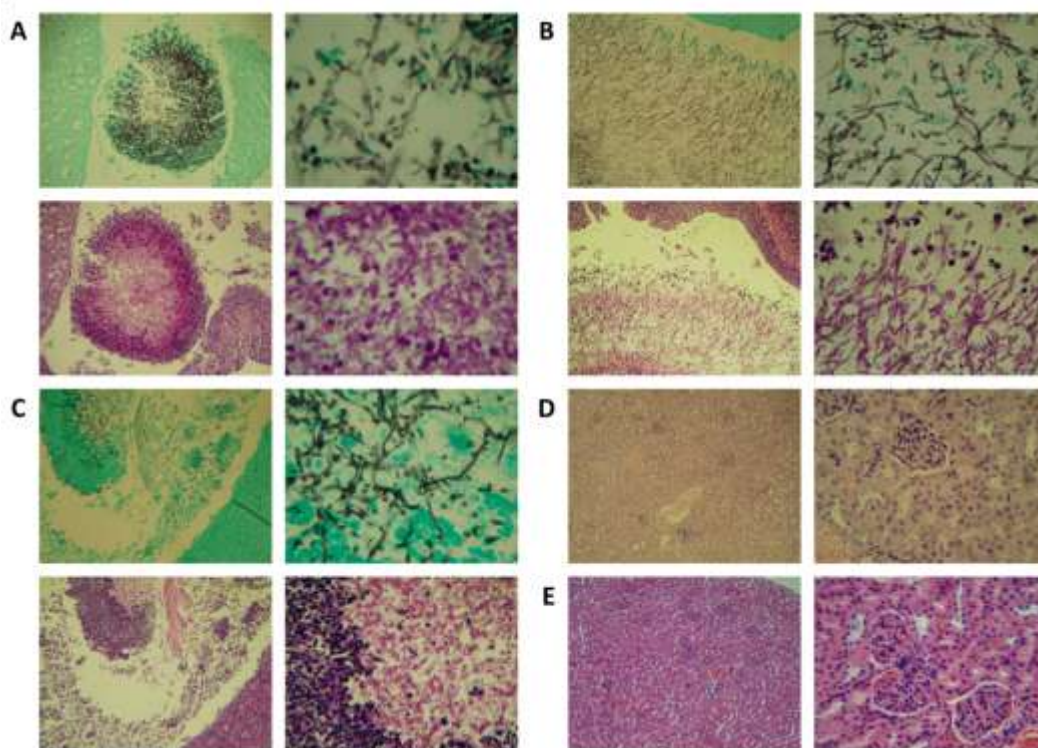
El estudio de la carga fúngica mediante la cuantificación de las UFCs mostró unos resultados muy similares tanto en riñones como en bazo de los ratones infectados con *L. prolificans* y *S. boydii* (Figura 4.9). En ambos grupos el alto número de UFCs recogidas confirmó el desarrollo de una infección fúngica diseminada. Concretamente, se recogieron  $5,17 \pm 0,74$  y  $4,48 \pm 1,62$  log UFC/g en los riñones para *L. prolificans* y *S. boydii*, respectivamente, y  $3,46 \pm 0,90$  y  $3,74 \pm 0,15$  log UFC/g en el bazo. Sin embargo, en el grupo infectado con *S. aurantiacum* se recogió una cantidad significativamente menor de UFCs en los riñones respecto a las obtenidas con los ratones infectados con *L. prolificans*. En este grupo, los órganos con mayor carga fúngica en orden descendente fueron el bazo, el hígado y los riñones, con  $4,09 \pm 0,83$  log UFC/g,  $2,26 \pm 1,01$  log UFC/g y  $1,89 \pm 0,39$  log UFC/g, respectivamente. En los ratones infectados con *A. fumigatus* los riñones fueron el órgano más afectado con una carga fúngica de  $3,44 \pm 0,87$  log UFC/g.

Cabe destacar que mientras que en el grupo de ratones infectados con *L. prolificans* el cerebro fue el tercer órgano con mayor carga fúngica ( $3,36 \pm 0,78$  log CFU/g), en todos los demás grupos el cerebro fue el menos infectado, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 4.9. Carga fúngica en ratones infectados con diferentes especies.** Resultado de la carga fúngica de los órganos de ratones infectados por vía intravenosa con  $10^5$  conidios/animal de *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium boydii* y *Scedosporium aurantiacum*, y con  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *Aspergillus fumigatus*. La carga fúngica se comparó con el grupo de *L. prolificans* mediante el test ANOVA de dos vías; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

El análisis de los cortes histológicos de los órganos mostró únicamente invasión renal en los grupos infectados con *Lomentospora* spp. (Figura 4.10A) y *Scedosporium* spp. (Figura 4-10B-C). En estos grupos las pelvis renal se hallaba dilatada con cantidad variable de respuesta inflamatoria por polimorfonucleares y eosinófilos, con hifas en el centro y elevada presencia de conidios de *L. prolificans*. Sin embargo, en los ratones infectados con *A. fumigatus* (Figura 4.10D), y en el grupo control (Figura 4.10E), no se observó afectación alguna en ninguno de los órganos estudiados.



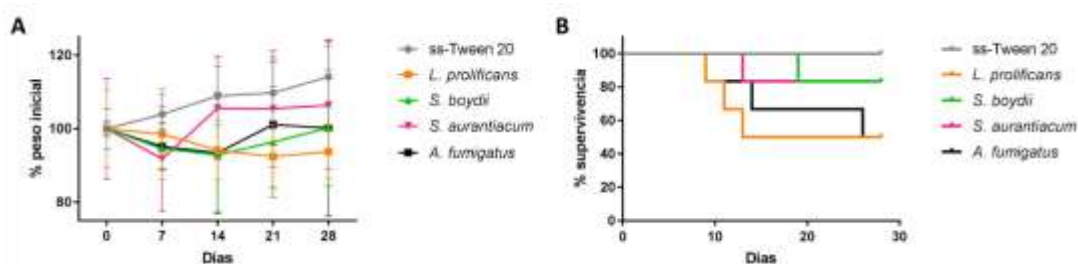
**Figura 4.10. Cortes histológicos de riñones de ratones infectados con diferentes especies fúngicas.** Secciones representativas de riñones de ratones infectados por vía intravenosa con  $10^5$  conidios/animal de *Lomentospora prolificans* (A), *Scedosporium boydii* (B) y *Scedosporium aurantiacum* (C) teñidas con metenammina de plata de Grocott (arriba) y hematoxilina-eosina (abajo). Secciones representativas de riñones teñidas con hematoxilina-eosina de ratones infectados con  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *Aspergillus fumigatus* (D) y del grupo control (E).

A lo largo de todo el proceso de experimentación se llevó a cabo un seguimiento diario del bienestar animal. Se observaron signos asociados al desarrollo de la infección en todos los grupos de ratones, a excepción del grupo control. Concretamente, en los ratones infectados con *L. prolificans*, *S. boydii* y *A. fumigatus* se detectaron los mismos signos asociados al malestar animal y al desarrollo de la infección abdomen encorvado, pelo erizado, aislamiento, letargo persistente, ausencia de movimientos inducidos y de respuesta a sonidos inesperados, pérdida severa de peso, y signos neurológicos, como inclinarse hacia un lado y la pérdida completa del equilibrio. En el grupo de ratones infectados con *S. aurantiacum* se observó un menor número de signos. Concretamente, se detectó el abdomen encorvado, el pelo erizado, una pérdida severa de peso, y signos neurológicos, como inclinarse hacia un lado, la pérdida completa del equilibrio y ataxia.

La inclinación hacia un lado fue entre todos los signos el más prevalente. Se detectó en el 66,67% de los infectados con *L. prolificans*, en el 100% de los infectados con *S. boydii* o *S. aurantiacum*, y en el 66,67% de los infectados con *A. fumigatus*. Dicho signo se detectó tres días después de la administración de *L. prolificans*, y cuatro días después de la administración de *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*.

En cuanto al seguimiento del peso semanal, los grupos infectados con *L. prolificans*, *S. boydii*, y *A. fumigatus* mostraron una pérdida de peso pronunciada, observándose la mayor disminución de peso en el grupo de *L. prolificans* (Figura 4.11A). El grupo infectado con *S. aurantiacum* tuvo una marcada pérdida de peso 7 días tras la administración del inóculo, pérdida que recuperó y mantuvo a lo largo de las próximas 3 semanas.

El grupo infectado por *L. prolificans* y el infectado con *A. fumigatus* fueron los que mayor mortalidad presentaron (Figura 4.11B), con un 50%. La primera muerte se recogió en ambos casos nueve días después de la administración del inóculo. Los grupos infectados por *S. aurantiacum* y *S. boydii* presentaron una tasa de mortalidad del 16,67%, recogiendo la primera muerte los días 13 y 19, respectivamente.



**Figura 4.11. Evolución del peso y supervivencia en ratones infectados con diferentes especies fúngicas.** Pesaje semanal (A) y supervivencia (B) de ratones infectados por vía intravenosa con  $10^5$  conidios/animal de *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium boydii* y *Scedosporium aurantiacum*, y con  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *Aspergillus fumigatus*, y del grupo control.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se confirmó la dosis de  $10^5$  conidios/animal como la dosis infectiva para desarrollar una infección diseminada por *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* en ratones Swiss inmunocompetentes. En el caso de *A. fumigatus*, la dosis infectiva fue  $5 \times 10^6$  conidios/animal, ya que con dosis inferiores los ratones apenas presentaron signos

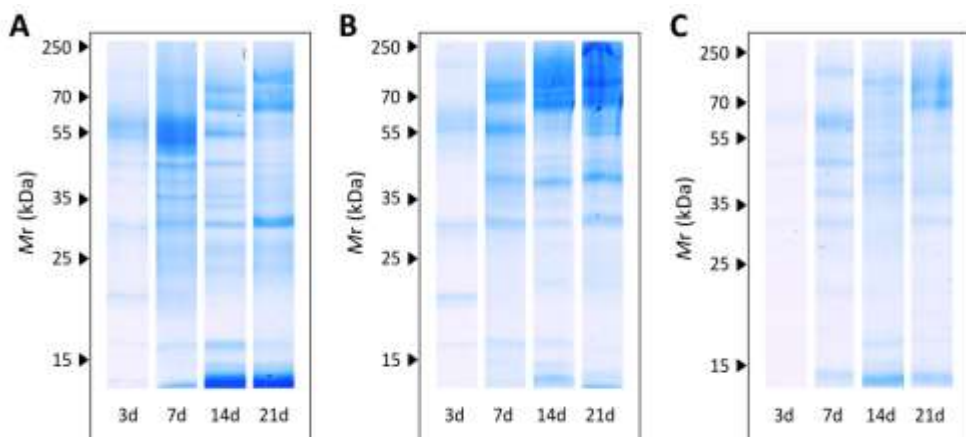
asociados a la infección, mostraron contajes reducidos de UFCs y no presentaron mortalidad alguna.

### 4.3. Estudio de la respuesta humoral de ratones infectados por *L. prolificans*

El estudio de la respuesta humoral se realizó enfrentando los sueros de los ratones infectados frente al secretoma y el extracto proteico total de *L. prolificans*. Para ello, se requirió de la optimización de la recogida del secretoma para su posterior caracterización mediante 2DE.

#### 4.3.1. Optimización de la recogida del secretoma de *L. prolificans* para su posterior análisis mediante 2DE

Para la obtención de las proteínas secretadas por *L. prolificans* se siguieron dos metodologías distintas. La primera metodología se basó en la filtración del sobrenadante del cultivo. Los extractos obtenidos en diferentes medios y tiempos de cultivo siguiendo este método fueron comparados cualitativamente y cuantitativamente mediante 1DE (Figura 4.12). De esta forma, el cultivo de *L. prolificans* en caldo Sabouraud dextrosa durante 14 días se seleccionó como la condición óptima para la recogida del secretoma, ya que el número y la definición de las bandas fueron superiores en comparación con el resto de condiciones.

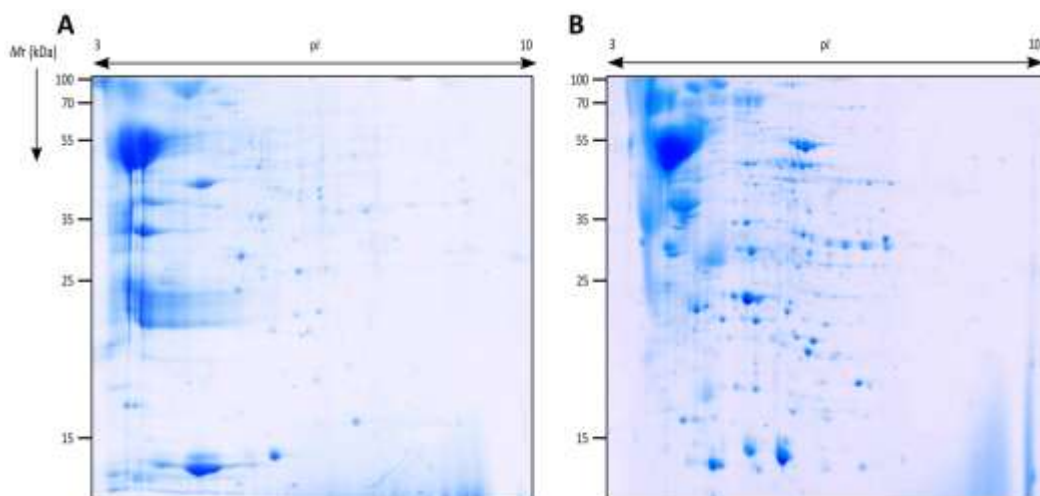


**Figura 4.12.** Análisis del secretoma de *Lomentospora prolificans* tras cultivo en distintas condiciones. Análisis mediante 1DE del secretoma de *L. prolificans* recogido en diferentes tiempos (3, 7, 14 y 21 días) en tres medios de cultivo: caldo Sabouraud dextrosa (A), caldo patata



dextrosa (B) y medio de extracto de levadura y glucosa (C).

Esta metodología fue posteriormente comparada con el protocolo descrito Da Silva *et al.* (2012) mediante 2DE (Figura 4.13) [174]. Pese a que los dos geles poseían una distribución de puntos muy similar, con el segundo método se observó una mayor cantidad (373 vs. 253). Además, el enfoque de las proteínas obtenido con el primer método fue peor, principalmente en la zona ácida y de alto peso molecular del gel, lo que posiblemente se deba a una concentración superior de impurezas en el extracto y/o una peor solubilización de las proteínas. De esta forma, pese a la utilidad de los extractos obtenidos mediante ambas metodologías, el segundo método fue el seleccionado como el adecuado para la caracterización del secretoma mediante 2DE.

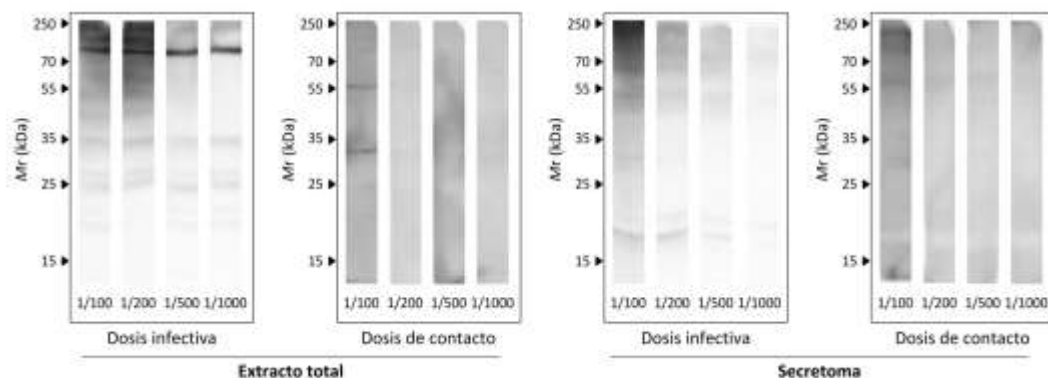


**Figura 4.13. Estudio del secretoma de *Lomentospora prolificans* mediante electroforesis bidimensional utilizando distintas técnicas de extracción proteica.** Proteomas representativos del secretoma de *L. prolificans* obtenido tras la incubación del hongo en caldo Sabouraud dextrosa durante 14 días (A) y siguiendo el protocolo descrito por da Silva *et al.* (2012) [174] (B).

Para analizar si las proteínas eran secretadas o intracelulares se estudió la integridad del hongo en el proceso de recogida del secretoma mediante microscopía óptica y el ensayo de la actividad enzimática de la LDH. Se observó una morfología normal del hongo, sin ruptura de las hifas. Por otro lado, con el ensayo de la LDH no se detectó actividad enzimática en el sobrenadante del cultivo. Con todo esto, quedó demostrado que las proteínas analizadas eran secretadas, y no proteínas intracelulares.

#### 4.3.2. Estudio de la intensidad de la respuesta humoral de ratones inoculados con la dosis de contacto e infectiva de *L. prolificans* frente al secretoma y el extracto total del hongo

Las mezclas de los sueros de los ratones del grupo control, y de los inoculados con la dosis de contacto y con la dosis infectiva se enfrentaron al extracto total y al secretoma de *L. prolificans* mediante WB unidimensional (1DWB) empleando diluciones de 1/100 hasta 1/1.000. Tal y como se observa en la Figura 4.14, la reactividad detectada empleando los sueros de los ratones infectados con la dosis de  $10^5$  conidios/animal (dosis infectiva) fue muy superior a la obtenida con los inoculados con la dosis de contacto ( $10^2$  conidios/animal). Por otro lado, la reactividad frente al extracto total fue muy superior a la obtenida con el extracto del secretoma para ambos grupos de ratones.



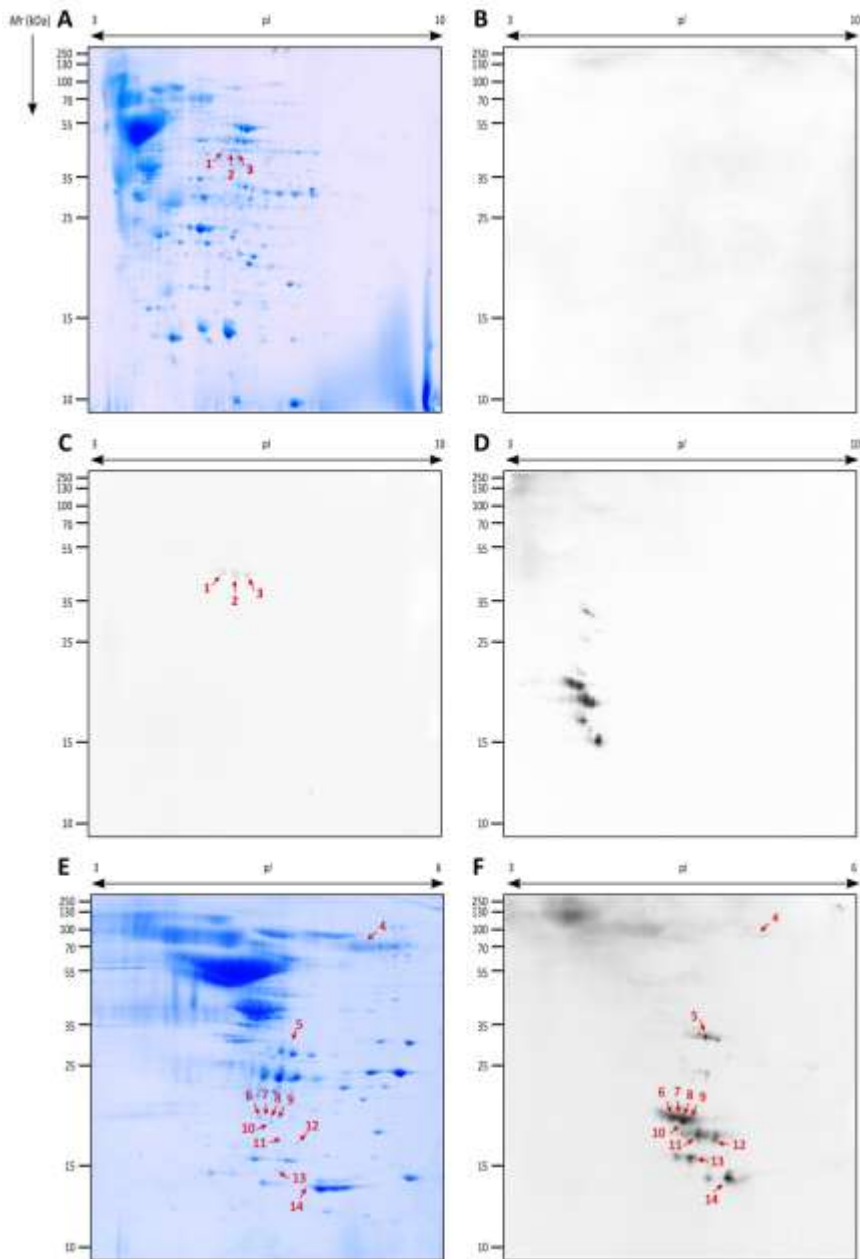
**Figura 4.14. Análisis de la respuesta humoral de ratones infectados con diferentes dosis de *Lomentospora prolificans*.** Western blot utilizando sueros de ratones inoculados con la dosis infectiva ( $10^5$  conidios/animal) y la dosis de contacto ( $10^2$  conidios/animal) de *L. prolificans* contra el extracto total y el secretoma del hongo. Se utilizaron diluciones de los sueros de 1/100, 1/200, 1/500 y 1/1.000.

Con este estudio se seleccionó la dilución de suero 1/1.000 para la detección e identificación de los principales antígenos mediante 2DWB, ya que en ambos grupos y en ambos extractos se obtenía reactividad en dicha dilución y se evitaba la excesiva reactividad de las diluciones más concentradas para el grupo de ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal.

#### 4.3.3. Identificación de los antígenos inmunodominantes del secretoma de *L. prolificans* reconocidos por ratones inoculados con dosis de contacto e infectiva

Las proteínas del secretoma de *L. prolificans* fueron separadas mediante 2DE en dos rangos diferentes de pI con el fin de visualizar mejor el perfil proteómico (Figura 4.15). Los geles obtenidos fueron teñidos con CBB G-250 y posteriormente analizados con el Software ImageMaster 2D Platinum con el fin de estimar el pI y el Mr de los puntos inmunorreactivos. En total se detectaron 373 puntos, distribuidos a lo largo de todo el rango de pI y el Mr. Pese a ello, la mayor cantidad de puntos se detectaron en el pI entre 3-7 tal y como se puede observar en la Figura 4.15.

Posteriormente, con el fin de detectar los antígenos del secretoma de *L. prolificans*, las mezclas de sueros de los ratones del grupo control, y de los inoculados con la dosis de contacto y con la dosis infectiva se enfrentaron al secretoma mediante 2DWB. Tal y como se observó en el estudio de la respuesta humoral realizado mediante 1DWB, el grupo inoculado con la dosis de contacto mostró una reactividad muy inferior al grupo infectado con la dosis elevada. Por otro lado, el grupo control no mostró reconocimiento alguno. Concretamente, de los 373 puntos detectados en el proteoma, tres mostraron inmunoreactividad frente a la dosis de contacto y hasta 36 frente a la dosis infectiva. La reactividad se observó en 5,5-6 pI y en torno a 50 kDa en el grupo contacto, y en 4-5 pI y con un Mr inferior a 35 kDa en el grupo infectado. No se detectaron antígenos compartidos por ambos grupos.



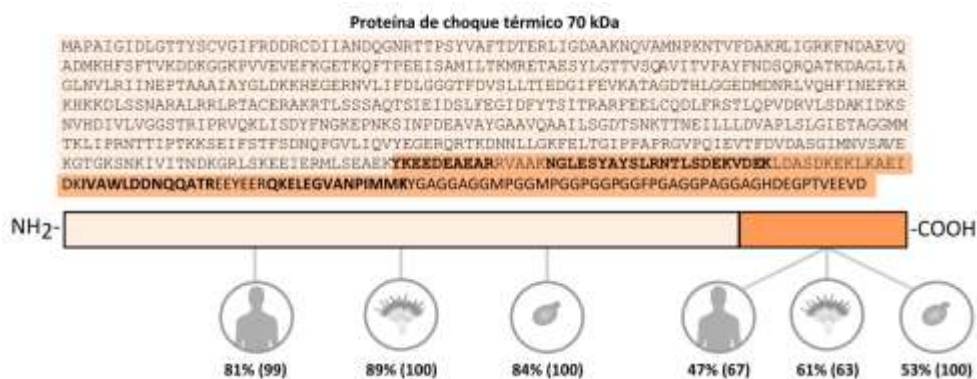
**Figura 4.15. Proteomas e inmunomas representativos del secretoma de *Lomentospora prolificans*.**

Proteínas secretadas separadas mediante 2DE en el rango de pH 3-10 (A) y electrotransferidas a membranas de PVDF para detectar las proteínas inmunorreactivas reconocidas por los sueros control (B), los sueros de la dosis contacto (C) y los sueros de la dosis infectiva (D). Proteínas secretadas separadas por 2DE en el rango de pH 3-6 (E) y electrotransferidas a membranas de PVDF para detectar las proteínas inmunorreactivas reconocidas por los sueros de la dosis infectiva (F). Los puntos marcados fueron extraídos para su identificación mediante LC-MS/MS.

Posteriormente, se procedió a la identificación de los antígenos más relevantes mediante LC-MS/MS (Tabla 4.3). Se seleccionaron los 3 antígenos detectados con los sueros de la dosis de contacto, y los puntos con un volumen relativo superior a 2,5 reconocidas por los sueros de la dosis infectiva. En el caso del punto 4, se seleccionó debido a su alta reactividad contra sueros de ratones infectados con especies de *Scedosporium* spp., como se explicará posteriormente en el apartado 4.4.1. Se identificaron doce puntos con éxito, que correspondían a siete proteínas diferentes: S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH) reconocida por los sueros de contacto, y la hidrolasa de la superfamilia haloácido dehalogenasa (hidrolasa tipo HAD), la proteína de choque térmico 70 kDa (Hsp70), la proteína de migración nuclear nudC (NUDC), una glicosil hidrolasa perteneciente a la familia GH16 (GH16), una cerato-platanina y una proteína de función desconocida (Hp jhhlp\_006787) reconocidas por sueros de ratones infectados. Es importante destacar que también se identificaron fragmentos de Hsp70 de bajo Mr, que de acuerdo a los péptidos detectados mediante LC-MS/MS, corresponden al fragmento final de la proteína. La secuencia de este fragmento final mostró una menor homología que el resto de la secuencia con las Hsp70s de humanos, *S. boydii*, *A. fumigatus* y *C. albicans* (Figura 4.16).

**Tabla 4.3. Identificación mediante LC-MS/MS de los antígenos inmunodominantes del secretoma de *Lomentospora prolificans* reconocidos por IgG de suero de ratones inoculados con la dosis de contacto e infectiva de dicho hongo.**

n.º	n.º acceso.	Nombre proteína	Microorganismo	Péptidos (n.º)	Cobertura (%)	Puntuación MASCOT	pl/Mr (kDa) teóricos	pl/Mr (kDa) experim.
<b>Antígenos del secretoma de <i>L. prolificans</i> reconocidos por los sueros de ratones infectados con la dosis de contacto (Figura 4.15A)</b>								
1		-						5,62/46,98
2	PKS06692.1	S-adenosilhomocisteina hidrolasa (hp jhhlp_006766)	<i>L. prolificans</i>	1	5	156	5,77/49,09	5,79/46,61
3		-						5,90/46,24
<b>Antígenos del secretoma de <i>L. prolificans</i> reconocidos por los sueros de ratones infectados con la dosis infectiva (Figura 4.15E)</b>								
4	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	27	51	1758	5,11/71,50	5,16/76,79
5	PKS07974.1	Hidrolasa tipo haloácido dehalogenasa (hp jhhlp_006586)	<i>L. prolificans</i>	4	35	179	4,93/26,36	4,57/30,28
6	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	5	7	170	5,11/71,50	4,25/18,45
7	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	5	8	160	5,11/71,50	4,29/18,45
8	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	5	8	172	5,11/71,50	4,36/18,41
9	PKS07141.1	Proteína de la familia glicosil hidrolasa 16 (Hp jhhlp_005741)	<i>L. prolificans</i>	2	7	90	4,44/41,13	4,43/18,43
	AAC49800.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>C. albicans</i>	1	8	59	6,33/35,51	
10	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	1	1	54	5,11/71,50	4,35/17,95
11	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	3	5	131	5,11/71,50	4,50/16,83
	PKS12714.1	Proteína de migración nuclear nudC (hp jhhlp_000922)	<i>L. prolificans</i>	1	5	81	5,30/21,12	
12	PKS12714.1	Proteína de migración nuclear nudC (hp jhhlp_000922)	<i>L. prolificans</i>	2	6	108	5,30/21,12	4,82/16,18
13	PKS06713.1	Hp jhhlp_006787	<i>L. prolificans</i>	1	7	107	4,82/22,77	4,42/14,90
14	PKS07725.1	Cerato-platanina (Hp jhhlp_006333)	<i>L. prolificans</i>	2	23	256	5,37/14,03	4,79/13,45



**Figura 4.16. Análisis de la secuencia de la proteína Hsp70 de *Lomentospora prolificans*.** Localización de los fragmentos secretados de bajo peso molecular de la Hsp70 en la secuencia de la proteína de acuerdo a los péptidos identificados por LC-MS/MS y marcados en negrita. Estudio de la similitud del fragmento C-terminal de la Hsp70 y del fragmento restante con las correspondientes Hsp70s de humanos, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. Se indican los porcentajes de cobertura (entre paréntesis) y de identidad.

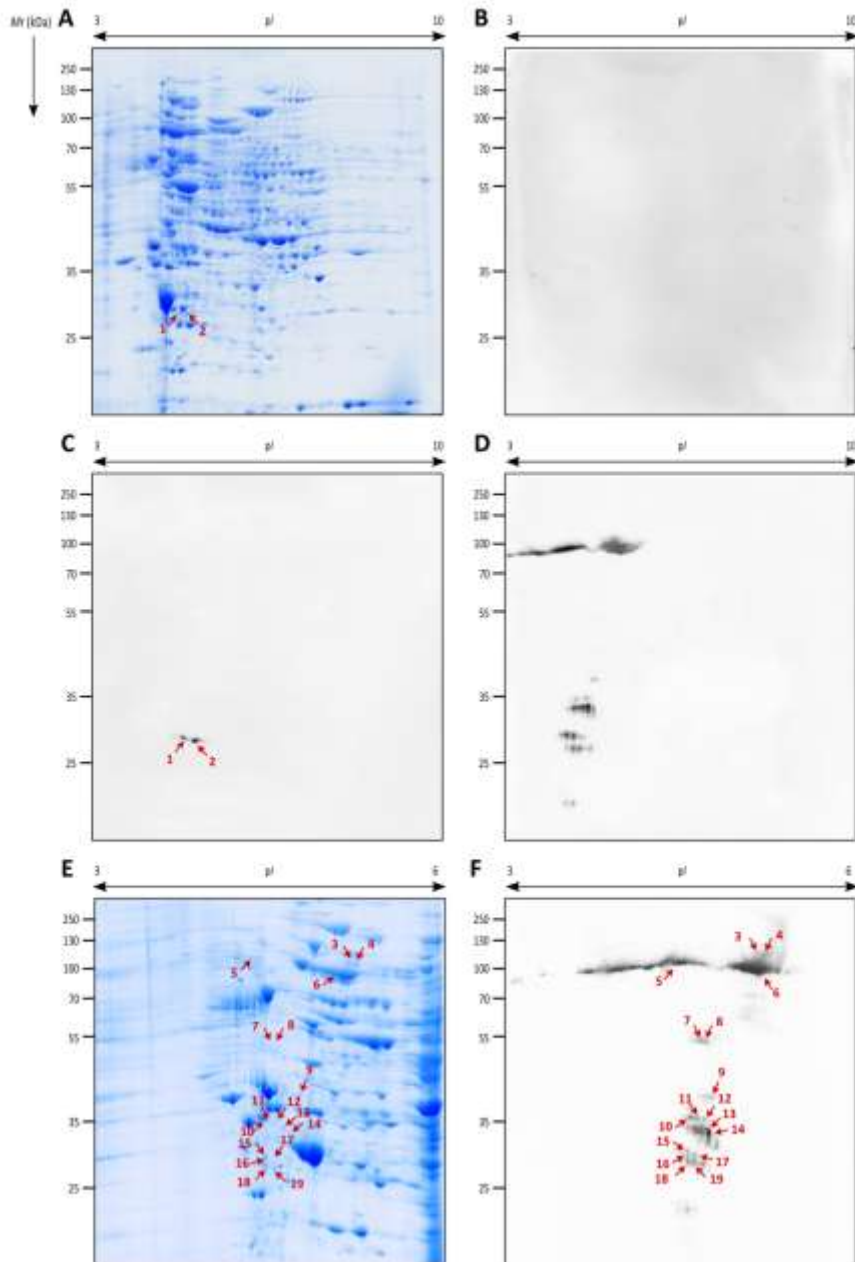
#### 4.3.4. Identificación de los antígenos inmunodominantes del extracto proteico total de *L. prolificans* reconocidos por ratones inoculados con dosis de contacto e infectiva

Para llevar a cabo este estudio se empleó el mismo flujo de trabajo anteriormente mencionado. De esta forma, las proteínas del extracto total de *L. prolificans* se separaron mediante 2DE en dos rangos de pH, del 3-10 y del 3-6 (Figura 4.17). En el proteoma obtenido con el rango de pH 3-10 se detectaron hasta 944 puntos, distribuidos a lo largo de todo el pI y Mr, con una mayor cantidad de puntos en el pI entre el 4-8 y el Mr de 25-130 kDa.

Las mezclas de sueros del grupo control, del grupo contacto y del grupo infectado se enfrentaron mediante 2DWB a las membranas que contenían las proteínas del extracto total del hongo. Del total de los 944 puntos del proteoma del extracto total, se detectaron dos puntos inmunorreactivos reconocidos por los sueros del grupo contacto y hasta 89 por los sueros del grupo infectado. La reactividad se observó principalmente en torno a 5 pI y 25 kDa en el grupo contacto, y en 4-5.5 pI y superior a 25 kDa en el grupo infectado. No se detectaron antígenos compartidos por ambos grupos y el grupo control no mostró reconocimiento alguno.

Paralelamente, los geles obtenidos con las proteínas del extracto total separadas mediante 2DE fueron analizados con el Software Image Master 2D Platinum. De esta forma, los principales puntos inmunorreactivos fueron extraídos manualmente de los geles e identificados mediante LC-MS/MS. Se identificaron los dos puntos reconocidos por los sueros de la dosis contacto y 17 puntos con un volumen relativo superior al 0,3 reconocidos por los sueros de la dosis infectiva (Tabla 4.4). Los 19 puntos inmunorreactivos correspondían a diez proteínas diferentes dos isoformas de la subunidad alfa del proteasoma como antígenos asociados a la dosis de contacto y la dipeptidil-peptidasa (Dpp), la Hsp70, el receptor proteasomal de ubiquitina, la carboxipeptidasa Y (CPY), la proteína con dominio de unión a la proteína Ran (RanBP1), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la hidrolasa tipo HAD, la proteína de clasificación vacuolar 28 (Vps28) y la proteína andamio del grupo hierro-azufre NFU1 (NFU1) como antígenos asociados con la infección diseminada. De todos los antígenos reconocidos por los ratones infectados, teniendo en cuenta el volumen relativo, la Hsp70 fue detectada como el antígeno más inmunodominante con un valor 20 veces superior al del siguiente antígeno.





**Figura 4.17. Proteomas e inmunomas representativos del extracto total de *Lomentospora prolificans*.** Proteínas del extracto total separadas mediante 2DE en el rango de pH 3-10 (A) y electrotransferidas a membranas de PVDF para detectar las proteínas inmunorreactivas reconocidas por los sueros control (B), los sueros de la dosis contacto (C) y los sueros de la dosis infectiva (D). Proteínas del extracto total separadas por 2DE en el rango de pH 3-6 (E) y electrotransferidas a membranas de PVDF para detectar las proteínas inmunorreactivas reconocidas por los sueros de la dosis infectiva (F). Los puntos marcados fueron extraídos para su identificación mediante LC-MS/MS.

**Tabla 4.4. Identificación mediante LC-MS/MS de los antígenos inmunodominantes del extracto total de *Lomentospora prolificans* reconocidos por IgG de suero de ratones inoculados con la dosis de contacto e infectiva de dicho hongo**

n.º punto	n.º acceso	Nombre proteína	Microorganismo	Péptidos (n.º)	Cobertura (%)	Puntuación MASCOT	pi/Mr (kDa) teor.	pi/Mr (kDa) experim.
<b>Antígenos del extracto total de <i>L. prolificans</i> reconocidos por los sueros de los ratones inoculados con la dosis de contacto (Figure 17A)</b>								
1	PKS10679.1	Subunidad alfa del proteasoma (hp jhhlp_002435)	<i>L. prolificans</i>	5	22	304	5,28/28,04	4,73/28,35
	PKS08308.1	NADP oxidoreductasa coenzima F420-dependiente (hp jhhlp_005252)	<i>L. prolificans</i>	5	27	288	5,66/32,60	
2	PKS10679.1	Subunidad alfa del proteasoma (hp jhhlp_002435)	<i>L. prolificans</i>	10	41	474	5,28/28,04	4,91/28,32
<b>Antígenos del extracto total de <i>L. prolificans</i> reconocidos por los sueros de los ratones inoculados con la dosis infectiva (Figure 17E)</b>								
3	PKS06544.1	Dipeptidil-peptidasa (hp jhhlp_007292)	<i>L. prolificans</i>	13	20	602	5,19/79,99	5,26/81,64
4	PKS06544.1	Dipeptidil-peptidasa (hp jhhlp_007292)	<i>L. prolificans</i>	15	23	797	5,19/79,99	5,32/81,10
5	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	22	49	1658	5,11/71,50	4,08/83,83
6	PKS06780.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	23	43	1159	5,11/71,50	4,66/77,14
7	PKS10466.1	Receptor proteasomal de ubiquitina (hp jhhlp_002217)	<i>L. prolificans</i>	5	25	225	4,65/40,76	4,62/51,74
8	PKS12946.1	Carboxipeptidasa (hp jhhlp_000287)	<i>L. prolificans</i>	2	4	111	4,99/60,56	4,66/51,68
9	PKS13321.1	Proteína con dominio RBP1 (hp jhhlp_000092)	<i>L. prolificans</i>	9	40	607	5,11/28,07	4,76/35,25
	PKS12026.1	Proteína ribosomal P0 (hp jhhlp_001322)	<i>L. prolificans</i>	4	20	374	4,81/33,75	
10	PKS10574.1	Antígeno nuclear de proliferación celular (hp jhhlp_002328)	<i>L. prolificans</i>	9	39	449	4,56/28,92	4,36/32,09
11	PKS10574.1	Antígeno nuclear de proliferación celular (hp jhhlp_002328)	<i>L. prolificans</i>	3	18	326	4,56/28,92	4,41/32,01
12	PKS10574.1	Antígeno nuclear de proliferación celular (hp jhhlp_002328)	<i>L. prolificans</i>	2	11	118	4,56/28,92	4,45/32,18
	XP_016642844.1	Subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente (hp SAPIO_CDS5122)	<i>S. apiospermum</i>	2	13	100	4,59/22,31	
13	PKS07974.1	Hidrolasa tipo haloácido dehalogenasa	<i>L. prolificans</i>	5	31	390	4,93/26,36	4,51/30,62

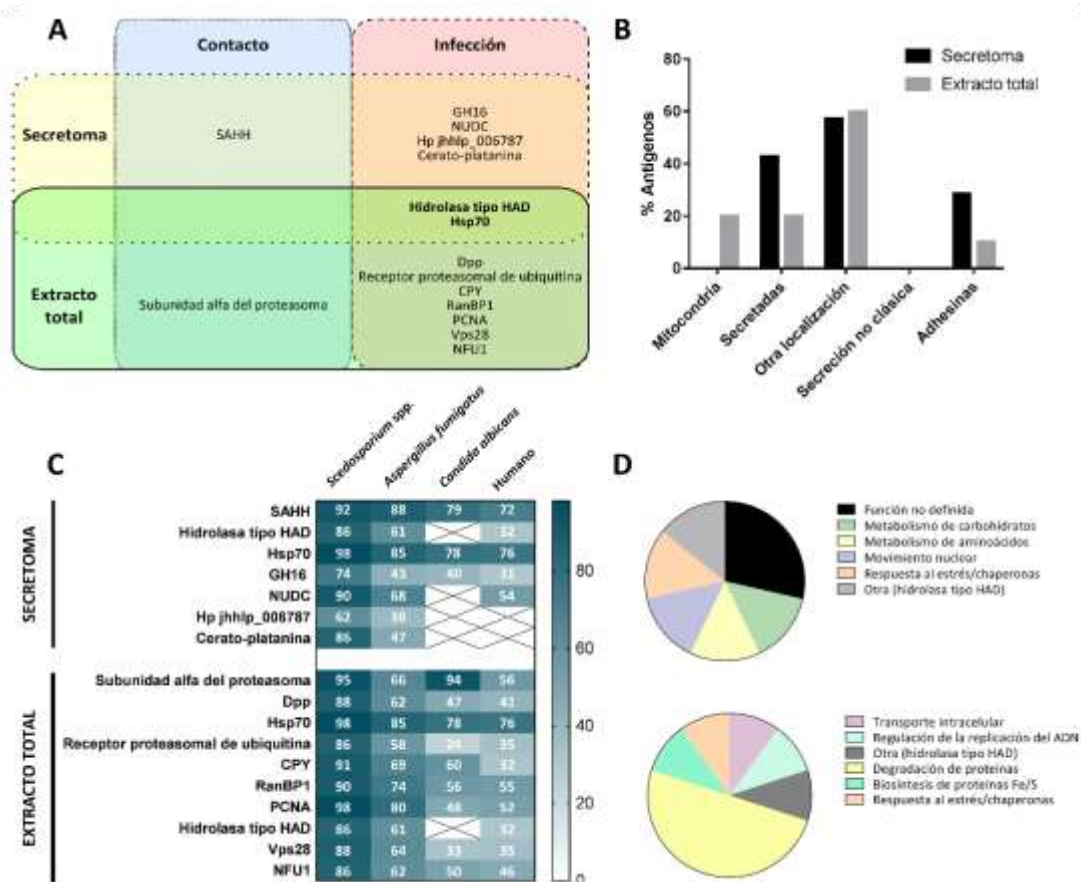
(hp jhhlp_006586)								
<b>14</b>	PKS07974.1	Hidrolasa tipo haloácido dehalogenasa (hp jhhlp_006586)	<i>L. prolificans</i>	7	41	431	4,93/26,36	4,41/30,00
<b>15</b>	PKS10466.1	Receptor proteasomal de ubiquitina (hp jhhlp_002217)	<i>L. prolificans</i>	3	12	174	4,65/40,76	4,57/30,19
	PKS11928.1	Factor de iniciación de traducción eucariótica 6 (hp jhhlp_001223)	<i>L. prolificans</i>	4	25	154	4,33/23,13	
<b>16</b>	PKS10466.1	Receptor proteasomal de ubiquitina (hp jhhlp_002217)	<i>L. prolificans</i>	4	12	241	4,65/40,76	4,57/29,58
	PKS11928.1	Factor de iniciación de traducción eucariótica 6 (hp jhhlp_001223)	<i>L. prolificans</i>	4	26	214	4,33/23,13	
<b>17</b>	PKS12778.1	Proteína de clasificación vacuolar 28 (hp jhhlp_000989)	<i>L. prolificans</i>	4	19	157	4,68/27,98	4,64/29,58
	PKS09814.1	Amino peptidasa (hp jhhlp_004437)	<i>L. prolificans</i>	3	7	129	5,50/60,03	
<b>18</b>	PKS09755.1	Proteína andamio del grupo hierro-azufre NFU1 (hp jhhlp_004376)	<i>L. prolificans</i>	5	28	299	5,78/33,19	4,61/24,42
<b>19</b>	PKS09755.1	Proteína andamio del grupo hierro-azufre NFU1 (hp jhhlp_004376)	<i>L. prolificans</i>	6	31	343	5,78/33,19	4,64/28,20

#### 4.3.5. Estudio de la localización, función y homología de los antígenos de *L. prolificans*

El análisis bioinformático de las proteínas detectadas en el secretoma predijo la secreción clásica de la hidrolasa tipo HAD, GH16 y cerato-platanina (Figura 4.18B). Se detectaron propiedades de adhesión para las proteínas GH16 y Hp jhhlp\_006787. Entre las proteínas del extracto total, se predijo la secreción clásica de CPY y de la hidrolasa tipo HAD, y la localización mitocondrial de la proteína RanBP1 y NFU1. Sólo el receptor proteasomal de ubiquitina mostró propiedades de adhesión.

El estudio de la homología de las proteínas de *L. prolificans* frente a las de *Scedosporium* spp., *A. fumigatus*, *C. albicans* y las humanas mostró las mayores similitudes con *Scedosporium* spp. seguidas por *A. fumigatus*, obteniéndose menor homología con los antígenos secretados que con los del extracto total (Figura 4.18C). De entre todas, SAHH y Hsp70 fueron las que mayor grado de homología mostraron, obteniendo en todos los casos identidades superiores al 70%. Por otro lado, las proteínas que presentaron un menor grado de homología frente a las humanas fueron Vps28 (35%), receptor proteasomal de ubiquitina (35%), CPY (32%), hidrolasa tipo HAD (32%), GH16 (31%), Hp jhhlp\_006787 (0%) y cerato-platanina (0%). Todos los antígenos mencionados mostraron una homología <50% frente a *C. albicans*, y los últimos cuatro mostraron una similitud <50% en comparación con *A. fumigatus*.

Según la funcionalidad, los antígenos con función no definida y los relacionados con los procesos de degradación (metabolismo de carbohidratos y aminoácidos) destacan en el secretoma, mientras que entre las proteínas inmunorreactivas identificadas en el extracto total, los antígenos implicados en la degradación de proteínas son los más abundantes (Figura 4.18D).

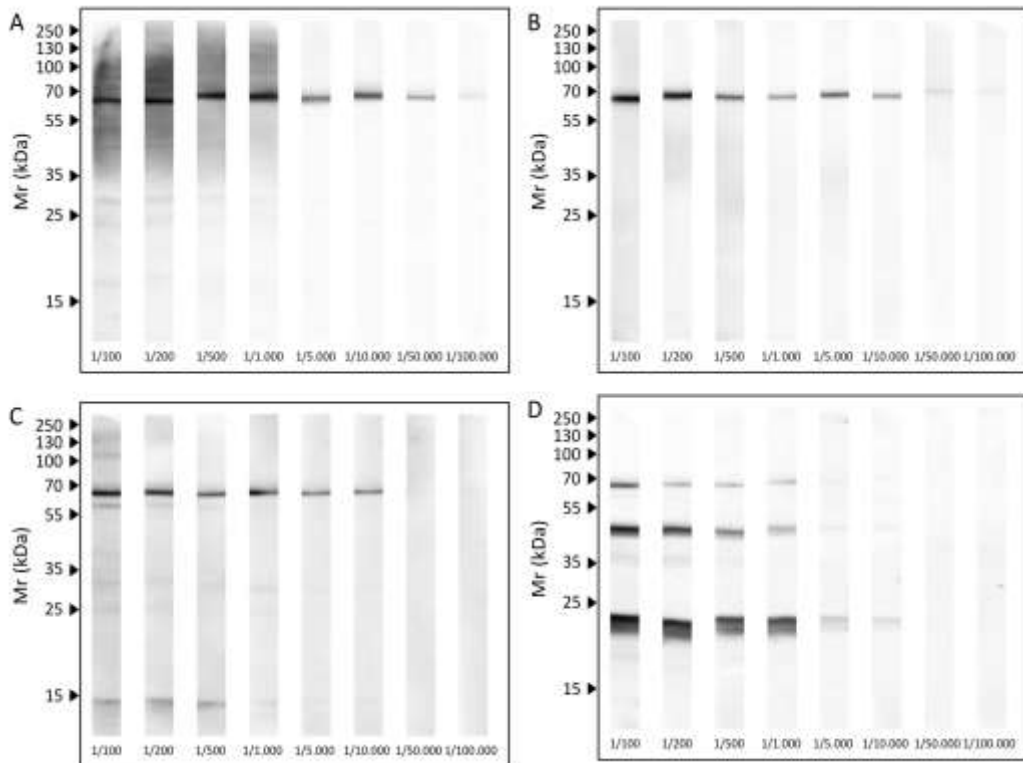


**Figura 4.18.** Análisis de antígenos del secretoma y del extracto total de *Lomentospora prolificans*. Diagrama de los antígenos del secretoma y del extracto total de *L. prolificans* reconocidos por los sueros de ratones inoculados con la dosis de contacto e infecciosa (A). Análisis bioinformático de su localización (B) y de su similitud con las proteínas de *Scedosporium spp.*, *A. fumigatus*, *C. albicans* y humanas, indicando los porcentajes de identidad (C). Clasificación funcional de los antígenos del secretoma (arriba) y del extracto total (abajo) (D).

#### 4.4. Estudio de la respuesta humoral de ratones infectados con *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*

El estudio de la respuesta humoral se llevó a cabo empleando mezclas de suero formadas por 5 individuos/grupo de ratones infectados con *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*. En primer lugar, los sueros de los ratones infectados con cada especie se enfrentaron a sus correspondientes extractos proteicos totales mediante 1DWB, empleando diluciones de 1/100 hasta 1/100.000. Se observó una amplia reactividad para todos los grupos, detectando reactividad

hasta la dilución 1/100.000 con los ratones infectados con *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum*, y hasta 1/10.000 con *A. fumigatus* (Figura 4.19). Debido a la fuerte reactividad observada en todos los grupos con la dilución 1/1.000, dicha dilución fue la seleccionada para los posteriores estudios mediante 2DWB.



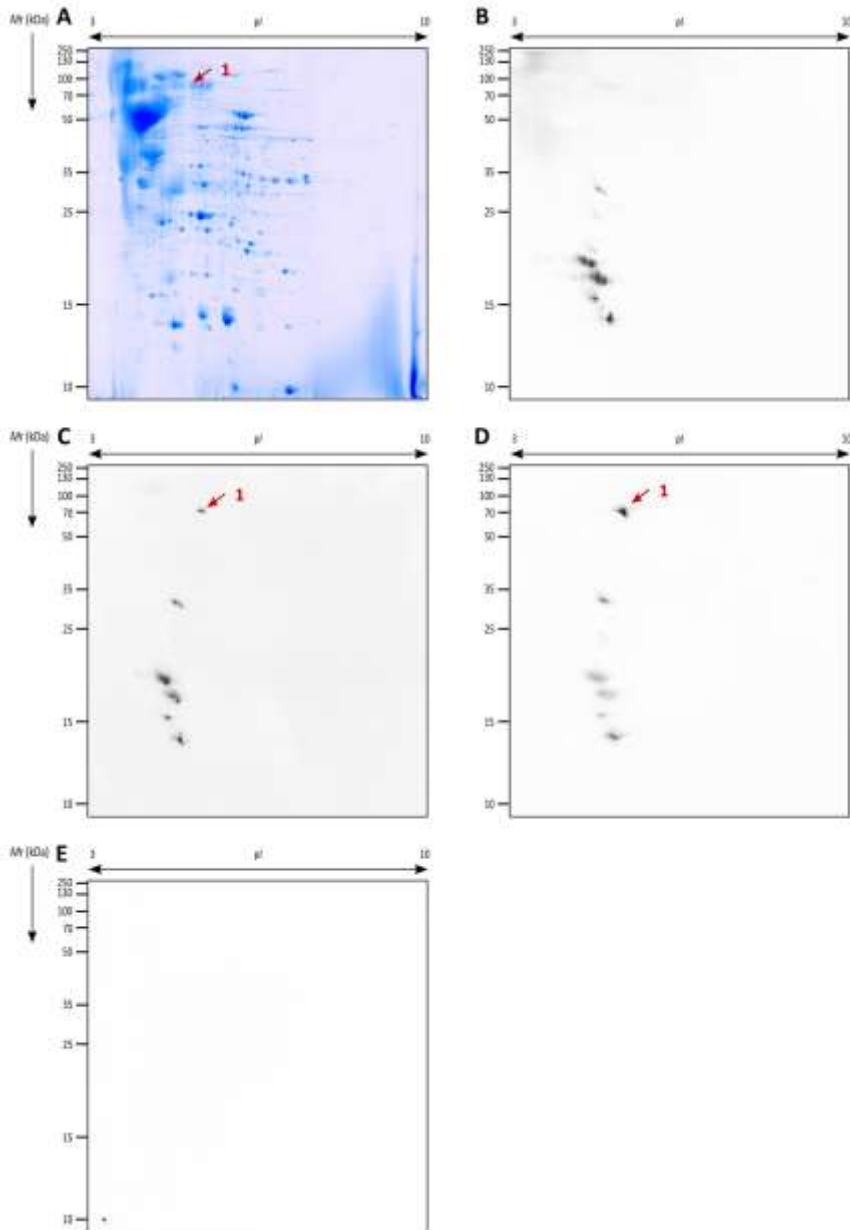
**Figura 4.19. Estudio de la concentración de anticuerpos producidos frente a infecciones intravenosas con diferentes especies fúngicas.** Respuesta humoral de ratones infectados con  $10^5$  conidios/animales de *Lomentospora prolificans* (A), *Scedosporium boydii* (B) y *Scedosporium aurantiacum* (C), y con  $5 \times 10^6$  conidios/animales de *Aspergillus fumigatus* (D). Las mezclas de los sueros de cada grupo se enfrentaron diluidas (1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/50000, 1/100.000) a los correspondientes extractos proteicos totales de los hongos.

#### 4.4.1. Identificación de los antígenos del secretoma de *L. prolificans* reconocidos por sueros de ratones infectados con *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*

Las mezclas de sueros utilizados en el apartado anterior se enfrentaron mediante 2DWB al secretoma de *L. prolificans* a la dilución de 1/1.000. Los inmunomas obtenidos al emplear los 90

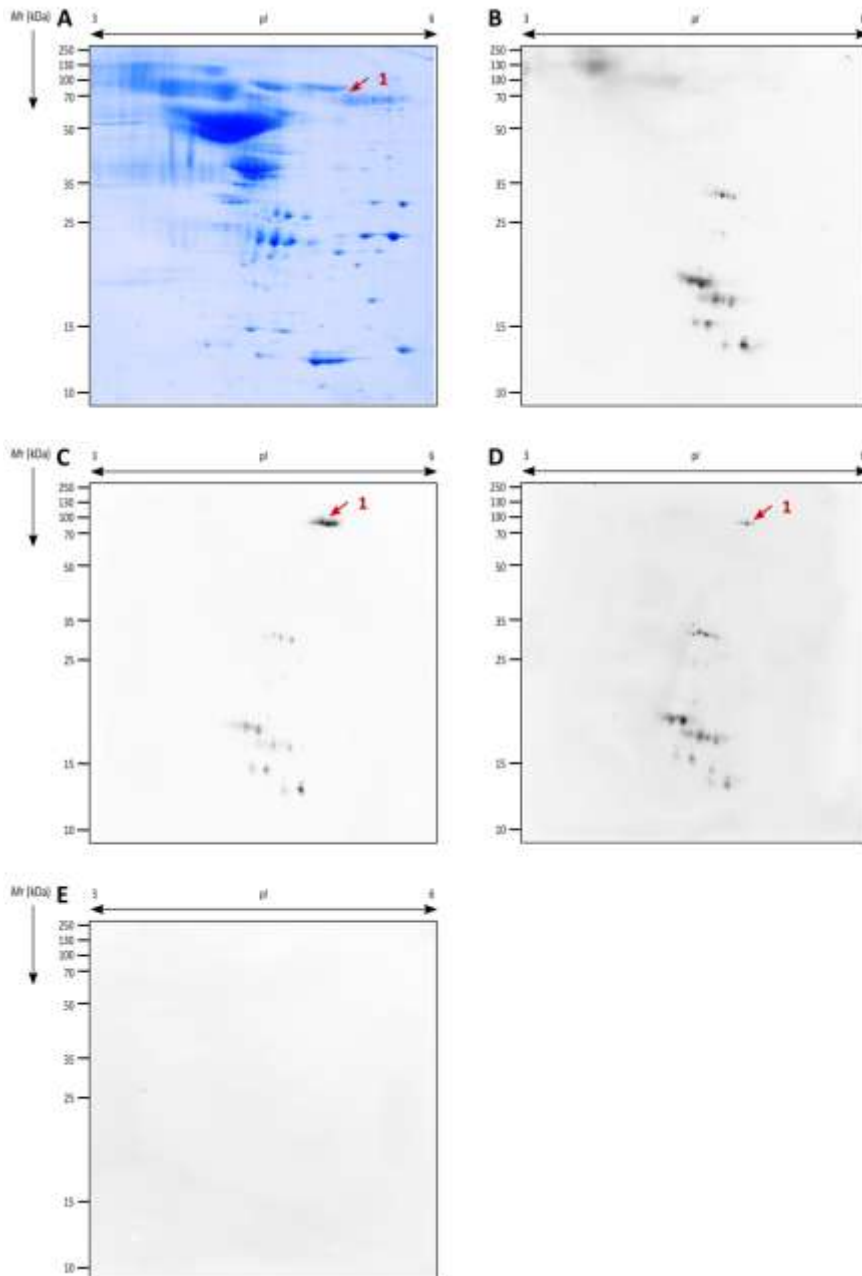
sueros de los ratones infectados con *S. boydii* y *S. aurantiacum* frente al secretoma de *L. proliferans* presentaron el mismo patrón que al utilizar los sueros de ratones infectados con *L. proliferans*, exceptuando la mayor reactividad obtenida frente a la Hsp70 secretada (punto 1 en la Figura 4.20), que corresponde al punto número 4 de las identificaciones de *L. proliferans* (Figura 4.15 y Tabla 4.3). Por lo tanto, estos antígenos ya se identificaron en el apartado 4.3.3. Por el contrario, no se detectó reactividad al emplear los sueros de ratones infectados con *A. fumigatus*.

Con el objetivo de realizar un análisis más preciso de la respuesta humoral, se realizó el mismo estudio empleando geles con un rango de pH del 3 al 6 (Figura 4.21), corroborando el resultado anterior.



**Figura 4.20.** Estudio de la reactividad cruzada de los antígenos del secretoma de *Lomentospora prolificans* en un rango pH del 3-10. Proteoma representativo del secretoma de *L. prolificans* en el rango de pH del 3-10 (A) y la detección de proteínas del secretoma de *L. prolificans* reconocidas por sueros de ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal de *L. prolificans* (B), *Scedosporium boydii* (C) y *Scedosporium aurantiacum* (D), y con  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *Aspergillus fumigatus* (E). Marcada la Hsp70 (1) del secretoma de *L. prolificans*.





**Figura 4.21. Estudio de la reactividad cruzada de los antígenos del secretoma de *Lomentospora prolificans* en un rango de pH 3-6.** Proteoma representativo del secretoma de *L. prolificans* en el rango de pH del 3-6 (A) y la detección de proteínas del secretoma de *L. prolificans* reconocidas por sueros de ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal de *L. prolificans* (B), *S. boydii* (C) y *S. aurantiacum* (D), y con  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *A. fumigatus* (E). Marcada la Hsp70 (1) del

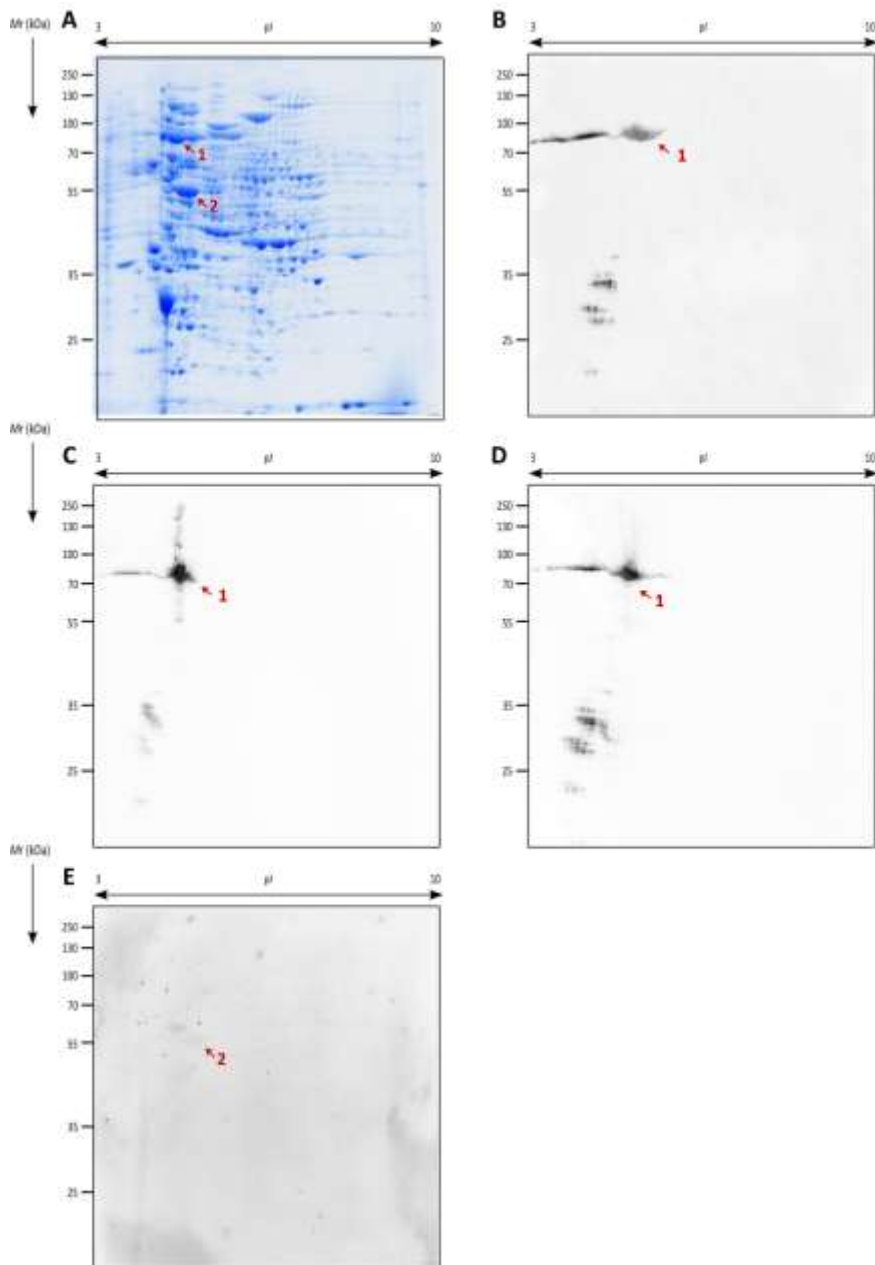
secretoma de *L. prolificans*.

#### 4.4.2. Identificación de los antígenos del extracto total de *L. prolificans* reconocidos por sueros de ratones infectados con *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron nuevamente las mezclas de sueros anteriormente descritos y se enfrentaron al extracto total de *L. prolificans*, empleando para ello la dilución 1/1.000 de las muestras.

En los 2DWBs realizados empleando los sueros de ratones infectados con *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* se detectaron los mismos puntos inmunorreactivos (Figura 4.22). Por lo tanto, dado que la identificación de los antígenos inmunodominantes ya se había realizado en el apartado 4.3.4., cuyos resultados se mostraron en la Tabla 4.4, no fue necesario repetirla. En todos los 2DWBs la Hsp70 fue detectada como el antígeno más inmunodominante.

Sin embargo, en los 2DWBs realizados empleando los sueros de los ratones infectados con *A. fumigatus* se obtuvo una reacción muy débil. El patrón del inmunoma obtenido en este caso fue muy diferente al obtenido con los sueros de los grupos de *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum*. Concretamente, ninguno de los antígenos coincidió con los reconocidos utilizando los sueros de ratones infectados con *Lomentospora/Scedosporium* y de acuerdo a los análisis inmunoproteómicos realizados en el apartado 4.1. y por Pellon *et al.* (2016) [173] la enolasa es uno de los antígenos de *L. prolificans* reconocidos por los sueros de *A. fumigatus*.

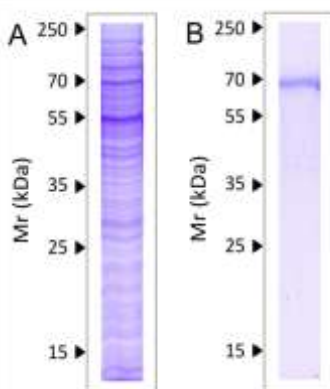


**Figura 4.22.** Estudio de la reactividad cruzada de los antígenos del extracto total de *Lomentospora prolificans* en un rango de pH 3-10. Proteoma representativo del extracto total de *L. prolificans* en el rango de pH del 3-10 (A) y la detección de proteínas del extracto total de *L. prolificans* reconocidas por sueros de ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal de *L. prolificans* (B), *S. boydii* (C) y *S. aurantiacum* (D), y con  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *A. fumigatus* (E). Marcadas la Hsp70 (1) y la enolasa (2) del extracto total de *L. prolificans*.

#### 4.4.3. Estudio de la prevalencia del reconocimiento de la Hsp70

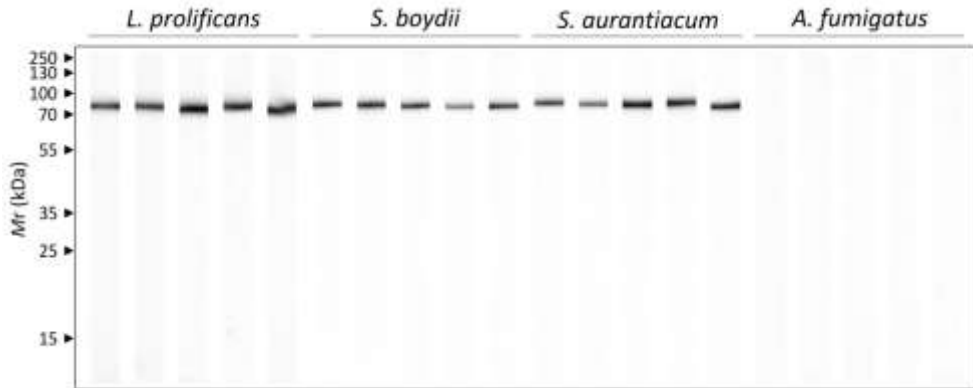
La Hsp70 fue detectada como el antígeno más inmunorreactivo del extracto total de *L. prolificans* reconocido por los sueros de los ratones infectados con *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum*. Con el objetivo de estudiar la respuesta humoral frente a este antígeno con mayor profundidad, se procedió a su purificación desde el extracto total de *L. prolificans* mediante electroelución.

Las muestras con la proteína electroeluida se migraron en un gel de 1DE con el objetivo de comprobar su correcta purificación (Figura 4.23). Al contrario que en la 1DE del extracto de proteínas total, en la de la muestra de la Hsp70 electroeluida se observó una única banda de 70 kDa de Mr (Figura 4.23B), lo que demuestra la correcta electroelución de la proteína de interés.



**Figura 4.23.** Análisis de la correcta purificación de la Hsp70 de *Lomentospora prolificans*. 1DE del extracto total de proteínas de *L. prolificans* (A) y de la Hsp70 obtenida tras su electroelución (B).

Con el objetivo de determinar la prevalencia de la Hsp70 como antígeno y su especificidad, se estudió el reconocimiento de la Hsp70 purificada por sueros murinos procedentes de infección de manera individual mediante 1DWB (Figura 4.24). Se analizaron un total de 25 sueros (5 sueros/grupo) pertenecientes a los siguientes grupos grupo de ratones control, grupo de ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal de *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum*, y grupo de ratones infectados con  $5 \times 10^6$  conidios/animal de *A. fumigatus*. Para ello, se empleó la dilución 1/1.000, previamente seleccionada. Todos los sueros de ratones infectados con *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* mostraron una fuerte reactividad frente a la Hsp70 purificada. En el caso del grupo control (datos no mostrados) y de ratones infectados con *A. fumigatus*, en cambio, no se detectó reconocimiento alguno.



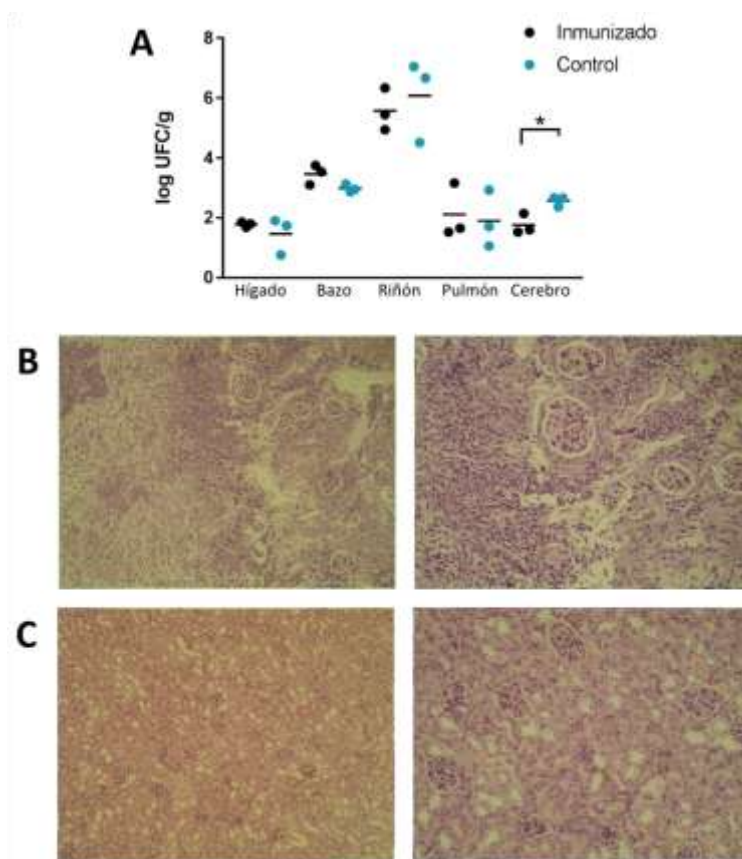
**Figura 4.24. Estudio del reconocimiento de la Hsp70 purificada por sueros de ratones infectados con diferentes hongos.** Respuesta humoral de ratones infectados con  $10^5$  conidios/animal de *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium boydii* y *Scedosporium aurantiacum*, y con *Aspergillus fumigatus*  $5 \times 10^6$  conidios/animal frente a la Hsp70 purificada de *L. prolificans*. Se utilizaron cinco sueros por grupo individualmente.

#### 4.5. Desarrollo de un modelo de inmunización frente a las infecciones producidas por *L. prolificans*

Con el fin de estudiar el efecto protector obtenido tras el contacto con el hongo, se llevó a cabo el siguiente experimento en el que se emplearon dos grupos de ratones *Swiss* formados por 5 individuos/grupo. A uno de los grupos se le administraron dos dosis no infecciosas de conidios por vía intravenosa, una primera dosis de  $10^2$  conidios/animal y una segunda de  $10^3$  conidios/animal (grupo inmunizado). Al segundo grupo se le administró únicamente ss-Tween 20 (grupo control). Posteriormente, se les administró a todos los ratones un inóculo infeccioso ( $2 \times 10^5$  conidios/animal) por vía intravenosa.

La elevada carga fúngica detectada en todos los órganos confirmó el desarrollo de una infección murina diseminada por *L. prolificans*, obteniendo contajes de UFCs muy semejantes para ambos grupos (Figura 4.25A). Concretamente, los riñones y el bazo fueron los órganos más afectados, obteniendo para el grupo inmunizado y el grupo control los valores de  $5,58 \pm 0,70$  log UFC/g y de  $6,08 \pm 1,37$  log UFC/g en los riñones y de  $3,46 \pm 0,33$  log UFC/g y de  $2,99 \pm 0,13$  log UFC/g en el bazo, respectivamente. La mayor diferencia entre ambos grupos se detectó en el cerebro, con una reducción significativa de UFCs en los del grupo inmunizado respecto al control.

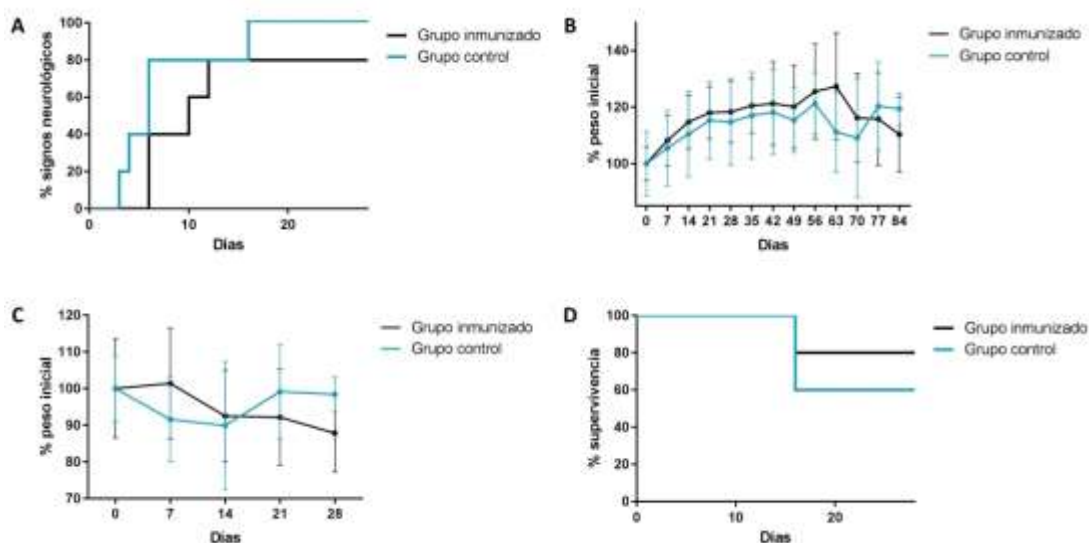
Por otro lado, en el análisis histológico únicamente se detectaron focos inflamatorios en los riñones del grupo inmunizado, mientras que en el control se observó muy poca respuesta (Figura 4.25B-C).



**Figura 4.25.** Análisis de los órganos del grupo inmunizado y control tras la administración de  $2 \times 10^5$  conidios/animal de *Lomentospora prolificans*. Resultado de la carga fúngica de los órganos del grupo inmunizado y control (A). Secciones representativas de riñones del grupo inmunizado (B) y control (C) teñidas con hematoxilina-eosina. La carga fúngica fue comparada empleando el test t-Student; \*  $p < 0,05$ .

Tras la administración intravenosa del inóculo infeccioso, se realizó un seguimiento diario del bienestar animal. Se detectaron signos asociados a la infección en todos los ratones empleados en el estudio. En ambos grupos se observó pérdida severa de peso, abdomen encorvado, pelo erizado, aislamiento, letargo persistente, ausencia de respuesta a sonidos inesperados, y afecciones neurológicas como inclinarse hacia un lado. A su vez, en el grupo control se detectaron otros signos neurológicos como ataxia y pérdida completa del equilibrio y en el grupo inmunizado se detectaron la ausencia de movimientos inducidos y presencia de movimientos repetitivos.

El signo neurológico principal fue la inclinación hacia un lado que fue detectado en el 100% y en el 80% de los ratones del grupo control y de los del grupo inmunizado, respectivamente, 3 y 6 días después de la administración del inóculo infeccioso (Figura 4.26A). Se detectó pérdida de peso tras la administración del inóculo infeccioso en ambos grupos, con una recuperación posterior del peso inicial en los ratones del grupo control (Figura 4.26B-C). Por último, en ambos grupos la primera muerte se detectó 16 días tras la administración del inóculo infeccioso, obteniendo una tasa de supervivencia del 60% para el grupo control frente al 80% del grupo inmunizado (Figura 4.26D).



**Figura 4.26. Monitorización del bienestar animal del grupo inmunizado y del control tras la administración intravenosa de  $2 \times 10^5$  conidios/animal de *Lomentospora prolificans*. Detección de signos neurológicos (A). Pesaje semanal de los ratones los 84 días de duración del experimento (B) y desde la administración de  $2 \times 10^5$  conidios/animal de *L. prolificans* (C). Curva de supervivencia de los ratones (D).**

Por lo tanto, todos los parámetros estudiados mostraron una mejoría en el grupo inmunizado respecto al control, observando un retraso en la aparición de los signos neurológicos, una reducción de la mortalidad y una reducción significativa en el conteo de las UFCs del cerebro.





---

## **Discusión**

---



### **5.1. Identificación de los antígenos más prevalentes de conidios de *L. prolificans* reconocidos por IgA salivar de donantes sanos, estudio de su localización y su reactividad cruzada con *A. fumigatus***

Pese a que las infecciones por hongos afectan a millones de personas y causan altas tasas de mortalidad, a menudo de más del 50%, el gasto total en investigación en el área de la micología médica es muy bajo en comparación con la financiación disponible para el estudio de otras infecciones [23]. Además, los tratamientos actualmente disponibles son altamente tóxicos y no son eficaces contra algunos hongos como *L. prolificans* que, sobre todo, afectan a pacientes inmunodeprimidos. Por lo tanto, el estudio de la respuesta inmune entre la población inmunocompetente, que normalmente puede evitar estas infecciones, puede ofrecer nuevas oportunidades para el desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos. Teniendo en cuenta este hecho y que los conidios de *L. prolificans* presentan mayor inmunorreactividad frente a las IgA humanas que las hifas [19], el presente estudio se diseñó para identificar los antígenos más prevalentes de conidios de *L. prolificans* reconocidos por la saliva de una población sana. Además, se estudió la ubicación de los antígenos en dicho hongo y la reactividad cruzada con otras especies relacionadas.

En este estudio, la ciclofilina y la enolasa fueron los antígenos salivales que mostraron la mayor prevalencia dentro de la población analizada. De hecho, todas las muestras utilizadas mostraron reactividad frente a, al menos, una de las dos proteínas y, por lo tanto, los anticuerpos contra esas enzimas podrían ofrecer una cobertura del 100% frente a *L. prolificans*. Los otros antígenos prevalentes identificados fueron la cys-gly metalopeptidasa, la malato deshidrogenasa (MDH), la dihidrolipoil deshidrogenasa, la proteína de choque térmico 70 kDa (Hsp70) y la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada TOXF. Su alta prevalencia, de más del 50%, destaca el interés de estos antígenos teniendo en cuenta los diferentes patrones antigénicos observados entre la población estudiada.

Respecto a su antigenicidad, la enolasa, la ciclofilina, la MDH, y la Hsp70 han sido ampliamente descritas como antígenos fúngicos [193–198]. De hecho, los tres últimos también han sido identificados previamente como antígenos inmunodominantes de los conidios de *L. prolificans* reconocidos por la IgA humana [172]. Aunque otros antígenos, como la enolasa, no se detectaron en ese estudio, esto puede deberse a diferencias en el protocolo de extracción de proteínas y en los criterios de selección de los puntos, ya que en el estudio anterior los antígenos

fueron identificados de acuerdo a su intensidad relativa y no a su prevalencia. Además, la enolasa, la MDH y la Hsp70 se han descrito como antígenos de *L. proliferans*, con una alta reactividad frente a sueros de individuos inmunocompetentes con una prevalencia de hasta 70, 90 y 100%, respectivamente. En ese mismo estudio la enolasa y la Hsp70 se identificaron también como antígenos asociados a la pared celular reconocidos por la IgG de humanos sanos [173].

Varios de los antígenos detectados en este estudio han sido anteriormente destacados por su implicación en el proceso de infección de diferentes hongos patógenos. Las ciclofilinas, enzimas involucradas en el plegamiento de las proteínas, han sido descritas como proteínas necesarias para el correcto crecimiento celular y la virulencia de *C. neoformans*. Concretamente, la doble mutación de las ciclofilinas A Cpa1 y Cpa2 de *C. neoformans*, generó graves defectos en el crecimiento y pérdida de virulencia en modelos animales [199]. En relación a la enolasa, se ha descrito que esta proteína está presente en la superficie de diferentes hongos patógenos, entre ellos *C. albicans* y *A. fumigatus*, donde actúa como proteína de unión al plasminógeno humano, pudiendo contribuir a la invasión y a la diseminación de las infecciones fúngicas [200,201]. También se ha observado que la enolasa participa en la adhesión de *Candida* al epitelio gastrointestinal de ratones [202] y en la adhesión de *P. brasiliensis* al epitelio pulmonar [203]. Por otro lado, las metalopeptidasas están involucradas en la diferenciación celular de conidios a hifas en *Scedosporium* spp. y degradan compuestos proteicos del huésped, como las IgG y componentes de la matriz extracelular, pudiendo contribuir a la obtención de nutrientes, a la evasión de la respuesta inmune y a la invasión de los tejidos [181,204]. Además, los análisis bioinformáticos llevados a cabo en el presente trabajo predijeron propiedades de adhesina para la MDH, enzima involucrada en el ciclo del ácido tricarbóxico y del glioxilato, pudiendo ser, por lo tanto, importante para la virulencia de *L. proliferans*. Con todo ello, es posible que los antígenos reconocidos por IgA e identificados en este estudio sean también importantes en la patogénesis de *L. proliferans* y, por ello, el bloqueo de la función de todas estas proteínas mediante los anticuerpos podría ayudar a evitar el desarrollo de la infección

Además de su importancia en la virulencia, algunas de estas proteínas han sido previamente seleccionadas por su interés como dianas diagnósticas y terapéuticas. Entre ellas, la ciclofilina es la diana del fármaco inmunosupresor y antifúngico ciclosporina A, producto natural de los hongos del suelo. Este fármaco se une a la ciclofilina y el complejo ciclofilina-ciclosporina A inhibe la fosfatasa calcineurina, enzima involucrada en importantes funciones celulares, como la respuesta al estrés, la integridad de la pared celular, la resistencia a los antifúngicos y la virulencia

[205–207]. Por otro lado, la enolasa ha sido objeto de estudio para el desarrollo de vacunas en modelos murinos de candidiasis diseminada en los que se ha obtenido una protección parcial [208,209]. A su vez, varios estudios han testado la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos anti-enolasa en pacientes con candidiasis invasiva, solos o en combinación con otros anticuerpos contra antígenos importantes como Hsp90, con resultados prometedores [175,210–212], pudiéndolos detectar incluso en pacientes inmunosuprimidos [213].

Dos de estas enzimas, la enolasa y la ciclofilina fueron identificadas, a su vez, en el subproteoma asociado a la pared celular. Por lo tanto, estos antígenos podrían ser buenas dianas debido a su accesibilidad al sistema inmunológico. Su ubicación extracelular no es sorprendente ya que la ciclofilina se ha detectado previamente en la pared del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* como receptor de células dendríticas [214], y la enolasa parece estar expuesta en la superficie de la mayoría de los hongos, cuando menos ascomicetos, [201] y ha sido identificada como la proteína principal de la pared de *C. albicans* [215].

Así mismo, se llevaron a cabo estudios inmunómicos comparativos entre *L. prolificans* y las especies *S. boydii* y *S. aurantiacum* debido a su proximidad filogenética [14] y a su relevancia clínica [16,34]. En primer lugar, se realizó un ensayo ELISA para comparar la concentración de IgA entre personas sanas. La señal obtenida fue mayor al utilizar extractos de proteínas en lugar de conidios completos, lo que podría deberse a diferencias en la cantidad de proteínas diana entre conidios y extractos, o al hecho de que los antígenos en los conidios podrían estar parcialmente ocultos o localizados intracelularmente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las tres especies en ninguno de los casos. Teniendo en cuenta el hecho de que algunos de los antígenos identificados están ampliamente conservados entre los patógenos fúngicos, estos resultados sugieren que la reactividad cruzada entre especies podría desempeñar un papel importante en la detección de estos hongos.

Para completar el estudio comparativo, se analizaron los tres proteomas e inmunomas. No es de extrañar que se obtuvieran patrones muy diferentes, ya que *L. prolificans* se encuentra actualmente separado del género *Scedosporium* [14]. No obstante, también se detectaron la ciclofilina y la enolasa como antígenos de *S. boydii* y *S. aurantiacum*, lo que podría deberse a una reactividad cruzada que explicaría asimismo la elevada prevalencia de estos antígenos, y que podría producirse también con otros hongos. En consecuencia, se realizó un estudio de reactividad cruzada frente a *A. fumigatus*, ya que es el hongo filamentoso más frecuentemente asociado a

infecciones de transmisión aérea en todo el mundo [23,216]. En este estudio se observó que las IgA purificadas tras la unión a *A. fumigatus* reconocían la enolasa y las ciclofilinas de *L. prolificans*, lo que demuestra un proceso de reactividad cruzada entre estas proteínas de especies de hongos filamentosos diferentes. Esto no es sorprendente, ya que las ciclofilinas se han descrito como panalérgenos de hongos e incluso indirectamente en humanos [193], lo que debería estudiarse con mayor profundidad para evitar resultados indeseables si las ciclofilinas fueran a considerarse para el desarrollo de vacunas en el futuro. Así mismo, la enolasa es una proteína muy conservada, detectada como antígeno de numerosos hongos patógenos [194,196,217], entre ellos de *A. fumigatus* [194,218]. Además, estudios realizados con diversos patógenos, incluido el presente, han demostrado el reconocimiento por reactividad cruzada de esta enzima [195,219]. Por lo tanto, se puede deducir que la IgA podría tener un papel protector frente a estas enzimas altamente conservadas de diferentes especies de hongos, generando una respuesta inmune panfúngica. De hecho, tal y como se ha comentado anteriormente, el uso de una de estas enzimas para terapia, la enolasa, se ha probado parcialmente como vacuna contra *C. albicans*, provocando una disminución de la carga fúngica y del daño tisular [208].

En resumen, debido a la alta prevalencia y reactividad de la ciclofilina y la enolasa de *L. prolificans* frente a la IgA y su localización en la superficie de la pared celular, estas enzimas parecen tener un interesante potencial como dianas terapéuticas o como inmunógenos para desarrollar vacunas protectoras. Además, la reactividad cruzada estudiada muestra que las terapias contra la enolasa y las ciclofilinas podrían proteger frente a frecuentes patógenos fúngicos.

## **5.2. Desarrollo de un modelo de infección murina diseminada por *L. prolificans* y comparación de su patogenicidad frente a *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus***

Las infecciones causadas por *L. prolificans* se caracterizan por ser frecuentemente diseminadas y presentar una elevada mortalidad (87,5%) [3]. De hecho, la capacidad de *L. prolificans* de producir infecciones diseminadas es muy superior en comparación con otros hongos patógenos filogenéticamente relacionados. Concretamente, en un extenso estudio realizado por Seidel *et al.* (2019) en el que analizaron 264 casos clínicos de *Scedosporium/Lomentospora* detectaron un número muy superior de fungemias (46,4% vs 5,8%) y de infecciones diseminadas (58,9% vs 22,1%) generadas por *L. prolificans* frente a *Scedosporium* spp. [8]. Con el objetivo de

aumentar el conocimiento en torno a la patogenia de estas micosis, se desarrolló un modelo murino de infección diseminada utilizando *L. prolificans*, que fue comparada con la causada por las especies filogenéticamente relacionadas *S. boydii* y *S. aurantiacum*, así como por el hongo filamentoso con mayor relevancia clínica, *A. fumigatus*.

Para ello, en primer lugar, se estudiaron la mortalidad, la aparición de signos y la carga fúngica de los órganos como indicadores del proceso de infección tras la administración de  $10^2$ - $10^5$  conidios/animal de *L. prolificans*. Mientras que con las dosis bajas de conidios se recogió el hongo principalmente de los órganos asociados a la circulación sanguínea (bazo, hígado, riñones), en los ratones infectados con dosis superiores se observó también la invasión del cerebro y de los pulmones. La elevada carga fúngica detectada en el cerebro ya ha sido previamente descrita por otros autores [179,189,220].

El grupo infectado con la dosis más elevada fue el único que mostró síntomas asociados a la infección y mortalidad, siendo esta del 50%. La infección se caracterizó principalmente por la aparición de anomalías neurológicas, como la inclinación hacia un lado, la pérdida completa del equilibrio y ataxia. En esta línea, en todos los ensayos murinos similares realizados hasta el momento con *L. prolificans* se han descrito signos neurológicos en la progresión de la infección [121,189,220]. Estos resultados asociados a la elevada carga fúngica observada en este órgano evidencian una severa infección del cerebro causada por *L. prolificans*. Este hecho está en consonancia con el neurotropismo que presenta dicho hongo [3,45]. Esta tendencia de *L. prolificans* a invadir el SNC y causar graves trastornos neurológicos que conducen generalmente a la muerte, ha sido recientemente asociada a una ineficiente respuesta de la microglía [166]. Teniendo en cuenta todos estos datos, la dosis de  $10^5$  conidios/animal fue seleccionada como la dosis mínima para producir una infección diseminada por *L. prolificans* en nuestro modelo murino, lo que va en concordancia con los resultados observados en la bibliografía [121–123,220].

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio comparativo de las infecciones diseminadas producidas por *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus*. Estos resultados mostraron que en comparación con la tasa de mortalidad del 50% obtenida con *L. prolificans*, *S. boydii* y *S. aurantiacum* mostraron una tasa del 16,67%. Esta menor virulencia de las especies del género *Scedosporium* spp. frente a *L. prolificans* ya ha sido previamente descrita en modelos murinos similares [121–123]. En cuanto a *A. fumigatus*, fue la especie que menor virulencia mostró, ya que se requirió de una dosis más elevada para desarrollar una infección sistémica, la cual causó un 50%

de mortalidad. Los órganos en los que mayor carga fúngica se detectó fueron los riñones, exceptuando los ratones infectados con *S. aurantiacum*. La invasión renal fue confirmada en el análisis histopatológico, detectando hifas y una elevada cantidad de conidios de *L. prolificans*, probablemente debido a su capacidad de esporular *in vivo* [3]. Esta capacidad, que ha sido también observada en tejidos humanos [3], se ha asociado a la facilidad de diseminación del hongo a través del torrente sanguíneo. Este hecho, sumado a la menor capacidad de la microglía para fagocitar *L. prolificans*, en comparación con *S. boydii* y a *S. aurantiacum* [166], podría ser determinante en que, pese a haber detectado signos neurológicos en todos los grupos de ratones infectados con los diferentes hongos, *L. prolificans* mostró una mayor capacidad de infectar el SNC, obteniendo una carga fúngica en el cerebro significativamente superior al resto.

### **5.3. Identificación de los antígenos inmunodominantes del secretoma y del extracto total de *L. prolificans* reconocidos por ratones inoculados con la dosis de contacto e infectiva**

A pesar de la prevalencia relativamente baja de las infecciones causadas por *L. prolificans*, tienen una elevada relevancia en la clínica debido a su alta tasa de mortalidad. Este hecho está asociado con la tendencia del hongo a infectar a los huéspedes debilitados, a la falta de métodos de diagnóstico rápidos y a su resistencia intrínseca a prácticamente todos los antifúngicos disponibles en la actualidad. Por lo tanto, se deben hacer mayores esfuerzos para identificar nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas, y los estudios inmunoproteómicos podrían ser una herramienta adecuada para lograr este objetivo. En consecuencia, en este trabajo se analizó la respuesta humoral desarrollada en ratones tras la administración intravenosa de *L. prolificans*. Este es el primer trabajo desarrollado con esta finalidad con *L. prolificans*, pese a que son numerosos los realizados con otros hongos patógenos, como *A. fumigatus* [218] y *C. albicans* [218,219,221–223], cuyos resultados han permitido la identificación de nuevas dianas diagnósticas. Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron la dosis de conidios más baja ( $10^2$  conidios/animal) como dosis de contacto no infectiva, y la dosis más elevada ( $10^5$  conidios/animal) como dosis infectiva.

En primer lugar, los sueros de ambos grupos se enfrentaron al secretoma de *L. prolificans*. El análisis proteómico de las proteínas secretadas resulta de especial interés, ya que parecen jugar un papel crítico en la virulencia, participando en la degradación de las barreras estructurales del hospedador, en la eliminación de mecanismos de la defensa inmune y/o en la adquisición de



nutrientes [224,225]. Además, en comparación con las proteínas citosólicas, el secretoma presenta una reducida homología respecto a las proteínas humanas [226], pudiendo contener interesantes marcadores específicos de diagnóstico, dianas terapéuticas o candidatos de vacunas. Se han realizado numerosos estudios del secretoma del hongo patógeno *A. fumigatus*, muchos de ellos basados en la identificación de proteínas inmunorreactivas que han permitido identificar candidatos prometedores para la mejora de los test de diagnóstico, como la quitosanasa o la dipeptidil-peptidasa V [227–230]. Sin embargo, la investigación del secretoma de otros hongos patógenos ha sido escasa o nula. Concretamente, en el caso de los hongos del género *Scedosporium* spp. numerosos estudios han descrito la secreción de una gran variedad de compuestos como antibióticos, fungistáticos, peptidasas y poliketidos asociados a la virulencia. Así mismo, se han identificado moléculas útiles como biomarcadores de las infecciones generadas por estos hongos, como el sideróforo *N*( $\alpha$ )-metil coprogeno B [136,231]. Sin embargo, únicamente se han llevado a cabo tres investigaciones de proteómica del secretoma global de *Scedosporium* spp. [174,232,233], y en el caso de *L. prolificans* no existe ninguna publicación acerca de dicho extracto. Por lo tanto, atendiendo a nuestro conocimiento, este estudio es el primero en llevar a cabo un análisis el secretoma de *L. prolificans*.

Una de las limitaciones del estudio del secretoma es la elevada variabilidad del extracto dependiente de factores ambientales, lo que responde a la necesidad esencial de los hongos de contener un secretoma adaptado al ambiente. En esta línea, en el análisis comparativo realizado mediante 1DE del secretoma de *L. prolificans* extraído en diferentes tiempos y medios de cultivo se obtuvieron patrones de bandas muy diferentes. Así mismo, existe un gran número de estudios en los que detectan elevadas variaciones del extracto tras el empleo de diferentes fuentes de nutrientes [228,234–239]. Este hecho limita la posibilidad de conocer las proteínas realmente secretadas en el proceso de infección. La identificación de las proteínas inmunorreactivas reconocidas por sueros de ratones infectados permite la detección de proteínas que probablemente hayan sido producidas durante la infección y que, por ello, podrían estar involucradas en la patogénesis de estas micosis.

En el análisis proteómico del secretoma, solo 3 de los 373 puntos detectados fueron reconocidos por los sueros de ratones inoculados con la dosis de contacto, mientras que 36 lo fueron con los sueros de la dosis infectiva. La reactividad observada en el grupo contacto no solo fue menor en número, sino que también lo fue en la intensidad de la señal detectada, teniendo que aumentar el contraste de la imagen para poder visualizar el resultado. Los puntos con mayor

volumen relativo de ambos grupos se identificaron mediante espectrometría de masas. Concretamente, se seleccionaron 14 puntos para su identificación, de los cuales en 2 de la dosis de contacto no se obtuvieron resultados satisfactorios posiblemente debido a la reducida cantidad de proteína en el gel o porque los espectros de péptidos generados no mostraron semejanza con las proteínas anotadas en la base de datos del NCBI. Pese a que actualmente el genoma de *L. prolificans* está completamente anotado, el proteoma del hongo es desconocido todavía en gran medida. Concretamente, mientras que para *S. apiospermum* hay actualmente un total de 18.239 entradas de proteínas, para *L. prolificans* únicamente hay 8.752. Por ello, resulta necesaria la completa anotación de la secuencia de aminoácidos con el fin de obtener identificaciones de mayor calidad y fiabilidad.

En el secretoma se identificaron con éxito 12 puntos inmunorreactivos, que en realidad correspondían a siete antígenos diferentes. Concretamente, la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH) fue identificada con la dosis de contacto, y la hidrolasa de la superfamilia haloácido dehalogenasa (hidrolasa tipo HAD), la Hsp70, la proteína de migración nuclear nudC (NUDC), una glicosil hidrolasa perteneciente a la familia GH16 (GH16), una cerato-platanina y una proteína de función desconocida (Hp jhhlp\_006787) con la dosis infectiva. La identificación de proteínas con función desconocida en el secretoma de los hongos filamentosos es común y, además, en el caso de esta proteína es lógica teniendo en cuenta su bajo nivel de homología con otras especies de hongos como *A. fumigatus* (38,22%). Todo esto muestra una falta de conocimiento en torno a la composición de los secretomas y, a su vez, aumenta el interés por profundizar en el estudio del papel de estas proteínas extracelulares.

El antígeno reconocido por los sueros de contacto, SAHH, es una enzima metabólica responsable de la hidratación reversible de S-adenosil-L-homocisteína en adenosina y homocisteína [240]. Esta enzima ha sido detectada como antígeno del exoproteoma del dermatofito *Trichophyton verrucosum* reconocido por suero de pacientes infectados [241]. Este antígeno probablemente también pueda ser reconocido por los sueros de ratones infectados, pero la alta inmunoreactividad de otras proteínas podría impedir o enmascarar su detección. El hecho de que los antígenos inmunodominantes no sean compartidos por ambos grupos aumenta la importancia de aquellos reconocidos por ratones con infección diseminada como marcadores de infección.

Las proteínas identificadas en el secretoma se sometieron a análisis bioinformáticos para analizar su localización celular y su vía de secreción. De ellas, únicamente en 3 (42,9%) fue posible predecir la secreción por la vía clásica. Estas tres proteínas corresponden a la hidrolasa tipo HAD, la GH16 y la cerato-platanina. Numerosos estudios han detectado un elevado porcentaje de proteínas extracelulares sin péptido señal que podrían ser secretadas por rutas alternativas como exocitosis de vesículas recubiertas, lisosomas secretores, microvesículas o transportadores de casetes de unión a ATP [235,242,243] lo que podría explicar la presencia del resto de las proteínas en el secretoma de *L. prolificans*. De hecho, la secreción de SAHH y la Hsp70 mediante vesículas extracelulares ya ha sido descrita para varios hongos patógenos [244,245].

Por otro lado, los análisis bioinformáticos también predijeron propiedades de adhesinas para 2 proteínas, la GH16 y la Hp jhhlp\_006787. Entre las funciones relacionadas con la virulencia del secretoma de otros hongos, se ha detectado la capacidad de las proteínas extracelulares de actuar como adhesinas [226,242,246], facilitando la interacción hongo-hospedador y la invasión del patógeno. Como ejemplo, se ha detectado la capacidad de unión al plasminógeno de numerosas proteínas del secretoma de *Paracoccidioides*, pudiendo favorecer la propagación del hongo a tejidos más profundos [247].

En relación a la función de las proteínas identificadas, el 50% con función conocida son enzimas hidrolíticas. Concretamente, se identificaron tres hidrolasas, la SAHH, la hidrolasa tipo HAD, y una glicosil hidrolasa. La hidrolasa tipo HAD pertenece a una superfamilia de hidrolasas que incluye dehalogenasas, fosfonatasas, fosfomutasas, fosfatasas y ATPasas [248]. Algunas de ellas han sido detectadas en el secretoma de *S. boydii* [174] e identificadas como antígenos seroprevalentes de *L. prolificans* reconocidas por IgG de suero de humanos sanos [173]. En un trabajo realizado por Hernández *et al.* (2010) asociaron una proteína perteneciente a esta superfamilia con la morfología, adherencia a las células epiteliales humanas y la virulencia de *P. brasiliensis* [249]. Así mismo, estudios realizados por Jung *et al.* (2017) demostraron el papel regulador de una proteína de esta superfamilia en la termotolerancia, integridad de la pared celular y virulencia de *C. neoformans* [250].

En el secretoma de *L. prolificans* se detectó a su vez una proteína perteneciente a la recientemente identificada familia de las cerato-plataninas. Esta familia está formada por proteínas pequeñas, secretadas y ricas en cisteína exclusivamente sintetizadas por hongos filamentosos [251]. Diversas proteínas de esta familia han sido detectadas en el secretoma de

importantes patógenos humanos como los dermatofitos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, y *Arthroderma benhamiae* [241], *S. boydii* [174] y *A. fumigatus* [230]. Concretamente, el alérgeno Asp f13/15 de *A. fumigatus* perteneciente a la familia de las certo-plataninas ha sido detectado como proteína necesaria para la inflamación y remodelación de las vías respiratorias inducida por dicho hongo [230,252].

Por otro lado, la proteína NUDC ha sido identificada como proteína necesaria para el movimiento nuclear en *Aspergillus nidulans*, proceso con especial relevancia en el crecimiento de las hifas, y ha sido localizada en el cortex y en el centro organizador de microtubulos, los cuerpos polares del huso, [253]. Finalmente, la Hsp70 es uno de los antígenos más importantes del secretoma de *L. prolificans*. Sin embargo, teniendo en cuenta su inmunorreactividad también en el extracto total de *L. prolificans* y en la comparación entre especies descrita en los párrafos siguientes, se discutirá en detalle más adelante.

Después del análisis inmunoproteómico del secretoma, se realizó el mismo proceso con el extracto total de *L. prolificans*. En el análisis del proteoma del extracto celular total mediante 2DE se detectaron hasta 944 puntos, de los cuales dos fueron reconocidos por los sueros de los ratones inoculados con la dosis de contacto y hasta 89 por los inoculados con la dosis infectiva, detectando nuevamente una menor inmunorreactividad para el primer grupo. Los 19 puntos inmunorreactivos con mayor volumen relativo fueron extraídos e identificados mediante espectrometría de masas, los cuales correspondieron a 10 proteínas diferentes: dos isoformas de la subunidad alfa del proteasoma como antígenos asociados a la dosis de contacto y la dipeptidil-peptidasa (Dpp), la Hsp70, el receptor proteasomal de ubiquitina, la carboxipeptidasa Y (CPY), la proteína con el dominio RanBP1 (RanBP1), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la hidrolasa tipo HAD, la proteína de clasificación vacuolar 28 (Vps28) y la proteína NFU1 del cluster hierro-azufre (NFU1) como antígenos asociados con la infección diseminada. Las isoformas de la subunidad alfa del proteasoma posiblemente también sean antígenos asociados a la infección, pero posiblemente la elevada inmunorreactividad obtenida para otras proteínas podría haber impedido detectar su señal.

De todos los antígenos reconocidos por los sueros infectados, de acuerdo al volumen relativo la Hsp70 fue detectada como el antígeno más inmunodominante con un valor 20 veces superior al del siguiente antígeno. Esta proteína y la hidrolasa tipo HAD también han sido

identificadas en el secretoma reconocidas por suero de ratones infectados, y junto con la Dpp ya han sido previamente descritas como antígenos de hongos en otros trabajos [173,230,254–256].

Por lo tanto, se detectaron dos subunidades del proteasoma 26S, responsable de la degradación selectiva de las proteínas poli-ubiquinadas [257], como antígenos de *L. prolificans*: la subunidad alfa del proteasoma y el receptor proteasomal de ubiquitina. Además, se detectaron dos antígenos con actividad exopeptidasa, la proteasa CPY y la Dpp. Las Dpps, merecen especial mención, ya que han sido descritas como factores de virulencia de *A. fumigatus* al facilitar la colonización de los tejidos mediante la degradación de proteínas humanas como el colágeno, las hormonas y las citocinas [258] Así mismo, la DppIVA de *Blastomyces dermatitidis* promueve la evasión de la respuesta inmune al escindir un dipéptido del extremo N-terminal de las citocinas, inactivándolas de ese modo [259]. En cuanto a su utilidad en la clínica, la DppV de *Aspergillus* ha sido identificada como interesante diana para el serodiagnóstico de diferentes aspergilosis como la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), la infección invasiva por *A. terreus* y el aspergiloma [231].

Con respecto a los otros antígenos identificados en el extracto total, la Vps28 forma parte del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT-I) que está asociado a las membranas endosomales y participa en la clasificación de las proteínas desde los endosomas hasta la vacuola través de cuerpos multivesiculares (MVB) [260]. La eliminación de la proteína Vps28 aumenta la susceptibilidad de *C. albicans* a las equinocandinas y los azoles [261], y reduce significativamente su virulencia en un modelo murino de candidiasis invasiva [262]. Además, hasta donde sabemos, es la primera vez que la RanBP1, el PCNA y la NFU1 son detectadas como antígenos fúngicos. En cuanto a su funcionalidad, la RanBP1, que está implicada en el transporte entre el núcleo y el citoplasma, es esencial para la viabilidad celular y necesaria tanto para la importación de proteínas nucleares como para la exportación de ARN poli-A+ [263]. Por otro lado, el PCNA es una proteína conservada que sirve como plataforma de acoplamiento al ADN para muchas proteínas que funcionan en la replicación, reparación, recombinación, ciclo celular y remodelación de la cromatina del ADN [264]. La proteína NFU1 se encuentra localizada en la mitocondria, tal y como se ha predicho mediante el análisis bioinformático, y desempeña un papel importante en la homeostasis intracelular del hierro y en la biosíntesis de proteínas con el grupo Fe/S [265,266].

#### **5.4. Estudio de la respuesta humoral de ratones tras una infección intravenosa con *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus***

Con el objetivo de estudiar la especificidad de los antígenos de *L. prolificans*, los sueros de los ratones infectados con *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *A. fumigatus* se enfrentaron al extracto total y al secretoma de *L. prolificans*. Todas las proteínas del secretoma y del extracto total reconocidas por sueros de ratones infectados con *L. prolificans* fueron también inmunorreactivas cuando se enfrentaron a los sueros de ratones infectados con *Scedosporium* spp.. Por tanto, estos antígenos ya han sido descritos en detalle a lo largo de esta discusión. Esta alta reactividad cruzada hace imposible la detección de antígenos específicos a nivel de especie dentro del complejo *Scedosporium/Lomentospora* y esto se debe muy probablemente al alto nivel de homología asociado con la proximidad filogenética entre ellas. Sin embargo, los sueros de los ratones infectados con *A. fumigatus* no reconocieron ninguno de estos antígenos, y reaccionaron con ninguna o muy pocas proteínas del secretoma y del extracto total de *L. prolificans*, respectivamente. Estos antígenos posiblemente también sean reconocidos por los sueros de ratones infectados con *Scedosporium/Lomentospora*, pero debido a la fuerte reactividad del resto de antígenos no han podido ser detectados. Entre las proteínas de *L. prolificans* reconocidas por sueros de ratones infectados con *A. fumigatus* se encuentra la enolasa. No es de extrañar este resultado, ya que esta proteína está muy conservada y ha mostrado reactividad cruzada entre varias especies de hongos [195,219], tal y como se ha demostrado en el primer apartado de este trabajo.

Los antígenos compartidos entre las especies *S. boydii*, *S. aurantiacum* y *L. prolificans* son interesantes candidatos para el estudio de terapias alternativas de estas infecciones, así como potenciales marcadores de diagnóstico para la diferenciación de estas especies frente a especies con mayor prevalencia como *A. fumigatus*. En concreto, las proteínas del extracto total de *L. prolificans* el receptor proteasomal de ubiquitina, la CPY, la Vps28, y la hidrolasa tipo HAD tienen una homología menor al 40% con las proteínas humanas, lo que pone de manifiesto su interés como dianas terapéuticas o para la producción de vacunas. Por otro lado, entre las proteínas secretadas, la proteína de función desconocida, la GH16, la hidrolasa tipo HAD y la ceratoplatanina tienen una baja o nula homología con las proteínas humanas, y menor al 50% con las de *A. fumigatus*. Por lo tanto, estas proteínas además de ser interesantes candidatos como dianas terapéuticas, también lo son para el desarrollo de técnicas de diagnóstico específicas para *Lomentospora/Scedosporium*. Dado que son proteínas secretadas, la detección directa de estas

proteínas en los fluidos corporales podría ser de especial interés, ya que muchos de los pacientes afectados por estas micosis presentan una respuesta inmune defectuosa.

Para finalizar con la discusión de los antígenos identificados, la proteína inmunorreactiva Hsp70 merece mención especial, ya que ha sido ampliamente detectada por nuestro grupo de investigación como antígeno inmunodominante de *L. prolificans*. Este resultado no es de extrañar, ya que las proteínas de la familia Hsp70 además de cumplir funciones esenciales como chaperonas intracelulares son importantes dianas de la respuesta inmune frente a bacterias, hongos y parásitos [267]. Concretamente, proteínas de esta familia han sido detectadas como antígenos en la aspergilosis [254], candidiasis [268] y paracoccidioidomicosis [255], y como el antígeno más inmunodominante en la criptococosis pulmonar [256]. Además, la localización de la Hsp70 en la superficie celular [173] y en el secretoma de *L. prolificans* la convierte en una proteína muy accesible a la respuesta inmune y podría explicar la elevada inmunogenicidad asociada a esta proteína. Por otro lado, proteínas de esta familia han sido identificadas como factores de virulencia de importantes patógenos fúngicos, actuando como invasina de *C. albicans* [269] y como proteína de unión al plasminógeno de *C. neoformans* [270].

En los estudios realizados por nuestro grupo de investigación en torno a la respuesta humoral de humanos sanos frente a *L. prolificans*, la Hsp70 ha sido identificada como antígeno prevalente reconocido tanto por IgG sérica [173] como por IgA salivar. Este hecho aumenta el interés de emplear esta proteína para el desarrollo de terapias profilácticas, como vacunas, ya que, con este antígeno los pacientes podrían desarrollar anticuerpos protectores frente a diferentes niveles de la infección por *L. prolificans*. De hecho, las proteínas de choque térmico (Hsp) ya han sido estudiadas como vacunas de importantes hongos patógenos como, *H. capsulatum* [198] y *C. albicans* [271]. En concreto, la Hsp90 de *C. albicans* ha sido probada con éxito como vacuna en un modelo murino de candidiasis sistémica, obteniendo una correlación positiva entre el nivel de anticuerpos anti-Hsp90 y la tasa de supervivencia [271]. Además, debido a su actividad inmunomoduladora, las Hsps han sido empleadas como adyuvantes o moléculas portadoras en el desarrollo de vacunas contra bacterias, virus y parásitos. Concretamente, la Hsp70 de *Mycobacterium* spp. ha sido utilizada junto a péptidos u oligosacáridos de *Plasmodium falciparum*, del VIH y del meningococo C, logrando estimular la respuesta tanto humoral como celular sin la necesidad de adyuvantes [272,273].

Pese a que la Hsp70 es una proteína altamente conservada, tal y como se ha observado en el estudio de homología, presenta un fragmento C- terminal de menor similitud. Los estudios realizados con la Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* demostraron que esta proteína estimula las células de la respuesta inmune, induciendo la producción de quimiocinas y citocinas en los monocitos humanos, y la maduración de las células dendríticas, y que el dominio C-terminal es el responsable de dicha estimulación [274]. Por lo tanto, el estudio del fragmento final de esta proteína como vacuna es de especial interés, debido a su potencial para inducir la respuesta inmune y su menor nivel de homología con respecto a la correspondiente Hsp70 humana, lo que podría disminuir la aparición de efectos secundarios asociados a una reactividad cruzada.

Por otro lado, la Hsp70 ha sido recientemente relacionada con la resistencia a la anfotericina B y a la caspofungina en *A. terreus* y *A. fumigatus*, respectivamente [73,275] y con la resistencia de *L. prolificans* al voriconazol [71], y por lo tanto podría ser útil para el desarrollo de tratamientos alternativos. En esta línea, el anticuerpo Mycograb desarrollado contra la Hsp90 de *C. albicans* en combinación a la anfotericina B ha demostrado eficacia frente a *C. albicans* y *C. neoformans* [112,120]. Además, los compuestos Inhibidores del eje Hsp90-calcineurina, en la que está involucrada la Hsp70, han sido testados con éxito *in vitro* frente a cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles y a equinocandinas [276], y frente a *L. prolificans* [73]. Pese a que el uso de inhibidores específicos de la Hsp70, la pifitrina- $\mu$ , ha mostrado una reducida actividad frente a *L. prolificans* [73], el estudio del posible efecto sinérgico de este compuesto con el voriconazol no ha sido testado, y podría ser de gran interés para futuras investigaciones.

Por último, cabe destacar el interés de utilizar la Hsp70 como diana diagnóstica de *Lomentospora/Scedosporium*, ya que fue identificada como el antígeno más inmunodominante del extracto total de *L. prolificans* reconocida por el 100% de los sueros de ratones infectados con *Lomentospora/Scedosporium*, pero no por ratones infectados con *A. fumigatus*. En esta línea, la Hsp90 de *C. albicans* ya ha sido anteriormente empleada con éxito para el desarrollo de métodos de diagnóstico de candidiasis invasivas [175,277].



## 5.5. Desarrollo de un modelo de inmunización frente a las infecciones producidas por *L. prolificans*

Estudios previos realizados con otros hongos patógenos como *C. albicans* y *A. fumigatus* han demostrado que el contacto no infeccioso con el hongo puede inducir una respuesta inmune protectora [221,278]. En este trabajo se estudió el efecto protector obtenido tras la administración de dosis de conidios no infectivos ante una posterior infección diseminada por *L. prolificans*. En los dos grupos de ratones, inmunizado y control, el principal signo asociado al proceso de infección fueron las alteraciones neurológicas, cuya aparición fue más temprana en los ratones del grupo control. En el grupo inmunizado se observó a su vez una reducción de la mortalidad y una reducción significativa de la carga fúngica del cerebro. La menor carga fúngica detectada en el cerebro del grupo inmunizado podría deberse a una menor invasión de este órgano, lo que concuerda con la aparición más tardía de los signos neurológicos.

Por tanto, el contacto previo con dosis de conidios no infectivos confirió una leve protección frente a la infección, que quizás no fue mayor debido a la reducida capacidad para inducir la respuesta humoral de la dosis de contacto, tal y como se ha descrito anteriormente. Pese a ello, todos los parámetros analizados mostraron una mejoría, destacando la reducción significativa de la carga fúngica en el cerebro respecto al grupo control. Sin embargo, sería necesario confirmar estos resultados aumentando el número de individuos, y a su vez, sería interesante probar otras vías de inoculación, diferentes dosis de conidios y otras pautas de inmunización.

Como resumen final, el estudio inmunoproteómico llevado a cabo en este trabajo ha permitido la identificación de antígenos de *L. prolificans* de relevancia para el diagnóstico y el tratamiento. Concretamente, se ha descrito una elevada prevalencia de reactividad de las IgA salivares de humanos sanos frente a la ciclofilina y la enolasa del hongo, lo que, junto a su localización en la superficie celular, hacen de estas enzimas unas candidatas potenciales a ser estudiadas como dianas terapéuticas o para el desarrollo de vacunas. Además, se ha demostrado la reactividad cruzada de estas enzimas con *A. fumigatus*, lo que puede ser de interés para el desarrollo de tratamientos eficaces frente a ambos géneros.

Por otro lado, se ha demostrado que *L. prolificans* es la especie más virulenta de las estudiadas, seguida por las especies de *Scedosporium* spp. y finalmente por *A. fumigatus*. En comparación con las otras especies, las infecciones causadas por *L. prolificans* se caracterizan por

una gran presencia de conidios en tejidos y una mayor tendencia a infectar el cerebro. El estudio de los sueros obtenidos de dichas infecciones permitió la identificación de los antígenos inmunodominantes de *L. prolificans* reconocidos por IgG séricas, los cuales mostraron una elevada reactividad cruzada con los sueros de ratones infectados con *Scedosporium* spp. pero no con los de *A. fumigatus*. Este hecho dificulta su utilización para realizar un diagnóstico diferencial entre las especies de *Lomentospora/Scedosporium*, pero puede ser de gran utilidad para diferenciar este complejo frente a *Aspergillus*. Algunas de las proteínas identificadas, como el receptor proteasomal de ubiquitina, CPY, Vps28, hidrolasa tipo HAD, GH16, Hp jhlp\_006787 y la ceratoplatanina pueden ser interesantes también como dianas terapéuticas por su baja homología con las proteínas humanas. Otra proteína que merece una mención especial es la Hsp70, ya que fue reconocida por todos los sueros de ratones infectados con *L. prolificans* y *Scedosporium* spp. Además, pese a ser una proteína altamente conservada presenta un fragmento C-terminal menos similar, cuyo potencial clínico debería ser estudiado en futuras investigaciones.

---

# Conclusiones

---



1. La ciclofilina y la enolasa han sido identificadas en conidios de *L. prolificans* como antígenos reconocidos por las IgA salivares con una elevada prevalencia y reactividad entre una población de individuos sanos.

2. La ciclofilina y la enolasa de *L. prolificans* se han detectado por las IgA salivares entre las proteínas extraídas de la superficie de la pared celular del hongo y han mostrado reactividad cruzada con *A. fumigatus*, lo que hace de estas enzimas unas potenciales candidatas a ser estudiadas como dianas terapéuticas o para el desarrollo de vacunas frente a ambos géneros.

3. La especie *L. prolificans* es más virulenta que *S. aurantiacum* y *S. boydii* en un modelo murino de infección diseminada, siendo estas especies a su vez, más virulentas que *A. fumigatus*. En comparación con las otras, las infecciones causadas por *L. prolificans* se caracterizan por una elevada presencia de conidios en tejidos y una mayor tendencia a infectar el cerebro.

4. Los antígenos más inmunorreactivos de *L. prolificans* reconocidos por las IgG séricas de ratones infectados por dicho hongo mostraron una elevada reactividad cruzada con los sueros de ratones infectados con *Scedosporium* spp. pero no con los de *A. fumigatus*. Este hecho impide su utilidad para realizar un diagnóstico diferencial entre especies de *Scedosporium/Lomentospora*, pero puede ser de gran importancia para diferenciar estas de las de *Aspergillus*.

5. Entre los antígenos identificados, la hidrolasa tipo HAD identificada tanto en secretoma como en extracto total, el receptor proteasomal de ubiquitina, la CPY y el Vps28 del extracto total, y la GH16, Hp jhlp\_006787 y la cerato-platanina del secretoma pueden ser interesantes como dianas terapéuticas debido a su nula o baja homología con sus homólogos humanos.

6. La Hsp70 fue identificada como antígeno del secretoma y del extracto total de *L. prolificans* reconocida por sueros de ratones con infección diseminada por *Lomentospora/Scedosporium*. Esta proteína se identificó como la proteína más inmunoreactiva del extracto total, reconocida por el 100% de los ratones. La Hsp70, a pesar de ser una proteína conservada presenta un fragmento C-terminal con mayor variabilidad que podría ser de gran interés clínico como diana diagnóstica o terapéutica.

7. La administración intravenosa de dosis no infecciosas de *L. prolificans* en un modelo murino ofrece una leve protección frente a una infección posterior. Todos los parámetros relacionados con la infección mejoraron, destacando la reducción significativa de la carga fúngica en el cerebro.

---

**Sarrera**

---





*Lomentospora prolificans*, lehenago *Scedosporium prolificans* bezala ezagutua, nagusiki giza aktibitate handia duten guneetako lurzoruan isolatutako onddo patogeno haritsua da [1]. Azaleratzen ari den patogenotzat hartu da azken hamarkadetan detektatutako kasu klinikoaren gorakadaren ondorioz [2].

Espezie hau *Microascaceae* familian sailkatzen da, *Microascales* ordenan eta *Ascomycota* phylumean. *Microascaceae* familian, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii*, *Scedosporium aurantiacum* eta *L. prolificans* dira espezie garrantzitsuenak klinikan. Horien artean, *L. prolificans* espezia % 87,5erainoko heriotza-tasa duten infekzio barreiatuak sortzeagatik bereizten da. Infekzio hauek batez ere immunoeskasi larria duten pazienteetan eragiten ditu, bereziki neoplasia gaiztoak dituztenetan [3]. Bestalde, *S. apiospermum* eta *S. boydii* espezieek eragindako infekzioak mundu osoan zabalduta dauden bitartean, *L. prolificans*ek eragindako kasu klinikoaren kokapena oso mugatua da, batez ere Espainian eta Australian detektatu direlarik. Hala ere, azkenaldian Europako beste herrialde batzuetan, AEBetan, Korean, Japonian, Indian eta Brasilen ere detektatuak izan dira [4–9].

### 1.1. Morfologia

Morfologiari dagokionez, *L. prolificans* mikroskopikoki hifa hialino trenkatuak eta matraz formako konidioforoak sortzeagatik bereizten da. Konidioforoetatik konidio zelulabakarren multzo txiki bat azaleratzen da. Oinarrian puztutako konidioforo hauek *L. prolificans*en ezaugarri taxonomiko garrantzitsua dira. Konidioen kolorea hialinotik marroi argira doa, oboide-piriforme forma daukate, oinarria moztua eta estuarekin, eta 2-5 µm bider 3-13 µm-ko tamaina daukate. Filogenetikoki erlazionaturiko espezieek ez bezala, ez da deskribatu onddo honek beste forma asexual batzuk dituenik, hala nola *Graphium* motako konidioforoak, ezta ugalketa sexualeko formarik ere [10].

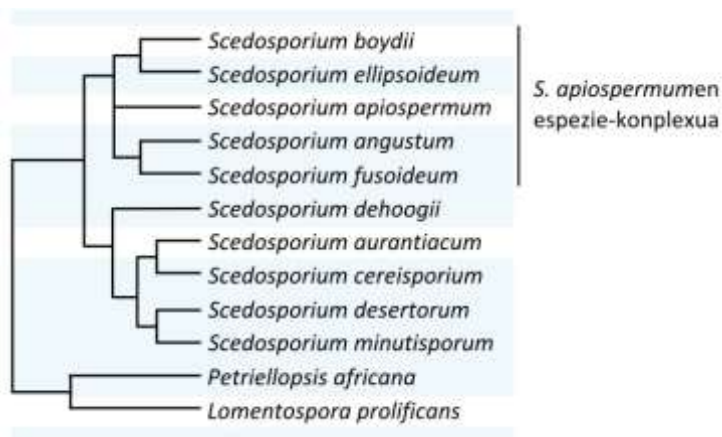
Bestalde, onddo honen koloniek neurrizko hazkuntza edo azkarra daukate 25°C-tan Sabouraud kultibo-ingurunean eta 5 egunetan heltzen dira, astebetean 3 zm ere neurtu dezaketelarik. Koloniak lauak dira, gainazal leun eta hezearekin. Kolore zuria daukate, ondoren oliba-berde argitik beltzera aldatzen dena konidiazioa agerikoa bihurtzen denean. Atzealdea marroi ilun kolorekoa bilakatzen da [10].

## 1.2. Taxonomia

1974ean Hennebertek eta Desaik isolatu eta deskribatu zuten lehen aldiz *L. prolificans* onddoa negutegi bateko lurretik [11]. Hamarkada bat geroago, Mallochek eta Salkinek *Scedosporium* espezie berri bat deskribatu zuten, haur immunogai baten hezur-biopsia batetik isolatutakoa, eta *S. inflatum* izena esleitu zioten bere matraz formako konidioforo bereizgarriengatik. Ondoren, beste autore batzuek *S. inflatum* eta *L. prolificans*en arteko sinonimia iradoki zuten, antzeko ezaugarri morfologiko eta molekularrak zituztelako. Aurkikuntza hauen ondorioz, *S. inflatum* eta *L. prolificans* izenak bateratu ziren *Scedosporium prolificans* binomio berrian [10,12].

Azken hamarkadan, *Pseudallescheria* eta *Scedosporium* generoek osatutako taldeak nomenklatura aldaketa ugari jasan ditu taxonomiaren garapenaren eta filogenetika molekularren sarreraren ondorioz. 2011ko uztailera arte onddoen nomenklaturak onddo beraren etapa asexualak (anamorfoa) eta sexualak (teleomorfoa) deskribatzen zituzten hainbat izen erabiltzea baimentzen zuen. 2011n komunitate zientifikoak nomenklatura bikoitz hori pixkanaka ezabatzeko akordio orokor bat lortu zuen, "Amsterdameko onddoen nomenklaturaren deklarazioa" n ezartzen den bezala [13].

*One Fungus = One Name* mugimenduaren eta sekuentziazio ikerlanen ostean, *Pseudallescheria/Scedosporium* infekzioei buruzko ECMM/ISHAMeko lan taldeko kideek *Microascaceae* familiaren taxonomia berrantolatu zuten, eta, bereziki, *Pseudallescheria/Scedosporium* espezie konplexuarena. Autore hauek, onddo beraren bizi zikloaren etapa sexual eta asexualari erreferentzia egiteko izen desberdinen erabileran, *Pseudallescheria* (sexuala) eta *Scedosporium* (asexuala), eragozpenak aurkitu zituzten. Horregatik, generorako izen bakar gisa *Scedosporium* erabiltzea proposatu zuten, termino zaharrena baita [14]. Gaur egun, *Scedosporium* generoak 10 espezie ditu *S. aurantiacum*, *S. minutisporum*, *S. desertorum*, *S. cereisporum*, *S. dehoogii*, eta *S. apiospermum* konplexua, *S. angustum*, *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. ellipsoideum* eta *S. fusarium* espezieak barne hartzen dituen (1.1 irudia) [15]. *Scedosporium prolificans* espeziea *Lomentospora prolificans* bezala izendatua izan zen, espezie honentzako izenik zaharrena berreskuratuz eta espezie bakarreko genero bat eratuz [14].



**1.1 irudia.  $\beta$ -tubulina genearen sekuentzietan oinarritutako *Scedosporium/Lomentospora* espezieen zuhaitz filogenetikoa.** Ramirez-Garcia *et al.*-etik (2018) jasotako eta egokitutako irudia [15].

*L. prolificans* eta *Scedosporium* generoko espezieak ikuspegi ebolutibo batetik zein ikuspegi mediko batetik bereizten dira. Izan ere, *Scedosporium* generoko espezieak ez bezala, *L. prolificans* oso erresistentea da borikonazolarekiko, eta gaixotasun-espektrua ezberdina sortzen du. Zehazki, *L. prolificans*ek infekzio barreiatuak eragiten ditu batez ere immunoeskasia duten pertsonetan, eta *S. apiospermum* konplexuko espezieak, berriz, ia itotzearen sindromearekin erlazionatuta daude [16] eta eumizetomen eragile kausal gisa. Gainera, gainontzeko *Scedosporium* espezieekiko duen distantzia filogenetikoa, bere morfologia mikroskopikoan nabarmentzen da. Lehen aipatu den bezala, *L. prolificans*en zelula konidiogenoak puztuta daude, *Scedosporium*enak tubularrak diren bitartean. Aldi berean, koloniek ehundura eta kolorazio ezberdina daukate [14].

### 1.3. Epidemiologia

#### 1.3.1. Ingurumen-epidemiologia

Patogenoen habitat naturala aztertzea funtsezkoa da infektatzeko modua hobeto ulertzeko eta infekzio-fokuaren identifikazio potentzialerako. Hala ere, *Scedosporium/Lomentospora* espezieen ingurumen-banaketa ez da guztiz ezagutzen, orain arte egindako azterketa ekologikoen kopuru txikia dela eta. Espezie hauek eragin antropogenikoa duten habitat ugarran aurkitu dira, hala nola industria-eremuetan, haur-parkeetan, petrolioz blaitutako lurzoruetan, abereen simaurrean, nekazaritzako lurzoruetan eta hondakin-uretan [1,17,18]. Ikerketa horiek baieztatu dute *Scedosporium/Lomentospora* espezieen ugartasuna biziki

areagotzen dela gizakiak ingurumenean duen eraginaren ondorioz. Izan ere, giza inpaktu txikiagoa duten eremuetan prebalentzia txikiagoa edo espezie horien gabezia ere hauteman da [17,18]. Ingurumen-banaketa hori lotuta egon liteke *Scedosporiumek* oxigeno-presio oso baxuetan bizirauteko eta gatz-eduki handia (% 5) jasateko duen ahalmenarekin. Izan ere, ezaugarri horiek kutsatutako inguruetan bizirauteko aukera ematen die, non aireztapen gutxi eta presio osmotiko altuak dauden [10]. Gainera, espezie hauen ugaritasunak korrelazio positiboa du amonio-kontzentrazioaren handitzearekin eta pH-aren murriztearekin 6,1-7,5 tartearen barnean. Bestalde, espezie hauek gas naturala eta konposatu aromatikoak erabili dezakete karbono-iturri gisa [17].

*Scedosporium/Lomentospora* espezieen presentzia aldatu egiten da aztertutako eskualdearen arabera. Hain zuzen ere, Kaltsei *et al.*-ek (2009) Australian egindako ikerlanean *S. apiospermum* *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezie nagusia izan zen (isolamenduen % 58,7-77,7), hurrengoa *S. dehoogii* (% 13,8-28,8) eta prebalentzia baxuagoarekin *S. aurantiacum* (% 4,8-7,7), *S. minutisporum* (% 5,8) eta *S. boydii* (% 1,9-2,3) [17]. Bestalde, Frantzia *S. dehoogii* izan zen konplexuaren barruan gehien isolatutako espeziea (% 39,4), ondoren *S. aurantiacum* (% 21,6), *S. apiospermum* (% 18,9) eta *S. boydii* (% 19,7), eta azkenik, *L. prolificans* eta *S. minutisporum* presentzia minimoarekin [18]. Espezie hauek ingurumenean duten banaketa ez dator bat, neurri handi batean, ingurune klinikoetan duten banaketarekin, eta horrek iradokitzen du espezie hauek birulentzia-maila desberdinak dituztela. Zentzu honetan, nabarmentzekoa da *S. dehoogiik* ingurumenean duen prebalentzia handia. Izan ere, nahiz eta espezie honek birulentzia handia erakutsi zain barnetik infektatutako saguetan, gutxitan identifikatu da infekzioen eragile kausal gisa [17–19].

Europan egindako ingurumen-azterketak Harun *et al.*-ek (2010) Australian egindako azterketatik desberdintzen dira. Izan ere, azken honetan *S. aurantiacum* (% 54,6) eta *L. prolificans* (% 43) *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezie nagusiak izan ziren, eta aldiz, *S. boydii* (% 2,1) eta *S. dehoogiiren* (% 0,3) prebalentzia baxua detektatu zen [1]. Emaitza hauek bat datoz *S. aurantiacum* eta *L. prolificans* espezieek Australian duten prebalentzia kliniko handiagoarekin, beste eskualde batzuetan hautemandakoarekin alderatuta [20–22].

Azkenik, espezie bakoitzerako lehen tasun ekologikoak detektatu dira. Zehazki, *S. dehoogiiren* ugaritasuna handiagoa da giza jardueraren indize handiak dituzten eremuetan, hala nola industria-eremuetan [17,18]. Bestalde, *S. aurantiacum* Frantzia mendebaldeko nekazaritza eremuekin erlazionatua izan da [18].

### 1.3.2. Epidemiologia klinikoa

Onddoen infekzioen datu epidemiologikoak oso eskasak dira, infekzioen diagnostiko okerrarengatik eta behaketa-sistema eraginkorrik ez dagoelako. Hala eta guztiz ere, uste da pertsona gehienek gainazaleko infekzio fungikoak pairatuko dituztela beren bizitzan zehar, oro har sendatzeko errazak direnak, eta mundu osoan milioika pertsonak hilgarriak izan daitezkeen infekzio inbaditzaileak pairatuko dituztela, diagnostikatzeko eta tratatzeko askoz ere zailagoak direnak. Infekzio inbaditzaile horiek hilkortasun-tasa onartezinak dauzkate, sarritan % 50etik gorakoak, eta urtero milioi eta erdi heriotza eragiten dituzte mundu mailan. Infekzio horien egungo intzidentzia, neurri handi batean, infekzio immunogutxitzzaileek (GIB/HIESa, esaterako) azken hamarkadetan izan duten gorakada nabarmenaren emaitza da, baita esku-hartze mediko immunogutxitzzaile eta inbaditzaile berrien gorakadaren ondorioa ere [23].

Onddoek eragindako heriotza guztien % 90 baino gehiago lau genero hauetako espezieek eragindakoak dira *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* eta *Pneumocystis* [23]. Hala ere, azken hamarkadetan areagotu egin da onddo espezie arraroen, kriptikoen eta azaleratzen ari diren espezieen prebalentzia klinikoa, zeinetan antifungikoekiko erresistentzia ohikoagoa da [24].

Ildo honetan, *Scedosporium/Lomentospora* patogenoak azaleratzen ari diren patogenotzat hartu dira, azken hamarkadetan detektatutako kasu klinikoen gorakada dela eta. Hala ere, prebalentzia txikia dute, urtean soilik batz bestea 16 kasu aitortzen baitira [8]. Zoritxarrez, *Scedosporium/Lomentosporak* eragindako infekzioen intzidentziari buruzko datuak urriak dira, eta baliteke infekzio horien benetako epidemiologia ez islatzea. Eskualdeko desberdintasunak daude, infekzio horien intzidentzia altuagoa izanik Australian, besteak beste. Eskualde horietako intzidentzia altuago honek zerikusia izan dezake onddo horien hazkundera errazten duten klima- eta ingurumen-baldintzekin. Zehazki, Australian eta Espainian *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezieak ez-*Aspergillus* onddo haritsuak eragindako infekzioen bigarren kausa dira [24,25].

Bestalde, *Scedosporium/Lomentospora* konplexuaren barruan, kasu klinikoen banaketa geografikoa aldatu egiten da espeziearen arabera. *S. apiospermumek* eta *S. boydii* sortutako infekzioak mundu osoan banatuta dauden bitartean, *S. aurantiacum* eta *L. prolificansek* sortutakoak geografikoki mugatuago daude. Zehazki, Australian eta Espainian *L. prolificansek* sortutako infekzioen prebalentzia handiagoa hauteman da (1.2 irudia) [20–22,26,27]. Australian egindako ikerketa batean, Heath *et al.*-ek (2009) *L. prolificansen* isolamendu kliniko gehiago

detektatu zituzten (% 40,8), *S. apiospermum* (% 35) eta *S. aurantiacumenak* (% 24,2) baino [21]. Era berean, Espainiako iparraldeko ospitale batean, *L. prolificans* izan zen 90eko hamarkadan hemokultiboetatik gehien isolatutako ondo haritsua [22]. Gainera, duela gutxi, *L. prolificansen* kasu klinikoak detektatu dira beste herrialde batzuetan, hala nola Europako AEBetan, Korean, Japonian, Indian eta Brasilen [4–9].



**1.2 irudia.** 2000. eta 2017. urteen artean diagnostikatutako *Lomentospora prolificans* espezieek eragindako infekzioen banaketa geografikoa, milioi biztanleko kasu kopuru gisa adierazita. Seidel *et al.*-etik (2009) jasotakoa [8].

## 1.4. Arriskuko biztanleria

### 1.4.1. Immunogutxituak

*L. prolificansen* batez ere paziente immunogutxituetan sortzen ditu infekzioak, bereziki neutropenia luzea jasaten dutenetan, eta horregatik espezie hau patógeno oportunistatzat hartzen da. Paziente hauek pronostiko okerrago batekin lotutako infekzio inbaditzaileak garatzeko arrisku handiagoa dute. Zehazki, *L. prolificansen* gehienbat neoplasia gaiztoa eta organo solidoaren transplantea duten pazienteetan sortzen ditu infekzioak, ondo honekin infektatutako pazienteen % 45,7 eta % 8,6a direlarik, hurrenez hurren (1.1 taula) [3]. Neoplasia gaiztoen artean hematologikoak nabarmentzen dira, batez ere leuzemia eta linfoma, eta transplanteen artean, biriketakoa [8]. Era berean, beste immunoeskasia batzuk dituzten pertsonen, hala nola hartutako immunoeskasiaren sindromea dutenek, *L. prolificansen* infekzioak pairatzeko arriskua dute [3].

**1.1. taula. *Lomentospora prolificans*ek infektatutako edo kolonizatutako 162 pazienteren ezaugarri klinikoak.** Rodriguez-Tudela et al.-etik (2009) jasotakoa [3]

Ezaugarriak	Paziente kopurua (%)	Hildako paziente kopurua (%)
<i>Infekzioaren unean azpiko afekziorik ez, infekzioaren kausa</i>		
Trauma	18 (11,1)	0 (0)
Kirurgia	5 (3,1)	0 (0)
Bat ere ez	11 (6,8)	0 (0)
<i>Infekzioaren uneko azpiko egoera</i>		
Minbizia	74 (45,7)	63 (85,1)
Fibrosi kistikoa	19 (11,7)	0 (0)
Organo solidoen transplantea	14 (8,6)	7 (50)
HIESa	8 (4,9%)	3 (37,5)
Bestelakoak*	13 (8)	3 (23,1)

\* Hauek barne hartzen ditu arazo immunologikoak (4); biriketako gaixotasun buxatzaile kronikoa (BGBK) (2); droga injektagarrien erabilera (2); bronkiektasia (1); biriketako fibrosia (1); diabetesa (1); goiztiar izatea (1); eta miokardio-infartua (1).

#### 1.4.2. Immunokonpetenteak

Paziente immunokonpetenteak ere *Scedosporium/Lomentospora*ekin infektatu daitezke prozedura kirurgiko bat edo trauma fisiko bat izan ondoren. Kasu hauetan, gaixotasunaren sintomak eta progresioa ez dira hain larriak azpiko edozein immunoeskasia duten pazienteekin alderatuta (1.1 taula) [3,8].

Bestalde, fibrosi kistikoa (FK) *L. prolificans*en infekzio bat garatzeko arrisku-faktore garrantzitsu gisa deskribatu da. FK gaixotasun hereditario hilgarri ohikoena da kaukasoarretan, prebalentzia Europan eta Estatu Batuetan 20 eta 50 kasukoa 100.000 biztanleko izanik, hurrenez hurren [28,29]. Gaixotasuna FKaren transmitezko konduktantziaren proteina erregulatzailean (CFTR) daukaten akats batek eragiten du. Proteina honen funtzioa giza guruin exokrinoetan kloruro ioiak jariatzea da, eta akatsak eragindako kloruro ioien faltaren ondorioz, guruinen jariatzeak biskositate areagotua dute. Guzti honek gaixotasun multiorganikoa sortzen du, biriketako afekzioa morbi-mortalitatearen kausa nagusia delarik. Mukosaren loditzeak eta arnasbideetako mukosaren suntsipenaren areagotzeak garbiketa mukoziliarraren galera, eta bakterio eta onddoek eragindako gune endobronkialaren kolonizazio kronikoa eragiten dute [30]. Bakterioen kolonizazioa sakonki aztertu da eta biriken funtzioaren murrizketa azkarrago batekin erlazionatu da [31]. FK duten pazienteen karkaxa-laginetan *Candida* spp., *Aspergillus* spp. eta *Scedosporium/Lomentospora* bezalako espezie fungikoen presentzia handia detektatu den arren, FK duten pazienteengan onddo hauen patogenizitatea aldatuta da eta ez da erabat ulertzen [32,33]. Zehazki,

*Lomentospora/Scedosporium* espezieek paziente horien arnasbideak kolonizatzen dituzte maiz, % 0-21eko tartean. Taldeko espezieen prebalentziari dagokionez, eskualdearen arabera aldatzen da. Hala, Frantzia eta Alemanian *S. boydii* eta *S. apiospermum* espezieak izan ziren konplexuko espezie isolatuenak [34,35], eta Espainian, berriz, *L. prolificans* izan zen nagusi isolatua [36]. Aldiz,, Australian egindako ikerketa batean *S. aurantiacum* gehien isolatu zen espeziea izan zen, jarraian *L. prolificans* eta *S. apiospermum* zeudelarik [37].

## 1.5. Manifestazio klinikoak

*Scedosporium/Lomentospora* espezieek infekzio-bideari eta pazientearen egoera immunitarioari lotutako manifestazio kliniko ugari eragiten dituzte. Manifestazio hauek arnasbideen kolonizaziotik eta azaleko infekzioetatik, mikosi inbaditzaile larri lokalizatu edo barreiatuetaraino doaz [15].

### 1.5.1. Kolonizazioa

Lehen esan bezala, *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezieak FK duten gaixoen arnasbideak gehien kolonizatzen dituzten onddoen artean daude [32,38]. Paziente horien kolonizazioa iraunkorra izan daiteke, urteetan zehar andui nagusi bera detektatuz [36,39]. Kolonizazioak, oro har, sintomarik gabekoak diren arren, patologiak sor ditzakete. Zehazki, bronkioetako kolonizazioak hantura kronikoa eragin dezake, eta immunoeskasia larria pairatzen duten pazienteetan, birika-transplantea jasan dutenetan bezala, hilgarria izan daiteken infekzio inbaditzaile bat garatu daiteke [38,40–43]. Hori dela eta, *Scedosporium/Lomentosporaren* kolonizazioa biriken transplante-programa batzuetan kontraindikaturatuta dago [44].

### 1.5.2. Infekzio lokalizatua

Infekzio lokalizatuetan onddoak argiki ostalariaren ehuna kaltetzen du. Hauen artean nabarmentzekoak dira biriketako, larruzaleko eta ehun biguneko, giltzaduretako eta hezurretako, eta begietako infekzioak. Horietatik guztietatik, biriketako infekzioa da manifestazio klinikorik ohikoena, infekzio barreiatuaren ondoren *L. prolificans* eragindako infekzio mota prebalenteena delarik (1.2 taula) [3]. Onddoaren sarrera-bide ohikoenari jarraituz (arnas traktua), eta erantzun immune gutxitu baten aurrean, onddoaren konidioak arnas traktuan erne daitezke eta organo hau inbaditu dezakete. Infekzio hauek % 21,3ko hilkortasun-tasa dute eta % 63,6koa azpiko gaixotasun gisa neoplasia gaiztoak pairatzen duten pazienteetan [3,10]. Nabarmendu behar da sarritan biriketako infekzioa diagnostikatzeko unean pazienteek infekzio barreiatuaren zeinuak izaten



dituztela, hala nola larruazalekoak, biriketatik gertatutako onddoaren barreiadura hematogeno azkarraren ondorioz [10].

**1.2 taula. *Lomentospora prolificans* bidezko infekzioa pairatutako 162 pazienteen infekzio-patroia.** Rodriguez-Tudela *et al.*-etik (2009) jasotakoa [3].

<b>Infekzio mota, kokapenaren arabera</b>	<b>Paziente kopurua (%)</b>	<b>Hildako paziente kopurua (%)</b>
Barreiatutako infekzioa	72 (44,4)	63 (87,5)
Biriketakoa	47 (29,0)	10 (21,3)
Osteomielitisa eta artritis	17 (10,4)	0 (0)
Larruazalekoa	7 (4,3)	0 (0)
Begietakoa	7 (4,3)	0 (0)
Otitisa	6 (3,7)	0 (0)
Garunekoa	2 (1,2)	2 (100)
Sinusitisa	2 (1,2)	0 (0)
Peritonitisa	1 (0,6)	1 (100)
Onikomikosis	1 (0,6)	0 (0)
Guztiak	162 (100)	76 (46,9)

Birikaz kanpoko infekzioei dagokienez, trauma edo kirurgia baten ondorengo infekzioaren hasierako aurkezpena izan daitezke, edo infekzioa barreiatzearen ondorioz sortu daitezke immunoeskasia duten pazienteetan [15]. Birikaz kanpoko infekzioek pronostiko hobea dute (1.2 taula), eta, oro har, tratamendu antifungikoak eta kirurgia behar dituzte sendatzeko. Kasu batzuetan, beharrezkoa da infektatutako zona anputatzea, eta begietako infekzioen kasuan begi-enukleazioa [3].

### 1.5.3. Infekzio barreiatua

Ondoa odolaren bidez barreiatzen da biriketatik, azaletik edo lokalizatutako beste edozein infekzio-tokitik. Infekzio barreiatua diagnostikatzen da hemokultibo positibo bat edo elkarren ondoan ez dauden bi gorputz-tokien infekzioak detektatzen direnean. Manifestazio kliniko hau azpiko gaixotasunak dituzten pazienteei eragiten die, batez ere neoplasia hematologikoak dituztenei. *L. prolificans* manifestaziorik bereizgarriena da, onddo honek sortutako infekzioen % 44,4 barreiatuak baitira, eta pronostiko okerrera duena, % 87,5eko heriotza-tasarekin [3]. *L. prolificans*ek Infekzio barreiatuak sortzeko joera handiagoa dauka *Scedosporium* spp espezieen aldean. Hau gorputzeko fluidoetan eta ehunetan konidioak sortzeko duen gaitasunarekin lotuta dago, odolaren bidezko barreiatzea erraztuz [8]. Infekzio barreiatuaren garapenarekin lotutako arrisku-faktoreen artean neutropenia nabarmentzen da, eta, aldiz, aplasiaren suspertzea arriskuaren murrizketarekin erlazionatu da [3].

Onddoa barreiatu ondoren, endokarditis eta aneurisma mikotiko larriak eragin ditzake, baita nerbio-sistema zentralaren (NSZ) infekzio larriak ere. Literaturan zabalki deskribatuta dago *Scedosporium/Lomentosporaren* neurotropismoa, eta deskribatutako manifestazio klinikoek garuneko abzesu bakar edo anitzak, meningitisa eta bentrikulitisa barne hartzen dituzte [15,45].

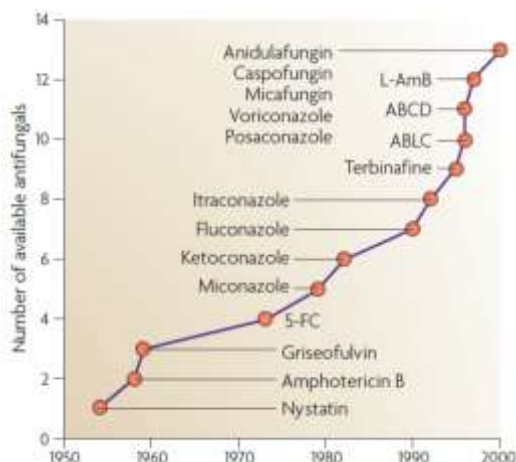
### **1.6. *L. prolificansen* tratamendua eta erresistentzia-mekanismoak**

Antifungikoen garapenean arazo nagusietako bat onddoen biologia bera izan da, prozesu metaboliko eta egitura zelular asko ugaztunekin partekatzen dituzten mikroorganismo eukariotoak baitira, diana espezifiko gutxi eskainiz. Hori dela eta, farmako antifungiko askok modu gurutzatuan erreakziona dezakete zelula ostalariekin, toxikotasuna eraginez [46]. Gaur egungo antifungikoen diana terapeutikoak, zuzenean edo zeharka, zelula-bilkinean kontzentratuta daude, bai zelula-paretan, bai mintz plasmaticoan. Zehazki, zelula-pareta etorkizun handieneko organuletako bat da, eskuragarri baitago agente terapeutikoentzat, eta ugaztunetan ez dagoen egitura bat baita [47].

50eko hamarkadan, lehen antifungiko sistemikoak merkaturatu ziren (1.3 irudia), eta horien artean, polienoen taldeko B anfoterizina bihurtu zen infekzio fungiko inbaditzaile askoren tratamendurako antifungiko nagusia. Farmako hau ergosterolarekin elkartzen da, mintzean poroak eratuz, horien bidez zelula barneko osagaiak askatzen direlarik. Farmako honek ergosterolarekin kolesterolarekin baino afinitate handiagoa izan arren, ugaztunen zelulei eragin diezaieke eta, ondorioz, toxikotasuna sor dezake. Hala ere, konposatu lipidikoekin egindako farmakoaren formulazioak nabarmen murriztu zuen haren toxikotasuna [48].

Antifungikoen funtsezko garapenik gabeko hamarkaden ondoren, 80ko hamarkadan triazolak garatu ziren, ahotik eta zain barnetik eman zitezkeenak, eta eraginkortasuna zuten polienoekiko erresistenteak ziren onddo-patogenoen aurrean [48]. Bere ekintza mekanismoa onddoen lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa entzimaren inhibizioan oinarritzen da, ergosterolaren biosintesian parte hartzen duena [46].

Ondoren, ekinokandinak garatu ziren, merkaturatutako antifungikoen talderik berriena. Lipopeptidoak dira, eta (1,3)- $\beta$ -D-glukanoaren sintesian parte hartzen duten proteinak inhibitzen dituzte. Konposatu hauen aurrean zelula-paretaren eraketa inhibitzen da eta onddoen zelulak shock osmotikoarekiko sentikor bihurtzen dira. Talde honetako farmako antifungikoen diana ugaztunen zeluletan ez dagoenez, bere toxikotasun maila oso baxua da [48].



**1.3 irudia. Farmako antifungiko sistemikoen garapenaren kronologia.** Grafikoak antifungiko sistemiko bakoitzaren lehen erabileraren urtea eta ulean-ulean erabilgarri zeuden konposatuen kopurua erakusten ditu. 5-FC, fluzitosina; ABCD, B anfoterizina dispersio koloidalean; ABLC, B anfoterizinen konplexu lipidikoa; L-Amb, B anfoterizina liposomala. Ostrosky-Zeichner *et al.*-etik (2010) jasotakoa [48].

Horrekin guztiarekin, gaur egun farmako antifungiko sistemikoen hiru talde nagusi bakarrik daude eskuragarri erabilera terapeutikorako lizentziarekin polienoak, azolak eta ekinokandinak. Beste farmako batzuk garatu dira, hala nola sordarinak, edo kitina sintasaren inhibitzailea den nikomizina Z. Hala ere, farmako hauekin oraindik ez da saiakuntza kliniko aurreraturik egin, onddoen aurkako etorkizun handiko aktibitatea eduki arren eta bigarren mailako ondorio nabarien txostenik ez eduki arren [48].

#### 1.6.1. *L. prolificans* eragindako infekzioen tratamendua

*Scedopodium* spp. generoko espezieek eta, bereziki, *L. prolificans* espezieek eragindako infekzioen tratamendua zailtasun handiak ditu, onddo horiek antifungikoekiko dauzkaten erresistentzien ondorioz. *Scedopodium* spp. generoko espezieak erresistenteak dira B anfoterizinarekiko, 5-fluzitosinarekiko, eta lehen belaunaldiko triazolekiko, itrakonazolekiko eta flukonazolekiko, eta isabukonazolekiko, eta, gainera, sentikortasun txikia dute ekinokondinekiko [15].

Ildo honetan, *L. prolificans* bereziki erresistentea da gaur egun eskuragarri dauden ia antimikotiko guztiekiko, farmako gehienentzat 8 µg/ml-tik gorako gutxieneko kontzentrazio Inhibitorioaren (GKI) balioak lortzen direlarik *in vitro* [8,10]. Gaur egun eskuragarri dauden

antifungikoetatik, borikonazola da *in vitro* aktibitate antifungiko handiena erakutsi duena. Hala ere, isolamenduen % 50a inhibitzeko beharrezkoa den farmako horren batez besteko gutxieneko kontzentrazio inhibitorioa ( $GKI_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$ ) oso gutxitan lortzen da era askean pazienteetan [10]. Azkeneko hau *L. prolificans*ekin infektatutako pazienteek *S. apiospermum*ekin infektatutakoekin alderatuta borikonazolaren aurrean daukaten erantzun eskasaren azalpena izan daiteke [49].

*L. prolificans* *In vitro* B anfoterizina formulazio liposomala eta kaspofunginaren aurrean erresistentea izan arren, eredu esperimental murinoetan farmako hauek aktibitate antifungikoa erakutsi dute [50,51]. Ikerketa horietan lortutako emaitzak berresten dituzten ikerketa gehiago behar dira, ordea. Era berean, aktibitate antifungikoa detektatu da *in vivo* albakonazolarentzat. Zoritxarrez, erabilitako dosiak beste onddo batzuen aurka erabilitakoak baino altuagoak izan ziren, eta horrek toxikotasun edo bigarren mailako ondorioak gehiago eragin litzake [52].

Gaur egun, Europako gidek borikonazola *Scedosporium/Lomentosporak* eragindako infekzioak tratatzeko lehen aukerako tratamendu gisa gomendatzen dute [53]. Hala ere, *L. prolificans*en multiresistentzia dela eta, onddo honek sortutako infekzioen pronostikoa oso negatiboa da; hilkortasun orokorra % 46,9koa izanik eta % 87,5koa infekzio barreiatua duten pazienteetan. Infekzio barreiatu hauen tratamendua etsigarria da, izan ere, kimioterapia antimikotikoa jasotzen duten pazienteengan hilkortasun-arriskua murrizten ez dela detektatu da [3]. Orain arte, badirudi infektatutako ehunaren desbridatze kirurgikoa eta immunoeskasiaren berreskuratzea direla mikosi honen progresioa geldiarazteko bide nagusiak [53]. Hala ere, ebakuntza kirurgikoa gutxitan izaten da aukera bat pazienteen egoera orokor txarragatik eta kasu gehienetan garatzen diren infekzio barreiatu konplexuengatik [8]. Horregatik, behar-beharrezkoa da mikosi horiek tratatzeko alternatiba terapeutikoak bilatzea.

Orain arte aztertu den estrategia terapeutiko nagusienetako bat antifungikoen konbinazioa da. Izan ere, antifungikoen konbinazioarekin eraginkortasun terapeutikoa lortzen da kontzentrazio baxuagoetan, kontrako efektuak murrizten dira, segurtasuna eta toleragarritasuna areagotzen da, eta,aldi berean, porrot terapeutikoa saihesten da antimikrobianoekiko erresistentzia susmoaren aurrean. Hala ere, orain arte, *L. prolificans*en aurkako terapia konbinatuen eraginkortasunari buruzko ikerketa gutxi daude [15]. Terbinafina eta triazolen (itronazola, mikonazola edo borikonazola) konbinazioa etorkizun handieneko konbinazioetako bat da. Konbinazio hori *in vitro* aztertutako isolamenduen % 85 baino gehiagorentzat sinergikoa izan zen, eta GKIak klinikan lortu daitezkeen kontzentrazioetaraino murriztu ziren.

Bi farmako horien elkarrekintza sinergikoa ergosterolaren biosintesi-bide berdinen hainbat urratsen blokeoan oinarritzen da [10,54]. Hala ere, konbinazio hau klinikan erabiltzerakoan emaitza aldakorak lortu dira [55–60]. Bestalde, efektu sinergikoa detektatu da *in vitro* mikafungina eta borikonazola [61] edo B anfoterizina [62], eta kaspofungina eta rabuconazola [63] konbinatu ondoren. Bestalde, mitelfosina medikamentu antiprotozoarioaren eta antifungikoen konbinazioari buruz orain arte lortutako emaitza urriak etorkizun handikoak izan dira, bai *in vitro* [64] bai klinikan [65–67].

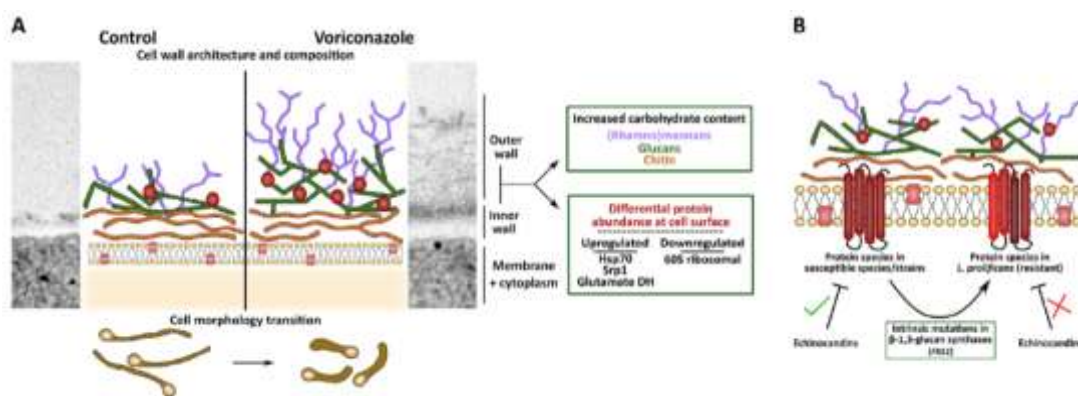
Orain arte bi azterlan baino ez dira egin *L. prolificans*en aurkako bi antifungiko baino gehiagoren konbinazioari buruz. Rodriguez *et al.*-ek (2009) mikafungina, B anfoterizina eta boriconazolaren eraginkortasuna ebaluatu zuten, bakarka eta konbinazio bikoitz eta hirukoitzetan, *L. prolificans*en infekzio barreatuaren sagu-eredu batean. Mikafunginaren konbinazioa borikonazolekin edo B anfoterizinarekin izan zen tratamendu eraginkorrena. Izan ere, konbinazio horiek izan ziren biziraupena luzatzeko eta giltzurrunetako eta garuneko onddo-karga murrizteko gai ziren tratamendu bakarrak. Farmako hauen konbinazio hirukoitzekin ez ziren konbinazio bikoitzekin lortutako emaitzak hobetu [68]. Ondoren, Martin-Vicente *et al.*-ek (2017) B anfoterizinarekin, borikonazolaren eta anidulafunginaren konbinazio bikoitzak eta hirukoitzak aztertu zituzten *in vitro*. Sinergia ehuneko handiena B anfoterizina eta anidulafunginaren konbinazioarekin behatu zen (% 72,7) hiru antifungikoen konbinazioarekin baino (% 63,6) [69].

Orain arte egindako ikerlanen arabera, bi antifungikoen konbinazioa monoterapia baino eraginkorragoa dela ondoriozta daiteke. Gainera, farmako antifungikoen artean, borikonazola lehen lerroko farmako gisa erabiltzea eta terbinafinarekin batera eman ahal izatea gomendatzen da [15].

#### 1.6.2. *L. prolificans*en erresistentzia-mekanismoak

Orain arte, *L. prolificans*en antifungikoen erresistentziari lotutako bi mekanismo molekular deskribatu dira (1.4 irudia). Zehazki, *L. prolificans* eta *S. apiospermum*en  $\beta$ -1,3-glukano sintasaren azpiunitate katalitikoak kodifikatzen duen Fks1 genean mutazioak deskribatu dira. Ekinoandinen ekintza mekanismoa entzima honen inhibizioan oinarritzen da, eta, horregatik, mutazio hauek, onddo hauek, ekinokandinen aurrean duten sentikortasuna murriztu azal lezakete [70].

Bestalde, gure ikerketa taldeak egindako ikerlan batean aldaketa molekularrak eta zelularrak antzeman ziren *L. prolificans*, ondooa borikonazolaren eraginpean egon ondoren. Zehazki, aldaketa drastikoak detektatu ziren zelulen morfologian, *L. prolificans* hifa laburragoak eta zabalagoak behatuz. Era berean, zelula-paretaren arkitekturan eta karbohidratoen konposizioan aldaketak deskribatu ziren, glukanoen eta mananoen presentzia handiagoa detektatuz. Gainera, Srp1 eta shock termikoaren proteina 70 kDa (Hsp70) proteinak borikonazolaren aurreko esposizioak eragindako estres-baldintzetan gehien gainadierazten diren proteina gisa identifikatu ziren. Aldaketa hauek guztiak ondoak antifungikoarekiko daukan erresistentziarekin erlazionatuta egon litezke [71].



**1.4 irudia.** Farmako antifungikoekiko erresistentziarekin erlazionatutako *Lomentospora prolificans* mekanismo molekularren irudikapen eskematikoa. Borikonazolarekiko esposizioaren ondoren *L. prolificans*ek garatutako aldaketa zelularrak eta molekularrak (A), eta ekinokandinekiko erresistentziarekin lotutako ondoaren mutazio intrintsekoak (B). Pellon *et al.*-etik (2018) jasotakoa [72].

### 1.6.3. *L. prolificans* aurkako tratamendu alternatiboak

Azken urteotan *Scedosporium/Lomentospora*ren aurrean eraginkortasuna erakutsi duten farmakoak garatu dira. Zehazki, kaltzineurina-Hsp90 ardatzaren konposatu inhibitzaileek hainbat patogenoren aurrean etorkizun handiko emaitzak erakutsi dituzte. Horien artean, Trikostatina A lisina desazetilasen inhibitzaile aktibitate antifungiko ona erakutsi du *in vitro* *L. prolificans* aurrean. Konposatu honek Hsp90aren funtzioa blokeatzen du chaperona honen azetilazioa eraginez [73]. Era berean, F901318 konposatuak (olorofim) antifungikoen familia berri bat irudikatzen du, eta pirimidinaren biosintesian parte hartzen duen ondoen dihidroorotato dehidrogenasa entzima inhibitzen du. Konposatu hau, gaur egun, garapen klinikoan dago, eta

akibitate antifungiko bikaina erakutsi du onddo ugariaren aurrean [74], horien artean *Scedosporium/Lomenospora* espezieen aurrean [8,75,76]. Wiederhold *et al.*-ek (2017) egindako ikerketan *Scedosporium* spp. eta *L. prolificans* espezieen 66 isolamendu erabili zituzten, eta 0,079-0,5 mg/l arteko GKI balioak lortu zituzten [76]. Ildo beretik, Biswas *et al.*-ek (2018) F901318ren jarduera antifungikoa frogatu zuten, *L. prolificans*en 30 isolamenduren eta *Scedosporium* spp.-en 20 isolamenduren aurrean. Konposatuak jarduera antifungikoa erakutsi zuen *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum*en isolamendu guztien aurrean, 0,125-0,5 mg/l arteko GKI balioekin [75]. Oraintsuago, Seidel *et al.*-ek (2019) 0,0039 mg/l-ko GKI balioak lortu zituzten *Scedosporium* spp. eta *L. prolificans*en 8 eta 7 isolamendutarako, hurrenez hurren [8].

Bestalde, E1210 (APX001) espektro zabaleko farmako berria 2016ko ekainean onartu zuen FDAk, kandidiasia, aspergilosi inbaditzaileak eta kokzidioidomikosia tratatzeko [15]. Konposatu honek inositolaren azilazioa blokeatzen du glikosilfosfatidilinositolaren (GPI) biosintesian, eta horrek akatsak sortzen ditu onddoaren zelula-paretaren biosintesian [77]. *L. prolificans*en aurrean E1210 konposatuarekin *in vitro* sentikortasun-probetan lortutako GKI balioak, gaur egun erabiltzen diren antifungikoekin lortutakoak baino gutxienez 10 aldiz baxuagoak izan ziren, borikonazola barne [15,77].

*L. prolificans*en aurrean duen eraginkortasunagatik eta toleragarritasun onagatik etorkizun handieneko farmakoetako bat taurina aminoazidotik eratorritako N-klorotaurina (NCT) da. Giza leukozitoek sortutako bizitza luzeko antioxidatzailea da [78], espektro zabaleko mikrobiozida gisa jarduten duena. Saiakuntza klinikoetan konposatu honek oso toleragarritasun ona erakutsi du % 1ean inhalatu era topikoki administratu ostean [79,80]. Gainera, kontzentrazio honetan NCTk aktibitate fungizida du *L. prolificans*, *S. apiospermum* eta *S. boydii*ren aurrean. NCTaren bidezko mikroorganismo hauen suntsipena zelula-hormaren eta mintzaren iragazkortasunaren handipenarekin erlazionatu da [81].

NCTak beste antiseptiko batzuekin alderatuta duen toleragarritasun bikainaren ondorioz, farmako honen inhalazioa beheko arnasbideen tratamendurako erabil daiteke [82]. Aplikazio hau bereziki interesgarria izan daiteke FKa duten pazienteen arnasbideetako patogenoak errotik kentzeko. Aipatzekoa da duela gutxi onddoen eragina paziente hauen biriken funtzioaren murrizketan azpimarratu dela, baita arnasketa-traktuko agente alergiko gisa duten eginkizuna ere [83,84]. Gainera, FKaren mukiaren konposizioa simulatzen duen karkaxa artifizialaren kultibo-ingurunean NCTaren *in vitro* aktibitate mikrobiozida areagotzen da. Gertaera hau onddoekin

bereziki nabarmena da, eta transhalogenazio bidezko monokloraminaren eraketaren ondorio izan daiteke. Izan ere, monokloraminak lipofilitate handiagoa duenez patogenoetan azkarrago barneratzen da [85].

#### 1.6.4. Txertoen eta antigorputz monoklonalen garapena

*L. proliferans*ek eragindako infekzioen garapenean immunitate-sistemaren egoera erabakigarria da. Horregatik, ikerketa ugariaren helburua erantzun immunea hobetzen duten eta mikosi horien aurrean baliagarriak diren molekulen bilaketa izan da. Ildo honetan, 1996an jada paziente neutropeniko batean *L. proliferans*ek eragindako fungemiaren sendatzea argitaratu zen, B anfoterizinarekin batera granulozitoen kolonien faktore estimulatzailea administratu ondoren [86]. Geroago, granulozito-makrofagoen kolonien faktore estimulatzaileak (GM-CSF) eta interferoi- $\gamma$ -k (IFN- $\gamma$ ) gizakien leukozito polimorfonuklearrek (PMNak) eragindako hifa-kaltea areagotzen dutela frogatu zen. Gainera, bi konposatuak batera erabiltzen direnean efektu hau indartzen dela detektatu zen [87]. Era berean, interleuzina-15ak (IL-15) hifei eragindako kaltea areagotzen du eta *L. proliferans*en presentzian leukozito PMNen zitokinen askatzea sustatzen du [88]. Bestalde, leukozito PMNen eta antifungikoen (boriconazola, posakonazola, itrakonazola edo B anfoterizina) konbinazioek *L. proliferans*eri eragindako kalte zelularrean eragin gehigarriak edo sinergikoak dituztela detektatu da [89,90].

Hala ere, etorkizun handieneko alorretako bat, zeinetan azken hamarkadetan ahalegin handiak egin diren, txertoen eta antigorputz monoklonalen (mAb) bidezko tratamendu alternatiboen bilaketan datza. Ikerketa horiek orain arte *L. proliferans*en oinarritu ez badira ere, beste onddo patogeno batzuekin lortutako emaitzak oso itxaropentsuak izan dira [91–94]. Horien artean, nabarmentzekoa da *Coccidioides*en antigeno espezifikoarekin (CSA), *Coccidioides*en prolinan aberatsa den zelula-paretako proteinarekin (Ag2/pRA<sub>1-106</sub>) [95–98], eta *Candida*ren atxikidura-proteinekin (Als1 eta Als3) [99–103] saguak txertatu ondoren lortutako babesaren onddo hauek eragindako infekzio hilgarriaren aurrean.

Era berean, *Cryptococcus neoformans*en kapsulako polisakaridoen [104–106], zelula-hormako lipidoen [107] eta melaninaren [108] aurkako, eta *Candida albicans*en zelula-paretako polisakaridoen [109] eta zelula-paretako proteinen [110] aurkako mAb babesleak identifikatu dira. Horietatik bi mAb gizakietan frogatuak izatera iritsi ziren, *C. neoformans*en glukuronoxilomanano kapsularraren aurka garatutakoa [93] eta *C. albicans*en Hsp90ren [111] aurka zuzendua. Bigarren mAb hori, Mycograb, Novartisek merkaturatu zuen 2006ra arte. Urte horretan, Giza Erabilerarako



Sendagaien Batzordeak farmakoaren segurtasun eta kalitatearen inguruko kezka zirela eta, iritzi negatibo eman zuen, eta ondorioz, Europar farmakoa ez erabiltzea aholkatu zen [112].

Bestalde, ikerketa ugari hainbat onddo patogenoren infekzioak prebenitzeko txerto eta mAbs panfungikoen garapena izan dute helburutzat. Zehazki, Torosantucci *et al.*-ek (2005) *Laminaria digitala* algatik eratorritako  $\beta$ -glukanoekin eta toxina difterikoarekin osatutako txerto konjugatuak onddo patogeno garrantzitsuenen aurrean, *C. albicans* eta *Aspergillus fumigatus*, babes eraginkorra eragiten duela behatu zuten [113]. Era berean, deskribatu da beroarekin hildako *S. cerevisiae* legamiarekin (HKY) saguen larruazalpeko txertaketak babes eskaintzen duela aspergilosien [114], kokzidioidomikosiaren [115], mukormikosiaren [116], kandidiasiarekin [117] eta kriptokokosiaren [118] aurrean.

Orain arte detektatu diren antigorputz babesle gehienak patogeno-espezifikokoak badira ere, hainbat mikosiaren aurrean babesleak diren mAb-en adibide batzuk daude [48]. Zehazki, shock termikoaren proteinaren aurka garatutako antigorputzak, Mycograbek, zenbait *Candida* spp. [119] eta *C. neoformans* [120] aurkako aktibitatea erakutsi du. Datu hauek guztiek onddo-gaixotasunen aurkako espektrora zabaleko terapia bat garatzea posiblea dela iradokitzen dute.

## 1.7. Diagnostikoa eta identifikazioa

### 1.7.1. *Scedosporium/Lomentosporak* eragindako gaixotasunen diagnostikoa

*Scedosporium/Lomentosporak* sortutako infekzioen diagnostikoak zailtasun handiak ditu manifestazio klinikoaren eta zeinuen espezifikotasun falta dela eta [3]. Gaur egun erabiltzen diren diagnostiko-metodo konbentzionalek sentsibilitate eta espezifikotasun baxua dute, eta trebatutako adituak eta denbora asko behar dituzte. Gainera, askotan ez dute ahalbidetzen kolonizazio-prozesuak infekziotik bereiztea. Testuinguru horretan, diagnostiko ziurraren atzeratzeak tratamendu egokiaren ezarpena atzeratu dezake, ondorio hilgarriekin, batez ere immunoeskasia duten pazienteetan edo infekzio barreiatuak dituztenetan [10].

Azpimarratzekoa da *Scedosporium/Lomentospora* konplexua espezie-mailan identifikatzeak izan lezakeen garrantzia, espezieen arteko heterogeneotasun intrintsekoa dela-eta, birulentziari dagokionez [19,121–123], edo antifungikoekiko sentikortasunari dagokionez [124]. Hau dela eta, ikertzaileak eta klinikariak gaixotasuna eragin duen agente etiologikoa identifikatzeko hainbat metodologiaren garapenean ahalegindu dira.

Infekzio horien laborategiko diagnostikoak metodo konbentzionalak barne hartzen ditu, hala nola hazkuntza, mikroskopia zuzena eta histopatologia. Izan ere, teknika-multzo hori ESCMID eta ECMMko adituen taldeak gehien gomendatutakoak dira (1.3 taula), ondo estandarizatuta eta eskuragarri baitaude ingurune kliniko gehienetan [53]. Zoritxarrez, biopsien azterketa histopatologikoan zaila da *Scedosporium/Lomentosporarekin* infektatutako ehunak *Aspergillus* edo *Fusariumekin* infektatutakoetatik bereiztea, guztiek erregularri trenkatutako hifak eta adarkadura dikotomikoak dituztelako [15]. Hala eta guztiz ere, zenbait ezaugarriek *L. prolificansek* eragindako mikosiak diagnostikatzen lagun dezakete, hala nola adarkatze-patroi irregularrak, limoi itxurako konidioak, eta konidiazio intrabaskular eta intratisularra [125]. Gainera, tindaketa histokimikoa koloratzaile fluoresenteekin, kalkofluor zuria kasu, onddoen bistaratzea errazten du, baina ez du askomizeto haritsu ezberdinen arteko desberdinketa baimentzen. Beraz, teknika hauek laborategi klinikoetan oso zabalduta dauden eta oso gomendagarriak diren arren [53], patologoek oso ondo prestatuta egon behar dute infekzioaren kausa behar bezala zehazteko.

**1.3. taula. ESCMID eta ECMMko aditu-taldeen gomendioen laburpena *Scedosporium/Lomentosporaren* diagnostikorako. Tortorano *et al.*-etik (2014) jasotakoa [53].**

Testa	SoR	QoE	Komentarioa
Mikroskopia zuzena	A	III	Oinarrizko ikerkuntza
Hazkuntza (morfología eta ezaugarri fisiologikoen araberako identifikazioa)	A	III	Oinarrizko ikerkuntza. Kultibo-ingurune selektiboen erabililera
Identifikazio método molekularrak	C	III	Espezieen identifikazio zehatza garrantzitsua da manei klinikoa gidatzeko
Histopatologia	A	III	Trenkatutako eta pareta meheeko hifak, 2 eta 5 µm arteko zabalerakoak, aspergilosian eta beste hialohifomikosi batzuetan behatzen direnen antzekoak. Adarkatze irregularra
PCR panfungikoa	C	III	Test molekularrak laborategiko test konbentzionalekin batera erabil daitezke
PCR multiplea	C	III	Test molekularrak laborategiko test konbentzionalekin batera erabil daitezke
<i>In situ</i> hibridazioa	C	III	Sentsibiltate baxua. Balioztatu gabe
Espezieen identifikazioa (MALDI-TOF* eta PCR)	C	III	Balioztatu gabe
Tipatze fisiologikoa	C	III	Agerraldien kasuetan
<i>In vitro</i> sentikortasun testa	C	III	Farmakoen aktibitatearen ikuspegi orokorra eskaintzen du eta, beraz, antifungikoen aukeraketan lagundu dezake

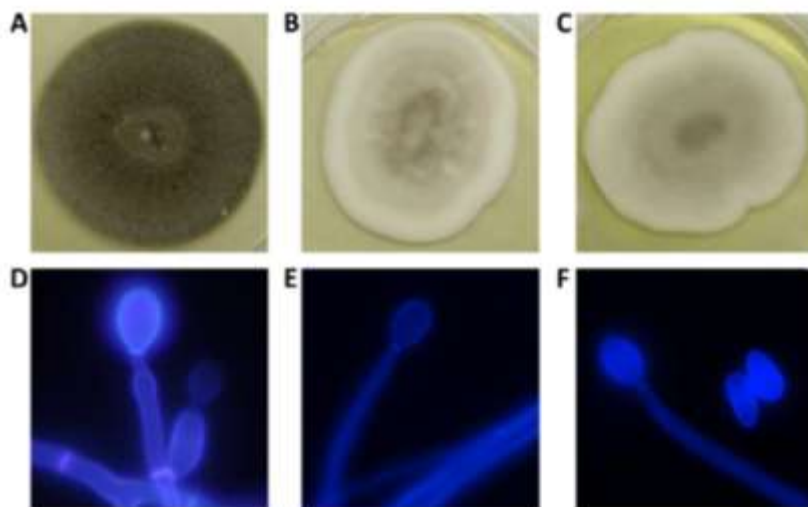
SoR gomendio-maila; QoE ebidentzia-maila. \* MALDI-TOF Laserraren bidezko desortzio-ionizazio matrizez lagundua-hegalde-denbora.

Egoera honen aurrean, hainbat teknika garatu dira *Scedosporium/Lomentosporaren* detekzio espezifikoak errazteko. Horien artean, *in situ* hibridazioaren teknikan ARNr-aren sekuentzien aurkako DNA zundak erabiltzen dira formalinan finkatutako eta parafinan txertatutako ehun-laginetan. Teknika honek azterketa morfologikoak baino sentsibilitate baxuagoa badu ere, *Scedosporium* sp.-ren behin betiko identifikazioa baimentzen du [126]. Gainera, antigorputz poliklonalak [127] eta monoklonalak garatu dira *Scedosporium/Lomentospora* detektatzeko. Zehazki, azken urteotan antigorputz monoklonal espezifikoak garatu dira *S. apiospermum/S. boydii* [128] eta *L. prolificans* [129] espezieentzat, lagin klinikoetan patogeno horien detekzio espezifikoak erraztu dezaketenak.

Hazkuntza-teknikak infekzioen diagnostikoan erabiltzen diren metodo garrantzitsuenetako bat dira gaur egun, mikosiak barne. Horretarako, funtsezkoa da lagin klinikoa behar bezala biltzea, baita behar bezala manipulatzeko, kontserbatzea eta garraiatzea laborategira ere. *Scedosporium/Lomentospora* generoetako onddoak ondo hazten dira ohiko kultibo-inguruetan, hala nola Sabouraud dextrosa-agarra, odol-agarra eta txokolate-agarra. Azken urteotan *Scedosporium/Lomentosporaren* hazkuntza beste onddo haritsu batzuen aurrean ahalbidetzen duten kultibo-ingurune selektiboak garatu dira. Kultibo-ingurune hauek likido bronkoalbeolarretik edo beste arnas jariakinetatik espezie hauek isolatzeko gomendatzen dira, lagin hauek sarritan *Aspergillus* spp. eta hazkuntza azkarragoko *Candida* spp. dituztelako [10]. Zehazki, Rainer *et al.*-ek (2008) garatutako SceSel + hazkuntza-ingurunea, antibiotikoak, diklorana eta benomiloa dituen, *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko onddoak isolatzen laguntzen du [130], eta askotan erabili da FKa duten pazienteen arnas laginetan espezie horiek detektatzeko [35,131]. Bestalde, *L. prolificans*ek eragindako infekzioetan lortutako kultibo positiboaren tasa handia nabarmentzekoa da, infekzio barreiatuak dituzten pazienteen hemokultiboaren % 70 positibo baitira. Itxurazko erraztasun diagnostiko hori gorabehera, kultibo gehienak positiboak izaten dira pazientearen heriotzatik hurbil, eta horrek teknika honen erabilgarritasun diagnostikoa mugatzen du eta diagnostiko azkarragoa ahalbidetuko duten prozedura berrien beharra areagotzen du [3].

Onddoak isolatu ondoren, beste analisi batzuk egin daitezke, identifikatzeko, sentikortasun antifungikoa aztertzeko edo tipifikazio epidemiologikoa egiteko. Morfologikoki eta fisiologikoki, *L. prolificans* erraz bereizten da *Scedosporium* espezieetatik, zikloheximidarekiko duen sentikortasunagatik, teleomorfoa ez izateagatik, kolonien kolore beltzagatik eta oinarria puztuta duten konidioforo bereizgarriengatik (1.5 irudia). Aldiz, *Scedosporium* spp.-k kolore zuritik grisera

edo marroira doazen koloniak sortzen ditu, zelula konidiogeno tubularrak ditu, eta, kasu batzuetan, teleomorfoak edo pigmentu hori barreiagarriak ditu. Aldi berean, beste ezaugarri fisiologiko batzuk, hala nola azukreen asimilazioa eta 40-45°C bitarteko hazkuntza, *Scedosporium/Lomentospora* espezieak bereiztea ahalbidetzen dute. Hala ere, identifikazio morfologikoak eta metodo biokimikoek denbora asko daramate eta aditu trebatuak behar dituzte [10,15,132].



**1.5 irudia.** Ikerlan honetan erabilitako *Lomentospora/Scedosporium* espezieen irudi makroskopikoak eta mikroskopikoak. Agar patata dextrosan 7 egunez hazitako *Lomentospora prolificans* (A, D), *Scedosporium boydii* (B, E) eta *Scedosporium aurantiacum* (C, F) kolonien irudiak (A-C) eta kalkofluor zuriarekin tindatutako onddoen mikrografiak (D-F). Aize Pellonen doktorego tesitik (2015) jasotakoa [133].

Kultibo mikologikoaren sentsibilitate baxuak egiturazko osagaien detekzioan (1,3-β-D-glukanoa; BG), pazienteek sortutako antigorputzen detekzioan edo onddoaren DNAREN detekzioan oinarritutako metodo alternatiboen garapena sustatu du. BGA infekzioaren garapenean askatzen den onddoen zelula-paretaren osagai bat da, eta infekzio inbaditzaileak dauzkaten pazienteen serumean detektatu daitekeen biomarkatzaile panfungiko bat da, muzormikosia eta kriptokoposian izan ezik [134]. Beraz, BGAREN detekzioak ez du baimentzen espezie fungikoak desberdintzen. Gainera, *Scedosporium/Lomentospora* espezieek polisakarido honen oso kantitate baxua askatzen dute beste onddo haritsu batzuekin alderatuta [135]. Bestalde, *Scedosporium* spp.-ek jariatutako zenbait molekula infekzio-markatzaile interesgarritzat hartu dira, hala nola pseudaziklinak, peptido zikliko ez-erribosomalak, eta azido dimerumiko eta N(α)-metil B

koprogeno sideroforoak. Zehazki, Bertrand *et al.*-ek (2010) *Scedosporium* spp.-ren N( $\alpha$ )-metil B koprogenoaren espezifikotasuna demostratu zuten. Gainera, *S. apiospermum*ekin kolonizatutako FK pazienteen karkaxa-laginetan hauteman zuten, *S. apiospermum* konplexuko espezieek eragindako arnasbidetako kolonizazioa detektatzeko markatzaile baliagarria dela frogatuz [136].

Gainera, hainbat ikerlan burutu dira *Scedosporium/Lomentospora* eragindako infekzioak diagnostikatzeko teknika serologikoak garatzeko helburuarekin. Horien artean, kontrainmunoelktroforesia (CIE), zeinetan estraktu antigeniko gordina erabiltzen den, FKa duten pazienteetan *Scedosporium* spp.-ek eragindako infekzioak diagnostikatzeko erabili da. Tamalez, *Aspergillusekin* erreaktibitate gurutzatu handia antzeman da [137]. Bestalde, *S. boydi*ren peptidoramnomanoa (PRM) eta A1 katalasa teknika serologikoak garatzeko markatzaile interesgarri gisa hautatu dira, eta A1 katalasa erabiltzean etorkizun handiko emaitzak lortu dira *Scedosporium* spp.-rekin infektatutako FQ duten pazienteen detektekzioan [138,139].

#### 1.7.2. *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezieen identifikazioa

Gaur egun, nukleotidoen anplifikazioan eta ondorengo sekuentziazioan oinarritutako analisia onddoak identifikatzeko urrezko estandarra da [15]. Hainbat eskualde genetiko ikertu dira talde eta onddo-espezieak identifikatzeko, horien artean DNA erribosomala, RNA polimerasarentzat kodifikatzen duten geneak, 1- $\alpha$  elongazio-faktorea,  $\beta$ -tubulina (BT2 eta TUB eskualdeak), kalmodulina eta transkribatutako barne-tarteak (ITS). Horien artean, ITS eskualdea hautatu da onddoen identifikaziorako eskualde estandar edo "*Standard barcoding*" gisa. Izan ere, eskualde honek espezie gehienekin bateragarriak diren hasle unibertsalak erabiltzea ahalbidetzen du, eta espezie-mailan identifikatzeko behar besteko aldakortasun genetikoa erakusten du [141]. Bere sekuentziazioak egokian identifikatzen ditu *Scedosporium/Lomentosporaren* espezie nagusiak. Hala ere,  $\beta$ -tubulinaren gene partzialaren (BT2) analisia beharrezkoa da estuki erlazionatuta dauden espezieak desberdintzeko [142].

Era berean, azken urteotan beste metodo molekular batzuk garatu dira *Scedosporium/Lomentospora* espezieak identifikatzeko eta tipifikatzeko Metodo hauek DNA sekuentzien anplifikazioan eta analisisan oinarritzen dira, hala nola, DNA polimorfikoaren ausazko anplifikazioa (RAPD) [143–146], anplifikatutako zatien luzera-polimorfismoak (AFLP) [20], barne-sekuentzia sinple errepikakorren anplifikazioa (ISSR PCR) [147], murrizketa-zatien luzeraren polimorfismoak (RFLP) [20,142], edo multiilocus sekuentzien tipifikazioa (MLST) [39,148].

Teknika horien artean, lagin klinikoetatik abiatuta onddoak zuzenean detektatzeko eta identifikatzeko aukera ematen duten tekniken interesa nabarmentzen da. Castelli *et al.* (2008) denbora errealeko bi PCR saiakuntza (RT-PCR) garatu zituzten *L. prolificans* eta *S. apiospermum* diagnostikatzeko, infekzio inbaditzaileko sagu-eredu batetik eratorritako laginak erabiliz. Teknika honen bidez % 100eko espezifikotasuna eta 10 fg-ko DNAren detekzio-muga lortu zituzten, eta % 100eko sentsibilitatea kultibatutako andui klinikoentzat, % 95,5koa birika-ehunentzat, % 85koa serumarentzat eta % 83,3koa odolarentzat [149]. Era berean, Harun *et al.*-ek (2011) garatutako PCR multipleak FK duten pazienteen arnas jariakinetatik abiatuta *Scedosporium/Lomentosporaren* identifikazioa ahalbidetu zuen. Teknika honekin % 62,1eko eta % 97,2ko sentikortasuna eta espezifikotasuna lortu zuten, hurrenez hurren [150]. Azkenik, alderantzizko hibridazioaren teknika (PCR-RLB), Lu *et al.*-ek (2011) garatutakoa eta BT2ren DNA zatira zuzendutakoa, FK zuten pazienteen karkaxa-laginetan *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezieak detektatzeko eta identifikatzeko erabili zen [151]. Lagin klinikoen hazkuntzarekin lortutako emaitzekin alderatuta teknika honekin sentikortasun askoz altuagoa eskuratu zen.

PCRn oinarritutako teknika hauek honako mugak dauzkate teknika gehienentzat laginak aurrez kultibatu beharra eta emaitza faltsu positiboaren arriskua, PCRaren aurreko laginen kutsadurak eragindakoa, hildako zelulalen DNAren amplifikazioak eragindakoa edo amplifikazio zehaztugabeak eragindakoa.

Bestalde, MALDI-TOF masa-espektrometria teknika eskuragarri dago lehen lerroko identifikaziorako. Merkeagoa da eta bere identifikazio zehaztasuna DNAren sekuentziazioarekin konpara daiteke [15]. Orain arte egindako ikerlanetan *Lomentospora/Scedosporium*ren konplexuaren errutinazko identifikazioa egiteko metodo fidagarria, azkarra eta zehatza dela frogatu da, argi eta garbi *L. prolificans* eta *Scedosporium* spp. espezieak desberdinduz [152,153]. Erreferentziazko espektroen kalitatea erabakigarria da identifikazio fidagarri baterako. Zoritxarrez, gaur egun MALDI-TOF bidezko identifikaziorako merkaturatutako datu-baseak desegokiak dira *Scedosporium/Lomentosporarentzat*, eta, beraz, beharrezkoa da MALDI-TOF masa-espektroen erreferentziazko datu-basearen garapena, onddoen identifikazioan espezializatutakoa eta mikologo adituek ondutakoa [15].

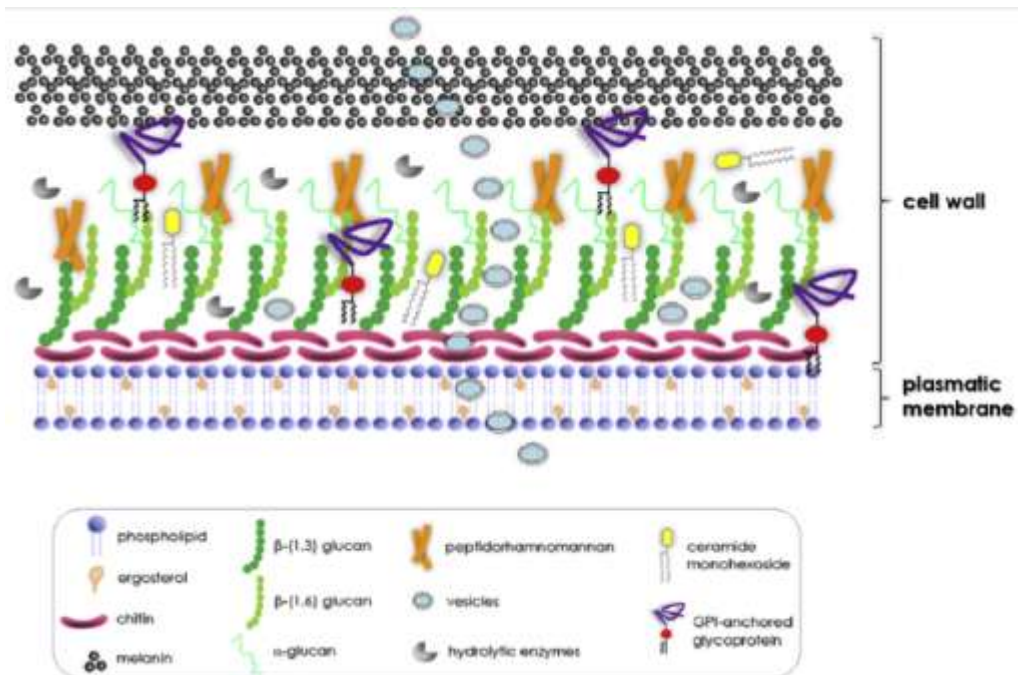
Beraz, *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezieak identifikatzeko oso etorkizun handiko metodo molekular berriak garatu diren arren, datu-base egokien falta, eta metodoen

baliozkotze eta estandarizazio falta dago. Egoera honen aurrean, gaur egun adituek proba molekularrak ohiko laborategiko probekin batera erabiltzea gomendatzen dute [53].

### **1.8. Ostalariaren erantzun immunea**

Onddoen aurkako erantzun immunea mekanismo zelularrez eta molekularrez osatutako sare konplexua da. Hesi orokorrek funtsezko zeregina dute onddo-patogenoen aurkako berezko erantzun immunean, hala nola, epitelioa, sistema mukoziliarra, ehunetako zelula immuneak, eta jariatutako peptido eta proteina zitotoxikoak [154].

Patogenoen berezko ezagutza patroiak ezagutzeko hartzaille (PRR) bidez lortzen da. Hartzaille hauek patogenoetara lotutako patroik molekularrak (PAMP) izeneko egitura kontserbatuak detektatzen dituzte, hala nola mananoak, glukanoak edo DNA [155]. Onddoen zelula-pareta bereziki garrantzitsua da ezagutza-prozesu honetan, zelulaz kanpoko ingurunearekin kontaktuan baitago. Zelula-paretaren konposaketa espeziearen arabera aldatzen bada ere, baita ingurune baldintzen arabera ere, zelula-paretaren egitura, nagusiki kitinari lotutako adarkatutako  $\beta$ 1,3/ $\beta$ 1,6 glukanoek osatzen dute (1.6 irudia). Egitura honek, aldi berean, beste karbohidrato batzuk ditu, mananoak kasu, eta proteinak, azken hauek, polisakaridoei zuzenean lotuta egon daitezke larrik edo gilkosilfosfatidilinositol (GPI) bidez ainguratuta. Zehazki, *Scedosporium/Lomentosporaren* PRMak, ramnomananoak eta  $\alpha$ -glukanoak bereziki garrantzitsuak dira onddo hauen zelula-paretaren egituran. Gainera, konposatu hauek, glukosilzamidekin batera, onddo zelulen ezagutzan eta/edo ostalariaren erantzun immunearen erregulazioan inplikatur daude [156 – 160].



**1.6 irudia. *Scedosporium/Lomentospora* espezieen zelula-paretaren irudikapena.** Onddo horietan deskribatutako paretako osagai nagusiak irudikatu dira, baita beste onddo haritsu batzuekin (*Aspergillus* spp.) argitaratutako lanetan oinarritutako interkonexio posibleak ere. Mellon *et al.*-etik (2019) jasotakoa [161].

PRR hartzailleak nagusiki zelula fagozitikoen eta antigenoak aurkezten dituzten zelulen gainazalean adierazten dira, neutrofiloak, makrofagoak eta zelula dendritikoak barne [162]. Hartzaille hauen artean, Toll motako hartzailleak (TLR) eta C motako lektina hartzailleak, hala nola dektinak eta manosa-hartzailleak, onddo-zelulen ezagutzan oso garrantzitsuak direla frogatu izan da [155,163]. Zehazki, TLR eta dektina-1 hartzailleak erabakigarriak dira *Scedosporium/Lomentospora*ren ezagutzan (1.7 irudia) [158,164–166].

Zelula fagozitikoek PRR hartzailleen bidez onddoen zelulak ezagutu ostean, onddoaren heriotza, hazkuntzaren atzerapena edo inhibizioa, eta leukozito PMNen erreklutazioa zitokina proinflamatorioen sintesiaren bidez sustatzen dute [15,167]. *In vitro* egindako ikerketek frogatu dute *L. prolificans* eta *S. apiospermum*en konidioak *A. fumigatus*ekin alderatuta oso era antzekoan fagozitatzen direla, gutxienez monizitoetatik eratorritako makrofagoengatik, euren konidioen tamaina handiagoa izan arren [168,169]. Zelula fagozitiko hauek, aldiz, *L. prolificans*en konidioen erretzea inhibitzen dute, *A. fumigatus*enak baino eraginkortasun gutxiagorekin [169]. Bestalde,



Pellon *et al.*-ek (2018) behatu zuten mikrogliaaren ahalmen fagozitikoa txikiagoa dela *L. prolificans*ekin, beste fagozito eta onddo batzuekin alderatuta, *Scedosporium* generokoak barne. Era berean, zelula hauek hanturazko zitokina gutxiago askatzen dituztela eta oxigeno-espezie erreaktibo (ROS) gutxiago ekoizten zituztela hauteman zuten. Gainera, *L. prolificans* zelula mikroglialen barnean ernaltzeko eta zelulen heriotza eragiteko gai dela frogatu zuten, zelula hauen aktibitate antifungikoa ekidinez [166]. Zitokinei dagokienez, *L. prolificans*ek giza monoizitoetan *A. fumigatus* baino askoz ere nekrosi tumoralaren  $\alpha$  faktorea (TNF- $\alpha$ ) eta interleukina-6aren (IL-6) askapen handiagoa eragiten du. Azkeneko hau, *L. prolificans*en zelula-paretaren konposizio espezifikoa ondo izan liteke, zehatz-mehatz ezagutzen ez den arren, molekula estimulatzaile indartsuagoak izan ditzakeena [170]. Bestalde, frogatua izan da IFN- $\gamma$  eta GM-CSF zitokinek leukozito PMNen aktibitate antifungikoa areagotzen dutela *Scedosporium/Lomentosporaren* aurka [87]. Era berean, IL-15ak leukozito PMNek *L. prolificans*en hifei eragindako kaltea handitzen du. Gainera, zitokina honek onddoaren eraginpean dauden leukozito PMNen leherketa oxidatiboa eta IL-8ren askapena areagotzen du [88].

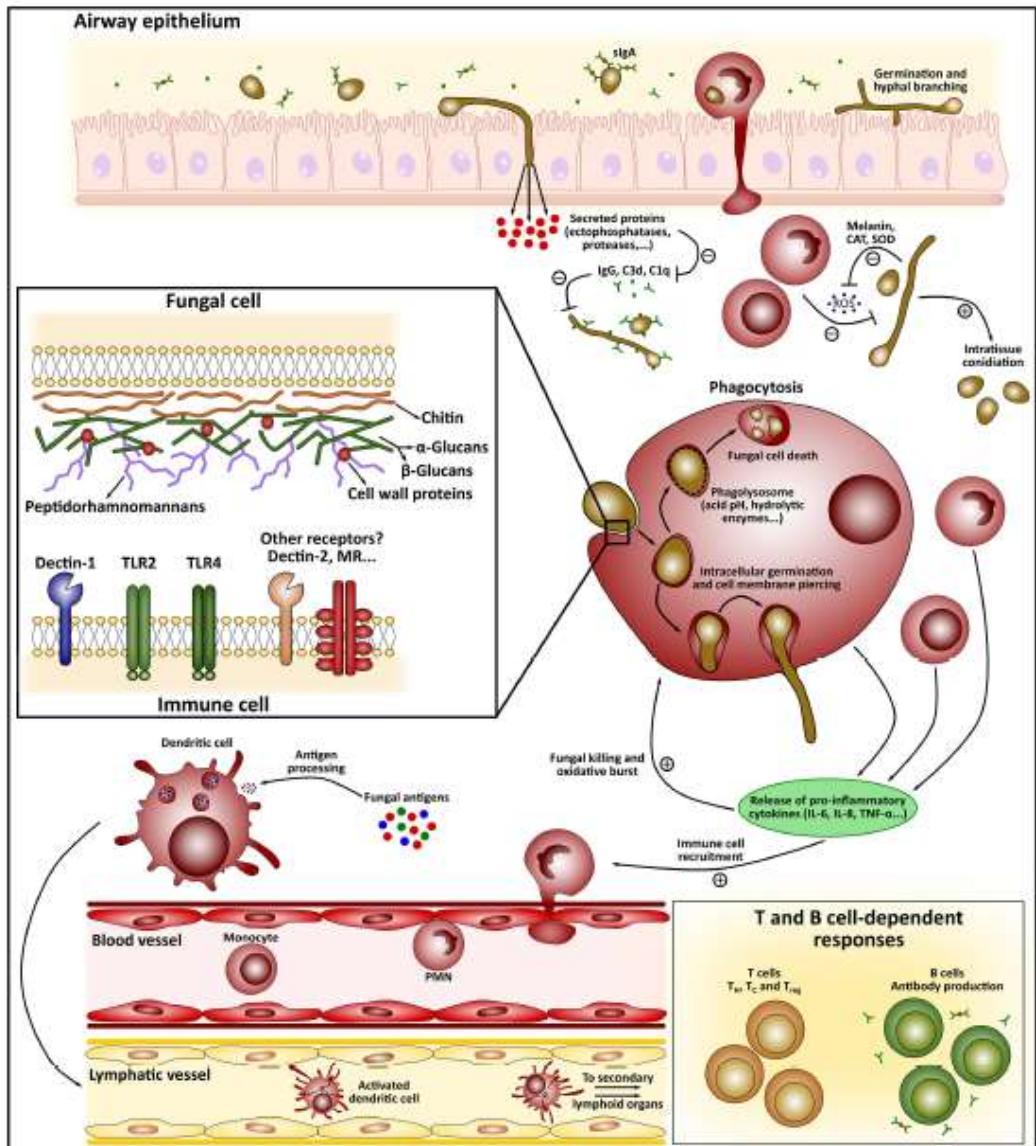
Fagozitoetatik kanpo *Scedosporium/Lomentosporaren* konidioek ernatzea lortzen dutenean, infekzio lekura erakarritako neutrofiloen funtzioa funtsezkoa bihurtzen da. Egoera honetan neutrofiloak degranulatzen hasten dira, ROS kantitate handiak askatuz eta onddo-zelulak neutrofiloen tranpa estrazelularretan (NET) harrapatuz. NETa nagusiki DNAz eta aktibitate antimikrobianoa duten proteinez osatutako matrizea da. Matrize honek aktibitate fungistatikoa dauka fungizida baino, onddoen barreiatzea ekidinez eta onddo-zelulak atxikituz, beste zelula immunitario batzuk infekzio lekura erakartzen diren bitartean [15,162].

Bestalde, antigenoak aurkezten dituzten zelulek, batez ere zelula dendritikoen, antigeno potentzialak digeritzen dituzte eta T zelulei aurkezten dizkiete, T zelulen desberdintzapena sustatuz. Inplikaturako estimuluaren eta PRRaren arabera, T zelula laguntzaile ( $T_H$ ), zitotoxiko ( $T_C$ ) eta erregulatzaileen ( $T_{reg}$ ) desberdintzapena sustatzen da. Zehazki,  $T_H1$ ,  $T_H2$  eta  $T_H17$  zelulek onddoen aurkako erantzun nagusia osatzen dute, *Scedosporium/Lomentospora* zelulen aurka duten paper espezifikoa ezezaguna den arren [15,155].

Azkenik,  $T_H$  zelulen funtsezko zeregina B zelulak aktibatzea da, antigorputzak ekoizteaz arduratzen direnak. 1990 arte, antigorputzek eragindako immunitateak ostalariak onddoen aurka garatutako erantzunean ez zuela garrantzirik uste zen. Izan ere, ordura arte erabilitako metodoek, hala nola serum immunearen transferentzia pasiboak, ez zuten ahalbidetzen erantzun

humoralaren eraginkortasuna frogatzea. Hala ere, mAb-ak ekoizteko teknologiak antigorputz espezifikoen paperari buruzko frogak eman ditu, ostalariaren onurarako edo kalterako [171]. Horrela, antigorputz babesleak deskribatu dira onddo-patogeno ugariaren aurrean, hala nola *C. neoformans*, *C. albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *A. fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis* eta *Sporothrix shenkii* [48]. Antigorputzen ekintza-mekanismo klasikoei dagokienez, opsonizazioa, konplementuaren aktibazioa, toxinen neutralizazioa eta antigorputzen mendeko zitotoxikotasun zelularra barne hartzen dituzte. Hala ere, berriki egindako ikerketek mekanismo gehigarriak iradokitzen dituzte, hala nola hanturazko erantzunaren modulazioa, eta biofilm eta erretzearen inhibizioa [171].

Gainera, *L. proliferans*ekin egindako immunoproteomikako ikerlanetan, immunogai diren pertsonen onddo honen aurkako erantzun humoral indartsu eta konplexua dutela frogatu da, listuko IgAk eta serumeko IgGk bideratutakoa [138,172–174]. Eraitza hauek ez datoz bat beste onddo patogeno batzuekin lortutakoekin, zeinetan infektatu gabeko pazienteen serumean oso erantzun humoral baxua detektatu den [175]. *L. proliferans*ekin egindako ikerlanetan detektatutako antigorputz batzuk babesleak izan litezke, eta pertsona immunokonpetenteetan *L. proliferans*en infekzioen aurkako babesan parte har lezakete. Gainera, ikerlan hauetan ikusi denez, IgAk onddoaren konidioak ia esklusiboki ezagutu arren, IgG serikoak konidioak zein hifak ezagutzen ditu. Gertaera hau bat dator onddoen arnasbideen inbasio prezesuarekin, zeinetan ostalariak onddoak sakabanatzeko erabiltzen duen morfologia inhalatzen duen, konidioak, hifak inhalatu beharrean [173].



1.7 irudia. *Scedosporium/Lomentosporaren* aurkako immunitatearen eskema orokorra. Ramirez-García *et al.*-etik (2018) jasotakoa [15].

### 1.9. Birulentzia-faktoreak

*L. prolificans*en patobiologia gutxi aztertu da orain arte, *Scedosporium/Lomentospora* konplexuko espezie birulentoenetako bat izan arren [121,123]. *L. prolificans*en birulentzia-faktoreen artean, nabarmentzekoa da *in vivo* daukan esporulatzeko gaitasuna, ondoaren barreatzea eta gaixotasunaren progresio azkarra errazten baititu [15].

Gainera, zelula-paareta *L. proliferans* birulentziarentzat funtsezko organoa da. Izan ere, melanina dauka (1.6 irudia), *L. proliferans* babesa ematen diona inguruneke estresaren aurrean (UV erradiazioa) eta zelula fagozitikoan leherketa oxidatiboan sortutako ROSen ( $H_2O_2$ ) aurrean [10,176]. Gainera, pigmentu hau, ostalariaren erantzun immunearen aurreko ihesarekin erlazionatu da, onddoaren PAMPak ezkatuz eta fagolisosomaren fusioa eragotziz [161,177]. *Scedosporium/Lomentosporaren* zelula-paretari lotutako beste birulentzia-faktore bat, aipamen berezia merezi duena, PRMa da (1.6. irudia). PRMak zelula epitelialen eta makrofagoen bidezko endozitosian, eta zelula epitelialen atxikiduran parte hartzen du [157,178]. Gainera, PRMak *L. proliferans* aurkako ostalariaren erantzun immunea murrizten du, onddoaren kolonizazioa, birulentzia eta barreiatzea erraztuz [179].

Bestalde, *Scedosporium* spp entzima ugari deskribatu dira ostalariaren inbasioan parte hartzen dutenak (1.7 irudia), horien artean serina-proteasa [180], metaloproteasak [181] eta konplementu-sistemaren konposatuak degradatzeaz arduratzen diren entzimak [182] nabarmentzen direlarik. Entzima proteolitiko hauek ehunak inbaditzeko funtsezko osagaiak dira, defentsa mekanismoak deuseztatzen dituztelako eta mantenugaiak eskuratzea errazten dutelako [15]. Gainera, ostalariaren erantzun immunea saihesten duten entzima garrantzitsuak detektatu dira *Scedosporium* ssp.-en, Cu/Zn superoxido dismutasa entzima zitosolikoa [183] eta katalasa [184], baita ektofosfatasak ere. Azken entzima hauek, aldezturik, *Candidaren* atxikimendu eta endozitosiarekin erlazionatuak izan dira, hala ere, *Scedosporium* spp.-ren patogenesisian duten papera ezezaguna da. [15]. Azkenik, *Scedosporium/Lomentosporan* detektatutako siderofoerok patogenesisian parte har lezakete, NSZn dagoen burdina librea eskuratzea ahalbidetuz eta, horrela, organo horren infekzioa erraztuz [10,185]. Zehazki, bi siderofoero identifikatu dira *Scedosporium* spp.-en, azido dimerumikoa eta *N*( $\alpha$ )-metil B koprogenoa, eta azkeneko hau *S. apiospermum* arnasbideen kolonizazioa detektatzeko markatzaile gisa aztertua izan da [136].

---

**Justifikazioa eta helburuak**

---



*Lomentospora prolificans* odol hodietan zehar barreiatzeko eta infekzio barreiatuak eragiteko gaitasun handia duen patogeno emergentea da. Infekzio barreiatuak eragiten ditu batez ere immunoeskasi larria duten pazienteetan, bereziki neoplasia hematologikoak dituztenetan. Infekzio hauen prebalentzia txikia bada ere, klinikan arazo larriak sortzen dituzte daukaten pronostiko negatiboaren ondorioz, % 87,5erainoko heriotza-tasarekin. Pronostiko negatibo hau erlazionatuta dago nagusiki onddoak ahuldutako ostalariak infektatzeko duen joerarekin, diagnostiko-metodo azkarren faltarekin eta gaur egun eskuragarri dauden antifungiko guztiengan daukan berezko erresistentziarekin.

Egoera honen aurrean, immunoproteomikako ikerlan bat burutu genuen, ostalariak garatutako erantzun humoralak ezagutzeko **helburu nagusiarekin**, honekin, mikosi horiei aurre egiten lagunduko duten itxurako terapeutiko eta diagnostiko berriak identifikatu ahal izateko.

Halaber, helburu hau arrera eramateko, honako **helburu partzialak** proposatu genituen

1. Emaila osasuntsuen listuko IgA-k ezagututako *L. prolificans*en konidioen antigeno nagusien identifikazioa, eta horien kokapenaren eta *A. fumigatus*ekin daukaten erreaktibitate-gurutzatuaren azterketa

2. *L. prolificans*ek eragindako infekzio barreiatuaren garapena saguetan eta patogeniaren alderaketa *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* espeziekin

3. *L. prolificans*ekin infektatutako saguen erantzun humoralaren azterketa eta onddoaren antigeno immunoerreaktiboaren identifikazioa eta ezaugarritzea

4. *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* espeziekin infektatutako saguen erantzun humoralaren azterketa konparatiboa eta *L. prolificans*en aterakin proteikoetan ezagututako antigeno nagusien identifikazioa

5. Immunizazio-eredu baten garapena *L. prolificans*ek eragindako infekzioen aurrean





---

**Material eta metodoak**

---



### 3.1. Mikroorganismoak eta hazkuntza-baldintzak

Ikerketa honetan, *Lomentospora prolificans* CECT 20842 andua erabili da, infekzio barreiatua zuen paziente batengandik isolatutakoa, eta *S. boydii* CECT 21169 andua. Biak Marqués de Valdecillako Unibertsitate Ospitalean (Santander) jaso ziren. Gainera, Santiagoko Unibertsitate Ospitale Klinikoan (Santiago de Compostela) paziente baten zauri-exudatu batengandik isolatutako *S. aurantiacum* CBS 116910 andua eta *A. fumigatus* Af293 erreferentziatzeko andua erabili dira.

Andui guztiak -80°C-tan kriokontserbatu ziren eta erabili baino 7 egun lehenago agar patata dextrosan (APD) (Pronadisa, Madril, Espainia) 37° C-tan hazi ziren. *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum*-en konidioak lortzeko, plakak bi aldiz garbitu ziren gatz-soluzio esterilarekin (NaCl% 0,9) eta esekidura gasa batekin iragazi eta zentrifugatu zen. Patata dextrosa saldan (PDS) (Pronadisa)  $5 \times 10^5$  konidio/ml inokulatu ziren eta 37°C-tan inkubatu ziren 7 egunez. Azkenik, konidioak gasarekin iragaziz eta zentrifugatuz (11.400 g, 5 min, 4°C) bildu ziren. *A. fumigatus*-en konidioak 28° C-tan 7 egunez inkubatutako APD hodietatik jaso ziren, gatz soluzio-Tween 20 erabiliz (% 0,9 NaCl, % 0,02 Tween 20) (gs-Tween 20). Zentrifugazio bidez bi aldiz garbitu ziren.

### 3.2. *Scedosporium boydi*ren identifikazioa

#### 3.2.1 DNA eskuratzea

DNA eskuratzeko Liu *et al*-ek (2000) aurrez deskribatutako metodoa erabili zen [186]. Lehenik eta behin, *S. boydii* PDSn inkubatu zen 37°C-tan, 120 rpm-tan, 3 egunez. Mizelioa zentrifugazio bidez eskuratu zen, eta 3 garbiketa egin ziren gatz-soluzio esterilarekin. Ondoren, mizelioari lisi-tanpoiaren 1 ml gehitu zitzaizkion (400 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, % 1 (p/b) SDS) eta 0,5 mm diametroko beira-mikroesferen 150-200 mg. Zelulen haustura Millmix 20 *bead beater*-en (Tehtnica, Eslovenia) burutu zen, 5 minutuz 30 Hz-tan. Ondoren, 300 µl potasio azetato tanpoi gehitu ziren (% 60 5 M potasio azetato pH 4,8, % 0,115 (b/b) azido azetiko glaziala), hainbat inbertsioren bidez nahastu zen eta bi aldiz zentrifugatu zen (8.000 g, 5 min), gainjalkinak berreskuratuz. Isopropanol bolumen bat gehitu zen, laginak nahastu ziren 8 inbertsio bidez, eta 14.000 g-ra zentrifugatu ziren 15 minutuz. Azkenik, lortutako pastillak 300 µl etanol hotzekin garbitu ziren, eta zentrifugatu egin ziren (14.000 g, 15 min), gainjalkinak baztertuz. Laginak airean lehortzen utzi ziren eta azkenik TE 50 µl (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) gehitu ziren. DNA kantitatea kuantifikatzeko, 260/280 xurgapena neurtu zen nanofotometroan (Implen, Munich, Alemania).

### 3.2.2 Sekuentzia nukleotidikoa hautatzea eta polimerasaren kate-erreakzioa (PCR)

Tubulina genearen bi zonalde anplifikatu ziren, BT2 eta TUB, lehenago *Scedosporium* spp generoko espezieak identifikatzeko erabiliak izan direnak. BT2 zonalderako Giraldo *et al.*-ek (2005) erabilitako hasleak [140] eta TUB zonalderako Luplertlop *et al.*-ek (2016) erabilitakoak [187] haukeratu ziren (3.1. taula).

#### 3.1. taula. Xede-geneak anplifikatzeko erabilitako zuzeneko eta alderantzizko hasleen sekuentziak.

Geneak	Hasleak	
BT2	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Zuzena
	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Alderantzizkoa
TUB	CTGTCCAACCCCTTACGGCGACCTGAAC	Zuzena
	ACCCTCACAGTATACCAATGCAAGAAAGC	Alderantzizkoa

PCR erreakzioetarako nahasketek (50 µl) BioMix™ (Bioline, Memphis, AEB), 400 ng DNA, 0,3 uM hasle bakoitzeko eta H<sub>2</sub>O 50 µl-raino zeukaten. Anplifikazioa MJ-Mini termozikladorean egin zen (Bio-Rad, Hercules, CA, AEB), honako protokolo hau erabiliz 96°C-ko aurre-beroketa 6 minutuz, 94°C-ko 35 ziklo 1 minutuz, 55°C 1 minutuz eta 72°C 2 minutuz, eta 72°C-ko azken pausua 10 minutuz. Ondoren, PCR produktuen 5 µl elektroforesi bidez bereizi ziren % 1eko agarosazko geletan (p/b) Tris Acetato-EDTA tanpoian (TAE) (40 mM Tris-azetato, 1 mM EDTA, pH 8,3) elektroforesi kubeta batean (Bio-Rad) 110 V-tan 40 minutuz. Azkenik, Gel Red10000X (Biotium, Hayward, CA, AEB) koloratzaile fluoreszenteak igorritako fluoreszentzia UV U Genius transargiztazailean (Syngene, Cambridge, Erresuma Batua) detektatu zen. PCR produktuak Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) kita erabiliz purifikatu ziren.

Anplifikatutako DNAREN sekuentziazioa Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorretan (SGIker) egin zen. Lortutako sekuentziak BioEdit softwarea erabiliz editatu eta lerrokatu ziren, eta GenBank-en dauden sekuentziekin alderatu ziren BLASTn erabiliz (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3.3. Giza laginak biltzea

Euskadiko pertsona osasuntsu immunokonpetenteen listu-laginak jaso ziren, 20 antigenoen azterketarako eta 40 ELISArako. Jaso ondoren, laginak zentrifugatu ziren zelula-soberakinak kentzeko. Azterketa antigenikorako, listu-lagin bakoitzaren ml 1 nahastu zen, listu-

nahasketa bat lortuz. Azkenik, listu lagin guztiak -20°C-tan kontserbatu ziren erabili arte. Erabilitako prozedurak UPV/EHUko Etika Batzordeak onartu zituen.

### **3.4. Saguetan Infekzio barreiatuen garapena eta laginen bilketa**

#### *3.4.1. Animaliak*

Zortzi asteko *Swiss* sagu emeak erabili ziren, UPV/EHUko SGIker-eko animaltegiari hazi eta mantendu zirenak. Animaliak ad libitum ur eta janariarekin mantendu ziren kaiola esterilizatuetan, iragazkiekin eta presio negatiboko aireztapenarekin. Prozedura guztiak UPV/EHUko Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeak (AEEB) onartu zituen (M20/2016/235, M20/2016/323).

#### *3.4.2. Animaliaen gainbegiratzea*

Gainbegiratze-protokoloa lehen inokulua eman eta 24 ordura hasi zen, eta 24 ordutik behin egin zen esperimendua amaitu arte. Zeinu nabariak behatu ziren, eta bakoitzari 1etik 4ra bitarteko puntuazioa eman zitzaion, 4a larritasun handienekoa izanda. 4 puntuko puntuazioa zuen zeinu bat detektatuz gero, eutanasia aurrera eraman zen. Era berean, larritasun txikiagoko zeinuen batura ere sufrimendu adierazgarritzat hartu zen. Zehazki, detektatutako zeinuen puntuazioaren batura 10ekoa edo handiagoa izanda, eutanasia egin zen.

Animalien ikuskapen-protokoloa JM Orellana-Murianak [188] idatzitako “Animal Models in Cancer Reserch Assessment of Severity and the Application of Humane Endpoints” laneko taulan oinarritu zen [121,189]. Taula hau material osagarri gisa erantsita dago.

#### *3.4.3. Infekzio murinoen ereduak*

Infekzio guztiak zain-bidetik egin ziren, buztanaren zainetik, ketamina/xilazina (100/5 mg/kg) anestesia peritoneala erabiliz. Konidio-esekidurak gs-Tween 20n prestatu ziren eta 0,2 ml/animalia administratu ziren.

##### *3.4.3.1. Saguen *L. prolificans* infekzio barreiatuaren garapena*

Bost taldetan banatutako 24 sagu erabili ziren eta 102, 103, 104 edo 105 konidio/animalia eman zitzaizkien, eta gs-Tween 20 kontrol taldeari. Talde guztiek lau sagu zituzten, dosi handiena eman zitzaion taldeak izan ezik (105 konidio/animalia). Talde honetan detektatutako hilkortasun

handiaren ondorioz, zortzi sagu erabili ziren. Inokuloa administratu eta 28 egunera, bizirik jarraitzen zuten animaliak hil eta organoak eta odol laginak atera zitzaizkien.

#### 3.4.3.2. *L. proliferans*ek eragindako infekzioendako immunizazio-eredu baten garapena

Ikerketa honetarako 10 sagu erabili ziren, bi taldetan banatuta (bost sagu/talde). Talde bati *L. proliferans*-en konidio-dosi ez-infekziosoak administratu zitzaizkion zain barnetik (immunizatutako taldea), eta beste taldeari gs-Tween 20 administratu zitzaion inokulu horien ordean (kontrol-taldea). Horrela, immunizatutako taldeari infekziosoak ez ziren bi inokulu administratu zitzaizkion, lehena  $10^2$  konidio/animalia-koa esperimentuaren hasieran eta bigarrena  $10^3$  konidio/animalia-koa 28 egunen buruan. 56 egunen buruan, bi taldeei *L. proliferans*en infekzio-dosia administratu zitzaion zain barnetik ( $2 \times 10^5$  konidio/animalia). Azkenik, infekzio-dosia administratu eta 28 egunera, hau da, 84 egunera esperimendua hasi zenetik, bizirik zeunden saguak sakrifikatu ziren, eta odola eta organoak atera zitzaizkien.

#### 3.4.3.3. *L. proliferans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* onddoek saguetan eragindako infekzio barreiatuen azterketa konparatiboa

Ikerketa honetan 48 sagu erabili ziren, eta gs-Tween 20 (kontrol-taldea) edo *L. proliferans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* edo *A. fumigatus*en konidioak administratu zitzaient. *L. proliferans*, *S. boydii* edo *S. aurantiacum* espezieekin infektaturiko saguei onddo horien  $10^5$  konidio/animalia administratu zitzaizkien. *A. fumigatus* onddoaren kasuan, konidioen 3 dosi desberdin erabili ziren  $10^5$ ,  $10^6$  eta  $5 \times 10^6$  konidio/animalia. Sagu talde guztiak 6 saguez osatuta zeuden, *L. proliferans*ekin eta *A. fumigatus*en  $5 \times 10^6$  konidio/animalia-rekin infektatutako taldeetan izan ezik. Azken taldeetan detektatutako hilkortasun tasa handiaren ondorioz, taldeko 12 sagu erabili ziren. Inokuluak administratu zirenetik 28 egun igaro ondoren, bizirik zeunden saguak sakrifikatu ziren organoak eta odol laginak ateratzeko.

#### 3.4.4. Animalia laginen prozesatzea

Esperimenduaren amaierako puntuan, bizirik zeunden animaliak sakrifikatu ziren odol laginak eta organoak (giltzurrunak, birrikak, barea, gibela, burmuina) eskuratzeko. Odol-laginak koagulatu ziren, zentrifugatu (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), eta  $-80^\circ\text{C}$ -tan gorde ziren erabili arte. Organoak bi zatitan banatu ziren, horietako bat onddo-karga aztertzeko erabili zen Unitate Kolonia Eratzaileak (UKE) zenbatuz eta bestea azterketa histologikorako.

Onddo-karga aztertzeke, organoak pisatu ziren, eta, ondoren, mekanikoki homogeneizatu ziren beirazko hagaxken bidez gs-Tween 20 1 ml-tan. Azkenik, diluitutako homogeneizatuaren 0,1 ml hedaturaz erein ziren bitan APD plaketan 10 ug/ml kloranfenikol eta 25 ug/ml gentamizinarekin. Plakak 37° C-tan inkubatu ziren eta 2-3 egun ondoren UKE-ak zenbatu ziren. Organoen beste erdiak formalina %10ean finkatu ziren, eta, ondoren, parafinan murgildu ziren. Gutxienez bost ebaketa ezberdin egin ziren, lau mikrometroko lodierakoak, hematoxilina-eosinarekin eta Grocotten zilar metenaminarekin tindatu zirenak.

### 3.5. Proteina aterakinak

#### 3.5.1 *L. prolificans* konidioen proteinen erauzketa

Konidioak tanpoi fosfato gatzdunean (PBS) (pH 7,5) nahastu ziren, % 1 (b/b) 2-merkaptotanol eta % 1 (b/b) pH 3-10 anfolitoekin (GE Healthcare, Friburgo, Alemania). Zelulen haustura mekanikoa 0,5 mm-ko diametroko beirazko mikroesferekin gauzatu zen MillMix 20 *beater*-ean 20 minutuz 30 Hz-tan. Zelula-soberakinak zentrifugazio bidez kendu ziren (14.100 g, 5 min), eta gainjalkina -20 ° C-tan gorde zen erabili arte.

#### 3.5.2 *L. prolificans* konidioen zelula-paretako proteinen erauzketa

Erauzketa Pitarch *et al.*-ek (2002) deskribatutako protokoloari jarraituz egin zen [190]. Labur-labur, konidioak 100°C-ra mantendu ziren erauzketa-tanpoi batean (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 m EDTA,% 2 (p/b) SDS, 10mM DTT) 10 minutuz. Ondoren, zentrifugatu ziren (4.500 g, 5 min) eta gainjalkina jaso eta -20°C-tan gorde zen erabili arte. Proteinak erauzi ostean, konidioak kalkofluor zuriarekin (40 ng/ml) eta propidio ioduroarekin (10 µg/ml) tindatu ziren iluntasunean 30 minutuz. Ondoren, konidioak epifluoreszentiako mikroskopioarekin aztertu ziren, zelulak osorik zeudela eta ondorioz, proteina zitoplasmatikoak askatu ez zirela egiaztatzeke. Kontrol positibo gisa, autoklabatutako zelulak erabili ziren (121°C, 30 min) [174].

#### 3.5.3 Proteina aterakin totalaren erauzketa

Proteina aterakin totala biltzeko,  $5 \times 10^5$  konidio/ml inokulatu ziren 150 ml PDSn 37°C-tan, 120 rpm, 24 orduz. Ondoren, kultiboa zentrifugatu zen (11.400 g, 5 min, 4°C), eta PBSrekin bi aldiz garbitu zen. Zelulen pastillei PBS gehitu zitzaie, % 1 (b/b) 2-merkaptotanol eta % 1 (b/b) pH 3–10 anfolitoekin (GE Healthcare). Zelula-haustura 5.1 atalean zehaztutako prozedura bera erabiliz gauzatu zen.

### 3.5.4 *L. prolificansen sekretomaren azterketa*

#### 3.5.4.1 Sekretomaren bilketa

Lehenik eta behin, *L. prolificanse* jakituriko proteinak erazteko bi metodologia desberdin frogatu ziren. Ondoren, jakituriko proteinak bi dimentsioko elektroforesi (2DE) bidez bereizi eta aztertu ziren.

- *Kultiboaren gainjalkina iragaziz lortutako sekretoma*

Lehenik,  $10^6$  konidio/ml inokulatu ziren 300 ml Sabouraud dextrosa saldan (Panreac, Bartzelona, Espainia), PDSn eta legami-aterakina eta glukosa zeukan kultibo-ingurunean (% 0,5 (p/b) legami-aterakina, % 2 (p/b) glukosa; 5 kDa-ko poroarekin iragazi zen). Konidioak inkubatu ziren 37°C-tan, 120 rpm, eta kultiboak 3, 7, 14 eta 21 egunetan jaso ziren.

Ondoren, zelulak bereizteko asmoz, kultiboak iragazki paperarekin iragazi ziren, huts-ponpa baten laguntzaz; eta ostean 0,22 µm-ko iragazkien bidez esterilizatu zen (Merck Millipore, Cork, Irlanda). Ondoren, 6 aldiz kontzentratu zen Sartoriusen ultrairagazketa aparatu baten bidez (Gotinga, Alemania) 500 ml/minutuko abiaduran, 5 kDa-eko poro tamainako mintza erabiliz. Ondoren, kontzentratua 4°C-tan dializatu zen PBSrekin agitazioan, 6-8 kDa-eko poro tamainako mintza erabiliz (Orange Scientific, Belgika), eta zentrifugatu zen polisakarido disolbaezinak eta zelula-soberakinak kentzeko (11.400 g, 30 min, 4°C).

- *PBS-glukosan lortutako sekretoma*

Da Silva *et al*-ek (2012) *S. boydii* onddoaren sekretoma biltzeko deskribatutako metodologia erabili zen, aldaketa txikiekin.  $10^6$  konidio/ml inokulatu ziren 300 ml PDSn 24 orduz (37°C, 120 rpm). Ondoren, kultiboak iragazki-paperarekin iragazi ziren eta PBS esterilarekin bi aldiz garbitu ziren. Onddoak jaso eta % 2ko PBS-glukosan inkubatu zen, 20 orduz 1 g micelio/ml-ko kontzentrazioan 37°C-tan (120rpm). Azkenik, zentrifugatu zen (2.500 g, 20 min, 4°C), gainjalkina jaso zen, eta 0,22 µm-ko iragazkien bidez esterilizatu zen.

#### 3.5.4.2 Osotasun zelularra eta proteina zitoplasmatikoen absentsia egiaztatzea

Gainjalkinak bildu ondoren, onddoaren osotasun zelularra aztertu zen, sekretoman proteina zitoplasmatikorik ez zegoela baieztatzeko. Horretarako, onddoaren laginak mikroskopia optikoan aztertu zituzten. Era berean, laktato deshidrogenasaren (LDH) jarduera entzimatihoa



neurtu zen jasotako soberakinetan. LDHren entzima-jarduera aztertzeko, substratua (10 µl 1M pirubato, 770 µl 100 mM Tris-HCl (pH 7,1)) 30°C-ra aurretik inkubatu zen 5 minutuz. Ondoren, 20 µl 15 mM NADH eta 200 µl lagin gehitu zitzaizkion substratuari, eta xurgapena 60 segundoro 340 nm-ra neurtu zen 5 minutuz. Esperimentuaren kontrol positibo gisa, LDH purua erabili zen.

#### 3.5.4.3 Metodologiaren alderaketa

Sekretomak hirutan bildu ziren. Proteinen kontzentrazioa Pierce BCA Protein Assay Kit-a (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, AEB) bidez kuantifikatu zen, eta bildutako proteinen kalitatea elektroforesi bidez aztertu zen. Akrilamida % 12,5eko gelak erabili ziren, CBB G-250rekin (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, AEB) tindatu zirenak eta ImageScanner III (GE Healthcare) erabiliz digitalizatu zirenak.

### 3.6. ELISA bidezko listuko IgAren detekzioa

ELISA testa hirutan egin zen, 40 pertsona osasuntsuen listu-laginak erabiliz. Antigeno gisa, beroaren bidez inaktibatutako konidioak edo konidioen proteinak erabili ziren. Horretarako,  $8 \times 10^5$  konidio edo 5 µg proteina gehitu zitzaizkien ELISA plaken putzuei, eta 4°C-tan inkubatu ziren gauzez. Ondoren, putzuak blokeatu ziren ordubetez Tris duen gatz-soluzioarekin (TBS), % 5 (p/b) esne hautsarekin eta % 0,05 (b/b) Tween 20rekin. Listu-laginak 1/4 diluitu ziren % 0,05 (b/b) Tween 20 zeukan TBSrekin (TBST), eta ordubetez inkubatu ziren. Ondoren, putzuak hiru aldiz garbitu ziren TBSTrekin, eta TBSTen 1/50.000 diluitutako eta errefau pikantearen peroxidarekin (HRP) markatutako giza anti-IgArekin (Sigma-Aldrich) inkubatu ziren 30 minutuz. Putzuak TBSTrekin hiru aldiz garbitu ziren eta TMBrekin (Sigma-Aldrich) inkubatu ziren 30 minutuz. Azkenik, erreakzioak 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gehituz gelditu ziren eta plaken irakurketa 450 nm-tan egin zen BioTek SynergyHT (BioTek Instruments, Winooski, VT, AEB) plaka-irakurgailua erabiliz. Inkubazio guztiak giro-tenperaturan egin ziren, besterik adierazi ezean.

### 3.7. Elektroforesia

#### 3.7.1. Dimentsio bateko elektroforesia (1DE)

Proteina-laginen hiru bolumen nahastu ziren 4x karga-tanpoiaren bolumen batean (% 20 (p/b) SDS, 0,5 M Tris (pH 6,8), 2 M DTT, % 60 (b/b) glizerol). Elektroforesia Miniprotean II-n (Bio-Rad) egin zen 70 mA-tan, % 12,5eko akrilamida zuten gelak erabiliz. Pisu molekularreko

markatzaile bezala PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, AEB) erabili ziren.

### 3.7.2. Bi dimentsioko elektroforesia (2DE)

#### 3.7.2.1. Proteinen prezipitazioa

Proteinen prezipitazioa lau azetona bolumenetan egin zen, % 10 (p/b) azido trikloroazetiko (TCA) eta % 0,07 (b/b) 2-merkaptoetanolarekin, -20°C-tan ordubetez. Denbora hori igarota, 20 minutuz zentrifugatu ziren 14.100 g-ra, eta pastillaz azetonarekin garbitu ziren, airera lehortu eta errehidratazio-tanpoian (7 M urea, 2 M tiourea, 20 mM Tris, % 4 (p/b) Chaps, % 1 (b/b) anfolitoak, % 1 (b/b) 2-merkaptoetanola, % 0,001 (p/b) bromofenol urdina) erresuspenditu ziren.

Sekretomako proteinen prezipitazioa azetona bolumen batean egin zen, % 20ko (p/b) TCA eta % 0,07ko (b/b) 2-merkaptoetanolarekin, -20°C-tan ordubetez. Behin ordua igarota, zentrifugatu ziren (11.400 g, 45 min, 4°C), gainjalkina baztertu zen eta lortutako pastillak hiru aldiz garbitu ziren azetona hotzarekin, airean lehortu ziren eta errehidratazio-tanpoian erresuspenditu ziren (7 M urea, 2 M tiourea, 20 mM Tris, % 4 (p/b) CHAPS, % 0,5 (b/b) anfolitoak, 20 mM DTT, % 0,002 (p/b) bromofenol urdina). Laginak hiru aldiz sonikatu ziren 2 pultsurekin 40ko anplitudearekin 2 minutuz, eta zikloen artean 2 minutuz izotzean mantendu ziren. Laginak -20°C-tan gorde ziren erabili arte.

#### 3.7.2.2. Isoelektroenfokea (IEF) eta 2DEa

IEF prozesua bi tamainatako IEF geletan gauzatu zen, 7 zm eta 18 zm-koak, Ettan IPGphor (GE Healthcare) erabiliz eta gel tamaina bakoitzerako protokolo ezberdinak erabiliz. Bi kasuetan Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) eta PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder-ak (Thermo Fisher Scientific) pisu molekularreko markatzaile gisa erabili ziren. Proteinen kontzentrazioa Pierce 660 nm Protein Assay Reagent-en bidez (Thermo Fisher Scientific). neurtu zen

- *7 zm-ko gelak*

IEFrako 180 µg proteina kargatu ziren Immobiline DryStrip pH 3–10 (GE Healthcare) tiretan, eta honako protokoloa erabili zen 10 orduko errehidratazioa, 500 V 2.000 Vhr-ra, 1.000 V 3.000 Vhr-ra, 5.000 V 10.000 Vhr-ra, eta 5.000 V 40.000 Vhr-ra; 50 µA tira bakoitzeko. Behin amaituta, tirak bi aldiz inkubatu ziren 15 minutuz oreka-tanpoian (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH

6,8, % 25,5 (b/b) glizerola, % 2 (p/b) SDS, % 0,002 (p/b) bromofenol urdina), lehenengo % 1 (p/b) DTTrekin eta ondoren % 2,5ekin (p/b) iodoazetamidarekin. Azkenik, bigarren dimentsioa Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) sisteman gauzatu zen 70 mA-ra, % 12,5eko poliakrilamida zuten gelak erabiliz.

- *18 zm-ko gelak*

IEFa Immobiline DryStrip pH 3–10 (GE Healthcare) eta ReadyStrip™ IPG Strips pH 3-6 (Bio-Rad) tiretan gauzatu zen, 400 µg proteinarekin kargatu zirenak. Honako protokolo hau erabili zen 12 ordu errehidratazioan, 500 V 2.000 Vhr-ra, 1.000 V 9.000 Vhr-ra, 8.000 V 20.000 Vhr-ra, 8.000 V 100.000 Vhr-ra, eta 8.000V 10.000 Vhr-ra; 50 µA tira bakoitzeko. Ondoren, tirak 15 minutuz inkubatu ziren bi aldiz oreka-tanpoian (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 6,8, % 25,5 (b/b) glizerola, % 2 (p/b) SDS, % 0,002 (p/b) bromofenol urdina), lehenengo % 1 (p/b) DTTrekin eta ondoren % 2,5 (p/b) iodoazetamidarekin. Azkenik, 2DEa PROTEAN II xl Cell-en (Bio-Rad) gauzatu zen, gel bakoitzeko 45 mA erabiliz, hozte baldintzetan, eta %12,5eko poliakrilamida gelak erabiliz.

Sekretomaren laginetarako, lehen deskribatutako protokolo berdina jarraitu zen, aldaketa txikiekin. Laginak zentrifugatu ziren (14.100 g, 20 min) IEF prozesuaren aurretik, eta gainjalkina jaso zen. IEF protokoloari 150 V 300 Vhr-ra hasierako urratsa bezala gehitu zitzaion. IEF prozesua amaitu ondoren, aurreko protokoloa jarraitu zen, kasu honetan 2DErako % 13ko poliakrilamida gelak erabiliz.

### **3.8. Proteina eta antigenoen detekzioa**

#### *3.8.1. Proteinen detekzioa*

Gelak CBB G-250rekin (Sigma-Aldrich) tindatu ziren eta ondoren ImageScanner III-a erabiliz digitalizatu ziren. 2DE guztiak hiru aldiz egin ziren, eta hauetatik soilik gel adierazgarrienak erakutsi dira emaitzetan. Irudi-analisia ImageMaster 2D Platinum Softwarea (GE Healthcare) bidez egin zen.

#### *3.8.2. Antigenoen detekzioa*

Lehenik eta behin, geletako proteinak Hybond-P PVDF (GE Healthcare) mintzetara elektrotransferitu ziren Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell-a (Bio-Rad) bidez. 7 zm-ko IEF tirekin lortutako 2DEko gelak eta 1DEaren ondoren lortutakoak 400 mA-tan

elektrotransferitu zuten 20 minutuz, eta 18 zm-ko 2DEko gelak, berriz, 400 mA-ra 2 orduz. Bi kasuetan, proteinen transferentzia zuzena baiezatzeko, mintzak Ponceau Gorriarekin tindatu ziren (% 0,2 (p/b) Ponceau Gorria, % 1 (b/b) azido azetikoa). Proteina immunoerreaktiboak ECL Plus (GE Healthcare) erabiliz detektatu ziren G BOX Chemi system-ean (Syngene), fabrikatzailearen jarraibideak jarraituz. Western Bloten (WB) irudi-analisirako ImageMaster 2D Platinum Softwarea erabili zen.

#### 3.8.2.1. Giza-listuek ezagututako antigenoen detekzioa

Lehenik eta behin, mintzak ordu betez blokeatu ziren TBSn (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl), % 7ko (p/b) esne hautsarekin (TBSL). Ondoren, mintzak giza-listuan inkubatu ziren, % 7 (p/b) esne hautsarekin eta % 0,25 (b/b) Tween 20rekin. Mintzak 3 aldiz garbitu ziren TBSn, 10 minutu aldi bakoitzeko. Bigarren antigorputz gisa, anti-giza IgA erabili zen, HRParekin markatutakoa, eta 1/100.000 diluitua TBSLn, % 0,25 (b/b) Tween 20rekin. Azkenik, mintzak hiru aldiz garbitu ziren TBSrekin, 10 minutuz aldi bakoitzeko. Inkubazio guztiak giro-tenperaturan egin ziren.

*L. proliferans*en antigenoen prebalentzia aztertzeko, erreplika bakarra egin zen erabilitako 20 listu-lagin bakoitzerako, eta espezieen arteko azterketa konparatiborako, esperimenduak hiru aldiz egin ziren espezie bakoitzerako. Antigenoen bolumen erlatiboa *heatmap* batean irudikatu zen GraphPad Prism erabiliz (7. bertsioa; Graph Prism Software Inc., San Diego, CA, AEB).

#### 3.8.2.2. Infektatutako saguek ezagututako antigenoen detekzioa

Proteina immunoerreaktiboak detektatzeko, lehenik eta behin mintzak 2 orduz blokeatu ziren TBSn, % 5 (p/b) esne hautsarekin eta % 0,1 (b/b) Tween 20rekin (TBSL). Ondoren, mintzak TBSLn diluitutako sagu serumekin inkubatu ziren 4°C-tan gauetz. Denbora hori igarota, antigorputz soberakina kendu zen, TBSrekin 5 minutuko lau garbiketa eginez. Ondoren, mintzak HRPrekin markatutako anti-sagu IgGarekin inkubatu ziren, TBSLn 1/100.000 diluitutakoa. WBen inkubazioak giro-tenperaturan egin ziren, kontrakoa adierazi denean izan ezik. bi dimensioko WB (2DWB) guztiak hiru aldiz egin ziren, emaitzen atalean irudi adierazgarrienak bakarrik erakutsiz.

### 3.9. Proteina immunoerreaktiboen identifikazioa

Antigeno nagusienak eskuz erauzi ziren G-250rekin tindatutako geletatik eta UPV/EHUko SGiker-ean LC-MS/MS bidez identifikatu ziren. Ateratako gel zatiak digestio tanpoian murgildu

ziren (50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 12,5 ng/ $\mu\text{L}$  tripsina (Roche, Basilea, Suitza)) eta 37°C-tan inkubatu ziren gauzez. Ondoren, peptidoak erauzi ziren, lehenik 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  eta azetonitriloarekin (ACN), eta, ostean, % 0,1 (b/b) azido trifluoroazetiko eta ACNrekin. Bildutako gainjalkinak nahastu ziren, SpeedVac batean lehertu ziren (Thermo Electron, Waltham, MA, AEB), % 0,1 (b/b) azido formikoko (AF) 10  $\mu\text{L}$ -tan disolbatu ziren eta 5 minutuz sonikatu ziren.

LC-MS/MSa SYNAPT HDMS masa espektrometroan (Waters, Milford, MA, AEB) gauzatu zen, nanoAcquity UPLC System-arekin (Waters) interkonektatuta. Horretarako, lagin bakoitzaren 8  $\mu\text{L}$  Symmetry 300 C18 batean kargatu ziren, 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm-ko aurrezutabea (Waters), eta % 0,1 (b/b) AFrekin garbitu ziren, 3 minutuz 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ -ko emarira. Aurrezutabea BEH130 C18 batera konektatu zen, 75  $\mu\text{m}$  x 200 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters), % 3 (b/b) ACN eta % 0,1 (b/b) AFn orekatuta. Peptidoak % 3-60 (b/b) ACNko 30 minutuko gradiente linealarekin eluitu ziren zuzenean NanoEase Emitter batean (Waters). Kapilare-tentsioa 3.500 V-ra egokitu zen, eta datuen mendeko MS/MS eskuraketak 2, 3 edo 4ko karga-egoerak zituzten aitzindarietan egin ziren, 350-1.990eko m/z tartean.

Lortutako espektroen prozesamendua VEMS [192] erabiliz egin zen, eta bilaketa ondoetara mugatutako NCBIko datu base ez-erredundantean (nr) egin zen (20150309 bertsioa), MASCOT online zerbitzaria erabiliz (Matrix Science Ltd., Londres, Erresuma Batua; <http://www.matrixscience.com>). Proteinak identifikatzeko, zisteinen karbamidometilazioa aldaketa finko gisa hartu zen, eta metioninen oxidazioa aldaketa aldakor gisa. Puntu baterainoko zatiketa galera onartu zen, eta 50 ppm-ko eta 0,1 Da-ko balioak ezarri ziren peptidoen eta fragmentuen masa tolerantziarako, hurrenez hurren. Puntu bererako emaitza bat baino gehiago lortu zen kasuetan, puntuan hobekien identifikatutako proteinarentzat lortutako MASCOT puntuazioren % 60tik gorako balioa eta  $\geq$  % 5eko estaldura zuten proteinak bakarrik adierazi ziren.

### **3.10. Shock termikoaren proteina 70 kDa-aren elektroeluzioa (Hsp70)**

Hsp70ari zegozkien puntuak eskuz erauzi ziren Coomassie R-250arekin (Sigma-Aldrich) tindaturiko *L. proliferans*en proteina aterakin totalaren 2DE geletatik. Erauzitako gel zatien proteinak 422 Electro-eluter sistemarekin (Bio-Rad) elektroeluitu ziren, fabrikatzailearen jarraibideak betez. Prozesuaren eraginkortasuna areagotzeko asmoz, elektroeluzio-aparatuaren hodi bakoitzean Hsp70 zeukaten bi puntu gehitu ziren, eta puntu bakoitza hiru zatitan moztu zen. Proteinak 10 mA/hodi-tan (60 mA guztira) eluitu ziren 5 orduz. Ondoren, elektroeluitutako laginak 1DE bidez aztertu ziren, % 12ko akrilamida gelak erabiliz.

### 3.11. *L. prolificansen* antigenoen kokapena, funtzioa eta homologiaren analisi bioinformatikoa

Antigenoen kokapena eta funtzionaltasuna sekuentzien analisi bioinformatikoaren bidez aztertu ziren. Zehazki, TargetP softwarea (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) erabili zen kokapena iragartzeko, eta SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) sekrezio-biderako. Emaitzak positibotzat hartu ziren, puntuazioa  $\geq 0,5$  zenean TargetPrentzat eta  $\geq 0,6$  zenean SecretomeP 2.0rentzat. Gainera, atxikidura propietateak iragartzeko FaaPred (<http://bioinfo.icgeb.res.in/faap/>) erabili zen,  $-0,8$ ko puntuazio-atalasea erabiliz. Azkenik, proteinen funtzionaltasuna, familia eta domeinuak aztertzeko Interpro datu basea erabili zen (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Proteinak talde funtzionaletan eskuz sailkatu ziren.

*L. prolificansen* proteinen homologia NCBIko Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) erabiliz aztertu zen, *Homo sapiens*, *Scedosporium* spp., *Aspergillus fumigatus* eta *Candida albicans* proteinen sekuentzia ez-erredundanteekin (nr) alderatuz. Antigenoen homologia *heatmap* batean irudikatu zen GraphPad Prism erabiliz.

### 3.12. *A. fumigatus* eta *L. prolificansen* arteko giza-listuko IgAren errektibitate gurutzatuaren azterketa

*A. fumigatus*en  $10^{10}$  konidio jaso ziren, eta ordubetez giro-tenperaturan 40ml-ko listu-nahasketan inkubatu ziren. Esekidura hori zentrifugatu zen (4.500 g, 20 min), gainjalkina deuseztatu zen, eta konidioak hiru aldiz garbitu ziren 20 ml TBSrekin. Zelulei lotutako antigorputzak askatzeko, konidioak 0,1 M glicina-HCl tanpoiaren (pH 2,5) 20 ml-tan inkubatu ziren 3 orduz. Azkenik, gainjalkina zentrifugazio bidez jaso zen (4.500 g, 20 min) eta TBSn dializatu zen. *A. fumigatus* eta *L. prolificansen* arteko errektibitate gurutzatua hirutan aztertu zen 2DWB bidez. Purifikatutako anti-*A. fumigatus* IgAk ezagututako antigenoak detektatzeko, konidioen proteina aterakinak zituzten mintzak erabili ziren.

### 3.13. Analisi estatistikoa

Estatistika analisiak SPSS erabiliz egin ziren (Windowserako 17.0 bertsioa; Chicago, IL, AEB). ELISAn hiru espezieentzat lortutako absorbantzien arteko aldeak bide bateko ANOVA testaren bidez aztertu ziren, % 95eko konfiantza-tartearekin.

Bi sagu-taldeen organoen onddo-kargak alderatzeko T-student testa erabili zen. Bi talde baino gehiagoren onddo-karga alderatzeko bi bideko ANOVA proba erabili ziren, eta ondoren

alderaketa anitzak egin ziren, Dunnett probarekin zuzenduta. Datuak grafikoetan adierazi ziren GraphPad Prism bidez. Esangura-maila  $p \leq 0,05$ ,  $0,01$  eta/edo  $0,001$  izan zen konparazio guztietarako.





---

**Emaizak**

---



#### **4.1. Emaile osasuntsuen listuko IgAk ezagututako *L. proliferans* konidioen antigenoen identifikazioa. Hauen prebalentziaren, kokapenaren eta *A. fumigatus*ekin daukaten erreaktibitate-gurutzatuaren azterketa**

##### *4.1.1. Emaile osasuntsuen listuko IgAk ezagututako *L. proliferans* antigenoen prebalentzia eta erreaktibotasunaren azterketa*

Giza listuko IgAk ezagututako *L. proliferans*-en proteina immunoerreaktiboak 2DWB bidez detektatu ziren. 20 listu-lagin erabiliz lortutako immunomak listu-laginen nahasketa erabiliz lortutakoarekin alderatu ziren. Horrela, 104 puntu erreaktibo detektatu ziren, gehienak 4 eta 7 pI arten kokatuta eta 25 kDa baino gehiagoko Mr-rekin. Horietatik, 10 puntu listu-laginen % 50 baino gehiagorekin erreakzionatu zuten. Zehazki, ziklofilina eta enolasa izan ziren prebalentzia altuenarekin ezagututako antigenoak, WBen % 85 eta % 80an detektatu zirelarik, hurrenez hurren (4.1. taula, 4.1A-B irudiak). Gainera, ziklofilina hiru puntutan identifikatu zen antzeko Mr-rekin, baina pI ezberdinekin.

Antigeno bakoitzaren bolumen erlatiboa *heatmap* batean irudikatu zen, non banakoen arteko ezberdintasun handiak detektatu ziren (4.2A irudia). Puntuen bolumen erlatiboaren eta prebalentziaren artean erlazio zuzenik antzeman ez arren, espero bezala, ziklofilina eta enolasa bolumen erlatibo handiena zuten antigenoen artean detektatu ziren (4.2B irudia).

##### *4.1.2. *L. proliferans* antigenoen kokapena eta funtzioen azterketa*

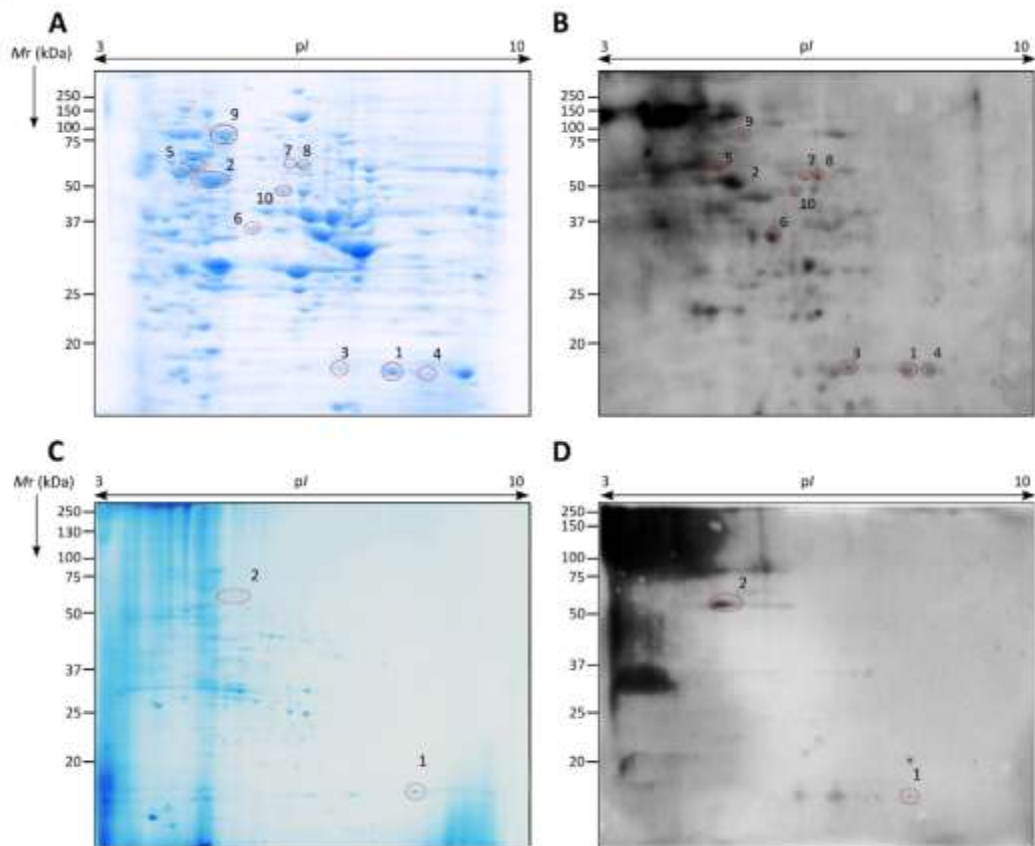
Ikerketa honetan identifikatutako *L. proliferans* antigeno nagusien kokapena aztertzeko bi metodo erabili ziren bioinformatikoa eta enpirikoa. Analisi bioinformatikoen antigenoen % 40ren kokapen mitokondrial iragarri zuten, zehazki, ziklofilinaren hiru isoformena eta cys-gly metalopeptidasarena (MEP). Bestalde, ez zuten iragarri jarriatutako antigenorik. Amaitzeko, analisi bioinformatikoen malato deshidrogenasaren (MDH) atxikidura-propietateak detektatu zituzten (4.2C irudia).

Bestalde, zelula-paretari lotutako proteinen proteoman 119 puntu detektatu ziren, eta horietatik IgAk ezagututako 34 antigeno detektatu ziren (4.1C-D irudiak). Horien artean, bi puntuk aurretik identifikatutako enolasaren eta prebalentzia altueneko ziklofilinaren Mr y pI berdinak zeuzkaten. Bi puntuak 2DE geletik erauzi eta LC-MS/MS bidez identifikatu ziren (4.1. taula).

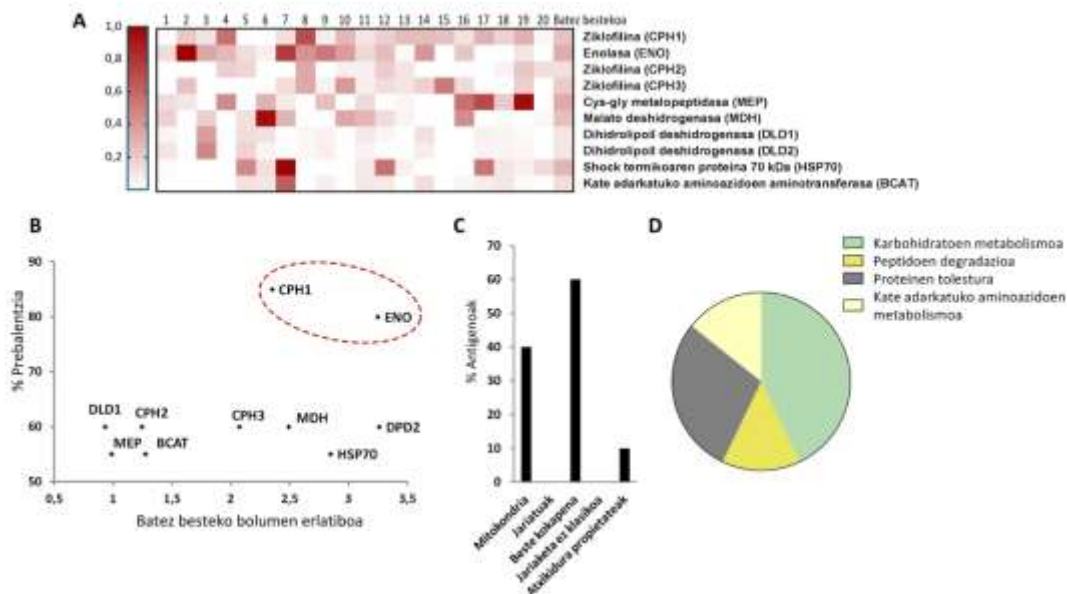
Identifikatutako antigenoen funtzionaltasuna Interpro datu-basearekin (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) aztertu zen, eta proteinak eskuz talde funtzionaletan sailkatu ziren. Azterketa honetan, identifikatutako proteina gehienak karbohidratoen metabolismoarekin eta proteinen tolesdurarekin erlazionatuta zeudela deskribatu zen (4.2D irudia).

**4.1. taula. Giza IgAk ezagututako *Lomentospora prolificans*en konidioen prebalentzia altueneko antigenoen eta pareta zelularreko antigenoen LC-MS/MS bidezko identifikazioa**

Puntu zk.	Prebalentzia (%)	Sarbide zk.	Proteinaren izena	Mikroorganismoa	Peptidoak (zk.)	Estaldura (%)	MASCOT puntuazioa	pI/Mr (kDa) teorikoa	pI/Mr (kDa) esperim.
<b><i>L. prolificans</i>en konidioen antigeno prebalenteak (4.1A irudia)</b>									
1	85	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ziklofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	5	26	352	9,79/27,09	8.22/19,11
2	80	PKS06586.1	Enolasa (hp_jhhlp_007334)	<i>L. prolificans</i>	13	42	1415	5,20/47,46	5.38/55,33
3	60	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ziklofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	7	34	276	9,79/27,09	7.49/18,32
4	60	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ziklofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	4	21	258	9,79/27,09	8.76/16,24
5	60	PKS07553.1	Cys-gly metalopeptidasa dug1 (hp_jhhlp_006157)	<i>L. prolificans</i>	9	23	482	5,87/61,40	4.63/53,19
		PKS11975.1	Alfa tubulina (hp_jhhlp_001271)		5	19	479	4,91/50,79	
6	60	PKS11886.1	Malato deshidrogenasa (hp_jhhlp_001180)	<i>L. prolificans</i>	14	58	924	5,87/34,74	5.89/36,02
7	60	PKS07073.1	Dihidrolipoil deshidrogenasa (hp_jhhlp_005670)	<i>L. prolificans</i>	11	13	972	5,88/129,04	6.42/60,10
8	55	PKS07073.1	Dihidrolipoil deshidrogenasa (hp_jhhlp_005670)	<i>L. prolificans</i>	9	10	372	5,88/129,04	6.63/56,11
9	55	PKS12794.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp_jhhlp_001005)	<i>L. prolificans</i>	19	53	2663	5,61/68,51	5.25/69,84
		PKS08780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp_jhhlp_003389)		20	45	2490	5,91/72,39	
		PKS08876.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp_jhhlp_003489)		20	45		5,82/72,44	
10	55	PKS06327.1	Kate adarkatuko aminoazidoen usteko aminotransferasa TOXF (hp_jhhlp_007075)	<i>L. prolificans</i>	9	37	644	5,89/42,19	6.08/43,97
<b><i>L. prolificans</i> konidioen pareta zelularreko proteinak (4.1C irudia)</b>									
1	-	PKS08256.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ziklofilina) (hp_jhhlp_005199)	<i>L. prolificans</i>	3	15	147	9,79/27,09	8.22/16,60
2	-	PKS06586.1	Enolasa (hp_jhhlp_007334)	<i>L. prolificans</i>	6	22	325	4,20/47,46	5.38/52,01



**4.1. irudia. *Lomentospora prolificans* konidioen 2DE bidezko proteoma eta immunoma.** Proteoma osoaren (A) eta giza listuko IgAk ezagututako immunomaren (B) irudi adierazgarriak. Listu-laginen % 50ek baino gehiagok detektatutako puntu antigenikoak markatuta daude. Zelula-paretako proteinekin lortutako proteomaren (C) eta giza listuko IgAk ezagututako immunomaren (D) irudi adierazgarriak. Markatutako puntuak ziklofilinari (1) eta enolasari (2) dagozkie.



**4.2. irudia.** Emaila osasuntsuen IgAk ezagututako *Lomentospora prolificans*-en prebalentzia altuko antigenoen prebalentzia, bolumen erlatiboa, kokapena eta funtzioa. Bolumen erlatiboaren irudikapena *heatmap* bidez (A), eta prebalentziaren eta bolumen erlatiboaren irudikapena grafikari (B). Kokapen zelularren eta atxikidura-propietatearen analisi bioinformatikoa (C) eta antigenoen sailkapen funtzionala (D).

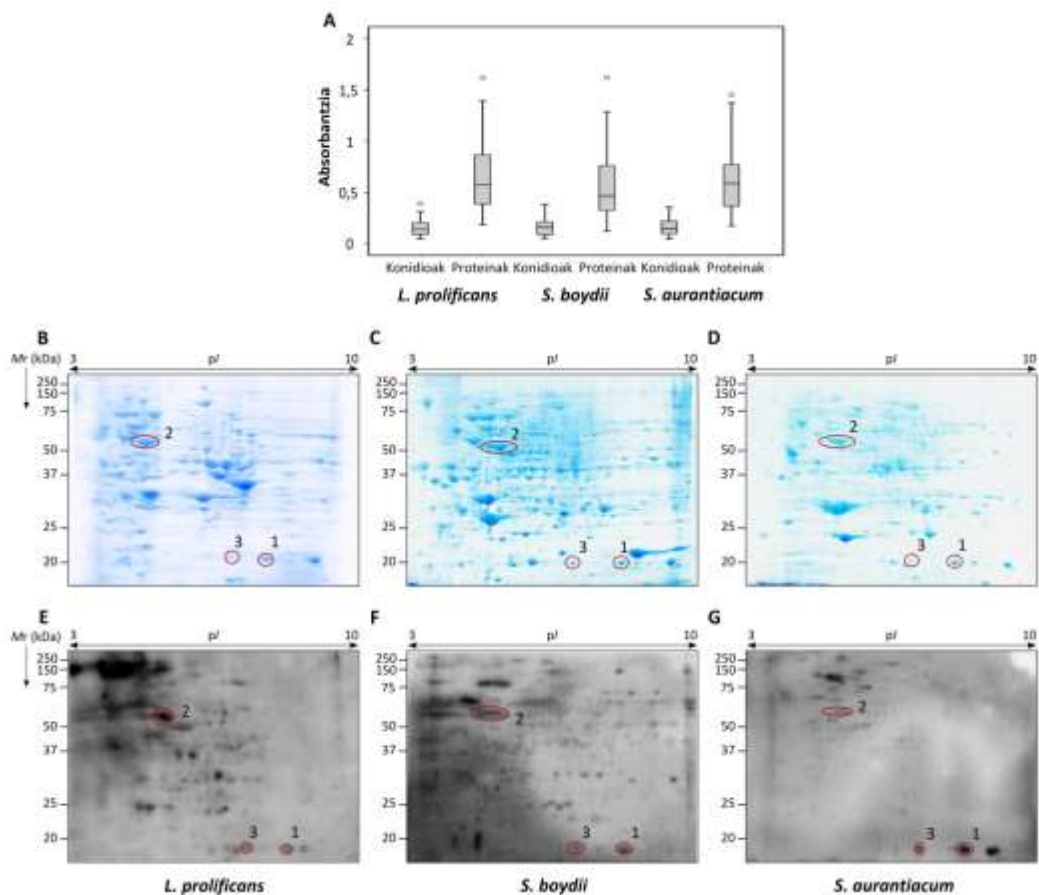
#### 4.1.3. Listuko IgAren *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieen ezagutze-konparatiboa populazio osasuntsu batean

*L. prolificans* filogenetikoki *Scedosporium* generoarekin estuki lotua dagoenez, listuko IgAren *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieen ezagutzea ELISA bidez alderatu zen, antigeno bezala konidio osoak zein aterakin proteikoak erabiliz. Bi azterlanek antzeko errektibotasun-maila erakutsi zuten hiru espezieen artean, eta datuen sakabanatze handia (4.3A irudia). Gainera, nabarmendu behar da proteinen aterakin osoarekin egindako ELISAn absorbantzia balore askoz altuagoak lortu zirela, konidio osoekin lortutako emaitzekin alderatuta.

Beste alde batetik, bigarren ikerlan bat aurrera eraman zen, *L. prolificans*-en antigeno nagusienak *S. boydii* eta *S. aurantiacum*-en ere bazeuden aztertzeko 2DE eta WB bidez. Patroi proteomiko eta immunomiko oso ezberdinak detektatu ziren, *Scedosporium* generoko bi espezieen

artean antzekotasun handiagoak antzemanaz. Hala ere, hiru espezieen artean patroi amankomuna detektatu zen 4-6 pI artean eta 50 kDa baino gehiagoko Mr-arekin(4.3B-G irudia).

Immunomak aztertzean, gutxienez hiru antigeno komun detektatu ziren hiru espezieetan. *L. prolificans*-en immunomarekin konparatuz puntu hauek enolasa eta bi ziklofilinen Mr eta pI berdina zeukaten (4.3E-G irudia). Horietako bi, enolasa eta prebalentzia altueneko ziklofilina, LC-MS/MS bidez identifikatu ziren (4.2. taula).



**4.3. irudia.** ELISA testetaren emaitzak, eta *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium boydii* eta *Scedosporium aurantiacum*en proteoma eta immunoma adierazgarriak. *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum*en konidioen eta proteina aterakinen aurkako IgAren kontzentratio-alderaketa ELISA bidez (A). *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum*-en proteomak (B-D) eta listu-immunomak (E-G). Ziklofilinak (1, 3) eta enolasa (2) markatuta daude.



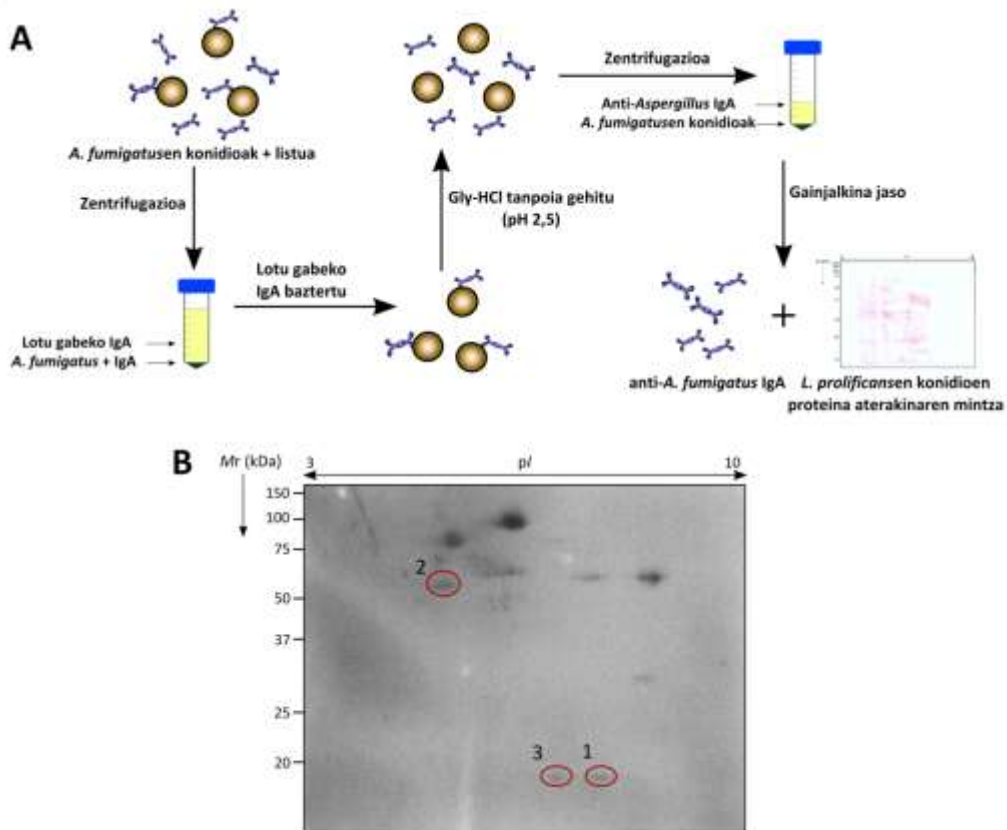
**4.2. taula. Giza IgAk ezagututako *Scedosporium boydii* eta *Scedosporium aurantiacum* konidioen antigenoen LC-MS/MS bidezko identifikazioa.**

<b><i>Scedosporium boydii</i>ren konidioak (4.3C irudia)</b>									
<b>1</b>	-	ATY62045.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ziklofilina)	<i>Cordyceps militaris</i>	2	13	156	9,69/24,94	8.28/16,84
<b>2</b>	-	XP_016644254.1	Enolasa	<i>S. boydii</i>	21	60	2390	5,19/47,50	5.32/48,71
<b><i>Scedosporium aurantiacum</i>ren konidioak (4.3D irudia)</b>									
<b>1</b>	-	KZL81228.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ziklofilina)	<i>Colletotrichum incanum</i>	5	20	460	9,66/25,90	8.04/16,13
<b>2</b>	-	XP_016644254.1	Enolasa	<i>S. boydii</i>	10	34	1396	5,19/47,50	5.24/52,59

#### 4.1.4. *A. fumigatus* eta *L. prolificans*en arteko erreaktibitate gurutzatuaren azterketa

*A. fumigatus* eta *L. prolificans*-en arteko erreaktibitate gurutzatua aztertzeko asmoz, espezifikoki *A. fumigatus*-en konidioei lotutako IgAk purifikatu ziren eta *L. prolificans*-en antigenoak detektatzeko erabili ziren WB bidez.

Ikerlan honetan, *A. fumigatus* konidioekin lotzeko gaitasunagatik purifikatutako antigorputzek ezagututako *L. prolificans*en 16 antigeno detektatu ziren. Hauen artean, giza listuko IgAk prebalentzia altuenarekin ezagututako antigenoak detektatu ziren, hau da, enolasa eta ziklofilina (4.4. irudia).



**4.4. irudia. *Aspergillus fumigatus* eta *Lomentospora prolificans* arteko listuko IgAren erreaktibitate gurutzatuaren azterlana.** *A. fumigatus*en konidioak listuarekin inkubatu ziren ordu betez 37°C-tan, eta, ondoren, bildu eta glizina-HCl tanpoian (pH 2,5) inkubatu ziren. *Aspergillus*ri lotutako antigorputzak askatzeko (A). Azkenik, purifikatutako eta dializatutako anti-

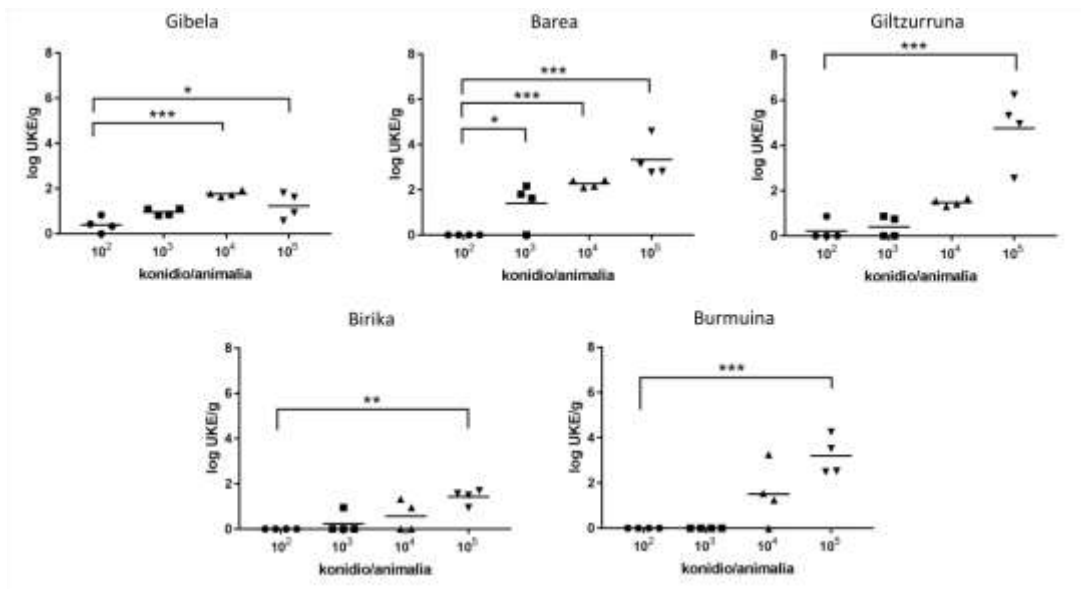
*A. fumigatus* IgAk *L. prolificans* konidioen proteinak detektatzeko erabili ziren WB bidez (B). Ziklofilinak (1, 3) eta enolasa (2) immunoblotean markatuta daude.

#### **4.2. *L. prolificans*ek eragindako infekzio barreiatuaren garapena saguetan eta patogeniaren alderaketa *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* espeziekin**

##### *4.2.1. Saguei L. prolificans*en konidioen dosi desberdinak administratu ondoren garatutako infekzioen azterketa

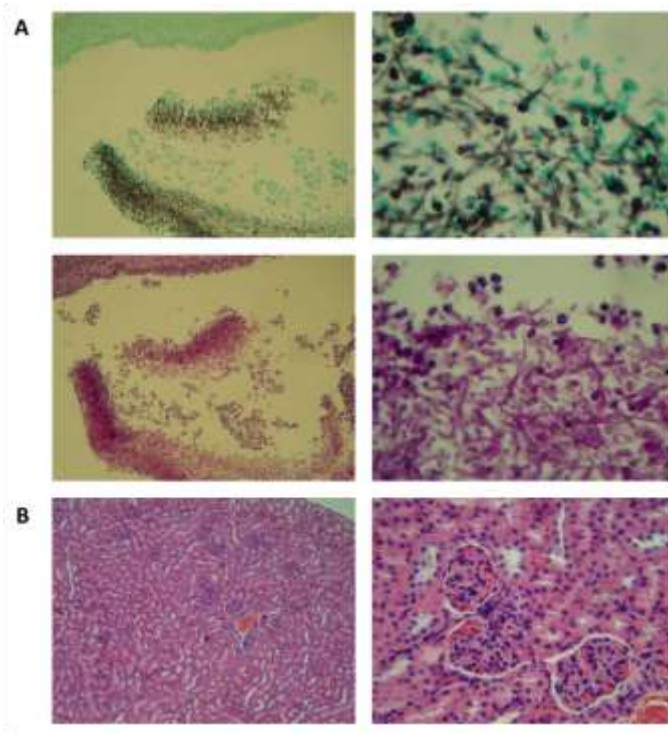
Lehenik eta behin, *L. prolificans*en konidioen dosi desberdinak eman zitzaizkien saguei zain barnetik. Horretarako, 5 sagu talde erabili ziren eta taldeko 4 sagu, dosi altueneko taldea izan ezik, hilkortasunaren ondorioz 8 sagu behar izan zituelako. Kontrol taldeari bakarrik gs-Tween 20 eman zitzaion eta gainerako taldeei honako konidioen dosiak eman zitzaizkien gs-Tween 20n  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  eta  $10^5$  konidio/animalia.

4.5. irudian ikus daitekeenez,  $10^2$  eta  $10^3$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako taldeetan UKE kopuru txikia zenbatu zen eta batez ere odol-zirkulazioarekin erlazionatutako organoetan detektatu ziren (barea, giltzurruna, gibela). Bestalde,  $10^4$  konidio/animali dosiarekin infektatutako saguen taldean, UKE kopuru handiagoa zenbatzeaz gain, onddoa garunean detektatu izana azpimarratzekoa da. Azkenik, dosi altuenarekin ( $10^5$  konidio/animalia) infektatutako taldean UKE kopuru oso altua jaso zen, desberdintasun estatistikoki esanguratsuak lortuz organo guztietan. Giltzurrunak, barea eta burmuina izan ziren organorik kaltetuenak dosi altuenarekin, eta  $4,77 \pm 1,58$ ,  $3,34 \pm 0,86$  eta  $3,20 \pm 0,86$  log UKE/g zenbatu ziren, hurrenez hurren.



4.5. irudia. Organoen onddo-kargaren emaitzak, zainetik *L. prolificansen* 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> konidio/animalia sartu ondoren. Onddo-kargak bi bideko ANOVA testa erabiliz alderatu ziren, erreferentziatuz 10<sup>2</sup> konidio/animalia dosiarekin infektatutako taldea hartuta; \* p < 0,05, \* p < 0,01 eta \*\*\* p < 0,001.

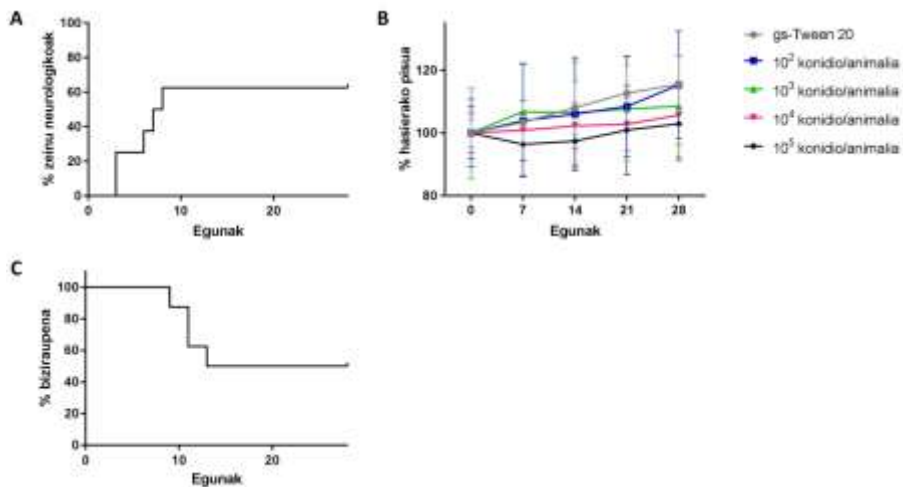
Organoen azterketa histologikoan soilik 10<sup>5</sup> konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen giltzurrunetan hauteman zen onddoa (4.6A irudia), konidio asko detektatuz. Gainerako taldeetan, ordea, ez zen kalterik antzeman. 6B irudian, kontrol-taldeko giltzurrunen ebaki histologikoak erakutsi dira adibide gisa.



**4.6. irudia. Zain barnetik *L. prolificansen*  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen giltzurrunen ebaki adierazgarriak, Grocottten zilar metenaminarekin tindatuak (goian) eta hematoxilina-eosinarekin (behean) (A). Hematoxilina-eosinarekin tindatutako kontrol-taldeko giltzurrunen ebaki adierazgarriak (B).**

Esperimentuak iraun zuen 28 egunetan zehar animalien ongizatearen eguneroko jarraipena egin zen, infekzioari lotutako zeinuen agerpena jasoz.  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguetan bakarrik hauteman ziren zeinuak. Zehazki, gehien behatu zirenak makurtutako sabelaldea, ile tentea, isolamendua, letargia iraunkorra, pisu-galera larria eta alterazio neurologikoak izan ziren. Induzitutako mugimenduen falta eta ustekabeko soinuei erantzun falta detektatu ziren, bai eta mugimendu errepikakorren presentzia ere. Detektatutako zeinu neurologiko nagusia alde baterantz makurtzea izan zen, batzuetan oreka erabat galtzearekin eta/edo ataxiarekin batera agertu zena. Zeinu hori inokulua eman eta hiru egunera behatu zen, eta infektatutako saguen % 62,5i eragin zien (4.7A irudia). Saguen pisuaren jarraipenak alderantzizko erlazioa erakutsi zuen hartutako pisuaren eta administratutako konidio kopuruaren artean (4.7B irudia). Horrela, pisu-galera handiena  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen taldean hauteman zen. Azkenik, infekzioarekin lotutako heriotzak soilik  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako taldean detektatu ziren. Lehenengo heriotza infektatu osteko 9. egunean

detektatu zen, eta % 50eko biziraupen-tasa lortu zen infektatu osteko 28. Eguneraa, hau da, 8 saguetatik 4 hil ziren (4.7C irudia).



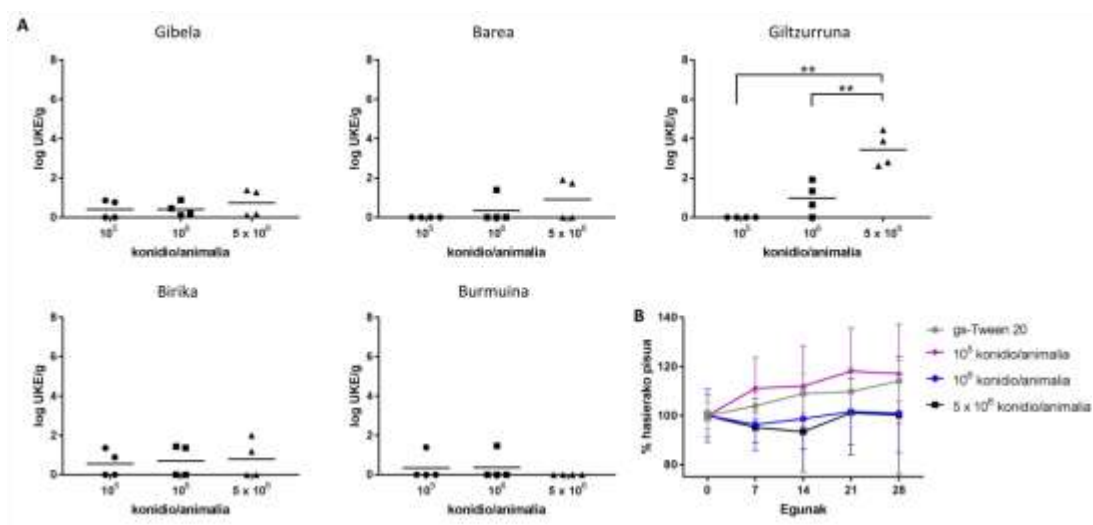
**4.7. irudia. Animalien ongizatearen monitorizazioa, *Lomentospora prolificansen* 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> konidio/animalia zain baretik administratu ondoren.** Zeinu neurologikoen detekzioa 10<sup>5</sup> konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguetan (A). Kontrol tardearen eta *L. prolificansen* inokulatutako saguen asteroko pisua (B). 10<sup>5</sup> konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen biziraupen-kurba (C).

Lortutako emaitzekin, 10<sup>5</sup> konidio/animalia dosia hautatu zen *L. prolificansen* infekzio barreiatua garatzeko gutxieneko dosi gisa (infekzio-dosia). Bestalde, 10<sup>2</sup> konidio/animalia dosiarekin inokulatutako saguetan UKE gutxi detektatu zirenez, eta infekzioari lotutako zeinu klinikorik detektatu ez zirenez, dosi hau infekzioa garatzeko gai ez zen kontaktu dosi gisa hautatu zen.

4.2.2. *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* espezieek saguetan eragindako zain barneko infekzioen azterketa konparatiboa

Aurreko atalean lortutako emaitzak kontuan hartuta, bai eta *Lomentospora* spp. eta *Scedosporium* spp generoen arteko hurbiltasun filogenetikoa ere, bi espezieentzat 10<sup>5</sup> konidio/animalia dosia erabili zen infekzio barreiatu bat sortzeko. *A. fumigatus*en kasuan, 3 sagu talde erabili ziren, eta 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> edo 5 x 10<sup>6</sup> konidio/animalia administratu zitzaizkien, infekzio-dosia hautatzeko.

A. *fumigatus*ekin infektatutako saguetan, korrelazio positiboa detektatu zen administratutako konidio kantitatearen eta bildutako UKEn artean. Konkretuki, dosi altuenarekin infektatutako saguen giltzurrunetan UKEn kopuru nabarmen altuagoa hauteman zen (4.8A irudia).  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin inokulatutako saguetan ez zen infekzioarekin lotutako zeinurik detektatu, ez eta pisu-galerarik ere (4.8B irudia).  $10^6$  konidio/animalia dosiarekin inokulatutako saguetan % 16,67n soilik detektatu ziren zeinuak, eta aldiz,  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin inokulatuen % 83,3n detektatu ziren. Azkenik,  $10^5$  eta  $10^6$  konidio/animalia dosiekin inokulatutako saguetan, biziraupen-tasa % 100ekoa izan zen, dosi handienarekin lortutako % 50aren aldean. Emaitza hauekin,  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosia A. *fumigatus*en infekzio-dosi gisa hautatu zen, heriotzak eta infekzio-prozesu bati lotutako zeinuak erakutsi zituen dosi bakarra izan baitzen.

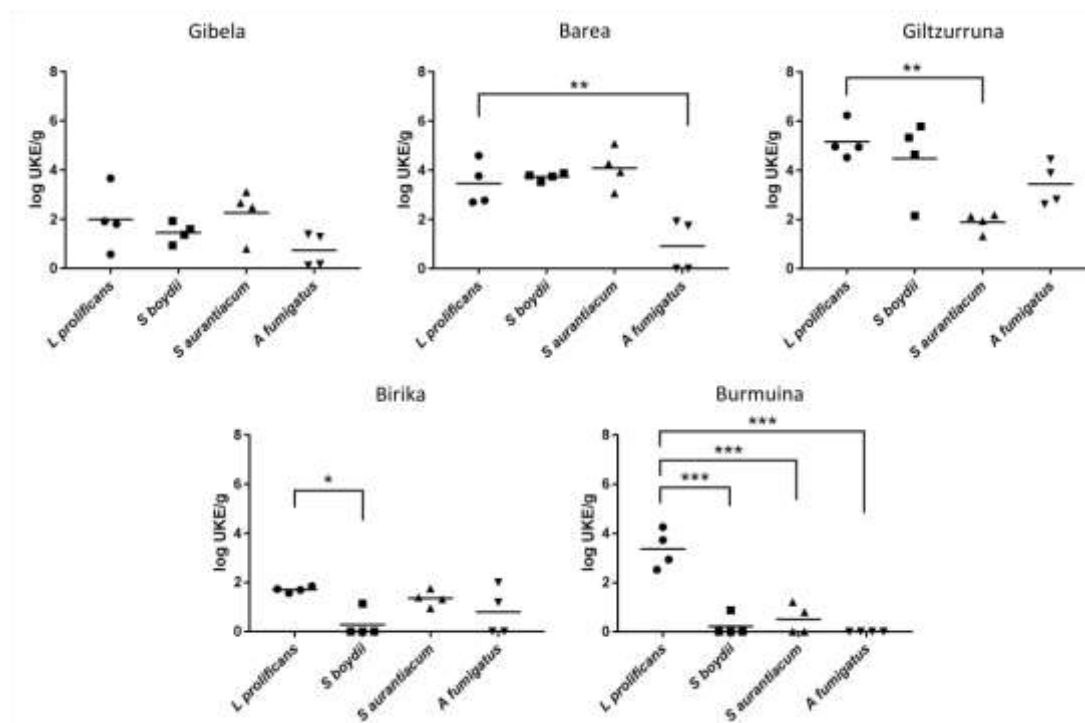


**4.8. irudia. Organoen onddo-karga eta saguen asteroko pisua zain barnetik A. *fumigatus* administratu ondoren.** Onddo-kargaren emaitzak (A) eta saguen asteroko pisua (B) gs-Tween 20 edo A. *fumigatus*en  $10^5$ - $5 \times 10^6$  konidio/animalia administratu ondoren. Onddo-karga bi bideko ANOVA testa erabiliz alderatu zen; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  eta \*\*\*  $p < 0,001$ .

Onddo-kargaren azterketan, UKEn kontaktetaren bidez, oso antzeko emaitzak lortu ziren *L. proliferans* eta *S. boydii* espezieekin infektatutako saguen giltzurrunetan eta barean (4.9. irudia). Bi taldeetan zenbatutako UKE kopuru altuak infekzio barreiatuaren garapena baieztatu zuen. Zehazki,  $5,17 \pm 0,7$  eta  $4,48 \pm 1,62$  log UKE/g-ko jaso ziren giltzurrunetan *L. proliferans* eta *S. boydii*arako,

hurrenez hurren, eta  $3,46 \pm 0,90$  eta  $3,74 \pm 0,15$  log UKE/g-ko barean. Aldiz, *S. aurantiacum*ekin infektatutako taldean, giltzurrunetan UKEen kopuru nabarmen txikiagoa zenbatu zen, *L. prolificans*ekin infektatutako saguekin alderatuta. Talde honetan, onddo-kargarik altuena zuten organoak barea, gibela eta giltzurrunak izan ziren  $4,09 \pm 0,83$  log UKE/g,  $2,26 \pm 1,01$  log UKE/g eta  $1,89 \pm 0,39$  log UKE/g, hurrenez hurren. *A. fumigatus*ekin infektatutako saguetan giltzurrunak izan ziren organorik kaltetuenak,  $3,44 \pm 0,87$  log UKE/g-ko ondo-kargarekin.

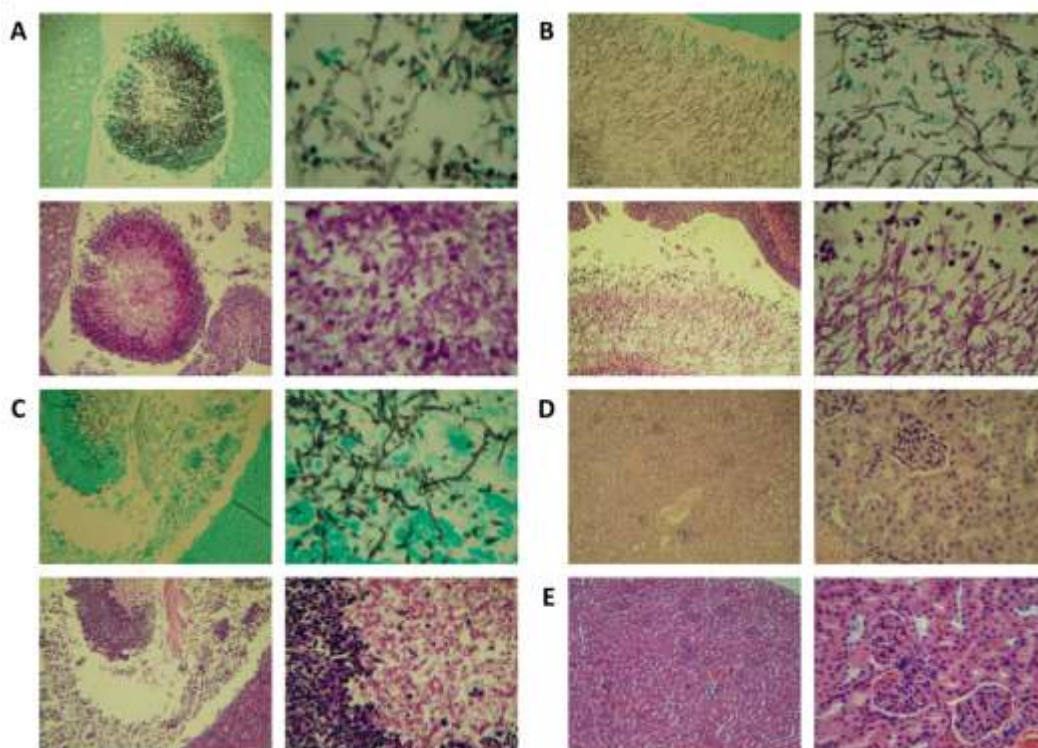
Aipatzekoa da *L. prolificans*ekin infektatutako saguen taldean burmuina izan zela onddo-kargarik altuena izan zuen hirugarren organoa ( $3.36 \pm 0.78$  log UKE/g). Kontrara, gainerako talde guztietan burmuina izan zen gutxien infektatua, desberdintasun horiek estatistikoki esanguratsuak izanik.



**4.9. irudia. Onddo espezie desberdinekin infektatutako saguen onddo-karga.** Zain barnetik *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum*en  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin eta *A. fumigatus*en  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen organoen onddo-kargaren emaitzak. Organoen onddo-karga *L. prolificans* taldearekin alderatu zen bi bideko ANOVA testaren bidez;\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  eta \*\*\*  $p < 0,001$ .



Organoen ebaki histologikoen azterketan giltzurrun-inbasioa baino ez zen detektatu *L. prolificans* (4.10A irudia), *S. boydii* eta *S.aurantiacumekin* (4.10B-C irudia) infektatutako taldeetan. Talde hauetan giltzurrun-pelbisa dilatatuta zegoen, polimorfonuklearrek eta eosiniloek eragindako hanturazko erantzun aldakorrarekin. Erdian hifak behatu ziren eta *L. prolificans*en konidio kopuru altua. Aldiz, *A. fumigatus*ekin infektatutako saguetan (4.10D irudia) eta kontrol taldean (4.10E irudia) ez zen inolako kalterik behatu aztertutako organo bakar batean ere.



**4.10. irudia. Onddo espezie desberdinekin infektatutako saguen giltzurrunen ebaki histologikoak.** Zain barnetik *L. prolificans* (A), *S. boydii* (B) eta *S. aurantiacum* (C)  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen giltzurrunen ebaki adierazgarriak Grocotten zilar metenaminarekin (goian) eta hematoxilina-eosinarekin (behean) tindatuta. *A. fumigatus*en  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen (D) eta kontrol-taldearen (E) giltzurrunen ebaki adierazgarriak hematoxilina-eosinarekin tindatuta.

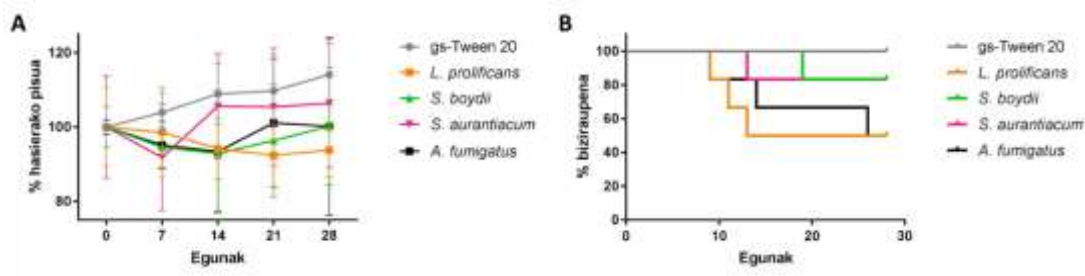
Ikerlan osoan zehar animalien ongizatearen eguneroko jarraipena egin zen. Sagu talde guztietan Infekzioaren garapenarekin erlazionaturiko zeinuak behatu ziren, kontrol-taldean izan ezik. Zehazki, *L. prolificans*, *S. boydii* eta *A. fumigatus* espezieekin infektatutako saguetan zeinu

berberak detektatu ziren makurtutako sabelalde, ile tentea, isolamendua, letargi iraunkorra, induzitutako mugimenduen eta ustekabeko soinuen aurreko erantzunen falta, pisu-galera larria, eta zeinu neurologikoak, hala nola alde baterantz makurtzea eta oreka erabat galtzea. *S. aurantiacum*ekin infektatutako saguetan, infekzioarekin erlazionatutako zeinu gutxiago hauteman ziren. Zehazki, talde honetan makurtutako sabelalde, ile tentea, pisu-galera larria, eta zeinu neurologikoak, hala nola alde baterantz makurtzea, oreka erabat galtzea eta ataxia, atzeman ziren

Alde baterantz makurtzea izan zen zeinu guztien artean nagusiena. *L. prolificans*ekin infektatutako % 66,67k, *S. boydii* edo *S. aurantiacum*ekin infektatutako % 100k, eta *A. fumigatus*ekin infektatutako % 66,67k garatu zutelarik. Zeinu hau, *L. prolificans* administratu eta hiru egunera detektatu zen, eta *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* administratu eta lau egunera.

Saguen asteroko pisuaren jarraipenari dagokionez, *L. prolificans*, *S. boydii* eta *A. fumigatus*ekin infektatutako saguek pisu-galera nabarmena izan zuten, eta zehazki, *L. prolificans* taldean pisu-jaitsiera handiena detektatu zen (4.11A irudia). *S. aurantiacum*ekin infektatutako saguek pisu-galera handia izan zuten inokulua eman eta 7 egunera, eta galera hori berreskuratu eta mantendu zuten hurrengo 3 asteetan.

*L. prolificans* eta *A. fumigatus*ekin infektatutako taldeek hilkortasun handiena izan zuten, % 50koa (4.11B irudia). Lehen heriotza, bi taldeetan, inokulua administratu eta bederatzai egunera jaso zen. *S. aurantiacum* eta *S. boydii*ekin infektatutako taldeek % 16,67ko heriotza-tasa izan zuten, eta lehen heriotza 13 eta 19 egunera izan zen, hurrenez hurren.



#### 4.11. irudia. Onddo espezie desberdinekin infektatutako saguen asteroko pisua eta biziraupena.

Zain barnetik *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum*en  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin eta *A. fumigatus*en  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen, eta kontrol taldearen asteroko pisatzea (A) eta biziraupena (B).

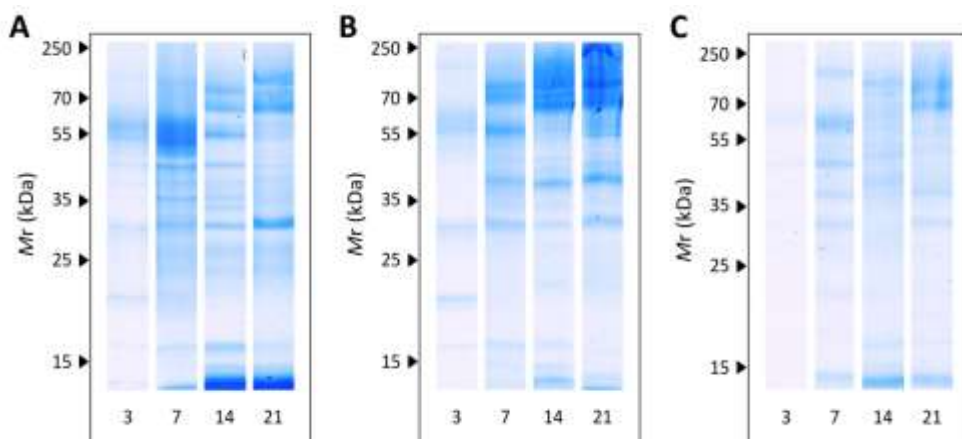
Atal honetan lortutako emaitzak kontuan hartuta,  $10^5$  konidio/animalia dosia aukeratu zen *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieekin Swiss saguetan barreiatutako infekzioa garatzeko infekzio-dosi gisa. Bestalde,  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosia hautatu zen *A. fumigatus* espeziearen infekzio-dosi gisa. Izan ere, *A. fumigatus*en dosi baxuagoekin infektatutako taldeetan infekzioari lotutako zeinu gutxi detektatu ziren, organoen UKEen zenbaketak baxuak izan ziren eta biziraupena % 100koa izan zen.

#### 4.3. *L. prolificans*ekin infektatutako saguen erantzun humoralaren azterketa

Erantzun humoralaren azterketan, infektatutako saguen serumak *L. prolificans*en proteina aterakin totalarekin eta sekretomarekin kontaktuan jarri ziren. Horretarako, lehenik eta behin, sekretomaren bilketa optimizatu zen, ondoren 2DE bidez aztertzeko.

##### 4.3.1. *L. prolificans*en sekretomaren bilketaren optimizazioa, ondoren 2DE bidez aztertzeko

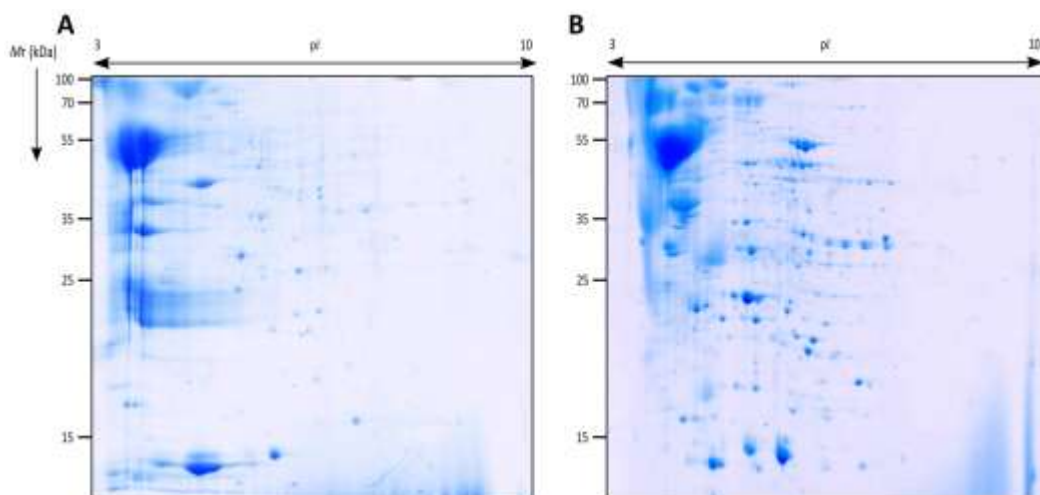
*L. prolificans*ek jariatutako proteinak biltzeko bi metodologia desberdin jarraitu ziren. Lehenengo metodologia kultiboko gainjalkinen filtrazioan oinarritzen da. Metodo honi jarraiki hazkuntza-ingurune eta inkubazio-denbora desberdinetan lortutako aterakinak kualitatiboki eta kuantitatiboki alderatu ziren 1DE bidez (4.12. irudia). Modu honetan, *L. prolificans* Sabouraud dextrosa saldan 14 egunez inkubatzea sekretomaren bilketarako baldintza hobereena bezala aukeratu zen. Izan ere, baldintza honetan banden kopurua eta bereizmena handiagoa izan zen gainerako baldintzekin alderatuta.



4.12. irudia. *Lomentospora prolificans*en sekretomaren analisisa onddo baldintza

**desberdinetan inkubatu ostean.** *L. prolificans* sekretomaren analisia 1DE bidez, onddoa inkubazio-denbora (3, 7, 14 eta 21 egun) eta hiru kultibo-ingurune desberdinetan inkubatu ostean Sabouraud dextrosa saldan (A), patata dextrosa saldan (B) eta legami-aterakin eta glukosa kultibo-ingurunean (C).

Metodologia hau Da Silva *et al.*-ek (2012) deskribatutakoarekin alderatu zen 2DE bidez (4.13. irudia) [174]. Bi gelek puntu banaketa oso antzekoa eduki arren, bigarren metodoarekin puntu kopuru altuagoa detektatu zen (373 vs. 253). Gainera, lehen metodoarekin proteinen fokuratzea okerragoa izan zen, batez ere gelaren pisu molekular altuko zonalde azidoan, beharbada, aterakinaren ezpurutasunen kontzentrazio handiagoaren eta/edo proteinen solubilitate okerragoaren ondorioz. Horrela, nahiz eta bi metodologiaren bidez lortutako aterakinak erabilgarriak izan, bigarren metodoa izan zen 2DE bidezko sekretomaren azterketarako egokiena.

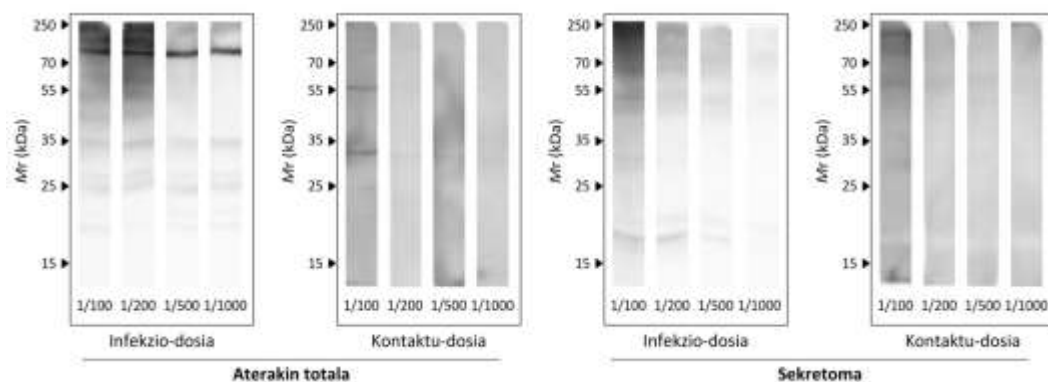


**4.13. irudia. Proteinen erauzketa teknika desberdinak erabiliz lortutako *L. prolificans* sekretomaren azterketa bi dimentsioko elektroforesiaren bidez.** *L. prolificans* sekretomaren proteoma adierazgarriak, Sabouraud dextrosa saldan 14 egunez inkubatu ondoren (A) eta da Silva *et al.*-ek (2012) deskribatutako protokoloari jarraituz. [161] (B).

Jasotako proteinak jariatutakoak edo intrazelularrak ziren aztertzeko, sekretomaren bilketa prozesuan onddoaren osotasuna kaltetzen ez zela aztertu zen, onddoa mikroskopio optikoaren bidez behatuz, eta gainjalkinean LDHren jarduera entzimatiokoaren saiakuntza burutuz. Onddoaren morfologia normala ikusi zen, hausturarik gabeko hifak behatuz. Bestalde, ez zen LDHren jarduera entzimatikorik antzeman kultiboaren gainjalkinean. Honekin guztiarekin, frogatuta geratu zen aztertutako proteinak jariatutakoak zirela, eta ez zelula barneko proteinak.

#### 4.3.2. *Kontaktu-dosiarekin eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguek ezagututako L. prolificansen sekretomaren eta proteina aterakin totalaren antígeno immunodominanteen identifikazioa*

Kontrol-taldeko lau serumeko nahasketa, eta kontaktu-dosiarekin eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguen lau serumeko nahasketak *L. prolificans* proteina aterakin osoarekin eta sekretomarekin jarri ziren kontaktuan dimentsio bateko WB (1DWB) bidez, 1/100 eta 1/1.000 arteko serum-diluzioak erabiliz. 4.14. irudian ikus daitekeenez,  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin (infekzio-dosia) infektatutako saguen serumak erabiliz detektatutako erreaktibitatea, kontaktu-dosiarekin ( $10^2$  konidio/animalia) inokulatutakoekin lortutakoa baino askoz altuagoa izan zen. Bestalde, bi sagu taldeetan aterakin totalaren aurkako erreaktibitatea sekretomarekin lortutakoa baino askoz altuagoa izan zen.



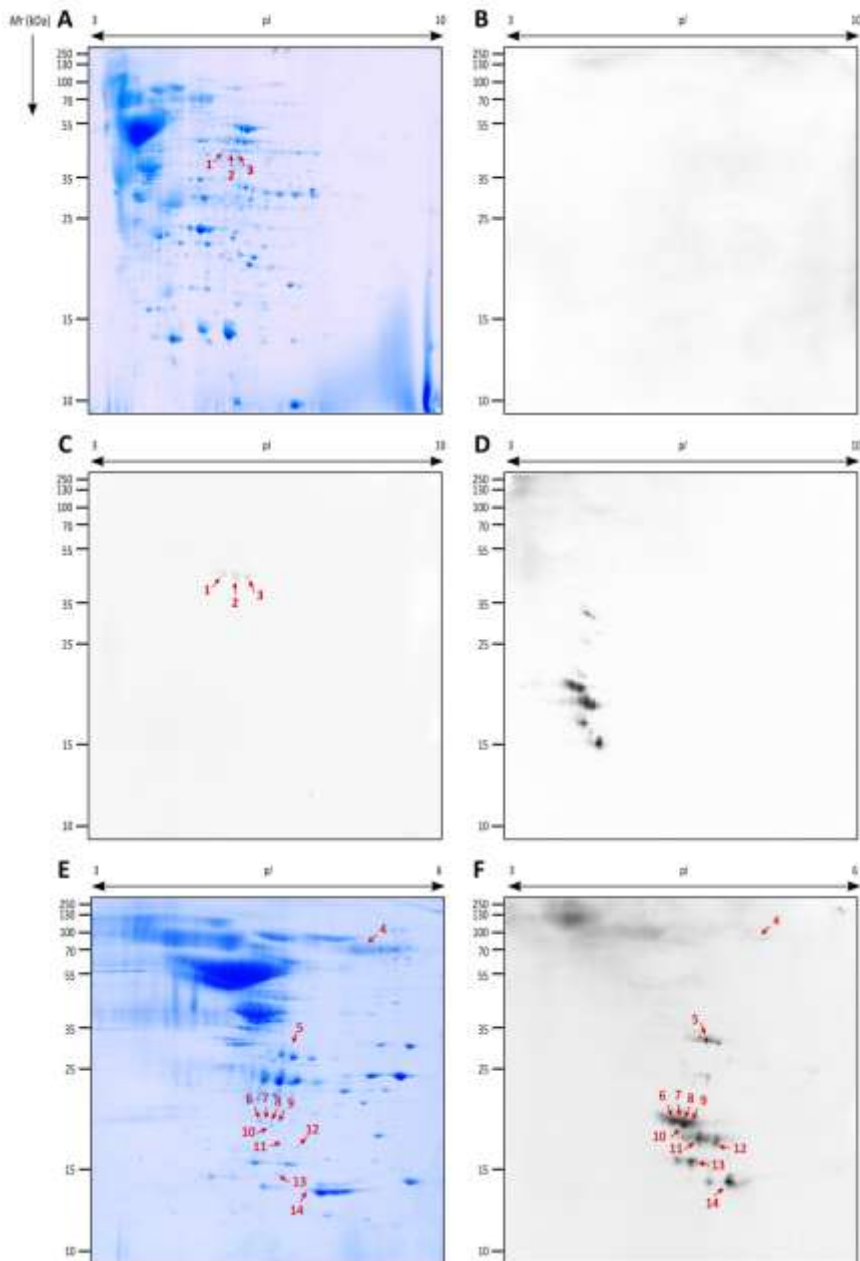
**4.14. irudia. *Lomentospora prolificans* dosi desberdinekin infektatutako saguen erantzun humoralaren azterketa.** Kontakto-dosiarekin ( $10^2$  konidio/animalia) eta infekzio-dosiarekin ( $10^5$  konidio/animalia) inokulatutako saguen erantzun humoralak *Lomentospora prolificans* aterakin osoaren eta sekretomaren aurka. 1/100, 1/200, 1/500 eta 1/1.000 serumen diluzioak erabili ziren.

Azterlan honen bidez, 1/1.000 serumaren diluzioa hautatu zen, antígeno nagusiak 2DWB bidez detektatzeko eta identifikatzeko. Izan ere, diluzio honekin bi sagu-taldeen serumekin eta bi aterakinen aurka erreaktibitatea detektatu zen, eta aldi berean,  $10^5$  konidio/animalia-rekin infektatutako sagu-taldean diluzio kontzentratuenen gehiegizko erreaktibitatea ekidin zen

4.3.3. *Kontaktu-dosia eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguek ezagututako L. prolificansen sekretomaren antigeno immunodominanteen identifikazioa*

*L. prolificansen* sekretomaren proteinak 2DE bidez bereizi ziren bi pI tarte desberdinetan, proteomaren profila hobeto aztertzeko asmoz (4.15. irudia). Lortutako gelak CBB G-250rekin tindatu ziren, eta, ondoren, ImageMaster 2D Platinum softwarearekin aztertu ziren, puntu immunoerreaktiboan pI eta Mr-ak balioztatzeke. Guztira 373 puntu detektatu ziren, pI eta Mr guztian zehar banatuta. Hala ere, puntu kopuru altuena 3-7 pI artean detektatu zen, 15. irudian ikus daitekeen bezala.

*L. prolificansen* sekretomaren antigenoak detektatzeko kontrol-taldeko saguen serum-nahasketa, eta kontaktu-dosiarekin eta infekzio-dosiarekin inokulatutako onddoaren sekretomarekin jarri ziren kontaktuan 2DWB bidez. Aurretik 1DWB bidez egindako erantzun humoralaren azterketan ikusi zen bezala, kontaktu-dosiarekin inokulatutako taldeak dosi altuenarekin infektatutako taldeak baino askoz ere erreaktibitate baxuagoa erakutsi zuen. Bestalde, kontrol-taldeko serumekin ez zen inolako erreaktibitateirik detektatu. Zehazki, proteoman detektatutako 373 puntuetatik hiruk immunoerreaktibitatea erakutsi zuten kontaktu-dosiaren serumekin, eta 36 puntu arte infekzio-dosiaren serumekin. Erreaktibitatea 5,5-6 pI eta 50 kDa inguruan detektatu zen kontaktu-taldean, eta 4-5 pI-an eta 35 kDa-etik beherako Mr-ean infektatutako taldean. Ez zen antzeman bi taldeek partekatutako antigenorik.



**4.15. irudia. *Lomentospora prolificans*en sekretomaren proteoma eta immunoma adierazgarriak.** Jariatutako proteinak 2DE bidez berezita 3-10 pH tartean (A) eta PVDF mintzetara elektrotransferituta kontrol taldeko serumek (B), kontaktu-dosiaren serumek (C) eta infekzio-dosiaren serumek (D) ezagututako proteina immunoerreaktiboak detektatzeko. Jariatutako proteinak 2DE bidez berezita 3-6 pH tartean (E) eta PVDF mintzetara elektrotransferituta infekzio-dosiaren serumek (F) ezagututako proteina immunoerreaktiboak

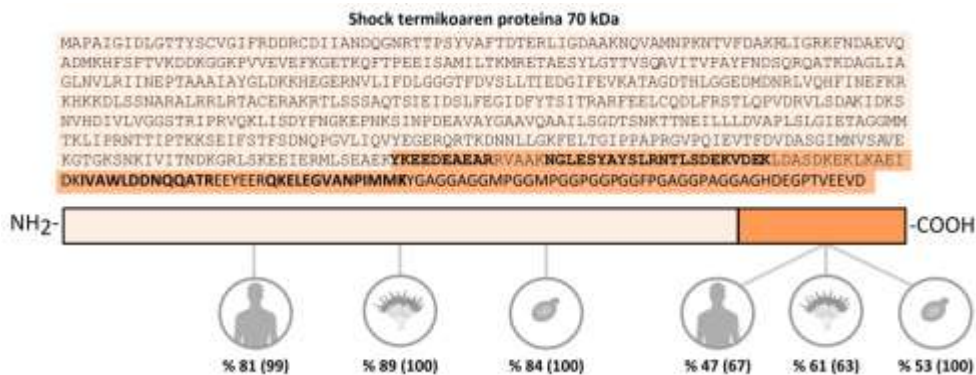
detektatzeko. Markatutako puntuak geletatik erauzi ziren LC-MS/MS bidez identifikatzeko.

Ondoren, antigeno garrantzitsuenak LC-MS/MS bidez identifikatu ziren (4.3. taula). Kontaktu-dosiaren serumekin detektatutako 3 antigenoak hautatu ziren, bai eta infekzio-dosiaren serumek ezagututako 2,5 baino bolumen erlatibo handiagoa zuten puntu immunoerreaktiboak ere. 4. puntuaren kasuan, *Scedosporium* spp espezieekin infektatutako saguen serumen aurka detektatutako erreaktibitate handiagatik hautatu zen, jarraian azalduko den moduan. Hamabi punturen identifikazioa arrakastatsua izan zen, zazpi proteina desberdinei zegozkienak S-adenosilhomozisteina hidrolasa (SAHH), kontaktu-serumek ezagututakoa, eta haloazido dehalogenasa superfamiliako hidrolasa (HAD gisako hidrolasa), shock termikoaren proteina 70 kDa (Hsp70), nudC migrazio nuklearreko proteina (NUDC), GH16 familiako glikosil hidrolasa (GH16), zerato-platanina eta funtzio ezezaguneko proteina bat (Hp jhhlp\_006787), infektatutako saguen serumek ezagututakoak. Nabarmentzekoa da *Mr* baxuko Hsp70 zatiak ere identifikatu zirela, eta LC-MS/MS bidez detektatutako peptidoen arabera, proteinaren azken zatiari dagozkio. Azken zati honen aminoazidoen sekuentziak, proteinaren gainontzeko sekuentzia baino homologia txikiagoa erakutsi zuen gizakien eta *S. boydii*, *A. fumigatus* eta *C. albicans*en Hsp70ekin alderatuta (4.16. irudia).



**4.3. taula. *Lomentospora prolificans* kontaktu- eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguen serumen IgGk ezagututako onddoaren sekretomaren antigeno immunodominanteen identifikazioa LC-MS/MS bidez.**

Puntu zk.	Sarbide zk.	Proteinaren izena	Mikroorg.	Peptidoak (zk.)	Estaldura (%)	MASCOT puntuazioa	pI/Mr (kDa) teorikoa	pI/Mr (kDa) esperim.
<b>Kontaktu-dosiarekin inokulatutako saguen serumek ezagututako <i>L. prolificans</i> sekretomaren antigenoak (4.15A irudia)</b>								
1		-						5,62/46,98
2	PKS06692.1	S-adenosilhomozisteina hidrolasa (hp jhhlp_006766)	<i>L. prolificans</i>	1	5	156	5,77/49,09	5,79/46,61
3		-						5,90/46,24
<b>Infekzio-dosiarekin inokulatutako saguen serumek ezagututako <i>L. prolificans</i> sekretomaren antigenoak (4.15E irudia)</b>								
4	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	27	51	1758	5,11/71,50	5,16/76,79
5	PKS07974.1	Haloazido dehalogenasa gisako hidrolasa (hp jhhlp_006586)	<i>L. prolificans</i>	4	35	179	4,93/26,36	4,57/30,28
6	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	5	7	170	5,11/71,50	4,25/18,45
7	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	5	8	160	5,11/71,50	4,29/18,45
8	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	5	8	172	5,11/71,50	4,36/18,41
9	PKS07141.1	Glikosil hidrolasa 16 familiako proteina (Hp jhhlp_005741)	<i>L. prolificans</i>	2	7	90	4,44/41,13	4,43/18,43
	AAC49800.1	Glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	<i>C. albicans</i>	1	8	59	6,33/35,51	
10	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	1	1	54	5,11/71,50	4,35/17,95
11	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	3	5	131	5,11/71,50	4,50/16,83
	PKS12714.1	nudC migrazio nuklearreko proteina (hp jhhlp_000922)	<i>L. prolificans</i>	1	5	81	5,30/21,12	
12	PKS12714.1	nudC migrazio nuklearreko proteina (hp jhhlp_000922)	<i>L. prolificans</i>	2	6	108	5,30/21,12	4,82/16,18
13	PKS06713.1	Hp jhhlp_006787	<i>L. prolificans</i>	1	7	107	4,82/22,77	4,42/14,90
14	PKS07725.1	Zerato-platanina (Hp jhhlp_006333)	<i>L. prolificans</i>	2	23	256	5,37/14,03	4,79/13,45



**4.16. irudia. *Lomentospora prolificans* Hsp70 proteinaren sekuentziaren analisisa.** Jariatutako pisu molekular txikiko Hsp70 zatien kokapena proteina osoaren sekuentzian, LC-MS/MS bidez identifikatutako eta letra lodiz markatutako peptidoen arabera. Hsp70aren K-muturreko zatiaren eta gainerako zatiaren alderaketa gizaki, *A. fumigatus* eta *C. albicans* Hsp70ekin. Estalduraren (parentesi artean) eta antzekotasunaren ehunekoak adierazi dira.

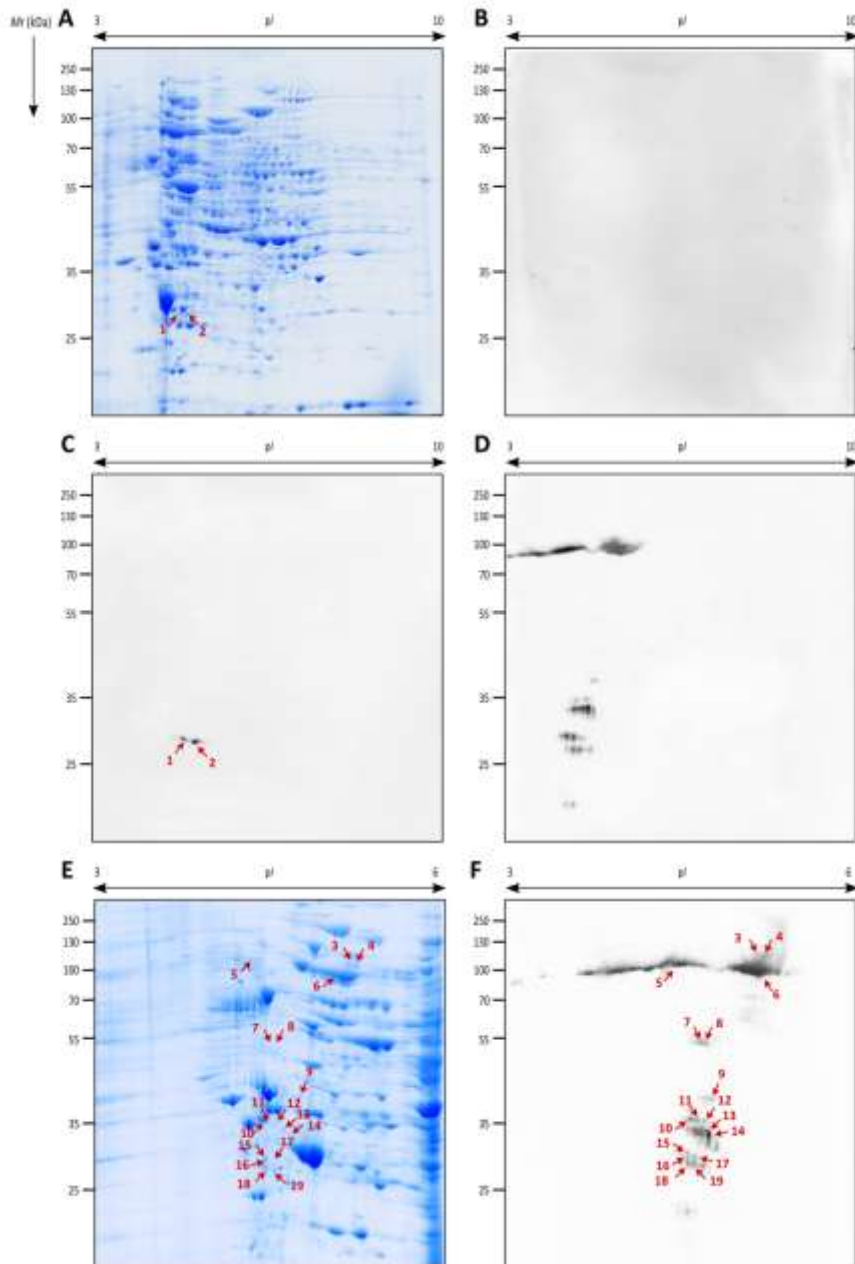
**4.3.4. Kontaktu- eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguek ezagututako *L. prolificans* aterakin totalaren antigeno immunodominanteen identifikazioa**

Azterlan hau aurrera eramateko, lehen aipatutako lan-fluxu berdina jarraitu zen. Horrela, *L. prolificans* aterakin totalaren proteinak 2DE bidez bereizi ziren 3-10 eta 3-6 pH tartean (4.17. irudia). 3-10eko tartea erabiltzerakoan guztira 944 puntu detektatu ziren, *pI* eta *Mr* guztian zehar banatuak. Zehazki, 4-8 *pI*-an eta 25-130 kDa arteko *Mr*-an puntu kopuru altuagoa detektatu zen.

Kontrol-taldeko, kontaktu-taldeko eta infekzio-taldeko serum-nahasketak ondoaren proteina aterakin totalarekin jarri ziren kontaktuan 2DWB bidez. Aterakin totalaren proteoman detektaturiko 944 puntuetatik, kontaktu-taldeko serumek bi puntu ezagutu zituzten, eta infekzio-taldeko serumek, berriz, 89 puntu arte. Erreaktibitatea 5 *pI* eta 25 kDa ingurukoa izan zen kontaktu-taldean, eta 4-5,5 *pI* eta 25 kDa-tik gorakoa infektatutako taldean. Ez zen antzeman bi taldeek partekatutako antigenorik. Bestalde, kontrol-taldeak ez zuen inolako punturik ezagutu.

Aldi berean, aterakin totalaren proteinak 2DE bidez bereizterakoan lortutako gelak Software Image Master 2D Platinum bidez aztertu ziren. Horrela, puntu immunoerreaktibo nagusiak geletatik eskuz erauzi ziren eta LC-MS/MS bidez identifikatu ziren. Kontaktu-dosiaren

serumek ezagututako bi puntuak eta infekzio-dosiaren serumek ezagututako 0,3tik gorako bolumen erlatiboa zuten 17 puntuak identifikatu ziren (4.4. taula). 19 puntu immunorreaktiboak hamar proteina desberdinei zegozkien proteasomaren alfa azpiunitatearen bi isoforma kontaktu-dosiarekin erlazionatutako antigeno gisa, eta dipeptidil-peptidasa (Dpp), Hsp70, proteasomako ubiquitina-hartzailea, karboxipeptidasa Y (CPY), Ran proteinari lortzeko domeinua duen proteina (RanBP1), ugalketa zelularren nukleoko antigenoa (PCNA), HAD gisako hidrolasa, sailkapen bakuolarraren proteina 28 (Vps28) eta NFU1 burdin-sufrearen taldeko andamio-proteina (NFU1) barreiatutako infekzioarekin erlazionatutako antigeno gisa. Infektatutako saguen serumek ezagututako antigeno guztietatik Hsp70 antigeno nagusia izan zen. Izan ere, antigeno honen bolumen erlatiboa hurrengo antigenoarena baino 20 aldiz handiagoa izan zen.



**4.17. irudia. *L. proliferans* aterakin totalaren proteoma eta immunoma adierazgarriak.**

Aterakin totaleko proteinak 2DE bidez berezita pH 3-10 tartean (A) eta PVDF mintzetara elektrotransferituta, kontrol taldeko serumek (B), kontaktu-dosiaren serumek (C) eta infekzio-dosiaren serumek (D) ezagututako proteina immunoerreaktiboak detektatzeko. Aterakin totalaren proteinak 2DE bidez berezita 3-6 pH artean (E) eta PVDF mintzetara elektrotransferituta, infekzio-dosiaren serumek (F) ezagututako proteina immunoerreaktiboak detektatzeko. Markatutako puntuak geletatik jaso ziren LC-MS/MS bidez identifikatzeko.

4.4. taula. *Lomentospora prolificans* kontaktu- eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguen serumen IgGk ezagututako onddoaren aterakin totalaren antigeno immunodominanteen LC-MS/MS bidezko identifikazioa.

Puntu zk.	Sarbide zk.	Proteinaren izena	Mikroorganismoa	Peptidoak (zk.)	Estaldura (%)	MASCOT puntuazioa	pi/Mr (kDa) teorikoa	pi/Mr (kDa) esperimentalak
<b>Kontaktu-dosiarekin inokulatutako saguen serumek ezagututako <i>L. prolificans</i> aterakin totalaren antigenoak (4.17A irudia)</b>								
1	PKS10679.1	Proteosomaren alfa azpiunitatea (hp jhhlp_002435)	<i>L. prolificans</i>	5	22	304	5,28/28,04	4,73/28,35
	PKS08308.1	NADP oxidoreduktasa koentzima F420-dependentea (hp jhhlp_005252)	<i>L. prolificans</i>	5	27	288	5,66/32,60	
2	PKS10679.1	Proteosomaren alfa azpiunitatea (hp jhhlp_002435)	<i>L. prolificans</i>	10	41	474	5,28/28,04	4,91/28,32
<b>Dosi-infektiboarekin inokulatutako saguen serumek ezagututako <i>L. prolificans</i> aterakin totalaren antigenoak (4.17E irudia)</b>								
3	PKS06544.1	Dipeptidil-peptidasa (hp jhhlp_007292)	<i>L. prolificans</i>	13	20	602	5,19/79,99	5,26/81,64
4	PKS06544.1	Dipeptidil-peptidasa (hp jhhlp_007292)	<i>L. prolificans</i>	15	23	797	5,19/79,99	5,32/81,10
5	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	22	49	1658	5,11/71,50	4,08/83,83
6	PKS06780.1	Shock termikoaren proteina 70 kDa (hp jhhlp_006854)	<i>L. prolificans</i>	23	43	1159	5,11/71,50	4,66/77,14
7	PKS10466.1	Proteasomako ubikitina-hartzailea (hp jhhlp_002217)	<i>L. prolificans</i>	5	25	225	4,65/40,76	4,62/51,74
8	PKS12946.1	Karboxipeptidasa (hp jhhlp_000287)	<i>L. prolificans</i>	2	4	111	4,99/60,56	4,66/51,68
9	PKS13321.1	RBP1 domeinua duen proteina (hp jhhlp_000092)	<i>L. prolificans</i>	9	40	607	5,11/28,07	4,76/35,25
	PKS12026.1	P0 proteina erribosomala (hp jhhlp_001322)	<i>L. prolificans</i>	4	20	374	4,81/33,75	
10	PKS10574.1	Ugalketa zelularren nukleoko antigenoa (hp jhhlp_002328)	<i>L. prolificans</i>	9	39	449	4,56/28,92	4,36/32,09
11	PKS10574.1	Ugalketa zelularren nukleoko antigenoa (hp jhhlp_002328)	<i>L. prolificans</i>	3	18	326	4,56/28,92	4,41/32,01
12	PKS10574.1	Ugalketa zelularren nukleoko antigenoa (hp jhhlp_002328)	<i>L. prolificans</i>	2	11	118	4,56/28,92	4,45/32,18
	XP_016642844.1	Sortzen ari den polipeptidoari lotutako konplexuaren alfa azpiunitatea (hp SAPIO_CDS5122)	<i>S. apiospermum</i>	2	13	100	4,59/22,31	

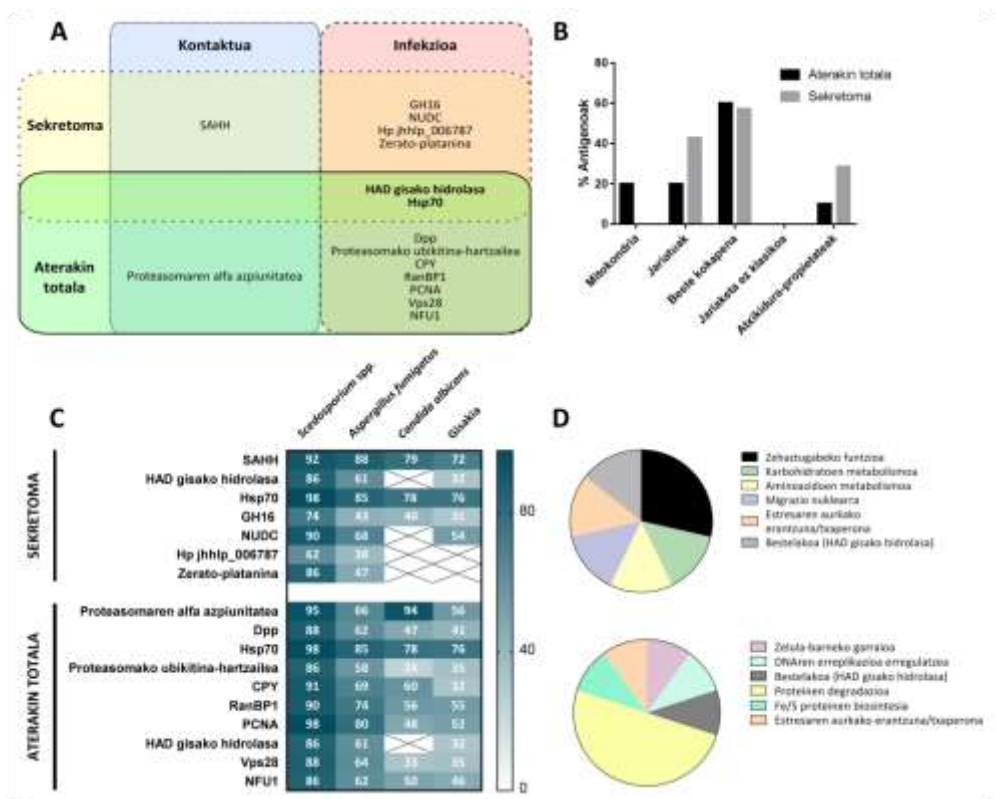
<b>13</b>	PKS07974.1	Haloazido dehalogenasa gisako hidrolasa (hp jhhlp_006586)	<i>L. proliferans</i>	5	31	390	4,93/26,36	4,51/30,62
<b>14</b>	PKS07974.1	Haloazido dehalogenasa gisako hidrolasa (hp jhhlp_006586)	<i>L. proliferans</i>	7	41	431	4,93/26,36	4,41/30,00
<b>15</b>	PKS10466.1	Proteasomako ubikitina-hartzailea (hp jhhlp_002217)	<i>L. proliferans</i>	3	12	174	4,65/40,76	4,57/30,19
	PKS11928.1	Itzulpena hasteko faktore eukariotikoa 6 (hp jhhlp_001223)	<i>L. proliferans</i>	4	25	154	4,33/23,13	
<b>16</b>	PKS10466.1	Proteasomako ubikitina-hartzailea (hp jhhlp_002217)	<i>L. proliferans</i>	4	12	241	4,65/40,76	4,57/29,58
	PKS11928.1	Itzulpena hasteko faktore eukariotikoa 6 (hp jhhlp_001223)	<i>L. proliferans</i>	4	26	214	4,33/23,13	
<b>17</b>	PKS12778.1	Sailkapen bakuolarraren proteina 28 (hp jhhlp_000989)	<i>L. proliferans</i>	4	19	157	4,68/27,98	4,64/29,58
	PKS09814.1	Amino peptidasa (hp jhhlp_004437)	<i>L. proliferans</i>	3	7	129	5,50/60,03	
<b>18</b>	PKS09755.1	NFU1 burdin-sufrearen taldeko aldami-proteina (hp jhhlp_004376)	<i>L. proliferans</i>	5	28	299	5,78/33,19	4,61/24,42
<b>19</b>	PKS09755.1	NFU1 burdin-sufrearen taldeko aldami-proteina (hp jhhlp_004376)	<i>L. proliferans</i>	6	31	343	5,78/33,19	4,64/28,20

#### 4.3.5. *L. prolificans* antigenoen kokapena, funtzioa eta homologiaren azterketa

Sekretomako proteinen analisi bioinformatikoak HAD gisako hidrolasaren, GH16 proteinaren eta zerato-plataninaren jariatze-klasikoa iragarri zuen (4.18B irudia). Gainera, GH16 eta Hp jhhlp\_006787 proteinen atxikidura-propietateak detektatu ziren. Aterakin osoaren proteinen artean, CPY eta HAD gisako hidrolasaren jariatze klasikoa eta RanBP1 eta NFU1 proteinen kokapen mitokondrialak iragarri ziren. Atxikidura-propietateak soilik proteasomako ubikitina-hartzailean detektatu ziren.

*L. prolificans* proteinen homologia *Scedosporium* spp., *A. fumigatus*, *C. albicans* eta giza proteinekin alderatuta aztertu zen. Antzekotasun handienak *Scedosporium* spp. proteinekin detektatu ziren eta jarraian *A. fumigatus*ekin. Bestalde, jariatutako antigenoekin, aterakin totalarekin baino homologia baxuagoa lortu zen (4.18C irudia). Guztian artean, SAHH eta Hsp70 izan ziren homologia maila altuena erakutsi zutenak, kasu guztietan % 70etik gorako antzekotasunak lortuz. Bestalde, giza proteinekin alderatuz homologia maila baxuena zuten proteinak honako hauek izan ziren Vps28 (% 35), proteasomako ubikitina-hartzailea (% 35), CPY (% 32), HAD gisako hidrolasa (% 32), GH16 (% 31), Hp jhhlp\_006787 (% 0) eta zerato-platanina (% 0). Aipatutako antigeno guztiek <% 50eko homologia erakutsi zuten *C. albicans* proteinekin alderatuta, eta azken lauek <% 50eko antzekotasuna erakutsi zuten *A. fumigatus*ekin alderatuta.

Funtzionaltasunari dagokionez, jariatutako antigenoen artean zehaztugabeko funtzioa eta degradazio-prozesuekin erlazionatutako funtzioak (karbohidratoen eta aminoazidoen metabolismoa) nabarmentzen dira. Aldiz, aterakin totalen identifikatutako proteina immunoerreaktiboaren artean, proteinen degradazioarekin erlazionatutako antigenoak dira ugariak (4.18D irudia).



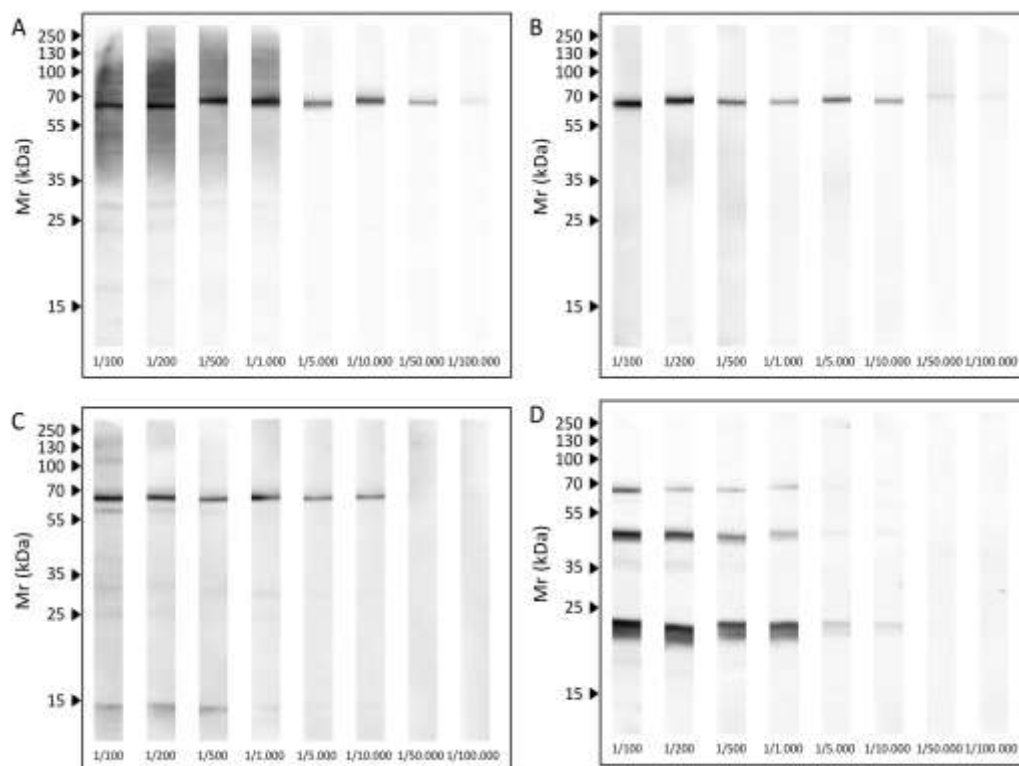
**4.18. irudia. *L. prolificans* sekretomaren eta aterakin totalaren antigenoen analisisa.** Kontaktua eta infekzio-dosiarekin inokulatutako saguen serumek ezagututako *L. prolificans* sekretomaren eta aterakin totalaren antigenoen diagrama (A). Antigenoen kokapenaren azterketa bioinformatikoa (B). Antigenoek *Scedosporium* spp, *A. fumigatus*, *C. albicans* eta giza proteinekin duten antzekotasunaren azterketa bioinformatikoa, antzekotasunaren ehunekoak adierazi direlarik (C). Sekretomaren (goian) eta aterakin totalaren (behean) antigenoen sailkapen funtzionala (D).

#### 4.4. *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus*ekin infektatutako saguen erantzun humoralaren azterketa

Erantzun humorala aztertzeko, *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* espezieekin infektatutako 5 saguen serum-nahasketak erabili ziren taldeko. Lehenik eta behin, espezie bakoitzarekin infektatutako saguen serumak euren aterakin totalako proteinekin jarri ziren kontaktuan 1DWB bidez, 1/100etik 1/100.000erainoko diluzioak erabiliz. Talde guztietan erreaktivitate handia hauteman zen (4.19. irudia). Zehazki, *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S.*



*aurantiacum* espezieekin infektatutako saguetan 1/100.000 diluziora arte detektatu zen seinalea eta *A. fumigatus*ekin infektatutakoetan 1/10.000 arte. 1/1.000 diluzioarekin talde guztietan hautemandako erreaktivitate handiaren ondorioz, diluzio hori hautatu zen 2DWB bidezko ondorengo azterketetarako.

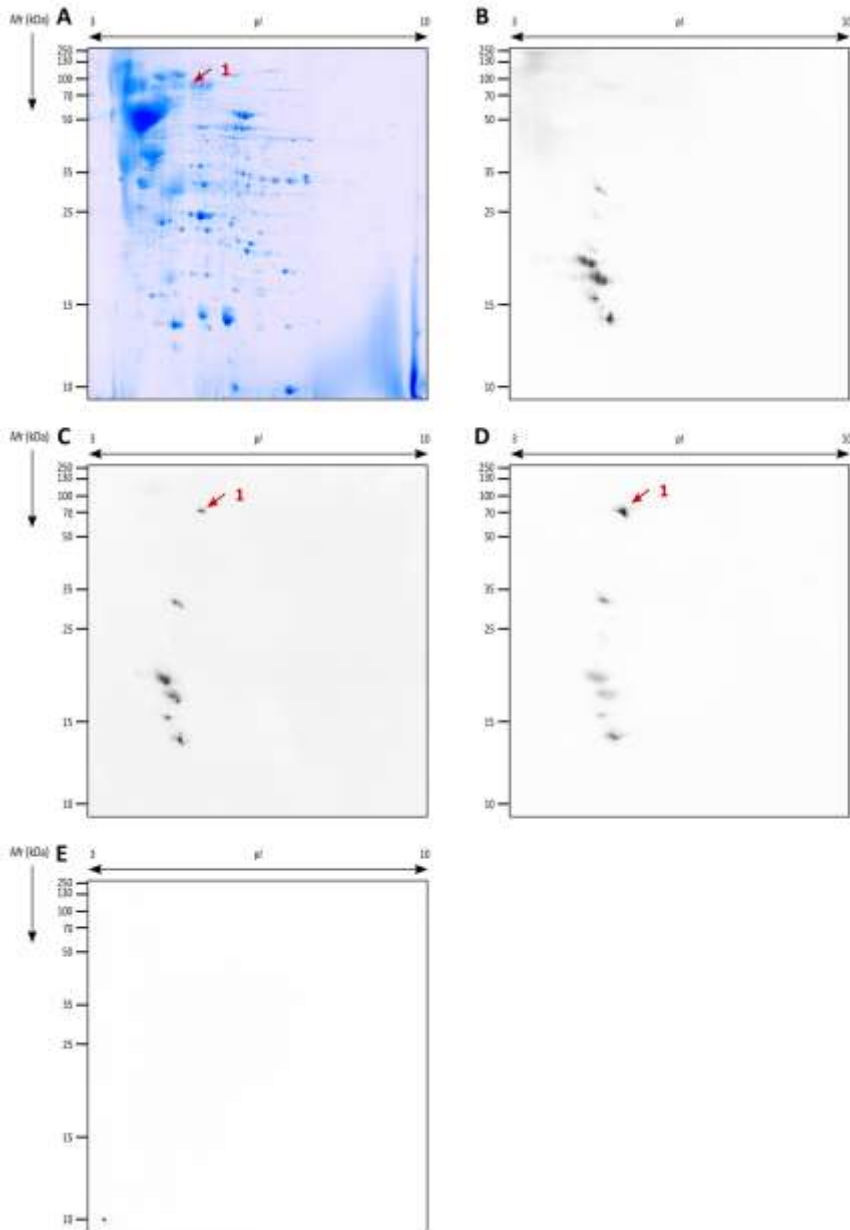


**4.19. irudia. Onddo espezie desberdinen barreatutako infekzioetan sortutako antigorputzen kontzentrazioaren azterketa.** *Lomentospora prolificans* (A), *Scedosporium boydii* (B) eta *Scedosporium aurantiacum* (C) espezieen  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen erantzun humoralak, eta *Aspergillus fumigatus*en  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen erantzun humoralak (D). Talde bakoitzeko serum-nahasketen diluzioak (1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/5000, 1/10.000, 1/50.000, 1/100.000) zegozkien ondorengo proteinak aterakin totalarekin jarri ziren kontaktuan.

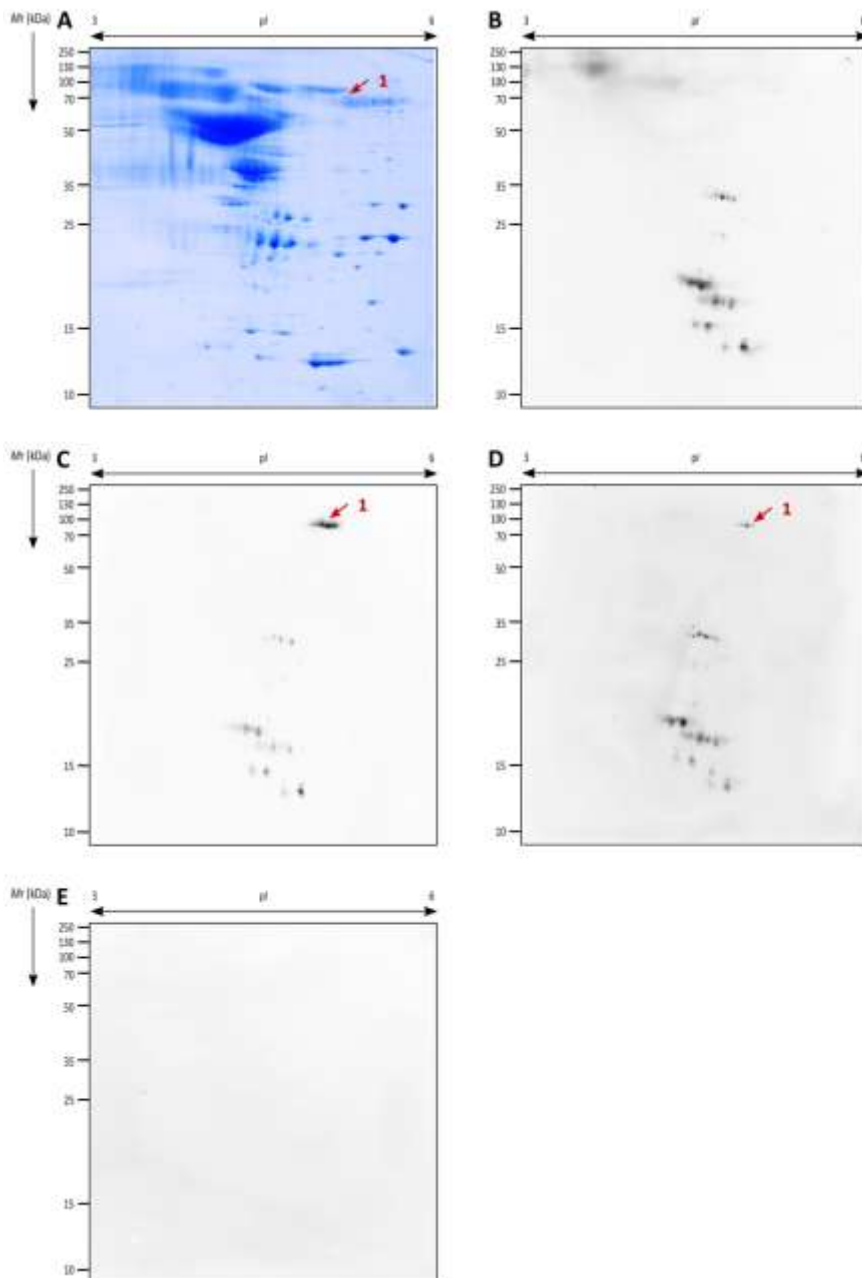
4.4.1. *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* espezieekin infektatutako saguen serumek ezagututako *L. prolificansen* sekretomaren antigenoen identifikazioa

Aurreko atalean erabilitako serum-nahasketak 2DWB bidez *L. prolificansen* sekretomarekin jarri ziren kontaktuan 1/1.000 diluzioan. *S. boydii* eta *S. aurantiacum*ekin infektatutako saguen serumak erabiltzean lortutako immunomek *L. prolificansen*ekin infektatutako saguen serumak erabiltzean lortutako immunomen patroia bera erakutsi zuten. Desberdintasun bakarra jariatutako Hsp70ren aurka *Scedosporium* spp.-ekin infektatutako serumek erakutsitako erreaktibitate handiagoa izan zen (1. puntua 4.20. irudian), *L. prolificansen* identifikazioen 4. puntuari dagokiona (4.15. Irudia eta 4.3. taula). Beraz, antigeno hauek 4.3.3. atalean identifikatu ziren. Aitzitik, *A. fumigatus*ekin infektatutako saguen serumak erabiltzean ez zen erreaktibitateirik detektatu.

Ondoren, erantzun humoralaren analisi zehatzagoa egiteko, prozedura bera errepikatu zen 3-6 pH tarteko gelak erabiliz (4.21. irudia), aurretik lortutako emaitza berretsiz.



**4.20. irudia. *Lomentospora prolificans* sekretomaren antigenoen erreaktibilitate gurutzatuaren azterketa 3-10 pH-tartean.** *L. prolificans* sekretomaren proteoma adierazgarria 3-10 pH-tartean (A), eta *L. prolificans* (B), *S. boydii* (C) eta *S. aurantiacumen* (D)  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin eta *A. fumigatusen*  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen serumek (E) ezagututako *L. prolificans* sekretomaren proteinen detekzioa. Markatutako puntua *L. prolificans* sekretomaren Hsp70 (1) da.



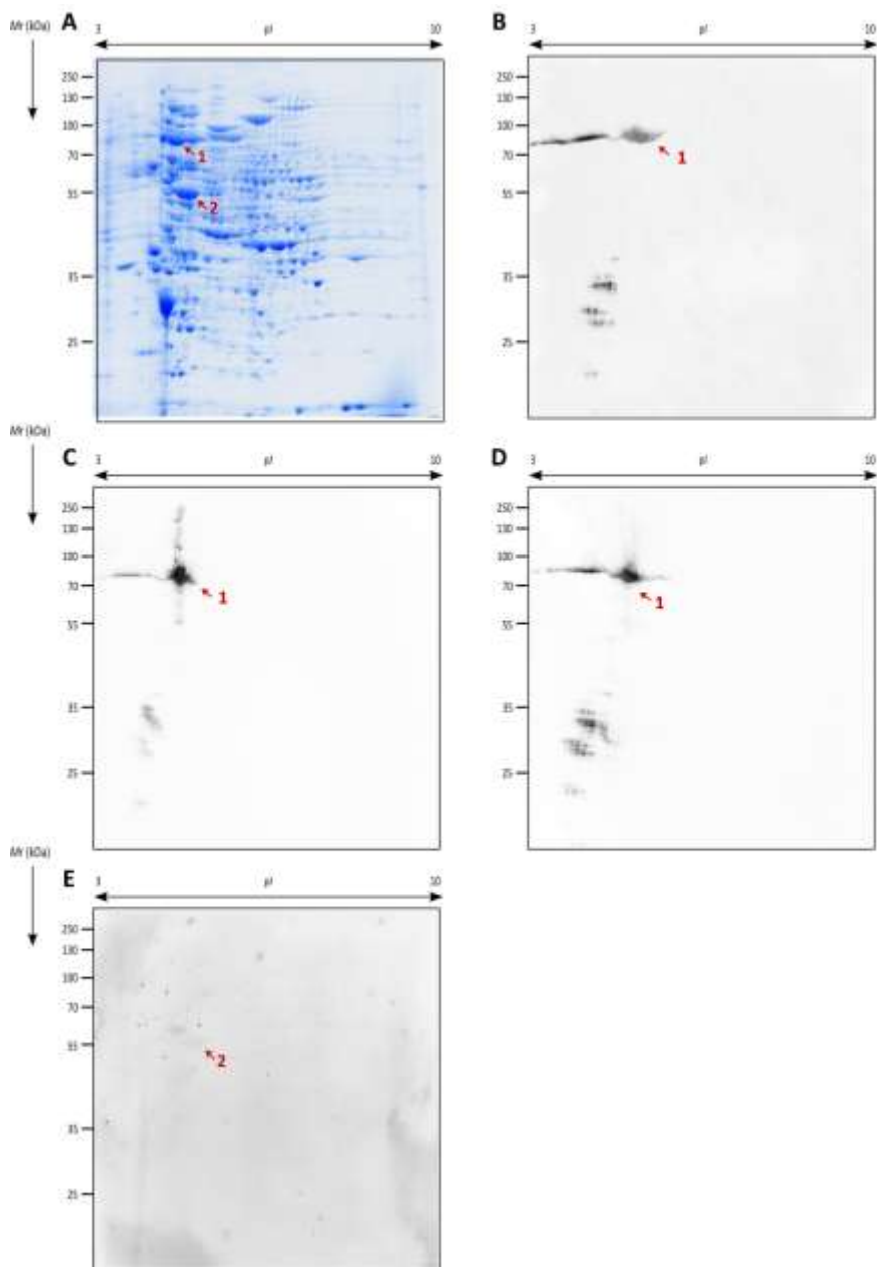
**4.21. irudia. *Lomentospora prolificans* sekretomaren antigenoen erreaktitate gurutzatuaren azterketa 3-6 pH-tartean.** *L. prolificans* sekretomaren proteoma adierazgarria 3-6 pH-tartean (A), eta *L. prolificans* (B), *S. boydii* (C) eta *S. aurantiacumen* (D)  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin eta *A. fumigatusen*  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen serumek ezagututako *L. prolificans* sekretomaren proteinen detekzioa. Markatutako puntua *L. prolificans* sekretomaren Hsp70 (1) da.

4.4.2. *S. boydii*, *S. aurantiacum* eta *A. fumigatus* espezieekin infektatutako saguen serumek ezagututako *L. prolificans*en aterakin totalaren antigenoen identifikazioa

Azterketa hau aurrera eramateko, lehen deskribatutako serum-nahasketak *L. prolificans*en aterakin totalarekin jarri ziren kontaktuan, laginen 1/1.000 diluzioa erabiliz.

*L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieekin infektatutako saguen serumak erabiliz egindako 2DWBetan puntu immunoerreaktibo berberak detektatu ziren (4.22. irudia). Beraz, antigeno immunodominanteak 4.3.4. atalean identifikatu zirenez (emaitzak 4.4. taulan jaso ziren), ez zen beharrezkoa izan identifikazioa errepikatzea. 2DWB guztietan Hsp70a antigeno immunodominanteena izan zen.

Aldiz, *A. fumigatus*ekin infektatutako saguen serumak erabiliz egindako 2DWBetan oso erreakzio ahula lortu zen. Kasu honetan lortutako immunomaren patroia *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* taldeen serumekin lortutakoarekin alderatuta oso ezberdina izan zen. Zehazki, antigenoetako bakar bat ere ez zen bat etorri *Lomentospora/Scedosporium*ekin infektatutako saguen serumek ezagututakoekin. Konkrétuki, 4.1. atalean egindako analisi immunoproteomikoen arabera, bai eta Pellon *et al.*-ek (2016) [173] eginkakoen arabera, *L. polificans*en enolasa *A. fumigatus*ekin infektatutako saguen serumek ezagututako antigenoetako bat da.

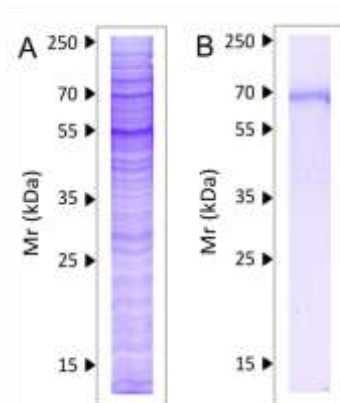


**4.22. irudia.** *Lomentospora prolificans* aterakin totalaren antigenoen erreaktivitate gurutzatuaren azterketa 3-10 pH-tartean. *L. prolificans* aterakin totalaren proteoma adierazgarria 3-10 pH-tartean (A), eta *L. prolificans* (B), *S. boydii* (C) eta *S. aurantiacumen* (D)  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin eta *A. fumigatus*en  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako saguen serumek (E) ezagututako *L. prolificans*en aterakin totalaren proteinen detekzioa. *L. prolificans*en aterakin totalaren Hsp70 (1) eta enolasa (2) markatu dira.

#### 4.4.3. Hsp70aren aurkako erreatibitatearen prebalentziaren azterketa

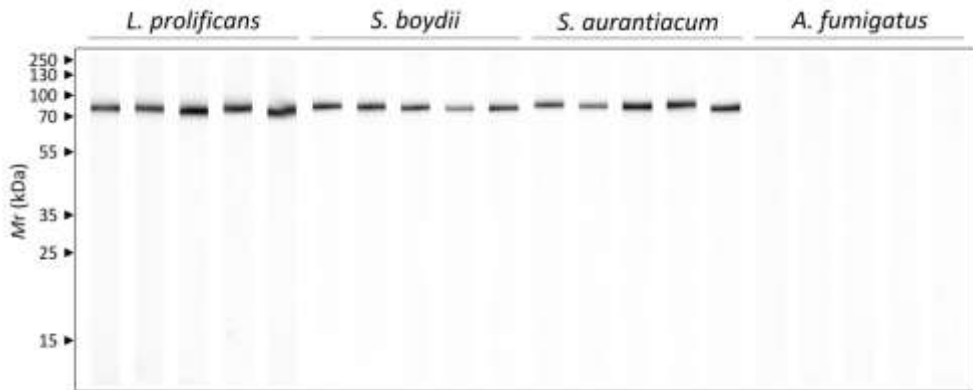
Hsp70a *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieekin infektatutako saguen serumek ezagututako *L. prolificans*en aterakin totalaren antigeno immunoerreaktiboa izan zen. Antigeno horren aurkako erantzun humoralak sakontasun handiagoz aztertzeko asmoz, Hsp70a *L. prolificans*en aterakin totalatik purifikatu zen elektroeluzio bidez.

Elektroeluitutako proteinaren laginak 1DEko gelean bereizi ziren, proteina behar bezala purifikatuta zegoela egiaztatzeko (4.23. irudia). Proteina aterakin totalaren 1DEan ez bezala, elektroeluitutako Hsp70aren laginean 70 kDa-ko banda bakarria behatu zen (4.23B irudia), eta honekin intereseko proteinaren elektroeluzioa era zuzenean burutu zela frogatu zen.



**4.23. irudia. *Lomentospora prolificans*en Hsp70aren purifikazio zuzenaren azterketa.** *L. prolificans*en proteina aterakin totalaren 1DEa (A) eta elektroeluitutako Hsp70arena (B).

Hsp70 antigenoaren prebalentzia eta espezifotasuna zehazteko, infektatutako saguen serumak banaka purifikatutako Hsp70arekin jarri ziren kontaktuan 1DWB bidez (4.24. irudia). Guztira 25 serum (5 serum/talde) aztertu ziren, honako talde hauetakoak *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieen  $10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako taldeak, *A. fumigatus* espeziearen  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiarekin infektatutako taldea, eta kontrol-taldea. Horretarako, alde zuzenetik hautatutako 1/1.000 diluzioa erabili zen. *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieekin infektatutako saguen serum guztiekin erreaktibitate altua detektatu zen purifikatutako Hsp70aren aurrean. Kontrol-taldearen kasuan (erakutsi gabeko datuak) eta *A. fumigatus*ekin infektatutako saguen kasuan, aldiz, ez zen erreaktibitateirik detektatu.



**4.24. irudia. Onddo desberdinekin infektatutako saguen erantzun humorala purifikatutako Hsp70aren aurka.** *L. prolificans*, *S. boydii* eta *S. aurantiacum* espezieen  $10^5$  konidio/animalia eta *A. fumigatus*en  $5 \times 10^6$  konidio/animalia dosiekin infektatutako saguen erantzun humorala purifikatutako *L. prolificans*en Hsp70aren aurka. Talde bakoitzeko bost serum erabili ziren banaka.

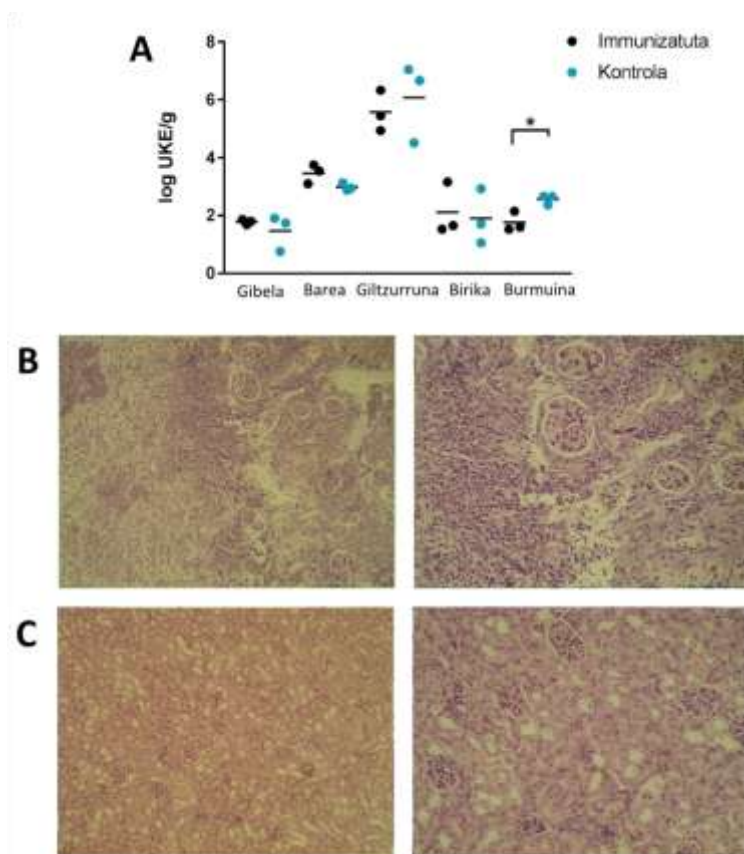
#### 4.5. Immunizazio-eredu baten garapena *L. prolificans*ek eragindako infekzioen aurrean

Onddoarekin kontaktua eduki ondoren lortutako babes-efektua aztertzeko, hurrengo esperimendua aurrera eraman zen. Esperimendu honetan, bi Swiss sagu talde erabili ziren eta 5 sagu/taldeko. Talde bati infekziosoak ez ziren bi dosi eman zitzaizkion zain barnetik, lehenengo dosia  $10^2$  konidio/animalia-koa eta bigarrena  $10^3$  konidio/animalia-koa (immunizatutako taldea). Bigarren sagu taldeari inokulu horien ordeztu gis-Tween 20 administratu zitzaion (kontrol-taldea). Ondoren, immunizazio-prozesuaren babes-efektua aztertzeko, sagu guztiei inokulu infekzioso bat ( $2 \times 10^5$  konidio/animalia) administratu zitzaion zain barnetik, kontrol-taldea barne.

Saguen organo guztietan detektatutako onddo-karga altuak *L. prolificans*en infekzio barreiatuaren garapena baieztatu zuen, bi taldeetan oso antzekoak ziren UKE zenbaketak lortuz (4.25A irudia). Zehazki, giltzurrunak eta barea izan ziren organo kaltetuenak, eta talde immunizatuan eta kontrol taldean honako balio hauek lortu ziren, hurrenez hurren  $5,58 \pm 0,70$  log UKE/g eta  $6,08 \pm 1,37$  log UKE/g giltzurrunetan, eta  $3,46 \pm 0,33$  log UKE/g eta  $2,99 \pm 0,13$  log UKE/g barean. Bi taldeen arteko alderik handiena burmuinean antzeman zen, UKEen murrizketa nabarmena detektatuz talde immunizatuan kontrol taldearekin alderatuz. Bestalde, organoen analisi histologikoan hantura-fokuak soilik detektatu ziren immunizatutako taldeko giltzurrunetan.



Kontrol-taldekoen giltzurrunetan, berriz, oso erantzun organiko gutxi hauteman zen (4.25B-C irudia).

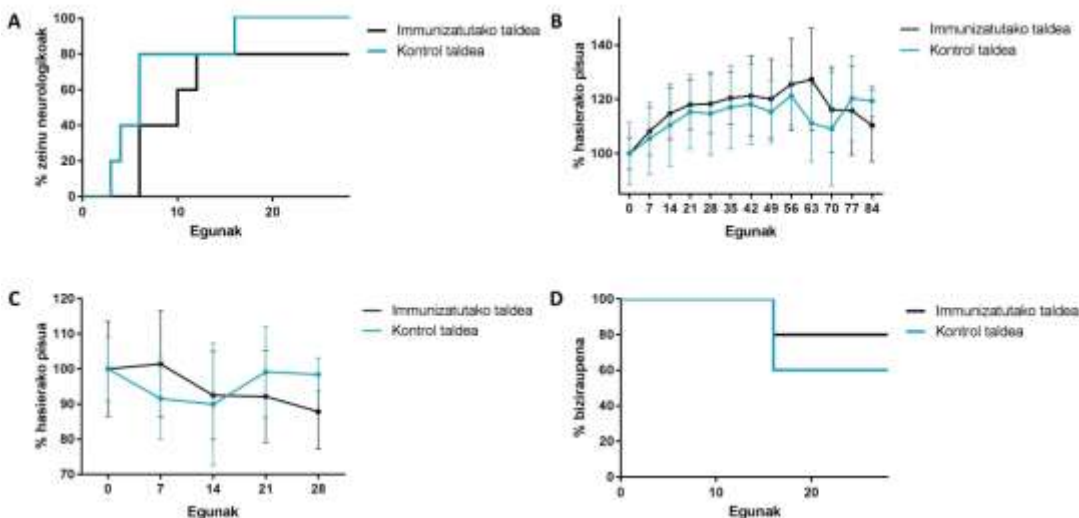


**4.25. irudia.** Kontrol-taldeko eta immunizatutako taldeko saguen organoen analisia *L. prolificans*  $2 \times 10^5$  konidio/animalia dosiarekin infektatu ostean. Kontrol-taldeko eta immunizatutako taldeko organoen onddo-kargaren emaitzak (A). Immunizatutako taldeko (B) eta kontrol-taldeko (C) giltzurrunen sekzio adierazgarriak hematoxilina-eosinarekin tindatuta. Onddo-karga t-Student testa erabiliz alderatu zen;\*  $p < 0,05$ .

Inokulu infekziosoa zain barnetik administratu ondoren, animalien eguneroko ongizatearen jarraipena egin zen. Infekzioari lotutako zeinuak ikerlanean erabilitako sagu guztietan antzeman ziren. Bi taldeetan pisu-galera larria, makurtutako sabelaldea, ile tentea, isolamendua, letargi iraunkorra, ustekabeko soinuei erantzun falta, eta zeinu neurologikoak detektatu ziren. Gainera, kontrol-taldean beste zeinu neurologiko batzuk hauteman ziren, hala nola ataxia eta orekaren erabateko galera, eta talde immunizatuan, berriz, induzitutako mugimenduen falta eta mugimendu errepikakorren presentzia detektatu ziren.

Zehazki, gehien behatu zirenak makurtutako sabelalde, ile tentea, isolamendua, letargia iraunkorra, pisu-galera larria eta alterazio neurologikoak izan ziren. Induzitutako mugimenduen falta eta ustekabeko soinuei erantzun falta detektatu ziren, bai eta mugimendu errepikakorren presentzia ere. Detektatutako zeinu neurologiko nagusia alde baterantz makurtzea izan zen,

Bi taldeetan zeinu neurologiko nagusia alde baterantz makurtzea izan zen. Zeinu hau inokulu infekziosoa eman eta 3 eta 6 egunera detektatu zen, hurrenez hurren, kontrol-taldeko eta immunizatutako taldeko saguen % 100ean eta % 80an (4.26A irudia). Inokulu infekziosoa administratu ondoren pisua-galera detektatu zen bi taldeetan, ostean kontrol-taldeko saguek hasierako pisua berreskuratu zutelarik (4.26B-C irudia). Bi taldeetan lehen heriotza inokulu infekziosoa eman eta 16 egunera detektatu zen. Ikerlanaren amaieran % 60ko biziraupen-tasa lortu zen kontrol-taldearentzat, immunizatutako taldearen % 80ren aldean (26D irudia).



**4.26. irudia. Kontrol-taldearen eta immunizatutako taldearen animalien ongizatearen monitorizazioa *Lomentospora prolificans*  $2 \times 10^5$  konidio/animalia zain barnetik administratu ondoren.** Zeinu neurologikoen detekzioa (A). Saguen asteroko pisua esperimentuak iraun zuen 84 egunetan (B) eta *L prolificans*  $2 \times 10^5$  konidio/animalia administratu ostean (C). Saguen biziraupen-kurba (D).

Beraz, aztertutako parametro guztiek hobekuntza bat erakutsi zuten immunizatutako taldean kontrol-taldearekin alderatuta. Zehazki, immunizatutako taldean zeinu neurologikoen agerpenean atzerapena, hilkortasunaren murrizketa eta garuneko UKEn zenbaketan murrizketa nabarmena detektatu ziren.

---

**Eztabaida (laburtuta)**

---



Lan honetan egindako ikerketa immunoproteomikoari esker diagnostikorako eta tratamendurako interesgarriak diren *L. prolificans* antigenoak identifikatu ahal izan dira. Zehazki, gizaki osasuntsuen listuko IgAren errektibitatearen prebalentzia altua deskribatu da ondoaren ziklofilinaren eta enolasaren aurrean, eta honek, entzima hauek zelula-gainazalean kokatuta egotearekin batera, diana terapeutiko gisa edo txertoak garatzeko hautagai potentzial bihurtzen ditu. Gainera, entzima horien errektibitate gurutzatua frogatu da *A. fumigatus*ekin, eta hau interesgarria izan daiteke bi generoen aurkako tratamendu eraginkorrak garatzeko.

Bestalde, *L. prolificans* ikerlan honetako espezierik birulentoena dela frogatu da, ondoren *Scedosporium* spp. generoko espezieak eta, azkenik, *A. fumigatus* espeziea, birulentzia txikienekoa. Beste espezieekin alderatuta, *L. prolificans*-ek eragindako infekzioetan konidio ugari detektatu dira ehunetan, eta burmuina infektatzeko joera handiagoa. Infekzio horietatik lortutako serumen IgG serikoek ezagututako *L. prolificans*en antigeno immunodominanteak identifikatu ziren. Antigeno hauek *S. boydii* eta *S. aurantiacum*ekin infektatuko saguen serumekin errektibitate gurutzatu handia erakutsi zuten, baina ez *A. fumigatus*en taldeko serumekin. Horrek zaildu egiten du antigeno hauek *Lomentospora/Scedosporium* espezieen arteko diagnostiko diferentziala egiteko erabiltzea, baina oso erabilgarria izan daiteke espezie-konplexu hau *Aspergillus* generotik bereizteko. Identifikatutako proteina batzuk, hala nola proteasomako ubikitina-hartzailea, CPY, Vps28, HAD gisako hidrolasa, GH16, Hp jhlp\_006787 eta zerato-platanina, diana terapeutiko gisa ere interesgarriak izan daitezke, gizakien proteinekin duten homologia baxuagatik. Aipamen berezia merezi duen beste proteina bat Hsp70 da, *L. prolificans* eta *Scedosporium* spp generoko espezieekin infektatutako saguen serum guztiek ezagutu baitzuten. Gainera, proteina oso kontserbatua izan arren, K-muturren antzekotasun baxuko zati bat du, eta zati honen potentzial klinikoa etorkizuneko ikerketetan aztertu beharko litzateke.



---

**Ondorioak**

---





1. Ziklofilina eta enolasa *L. prolificansen* kondidioetan identifikatu dira listu-IgAk ezagututako antigeno gisa, prebalentzia eta erreaktibitate altuarekin pertsona osasuntsuen populazio batean.

2. *L. prolificansen* ziklofilina eta enolasa listu-IgAren bidez detektatu dira onddoaren zelula-paretaren gainazaletik erauzitako proteinen artean, eta erreaktibitate gurutzatua erakutsi dute *A. fumigatus*ekin. Hori dela eta, entzima hauek diana terapeutiko gisa edo bi generoen aurkako txertoak garatzeko hautagai potentzialak dira.

3. *L. prolificans* espeziea *S. aurantiacum* eta *S. boydii* baino birulentoagoa da infekzio barreiatuko eredu murinoan, eta espezie horiek, aldi berean, *A. fumigatus* baino birulentoagoak dira. Beste infekzioekin alderatuta, *L. prolificans*ek eragindako infekzioek konidio-kantitate altua dute ehunetan eta burmuina infektatzeko joera handiagoa dute.

4. *L. prolificans*ekin infektatutako saguen IgG serikoek ezagututako onddo honen antigeno immunodominanteenak erreaktibitate gurutzatu handia erakutsi zuten *Scedosporium* spp.-ekin infektatutako saguen serumekin, baina ez *A. fumigatus*enekin. Honek, antigeno hauen erabilgarritasuna eragozten du *Scedosporium/Lomentospora* espezieen arteko diagnostiko diferentzial bat egiteko, baina garrantzi handikoa izan daiteke hauek *Aspergillus* espezieegandik bereizteko.

5. Identifikatutako antigenoen artean, bai sekretoman bai aterakin totalan identifikatutako HAD gisako hidrolasa, aterakin totaleko proteasomako ubikitina-hartzailea, CPY, eta Vps28, eta jariatutako GH16, Hp jhlp\_006787 eta zerato-platanina interesgarriak izan daitezke diana terapeutiko gisa, euren giza homologoekin duten homologia eza edo baxua dela eta.

6. Hsp70a, *Lomentospora/Scedosporium* barreiatutako infekzioa zuten saguen serumek ezagututako *L. prolificansen* sekretomaren eta aterakin totalaren antigeno gisa identifikatu zen. Proteina hau, aterakin totaleko proteina immunoerreaktiboena bezala identifikatu zen, saguen %100ek ezagututakoa. Hsp70a proteina kontserbatua izan arren, K-muturrean aldakotasun handiagoko zati bat du, interes kliniko handikoa izan daitekeena, diana diagnostiko edo terapeutiko gisa.

7. Eredu murino batean *L. prolificansen* dosi ez-infekziosoen zain barneko administrazioak babes arina sortzen du geroko infekzio baten aurrean. Infekzioarekin lotutako

parametro guztiek hobera egin zuten, garuneko onddo-kargaren murrizketa nabarmena azpimarratuz.

---

## **Bibliografía**

---



1. Harun, A.; Gilgado, F.; Chen, S.C.; Meyer, W. Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 2010, 48 Suppl 1, S70–S76.
2. Bouchara, J.-P.; Horr , R.; de Hoog, S. *Pseudallescheria* and *Scedosporium*: emerging opportunists. *Med. Mycol.* 2009, 47, 341–342.
3. Rodr guez-Tudela, J.L.; Berenguer, J.; Guarro, J.; Kantarcioglu, a S.; Horre, R.; de Hoog, G.S.; Cuenca-Estrella, M. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med. Mycol.* 2009, 47, 359–370.
4. Tintelnot, K.; Just-N bling, G.; Horre, R.; Graf, B.; Sobottka, I.; Seibold, M.; Haas, A.; Kaben, U.; De Hoog, G.S. A review of German *Scedosporium prolificans* cases from 1993 to 2007. *Med. Mycol.* 2009, 47, 351–358.
5. Bhagavatula, S.; Vale, L.; Evans, J.; Carpenter, C.; Barnes, R.A. *Scedosporium prolificans* osteomyelitis following penetrating injury: A case report. *Med. Mycol. Case Rep.* 2014, 4, 26–29.
6. Johnson, L.S.; Shields, R.K.; Clancy, C.J. Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of *Scedosporium* infections among solid organ transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 2014, 16, 578–587.
7. Song, M.J.; Lee, J.H.; Lee, N.Y. Fatal *Scedosporium prolificans* infection in a paediatric patient with acute lymphoblastic leukaemia. *Mycoses* 2011, 54, 81–83.
8. Seidel, D.; Meißner, A.; Lackner, M.; Piepenbrock, E.; Salmanton-García, J.; Stecher, M.; Mellinshoff, S.; Hamprecht, A.; Dur n Graeff, L.; K hler, P.; et al. Prognostic factors in 264 adults with invasive *Scedosporium* spp. and *Lomentospora prolificans* infection reported in the literature and FungiScope<sup>®</sup>. *Crit. Rev. Microbiol.* 2019, 45, 1–21.
9. Jenks, J.D.; Reed, S.L.; Seidel, D.; Koehler, P.; Cornely, O.A.; Mehta, S.R.; Hoenigl, M. Rare mould infections caused by Mucorales, *Lomentospora prolificans* and *Fusarium*, in San Diego, CA: the role of antifungal combination therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2018, 52, 706–712.
10. Cortez, K.J.; Roilides, E.; Quiroz-Telles, F.; Meletiadis, J.; Antachopoulos, C.; Knudsen, T.; Buchanan, W.; Milanovich, J.; Sutton, D. a.; Fothergill, A.; et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, 21, 157–197.
11. Hennebert, G.L.; Desai, B.G. *Lomentospora prolificans*, a new hyphomycete from greenhouse soil. *Mycotaxon* 1974.

12. Lennon, P.A.; Cooper, C.R.; Salkin, I.F.; Lee, S.B. Ribosomal DNA internal transcribed spacer analysis supports synonymy of *Scedosporium inflatum* and *Lomentospora prolificans*. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 2413-2416.
13. Hawksworth, D.L. A new dawn for the naming of fungi: Impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2011, 2, 155-162..
14. Lackner, M.; de Hoog, G.S.; Yang, L.; Ferreira Moreno, L.; Ahmed, S. a.; Andreas, F.; Kaltseis, J.; Nagl, M.; Lass-Flörl, C.; Risslegger, B.; et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers.* 2014, 67, 1-10.
15. Ramirez-Garcia, A.; Pellon, A.; Rementeria, A.; Buldain, I.; Barreto-Bergter, E.; Rollin-Pinheiro, R.; De Meirelles, J.V.; Xisto, M.I.D.S.; Ranque, S.; Havlicek, V.; et al. *Scedosporium* and *Lomentospora*: An updated overview of underrated opportunists. *Med. Mycol.* 2018, 56, S102–S125.
16. Guarro, J.; Kantarcioglu, a S.; Horr , R.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Cuenca Estrella, M.; Berenguer, J.; de Hoog, G.S. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* 2006, 44, 295–327.
17. Kaltseis, J.; Rainer, J.; De Hoog, G.S. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med. Mycol.* 2009, 47, 398–405.
18. Rougeron, A.; Schuliar, G.; Leto, J.; Sitterl , E.; Landry, D.; Bougnoux, M.E.; Kobi, A.; Bouchara, J.P.; Giraud, S. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ. Microbiol.* 2015, 17, 1039–1048.
19. Gilgado, F.; Cano, J.; G ne, J.; Serena, C.; Guarro, J. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med. Mycol.* 2009, 47, 371–374.
20. Delhaes, L.; Harun, A.; Chen, S.C. a; Nguyen, Q.; Slavin, M.; Heath, C.H.; Maszewska, K.; Halliday, C.; Robert, V.; Sorrell, T.C.; et al. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 282–290.
21. Heath, C.H.; Slavin, M. a.; Sorrell, T.C.; Handke, R.; Harun, a.; Phillips, M.; Nguyen, Q.; Delhaes, L.; Ellis, D.; Meyer, W.; et al. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: Epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009, 15, 689–693.

22. Idigoras, P.; Pérez-Trallero, E.; Piñeiro, L.; Larruskain, J.; López-Lopategui, M.C.; Rodríguez, N.; González, J.M. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990-1999. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32, e158–e165.
23. Brown, G.D.; Denning, D.W.; Gow, N. a R.; Levitz, S.M.; Netea, M.G.; White, T.C. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4, 165rv13.
24. Alastruey-Izquierdo, a.; Mellado, E.; Peláez, T.; Pemán, J.; Zapico, S.; Alvarez, M.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57, 3380–3387.
25. Slavin, M.; van Hal, S.; Sorrell, T.C.; Lee, A.; Marriott, D.J.; Daveson, K.; Kennedy, K.; Hajkovicz, K.; Halliday, C.; Athan, E.; et al. Invasive infections due to filamentous fungi other than *Aspergillus*: Epidemiology and determinants of mortality. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015, 21, 490.e1-490.e10.
26. Kooijman, C.M.; Kampinga, G.A.; Sybren De Hoog, G.; Goudswaard, W.B.; Reijnen, M.M.P.J. Successful treatment of *Scedosporium aurantiacum* osteomyelitis in an immunocompetent patient. *Surg. Infect. (Larchmt)*. 2007, 8, 605–610.
27. Nakamura, Y.; Suzuki, N.; Nakajima, Y.; Utsumi, Y.; Murata, O.; Nagashima, H.; Saito, H.; Sasaki, N.; Fujimura, I.; Ogino, Y.; et al. *Scedosporium aurantiacum* brain abscess after near-drowning in a survivor of a tsunami in Japan. *Respir. Investig.* 2013, 51, 207–211.
28. Delfino, E.; Del Puente, F.; Briano, F.; Sepulcri, C.; Giacobbe, D.R. Respiratory Fungal Diseases in Adult Patients With Cystic Fibrosis. *Clin. Med. Insights Circ. Respir. Pulm. Med.* 2019, 13.
29. Singh, A.; Ralhan, A.; Schwarz, C.; Hartl, D.; Hector, A. Fungal Pathogens in CF Airways: Leave or Treat? *Mycopathologia* 2018, 183, 119–137.
30. Schwarz, C.; Brandt, C.; Whitaker, P.; Sutharsan, S.; Skopnik, H.; Gartner, S.; Smazny, C.; Röhmel, J.F. Invasive Pulmonary Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia* 2018, 183, 33–43.
31. Elkin, S.; Geddes, D. Pseudomonal infection in cystic fibrosis: The battle continues. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2003, 1, 609–618.
32. Ziesing, S.; Suerbaum, S.; Sedlacek, L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. *Med. Mycol.* 2016, 54, 781–786.

33. Middleton, P.G.; Chen, S.C.A.; Meyer, W. Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2013, 19, 670–675.
34. Zouhair, R.; Rougeron, A.; Razafimandimby, B.; Kobi, A.; Bouchara, J.P.; Giraud, S. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 2013.
35. Sedlacek, L.; Graf, B.; Schwarz, C.; Albert, F.; Peter, S.; Würstl, B.; Wagner, S.; Klotz, M.; Becker, A.; Haase, G.; et al. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J. Cyst. Fibros.* 2015, 14, 237–241.
36. Lackner, M.; Rezusta, A.; Villuendas, M.C.; Palacian, M.P.; Meis, J.F.; Klaassen, C.H. Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An in vitro antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses* 2011, 54, 12–21.
37. Blyth, C.C.; Harun, A.; Middleton, P.G.; Sleiman, S.; Lee, O.; Sorrell, T.C.; Meyer, W.; Chen, S.C.A. Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48, 314-316.
38. Pihet, M.; Carrere, J.; Cimon, B.; Chabasse, D.; Delhaes, L.; Symoens, F.; Bouchara, J.P. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis - A review. *Med. Mycol.* 2009, 47, 387–397.
39. Bernhardt, A.; Sedlacek, L.; Wagner, S.; Schwarz, C.; Würstl, B.; Tintelnot, K. Multilocus sequence typing of *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 2013, 12, 592–598.
40. Serda Kantarcioglu, A.; Sybren de Hoog, G.; Guarro, J. Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. *Rev. Iberoam. Micol.* 2012, 29, 1–13.
41. Crawford, J.B. Bilateral Endogenous *Scedosporium prolificans* Endophthalmitis After Lung Transplantation. 2005.
42. Paaanen, J.; Halme, M.; Palomäki, M.; Anttila, V.J. Disseminated *Scedosporium apiospermum* central nervous system infection after lung transplantation: A case report with successful recovery. *Med. Mycol. Case Rep.* 2019, 24, 37–40.
43. Ference, E.H.; Kubak, B.M.; Zhang, P.; Suh, J.D. Successful Treatment of *Scedosporium* Sinusitis in Two Lung Transplant Recipients: Review of the Literature and Recommendations for Management . *Allergy Rhinol.* 2019, 10, 215265671982725.



44. Rammaert, B.; Puyade, M.; Cornely, O.A.; Seidel, D.; Grossi, P.; Husain, S.; Picard, C.; Lass-Flörl, C.; Manuel, O.; Le Pavec, J.; et al. Perspectives on *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in lung transplantation: Results of an international practice survey from ESCMID fungal infection study group and study group for infections in compromised hosts, and European Confederatio. *Transpl. Infect. Dis.* 2019, 0–2.
45. Marco de Lucas, E.; Sádaba, P.; Lastra García-Barón, P.; Ruiz Delgado, M.L.; Cuevas, J.; Salesa, R.; Bermúdez, A.; González Mandly, A.; Gutiérrez, A.; Fernández, F.; et al. Cerebral scedosporiosis: An emerging fungal infection in severe neutropenic patients: CT features and CT pathological correlation. *Eur. Radiol.* 2006, 16, 496–502.
46. Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003, 11, 272–279.
47. Latgé, J.P. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 2007.
48. Ostrosky-Zeichner, L.; Casadevall, A.; Galgiani, J.N.; Odds, F.C.; Rex, J.H. An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 719–727.
49. Troke, P.; Aguirrebengoa, K.; Arteaga, C.; Ellis, D.; Heath, C.H.; Lutsar, I.; Rovira, M.; Nguyen, Q.; Slavin, M.; Chen, S.C.A. Treatment of scedosporiosis with voriconazole: Clinical experience with 107 patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 1743–1750.
50. Bocanegra, R.; Najvar, L.K.; Hernandez, S.; McCarthy, D.I.; Graybill, J.R. Caspofungin and liposomal amphotericin B therapy of experimental murine scedosporiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005.
51. Ortoneda, M. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002.
52. Capilla, J.; Yustes, C.; Mayayo, E.; Fernández, B.; Ortoneda, M.; Pastor, F.J.; Guarro, J. Efficacy of albaconazole (UR-9825) in treatment of disseminated *Scedosporium prolificans* infection in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003.
53. Tortorano, a. M.; Richardson, M.; Roilides, E.; van Diepeningen, a.; Caira, M.; Munoz, P.; Johnson, E.; Meletiadis, J.; Pana, Z.D.; Lackner, M.; et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20, 27–46.

54. Meletiadis, J.; Mouton, J.W.; Meis, J.F.G.M.; Verweij, P.E. In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003.
55. Ochi, Y.; Hiramoto, N.; Takegawa, H.; Yonetani, N.; Doi, A.; Ichikawa, C.; Imai, Y.; Ishikawa, T. Infective endocarditis caused by *Scedosporium prolificans* infection in a patient with acute myeloid leukemia undergoing induction chemotherapy. *Int. J. Hematol.* 2015, 101, 620–625.
56. Ananda-Rajah, M.R.; Grigg, A.; Slavin, M.A. Breakthrough disseminated *Scedosporium prolificans* infection in a patient with relapsed leukaemia on prolonged voriconazole followed by posaconazole prophylaxis. *Mycopathologia* 2008, 166, 83–86.
57. Bhat, S. V.; Paterson, D.L.; Rinaldi, M.G.; Veldkamp, P.J. *Scedosporium prolificans* brain abscess in a patient with chronic granulomatous disease: Successful combination therapy with voriconazole and terbinafine. *Scand. J. Infect. Dis.* 2007, 39, 87–90.
58. Gosbell, I.B.; Toumasatos, V.; Yong, J.; Kuo, R.S.; Ellis, D.H.; Perrie, R.C. Cure of orthopaedic infection with *Scedosporium prolificans*, using voriconazole plus terbinafine, without the need for radical surgery. *Mycoses* 2003, 46, 233–236.
59. Howden, B.P.; Slavin, M.A.; Schwarzer, A.P.; Mijch, A.M. Successful control of disseminated *Scedosporium prolificans* infection with a combination of voriconazole and terbinafine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 22, 111–113.
60. Li, J.Y.Z.; Yong, T.Y.; Grove, D.I.; Coates, P.T.H. Successful control of *Scedosporium prolificans* septic arthritis and probable osteomyelitis without radical surgery in a long-term renal transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 2008, 10, 63–65.
61. Heyn, K.; Tredup, A.; Salvenmoser, S.; Müller, F.M.C. Effect of voriconazole combined with micafungin against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005.
62. Yustes, C.; Guarro, J. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005.
63. Cuenca-Estrella, M.; Alastruey-Izquierdo, A.; Alcazar-Fuoli, L.; Bernal-Martinez, L.; Gomez-Lopez, A.; Buitrago, M.J.; Mellado, E.; Rodriguez-Tudela, J.L. In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008.
64. Widmer, F.; Wright, L.C.; Obando, D.; Handke, R.; Ganendren, R.; Ellis, D.H.; Sorrell, T.C. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal

activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006.

65. Quaeset, L.; Stindel, E.; Lanternier, F.; Williams, T.; Jaffuel, S.; Moalic, E.; Garcia Heroso, D.; Lortholary, O.; Ansart, S. Miltefosine-based regimen as salvage therapy in *Lomentospora prolificans* bone and joint infection. *Med. Mal. Infect.* 2018.

66. Kesson, A.M.; Bellemore, M.C.; O'Mara, T.J.; Ellis, D.H.; Sorrell, T.C. *Scedosporium prolificans* Osteomyelitis in an Immunocompetent Child Treated with a Novel Agent, Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), in Combination with Terbinafine and Voriconazole: A Case Report. *Clin. Infect. Dis.* 2009.

67. Trubiano, J.A.; Paratz, E.; Wolf, M.; Teh, B.W.; Todaro, M.; Thursky, K.A.; Slavin, M.A. Disseminated *Scedosporium prolificans* infection in an "extensive metaboliser": Navigating the minefield of drug interactions and pharmacogenomics. *Mycoses* 2014.

68. Rodríguez, M.M.; Calvo, E.; Serena, C.; Mariné, M.; Pastor, F.J.; Guarro, J. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009.

69. Martin-Vicente, A.; Guarro, J.; Capilla, J. Does a triple combination have better activity than double combinations against multiresistant fungi? Experimental in vitro evaluation. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2017.

70. Johnson, M.E.; Katiyar, S.K.; Edlind, T.D. New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic resistance of *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011.

71. Pellon, A.; Andoni, R.G.; Idoia, B.; Aitziber, A.; Aitor, R.; Fernando, L.H. Molecular and cellular responses of the pathogenic fungus *Lomentospora prolificans* to the antifungal drug voriconazole. *PLoS One* 2017, 12, 1–14.

72. Pellon, A.; Ramirez-Garcia, A.; Buldain, I.; Antoran, A.; Martin-Souto, L.; Rementeria, A.; Hernando, F.L. Pathobiology of *Lomentospora prolificans*: could this species serve as a model of primary antifungal resistance? *Int. J. Antimicrob. Agents* 2018, 51, 10–15.

73. Lamoth, F.; Alexander, B.D.; Juvvadi, P.R.; Steinbach, W.J. Antifungal activity of compounds targeting the Hsp90-calcineurin pathway against various mould species. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, 70, 1408–1411.

74. Oliver, J.D.; Sibley, G.E.M.; Beckmann, N.; Dobb, K.S.; Slater, M.J.; McEntee, L.; Du Pré, S.; Livermore, J.; Bromley, M.J.; Wiederhold, N.P.; et al. F901318 represents a novel

class of antifungal drug that inhibits dihydroorotate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016.

75. Biswas, C.; Law, D.; Birch, M.; Halliday, C.; Sorrell, T.C.; Rex, J.; Slavin, M.; Chen, S.C.A. In vitro activity of the novel antifungal compound F901318 against Australian *Scedosporium* and *Lomentospora* fungi. *Med. Mycol.* 2018, 56, 1050–1054.

76. Wiederhold, N.P.; Law, D.; Birch, M. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor F901318 has potent in vitro activity against *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017, 72, 1977–1980.

77. Castanheira, M.; Duncanson, F.P.; Diekema, D.J.; Guarro, J.; Jones, R.N.; Pfaller, M.A. Activities of E1210 and comparator agents tested by CLSI and EUCAST broth microdilution methods against *Fusarium* and *Scedosporium* species identified using molecular methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 352–357.

78. Grisham, M.B.; Jefferson, M.M.; Melton, D.F.; Thomas, E.L. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J. Biol. Chem.* 1984.

79. Arnitz, R.; Stein, M.; Bauer, P.; Lanthaler, B.; Jamnig, H.; Scholl-Bürgi, S.; Stempfl-Al-Jazrawi, K.; Ulmer, H.; Baumgartner, B.; Embacher, S.; et al. Tolerability of inhaled N-chlorotaurine in humans: a double-blind randomized phase I clinical study. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2018.

80. Gottardi, W.; Nagl, M. N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010.

81. Lackner, M.; Binder, U.; Reindl, M.; Gönül, B.; Fankhauser, H.; Mair, C.; Nagl, M. N-Chlorotaurine exhibits fungicidal activity against therapy-refractory *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 6454–6462.

82. Schwienbacher, M.; Treml, B.; Pinna, A.; Geiger, R.; Reinstadler, H.; Pircher, I.; Schmidl, E.; Willomitzer, C.; Neumeister, J.; Pilch, M.; et al. Tolerability of inhaled N-chlorotaurine in an acute pig streptococcal lower airway inflammation model. *BMC Infect. Dis.* 2011.

83. Kumar, R.; Poongadan, M.N.; Singh, M. Allergic bronchopulmonary aspergillosis presenting as lobar or total lung collapse. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2015.

84. Kröner, C.; Kappler, M.; Grimmelt, A.C.; Laniado, G.; Würstl, B.; Griese, M. The basidiomycetous yeast *Trichosporon* may cause severe lung exacerbation in cystic fibrosis

patients - clinical analysis of Trichosporon positive patients in a Munich cohort. BMC Pulm. Med. 2013.

85. Gruber, M.; Moser, I.; Nagl, M.; Lackner, M. Bactericidal and fungicidal activity of N-Chlorotaurine is enhanced in cystic fibrosis sputum medium. Antimicrob. Agents Chemother. 2017.

86. Bouza, E.; Munoz, P.; Vega, L.; Rodriguez-Creixems, M.; Berenguer, J.; Escudero, A. Clinical resolution of *Scedosporium prolificans* fungemia associated with reversal of neutropenia following administration of granulocyte colony-stimulating factor. Clin. Infect. Dis. 1996.

87. Gil-Lamaignere, C.; Winn, R.M.; Simitopoulou, M.; Maloukou, A.; Walsh, T.J.; Roilides, E. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against *Scedosporium* spp.: Comparison with *Aspergillus* spp. Med. Mycol. 2005.

88. Winn, R.M.; Gil-Lamaignere, C.; Roilides, E.; Simitopoulou, M.; Lyman, C.A.; Maloukou, A.; Walsh, T.J. Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp. Cytokine 2005.

89. Gil-Lamaignere, C.; Roilides, E.; Mosquera, J.; Maloukou, A.; Walsh, T.J. Antifungal triazoles and polymorphonuclear leukocytes synergize to cause increased hyphal damage to *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002.

90. Gil-Lamaignere, C.; Roilides, E.; Maloukou, A.; Georgopoulou, I.; Petrikos, G.; Walsh, T.J. Amphotericin B lipid complex exerts additive antifungal activity in combination with polymorphonuclear leukocytes against *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. J. Antimicrob. Chemother. 2002.

91. Casadevall, A. Antibody immunity and invasive fungal infections. Infect. Immun. 1995.

92. Matthews, R.C.; Burnie, J.P. Recombinant antibodies: A natural partner in combinatorial antifungal therapy. In Proceedings of the Vaccine; 2004; Vol. 22, pp. 865–871.

93. Larsen, R. a; Pappas, P.G.; Perfect, J.; Aberg, J. a; Casadevall, A.; Cloud, G. a; James, R.; Filler, S.; Dismukes, W.E. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. Antimicrob. Agents Chemother. 2005, 49, 952–8.

94. Karwa, R.; Wargo, K.A. Efungumab: A novel agent in the treatment of invasive candidiasis. *Ann. Pharmacother.* 2009.
95. Shubitz, L.; Peng, T.; Perrill, R.; Simons, J.; Orsborn, K.; Galgiani, J.N. Protection of mice against *Coccidioides immitis* intranasal infection by vaccination with recombinant antigen 2/PRA. *Infect. Immun.* 2002.
96. Pan, S.; Cole, G.T. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*- specific antigen. *Infect. Immun.* 1995.
97. Peng, T.; Shubitz, L.; Simons, J.; Perrill, R.; Orsborn, K.I.; Galgiani, J.N. Localization within a proline-rich antigen (Ag2/PRA) of protective antigenicity against infection with *Coccidioides immitis* in mice. *Infect. Immun.* 2002, 70, 3330–3335.
98. Shubitz, L.F.; Yu, J.J.; Hung, C.Y.; Kirkland, T.N.; Peng, T.; Perrill, R.; Simons, J.; Xue, J.; Herr, R.A.; Cole, G.T.; et al. Improved protection of mice against lethal respiratory infection with *Coccidioides posadasii* using two recombinant antigens expressed as a single protein. *Vaccine* 2006.
99. Spellberg, B.J.; Ibrahim, A.S.; Avenissian, V.; Filler, S.G.; Myers, C.L.; Fu, Y.; Edwards, J.E. The anti-*Candida albicans* vaccine composed of the recombinant N terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice. *Infect. Immun.* 2005.
100. Ibrahim, A.S.; Spellberg, B.J.; Avenissian, V.; Fu, Y.; Filler, S.G.; Edwards, J.E. Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. *Infect. Immun.* 2005.
101. Ibrahim, A.S.; Spellberg, B.J.; Avanesian, V.; Fu, Y.; Edwards, J.E. The anti-candida vaccine based on the recombinant N-terminal domain of Als1p is broadly active against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* 2006.
102. Spellberg, B.J.; Ibrahim, A.S.; Avanesian, V.; Fu, Y.; Myers, C.; Phan, Q.T.; Filler, S.G.; Yeaman, M.R.; Edwards, Jr., J.E. Efficacy of the Anti- *Candida* rAls3p-N or rAls1p-N Vaccines against Disseminated and Mucosal Candidiasis . *J. Infect. Dis.* 2006.
103. Spellberg, B.; Ibrahim, A.S.; Lin, L.; Avanesian, V.; Fu, Y.; Lipke, P.; Otoo, H.; Ho, T.; Edwards, Jr., J.E. Antibody Titer Threshold Predicts Anti-Candidal Vaccine Efficacy Even though the Mechanism of Protection Is Induction of Cell-Mediated Immunity. *J. Infect. Dis.* 2008.

104. Fleuridor, R.; Zhong, Z.; Pirofski, L. A Human IgM Monoclonal Antibody Prolongs Survival of Mice with Lethal Cryptococcosis. *J. Infect. Dis.* 1998.
105. Mukherjee, J.; Scharff, M.D.; Casadevall, A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 1992.
106. Dromer, F.; Salamero, J.; Contrepolis, A.; Carbon, C.; Yeni, P. Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 1987.
107. Rodrigues, M.L.; Travassos, L.R.; Miranda, K.R.; Franzen, A.J.; Rozental, S.; De Souza, W.; Alviano, C.S.; Barreto-Bergter, E. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.* 2000.
108. Rosas, Á.L.; Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect. Immun.* 2001.
109. Han, Y.; Cutler, J.E. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* 1995.
110. Matthews, R.; Burnie, J. The role of antibodies in protection against candidiasis. *Res. Immunol.* 1998, 149, 343–352.
111. Pahl, J.; Svoboda, P.; Jacobs, F.; Vandewoude, K.; van der Hoven, B.; Spronk, P.; Masterson, G.; Malbrain, M.; Aoun, M.; Garbino, J.; et al. A Randomized, Blinded, Multicenter Trial of Lipid-Associated Amphotericin B Alone versus in Combination with an Antibody-Based Inhibitor of Heat Shock Protein 90 in Patients with Invasive Candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2006.
112. Bugli, F.; Cacaci, M.; Martini, C.; Torelli, R.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M.; Paroni Sterbini, F. Human monoclonal antibody-based therapy in the treatment of invasive candidiasis. *Clin. Dev. Immunol.* 2013.
113. Torosantucci, A.; Bromuro, C.; Chiani, P.; De Bernardis, F.; Berti, F.; Galli, C.; Norelli, F.; Bellucci, C.; Polonelli, L.; Costantino, P.; et al. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J. Exp. Med.* 2005.
114. Liu, M.; Capilla, J.; Johansen, M.E.; Alvarado, D.; Martinez, M.; Chen, V.; Clemons, K. V.; Stevens, D.A. *Saccharomyces* as a vaccine against systemic aspergillosis: “the friend of man” a friend again? *J. Med. Microbiol.* 2011.

115. Capilla, J.; Clemons, K. V.; Liu, M.; Levine, H.B.; Stevens, D.A. *Saccharomyces cerevisiae* as a vaccine against coccidioidomycosis. *Vaccine* 2009.
116. Luo, G.; Gebremariam, T.; Clemons, K. V.; Stevens, D.A.; Ibrahim, A.S. Heat-killed yeast protects diabetic ketoacidotic-steroid treated mice from pulmonary mucormycosis. *Vaccine* 2014.
117. Liu, M.; Clemons, K. V.; Johansen, M.E.; Martinez, M.; Chen, V.; Stevens, D.A. *Saccharomyces* as a vaccine against systemic candidiasis. *Immunol. Invest.* 2012.
118. Majumder, T.; Liu, M.; Chen, V.; Martinez, M.; Alvarado, D.; Clemons, K. V.; Stevens, D.A. Killed *Saccharomyces cerevisiae* Protects Against Lethal Challenge of *Cryptococcus grubii*. *Mycopathologia* 2014.
119. Matthews, R.C.; Rigg, G.; Hodgetts, S.; Carter, T.; Chapman, C.; Gregory, C.; Illidge, C.; Burnie, J. Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2208–2216.
120. Nooney, L.; Matthews, R.C.; Burnie, J.P. Evaluation of Mycograb<sup>®</sup>, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005, 51, 19–29.
121. Harun, A.; Serena, C.; Gilgado, F.; Chen, S.C.; Meyer, W. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med. Mycol.* 2010, 48 Suppl 1, S45–S51.
122. Nweze, E.I.; Okafor, J.I. Comparative virulence of *Scedosporium* species in animal models. *Braz. J. Infect. Dis.* 2009, 14, 271–6.
123. Ortoneda, M.; Pastor, F.J.; Mayayo, E.; Guarro, J. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J. Med. Microbiol.* 2002, 51, 924–928.
124. Lackner, M.; De Hoog, G.S.; Verweij, P.E.; Najafzadeh, M.J.; Curfs-Breuker, I.; Klaassen, C.H.; Meis, J.F. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 2635–2642.
125. Kimura, M.; Maenishi, O.; Ito, H.; Ohkusu, K. Unique histological characteristics of *Scedosporium* that could aid in its identification: Case Report. *Pathol. Int.* 2010, 60, 131–136.



126. Hayden, R.T.; Isotalo, P.A.; Parrett, T.; Wolk, D.M.; Qian, X.; Roberts, G.D.; Lloyd, R. V. In situ hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section. *Diagnostic Mol. Pathol.* 2003, 12, 21–26.
127. Jackson, J.A.; Kaplan, W.; Kaufman, L.; Standard, P. Development of fluorescent-antibody reagents for demonstration of *Pseudallescheria boydii* in tissues. *J. Clin. Microbiol.* 1983, 18, 668–673.
128. Thornton, C.R. Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009, 16, 756–764.
129. Thornton, C.R.; Ryder, L.S.; Le Cocq, K.; Soanes, D.M. Identifying the emerging human pathogen *Scedosporium prolificans* by using a species-specific monoclonal antibody that binds to the melanin biosynthetic enzyme tetrahydroxynaphthalene reductase. *Environ. Microbiol.* 2015, 17, 1023–1038.
130. Rainer, J.; Kaltseis, J.; de Hoog, S.G.; Summerbell, R.C. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2008, 93, 315–322.
131. Horr , R.; Marklein, G.; Siekmeier, R.; Nidermajer, S.; Reiffert, S.M. Selective isolation of *pseudallescheria* and *scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respiration* 2009, 77, 320–324.
132. Gilgado, F.; Cano, J.; Gen , J.; Sutton, D.A.; Guarro, J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 766–771.
133. Pellon, A. Study of *Lomentospora prolificans* pathogenicity: Host immune response and fungal virulence factors. Supervisors: Fernando L. Hernando and Andoni Ramirez. PhD Thesis. University of the Basque Country. Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, 2015.
134. Ostrosky-Zeichner, L.; Alexander, B.D.; Kett, D.H.; Vazquez, J.; Pappas, P.G.; Saeki, F.; Ketchum, P.A.; Wingard, J.; Schiff, R.; Tamura, H.; et al. Multicenter Clinical Evaluation of the (1-3) -D-Glucan Assay as an Aid to Diagnosis of Fungal Infections in Humans. *Clin. Infect. Dis.* 2005.
135. Odabasi, Z.; Paetznick, V.L.; Rodriguez, J.R.; Chen, E.; McGinnis, M.R.; Ostrosky-Zeichner, L. Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Med. Mycol.* 2006.

136. Bertrand, S.; Bouchara, J.P.; Venier, M.C.; Richomme, P.; Duval, O.; Larcher, G. N $\alpha$ -methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 2010.
137. Cimon, B.; Carrère, J.; Vinatier, J.F.; Chazalette, J.P.; Chabasse, D.; Bouchara, J.P. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 19, 53–6.
138. Mina, S.; Marot-Leblond, A.; Cimon, B.; Fleury, M.J.J.; Larcher, G.; Bouchara, J.P.; Robert, R. Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015, 22, 37–45.
139. Pinto, M.R.; Mulloy, B.; Haido, R.M.T.; Travassos, L.R.; Bergter, E.B. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology* 2001.
140. Gilgado, F.; Cano, J.; Gené, J.; Guarro, J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: Proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 4930–4942.
141. Irinyi, L.; Serena, C.; Garcia-Hermoso, D.; Arabatzis, M.; Desnos-Ollivier, M.; Vu, D.; Cardinali, G.; Arthur, I.; Normand, A.C.; Giraldo, A.; et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database - The quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 2015, 53, 313–337.
142. Lackner, M.; Klaassen, C.H.; Meis, J.F.; Van Den Ende, A.H.G.G.; De Hoog, G.S. Molecular identification tools for sibling species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria*. *Med. Mycol.* 2012, 50, 497–508.
143. Weber, M. Genotyping Study of *Scedosporium apiospermum* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. 2002, 40, 2108–2114.
144. San Millán, R.; Quindós, G.; Garaizar, J.; Salesa, R.; Guarro, J.; Pontón, J. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 2270–2274.
145. Ruiz-Díez, B.; Martín-Díez, F.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Álvarez, M.; Martínez-Suárez, J. V. Use of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and PCR- fingerprinting for genotyping a *Scedosporium prolificans* (*inflatum*) outbreak in four leukemic patients. *Curr. Microbiol.* 1997, 35, 186–190.

146. Zouhair, R.; Defontaine, A.; Ollivier, C.; Cimon, B.; Symoens, F.; Hallet, J.N.; Deunff, J.; Bouchara, J.P. Typing of *scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. *J. Med. Microbiol.* 2001, 50, 925–932.
147. Solé, M.; Cano, J.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Pontón, J.; Sutton, D.A.; Perrie, R.; Gené, J.; Rodríguez, V.; Guarro, J. Molecular typing of clinical and environmental isolates of *Scedosporium prolificans* by inter-simple-sequence-repeat polymerase chain reaction. *Med. Mycol.* 2003, 41, 293–300.
148. Harun, A.; Perdomo, H.; Gilgado, F.; Chen, S.C.A.; Cano, J.; Guarro, J.; Meyer, W. Genotyping of *Scedosporium* species: A review of molecular approaches. *Med. Mycol.* 2009, 47, 406–414.
149. Castelli, M. V.; Buitrago, M.J.; Bernal-Martinez, L.; Gomez-Lopez, A.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M. Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis. *J. Clin. Microbiol.* 2008.
150. Harun, A.; Blyth, C.C.; Gilgado, F.; Middleton, P.; Chen, S.C.A.; Meyer, W. Development and validation of a multiplex PCR for detection of *scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011.
151. Lu, Q.; van den Ende, A.H.G.G.; de Hoog, G.S.; Li, R.; Accoceberry, I.; Durand-Joly, I.; Bouchara, J.P.; Hernandez, F.; Delhaes, L. Reverse line blot hybridisation screening of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in patients with cystic fibrosis. *Mycoses* 2011.
152. Sitterlé, E.; Giraud, S.; Leto, J.; Bouchara, J.P.; Rougeron, A.; Morio, F.; Dauphin, B.; Angebault, C.; Quesne, G.; Beretti, J.L.; et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014.
153. Bernhard, M.; Zautner, A.E.; Steinmann, J.; Weig, M.; Groß, U.; Bader, O. Towards proteomic species barcoding of fungi - An example using *Scedosporium/Pseudallescheria* complex isolates. *Fungal Biol.* 2016.
154. Roilides, E.; Simitopoulou, M. Local innate host response and filamentous fungi in patients with cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 2010.
155. Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2011.
156. Lopes, L.C.L.; da Silva, M.I.D.; Bittencourt, V.C.B.; Figueiredo, R.T.; Rollin-Pinheiro, R.; Sassaki, G.L.; Bozza, M.T.; Gorin, P.A.J.; Barreto-Bergter, E. Glycoconjugates and polysaccharides from the *Scedosporium/Pseudallescheria boydii* complex: Structural

characterisation, involvement in cell differentiation, cell recognition and virulence. *Mycoses* 2011.

157. Xisto, M.I.D.S.; Bittencourt, V.C.B.; Liporagi-Lopes, L.C.; Haido, R.M.T.; Mendonça, M.S.A.; Sasaki, G.; Figueiredo, R.T.; Romanos, M.T. V.; Barreto-Bergter, E. O-Glycosylation in cell wall proteins in *Scedosporium prolificans* is critical for phagocytosis and inflammatory cytokines production by macrophages. *PLoS One* 2015.

158. Bittencourt, V.C.B.; Figueiredo, R.T.; Da Silva, R.B.; Mourão-Sá, D.S.; Fernandez, P.L.; Sasaki, G.L.; Mulloy, B.; Bozza, M.T.; Barreto-Bergter, E. An  $\alpha$ -glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and toll-like receptor activation. *J. Biol. Chem.* 2006.

159. Figueiredo, R.T.; Bittencourt, V.C.B.; Lopes, L.C.L.; Sasaki, G.; Barreto-Bergter, E. Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. In *Proceedings of the Carbohydrate Research*; 2012.

160. Da Silva Xisto, M.I.D.; Henao, J.E.M.; Dos Santos Dias, L.; Santos, G.M.P.; De Oliveira Rocha Calixto, R.; Bernardino, M.C.; Taborda, C.P.; Barreto-Bergter, E. Glucosylceramides from *Lomentospora prolificans* induce a differential production of cytokines and increases the microbicidal activity of macrophages. *Front. Microbiol.* 2019.

161. Mello, T.P.; Bittencourt, V.C.B.; Liporagi-Lopes, L.C.; Aor, A.C.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S. Insights into the social life and obscure side of *Scedosporium/Lomentospora* species: ubiquitous, emerging and multidrug-resistant opportunistic pathogens. *Fungal Biol. Rev.* 2019.

162. Brakhage, A.A.; Bruns, S.; Thywissen, A.; Zipfel, P.F.; Behnsen, J. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010.

163. Netea, M.G.; Brown, G.D.; Kullberg, B.J.; Gow, N.A.R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008.

164. Lamarinis, G.A.; Chamilos, G.; Lewis, R.E.; Kontoyiannis, D.P. Virulence Studies of *Scedosporium* and *Fusarium* Species in *Drosophila melanogaster*. *J. Infect. Dis.* 2007.

165. Lamarinis, G.A.; Lewis, R.E.; Chamilos, G.; May, G.S.; Safdar, A.; Walsh, T.J.; Raad, I.I.; Kontoyiannis, D.P. Caspofungin-Mediated  $\beta$ -Glucan Unmasking and Enhancement of Human Polymorphonuclear Neutrophil Activity against *Aspergillus* and Non-*Aspergillus* Hyphae. *J. Infect. Dis.* 2008.

166. Pellon, A.; Ramirez-Garcia, A.; Guruceaga, X.; Zabala, A.; Buldain, I.; Antoran, A.; Anguita, J.; Rementeria, A.; Matute, C.; Hernando, F.L. Microglial immune response is

impaired against the neurotropic fungus *Lomentospora prolificans*. *Cell. Microbiol.* 2018, 20, 1–11.

167. Waldorf, A.R.; Levitz, S.M.; Diamond, R.D. In vivo bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect. Dis.* 1984.

168. Gil-Lamaignere, C.; Roilides, E.; Lyman, C.A.; Simitopoulou, M.; Stergiopoulou, T.; Maloukou, A.; Walsh, T.J. Human Phagocytic Cell Responses to *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*): Variable Susceptibility to Oxidative Injury. *Infect. Immun.* 2003.

169. Gil-Lamaignere, C.; Maloukou, A.; Rodriguez-Tudel, J.L.; Roilides, E. Human phagocytic cell responses to *Scedosporium prolificans*. *Med. Mycol.* 2001.

170. Warris, A.; Netea, M.G.; Verweij, P.E.; Gaustad, P.; Kullberg, B.J.; Weemaes, C.M.R.; Abrahamsen, T.G. Cytokine responses and regulation of interferon-gamma release by human mononuclear cells to *Aspergillus fumigatus* and other filamentous fungi. *Med. Mycol.* 2005.

171. Casadevall, A.; Pirofski, L.A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe* 2012.

172. Pellon, A.; Ramirez-Garcia, A.; Antoran, A.; Fernandez-Molina, J.V.; Abad-Diaz-de-Cerio, A.; Montañez, D.; Sevilla, M.J.; Rementeria, A.; Hernando, F.L. *Scedosporium prolificans* immunomes against human salivary immunoglobulin A. *Fungal Biol.* 2014, 118, 94–105.

173. Pellon, A.; Ramirez-Garcia, A.; Buldain, I.; Antoran, A.; Rementeria, A.; Hernando, F.L. Immunoproteomics-Based Analysis of the Immunocompetent Serological Response to *Lomentospora prolificans*. 2016.

174. Da Silva, B.A.; Sodr , C.L.; Souza-Gonçalves, A.L.; Aor, A.C.; Kneipp, L.F.; Fonseca, B.B.; Rozental, S.; Romanos, M.T.V.; Sola-Penna, M.; Perales, J.; et al. Proteomic analysis of the secretions of *pseudallescheria boydii*, a human fungal pathogen with unknown genome. *J. Proteome Res.* 2012, 11, 172–188.

175. Pitarch, A.; Nombela, C.; Gil, C. Serum antibody signature directed against *Candida albicans* Hsp90 and enolase detects invasive candidiasis in non-neutropenic patients. *J. Proteome Res.* 2014, 13, 5165–5184.

176. Al-Laaiby, A.; Kershaw, M.J.; Penn, T.J.; Thornton, C.R. Targeted disruption of melanin biosynthesis genes in the human pathogenic fungus *Lomentospora prolificans* and its consequences for pathogen survival. *Int. J. Mol. Sci.* 2016.

177. Jahn, B.; Langfelder, K.; Schneider, U.; Schindel, C.; Brakhage, A.A. PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell. Microbiol.* 2002.
178. Pinto, M.R.; De Sá, A.C.M.; Limongi, C.L.; Rozental, S.; Santos, A.L.S.; Barreto-Bergter, E. Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEP2 cells. *Microbes Infect.* 2004.
179. Xisto, M.I.D.S.; Liporagi-Lopes, L.C.; Mu??oz, J.E.; Bittencourt, V.C.B.; Santos, G.M.P.; Dias, L.S.; Figueiredo, R.T.; Pinto, M.R.; Taborda, C.P.; Barreto-Bergter, E. Peptidorhamnomannan negatively modulates the immune response in a scedosporiosis murine model. *Med. Mycol.* 2016, 54, 846–855.
180. Larcher, G.; Cimon, B.; Symoens, F.; Tronchin, G.; Chabasse, D.; Bouchara, J.P. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem. J.* 1996.
181. Silva, B.A.; Pinto, M.R.; Soares, R.M.A.; Barreto-Bergter, E.; Santos, A.L.S. *Pseudallescheria boydii* releases metallopeptidases capable of cleaving several proteinaceous compounds. *Res. Microbiol.* 2006.
182. Rainer, J.; Rambach, G.; Kaltseis, J.; Hagleitner, M.; Heiss, S.; Speth, C. Phylogeny and immune evasion: A putative correlation for cerebral *Pseudallescheria/Scedosporium* infections. *Mycoses* 2011.
183. Lima, O.C.; Larcher, G.; Vandeputte, P.; Lebouil, A.; Chabasse, D.; Simoneau, P.; Bouchara, J.P. Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes Infect.* 2007.
184. Mina, S.; Staerck, C.; d’Almeida, S.M.; Marot, A.; Delneste, Y.; Calenda, A.; Tabiasco, J.; Bouchara, J.P.; Fleury, M.J.J. Identification of *Scedosporium boydii* catalase A1 gene, a reactive oxygen species detoxification factor highly expressed in response to oxidative stress and phagocytic cells. *Fungal Biol.* 2015.
185. de Hoog, G.S.; Marvin-Sikkema, F.D.; Lahpoor, G.A.; Gottschall, J.C.; Prins, R.A.; Guého, E. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Ökologie und Physiologie der opportunistischen Pilze Pseudallescheria boydii und Scedosporium prolificans*. *Mycoses* 1994.
186. Liu, D.; Coloe, S.; Baird, R.; Pedersen, J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR [5]. *J. Clin. Microbiol.* 2000.

187. Luplertlop, N.; Pumeesat, P.; Muangkaew, W.; Wongsuk, T.; Alastruey-Izquierdo, A. Environmental screening for the *Scedosporium apiospermum* species complex in public parks in Bangkok, Thailand. *PLoS One* 2016.
188. Orellana-Muriana, J.M. Animal models in cancer research: Assessment of severity and the application of humane endpoints. *Neuromethods* 2013.
189. Simitopoulou, M.; Gil-Lamaignere, C.; Avramidis, N.; Maloukou, A.; Lekkas, S.; Havlova, E.; Kourounaki, L.; Loebenberg, D.; Roilides, E. Antifungal activities of posaconazole and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo and in mice with disseminated infection due to *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 3801–3805.
190. Pitarch, A.; Sánchez, M.; Nombela, C.; Gil, C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 2002.
191. Dyballa, N.; Metzger, S. Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J. Vis. Exp.* 2009, 2–5.
192. Matthiesen, R.; Trelle, M.B.; Hojrup, P.; Bunkenborg, J.; Jensen, O.N. VEMS 3.0: Algorithms and computational tools for tandem mass spectrometry based identification of post-translational modifications in proteins. *J. Proteome Res.* 2005, 4, 2338–2347.
193. Flückiger, S.; Fijten, H.; Whitley, P.; Blaser, K.; Cramer, R. Cyclophilins, a new family of cross-reactive allergens. *Eur. J. Immunol.* 2002, 32, 10–17.
194. Denning, D.W.; O’Driscoll, B.R.; Hogaboam, C.M.; Bowyer, P.; Niven, R.M. The link between fungi and severe asthma: A summary of the evidence. *Eur. Respir. J.* 2006, 27, 615–626.
195. Simon-Nobbe, B.; Probst, G.; Kajava, A. V.; Oberkofler, H.; Susani, M.; Cramer, R.; Ferreira, F.; Ebner, C.; Breitenbach, M. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 106, 887–895.
196. Hernando, F.L.; Calvo, E.; Abad, A.; Ramírez, A.; Rementería, A.; Sevilla, M.J.; Pontón, J. Identification of protein and mannoprotein antigens of *Candida albicans* of relevance for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Int. Microbiol.* 2007, 10, 103–108.
197. Eroles, P.; Sentandreu, M.; Elorza, M. V.; Sentandreu, R. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology* 1997, 143 ( Pt 2, 313–320.

198. Gomez, F.J.; Gomez, a M.; Deepe, G.S. An 80-kilodalton antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell-mediated immune responses and protection in mice. *Infect. Immun.* 1992, 60, 2565–71.
199. Wang, P.; Cardenas, M.E.; Cox, G.M.; Perfect, J.R.; Heitman, J. Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO Rep.* 2001.
200. Jong, A.Y.; Chen, S.H.M.; Stins, M.F.; Kim, K.S.; Tuan, T.L.; Huang, S.H. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.* 2003.
201. Funk, J.; Schaarschmidt, B.; Slesiona, S.; Hallström, T.; Horn, U.; Brock, M. The glycolytic enzyme enolase represents a plasminogen-binding protein on the surface of a wide variety of medically important fungal species. *Int. J. Med. Microbiol.* 2016.
202. Silva, R.C.; Padovan, A.C.B.; Pimenta, D.C.; Ferreira, R.C.; da Silva, C. V.; Briones, M.R.S. Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014.
203. Donofrio, F.C.; Calil, A.C.A.; Miranda, E.T.; Almeida, A.M.F.; Benard, G.; Soares, C.P.; Veloso, S.N.; De Almeida Soares, C.M.; Mendes Giannini, M.J.S. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: Isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J. Med. Microbiol.* 2009.
204. Silva, B.A.; Souza-Goncalves, A.L.; Pinto, M.R.; Barreto-Bergter, E.; Santos, A.L.S. Metallopeptidase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. *Mycoses* 2011.
205. Ianiri, G.; Clancey, S.A.; Lee, S.C.; Heitman, J. FKBP12-dependent inhibition of calcineurin mediates immunosuppressive antifungal drug action in malassezia. *MBio* 2017.
206. Juvvadi, P.R.; Lee, S.C.; Heitman, J.; Steinbach, W.J. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence* 2017.
207. Steinbach, W.J.; Reedy, J.L.; Cramer, R.A.; Perfect, J.R.; Heitman, J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007.



208. Li, W. qing; Hu, X. chu; Zhang, X.; Ge, Y.; Zhao, S.; Hu, Y.; Ashman, R.B. Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine* 2011, 29, 5526–5533.
209. Xin, H.; Dziadek, S.; Bundle, D.R.; Cutler, J.E. Synthetic glycopeptide vaccines combining  $\beta$ -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008.
210. He, Z.X.; Chen, J.; Li, W.; Cheng, Y.; Zhang, H.P.; Zhang, L.N.; Hou, T.W. Serological response and diagnostic value of recombinant candida cell wall protein enolase, phosphoglycerate kinase, and  $\beta$ -glucosidase. *Front. Microbiol.* 2015.
211. Li, F. qiu; Ma, C. fang; Shi, L. ning; Lu, J. fen; Wang, Y.; Huang, M.; Kong, Q. qian Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. *BMC Infect. Dis.* 2013.
212. Pitarch, A.; Jiménez, A.; Nombela, C.; Gill, C. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics - Clin. Appl.* 2008.
213. Laín, A.; Elguezabal, N.; Amutio, E.; Fernández De Larrinoa, I.; Moragues, M.D.; Pontón, J. Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin. Dev. Immunol.* 2008.
214. Gomez, F.J.; Pilcher-Roberts, R.; Alborzi, A.; Newman, S.L. *Histoplasma capsulatum* cyclophilin A mediates attachment to dendritic cell VLA-5. *J. Immunol.* 2008, 181, 7106–7114.
215. Angiolella, L.; Facchin, M.; Stringaro, a; Maras, B.; Simonetti, N.; Cassone, a Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J. Infect. Dis.* 1996, 173, 684–90.
216. Latgé, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12, 310–350.
217. Benndorf, D.; Müller, A.; Bock, K.; Manuwald, O.; Herbarth, O.; Von Bergen, M. Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2008.

218. Asif, A.R.; Oellerich, M.; Armstrong, V.W.; Gross, U.; Reichard, U. Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. *Electrophoresis* 2010, 31, 1947–1958.
219. Coelho, P.S.R.; Im, H.; Clemons, K. V.; Snyder, M.P.; Stevens, D.A. Evaluating common humoral responses against fungal infections with yeast protein microarrays. *J. Proteome Res.* 2015, 14, 3924–3931.
220. Elizondo-Zertuche, M.; Montoya, A.M.; Robledo-Leal, E.; Garza-Veloz, I.; Sánchez-Núñez, A.L.; Ballesteros-Elizondo, R.; González, G.M. Comparative Pathogenicity of *Lomentospora prolificans* (*Scedosporium prolificans*) Isolates from Mexican Patients. *Mycopathologia* 2017, 182, 681–689.
221. Huertas, B.; Prieto, D.; Pitarch, A.; Gil, C.; Pla, J.; Díez-Orejas, R. Serum antibody profile during colonization of the mouse gut by *Candida albicans*: relevance for protection during a systemic infection. *J. Proteome Res.* 2016, acs.jproteome.6b00383.
222. Pitarch, a; Díez-Orejas, R.; Molero, G.; Pardo, M.; Sánchez, M.; Gil, C.; Nombela, C. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics* 2001, 1, 550–559.
223. Fernández-Arenas, E.; Molero, G.; Nombela, C.; Díez-Orejas, R.; Gil, C. Low virulent strains of *Candida albicans*: Unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics* 2004.
224. Behnsen, J.; Lessing, F.; Schindler, S.; Wartenberg, D.; Jacobsen, I.D.; Thoen, M.; Zipfel, P.F.; Brakhage, A.A. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infect. Immun.* 2010.
225. Santos, A.L.S.; Bittencourt, V.C.B.; Pinto, M.R.; Silva, B.A.; Barreto-Bergter, E. Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. In *Proceedings of the Medical Mycology*; 2009.
226. Champer, J.; Ito, J.I.; Clemons, K. V.; Stevens, D.A.; Kalkum, M. Proteomic analysis of pathogenic fungi reveals highly expressed conserved cell wall proteins. *J. Fungi* 2016, 2, 1–19.
227. Kumar, A.; Ahmed, R.; Singh, P.K.; Shukla, P.K. Identification of virulence factors and diagnostic markers using immunosecretome of *Aspergillus fumigatus*. *J. Proteomics* 2011, 74, 1104–1112.

228. Schwienbacher, M.; Weig, M.; Thies, S.; Regula, J.T.; Heesemann, J.; Ebel, F. Analysis of the major proteins secreted by the human opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro conditions. *Med. Mycol.* 2005, 43, 623–630.
229. Gautam, P.; Sundaram, C.S.; Madan, T.; Gade, W.N.; Shah, a.; Sirdeshmukh, R.; Sarma, P.U. Identification of novel allergens of *Aspergillus fumigatus* using immunoproteomics approach. *Clin. Exp. Allergy* 2007, 37, 1239–1249.
230. Singh, B.; Oellerich, M.; Kumar, R.; Kumar, M.; Bhadoria, D.P.; Reichard, U.; Gupta, V.K.; Sharma, G.L.; Asif, A.R. Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *aspergillus fumigatus*. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 5517–5529.
231. Ramirez-Garcia, A.; Pellon, A.; Buldain, I.; Antoran, A.; Arbizu-Delgado, A.; Guruceaga, X.; Rementeria, A.; Hernando, F.L. Proteomics as a Tool to Identify New Targets Against *Aspergillus* and *Scenedosporium* in the Context of Cystic Fibrosis. *Mycopathologia* 2018, 183, 273–289.
232. Han, Z.; Kautto, L.; Nevalainen, H. Secretion of proteases by an opportunistic fungal pathogen *scenedosporium aurantiacum*. *PLoS One* 2017.
233. Han, Z.; Kautto, L.; Meyer, W.; Chen, S.C.A.; Nevalainen, H. Growth and protease secretion of *Scenedosporium aurantiacum* under conditions of hypoxia. *Microbiol. Res.* 2018.
234. Lu, X.; Sun, J.; Nimtz, M.; Wissing, J.; Zeng, A.-P.; Rinas, U. The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb. Cell Fact.* 2010, 9, 23.
235. Wartenberg, D.; Lapp, K.; Jacobsen, I.D.; Dahse, H.M.; Kniemeyer, O.; Heinekamp, T.; Brakhage, A. a. Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a major secreted protein. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011, 301, 602–611.
236. Farnell, E.; Rousseau, K.; Thornton, D.J.; Bowyer, P.; Herrick, S.E. Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates. *Fungal Biol.* 2012.
237. Adav, S.S.; Ravindran, A.; Sze, S.K. Proteomic analysis of temperature dependent extracellular proteins from *Aspergillus fumigatus* grown under solid-state culture condition. *J. Proteome Res.* 2013.
238. Adav, S.S.; Ravindran, A.; Sze, S.K. Quantitative proteomic study of *Aspergillus Fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. *J. Proteomics* 2015.

239. Sharma Ghimire, P.; Ouyang, H.; Wang, Q.; Luo, Y.; Shi, B.; Yang, J.; Lü, Y.; Jin, C. Insight into Enzymatic Degradation of Corn, Wheat, and Soybean Cell Wall Cellulose Using Quantitative Secretome Analysis of *Aspergillus fumigatus*. *J. Proteome Res.* 2016.
240. Yamada, T.; Takata, Y.; Komoto, J.; Gomi, T.; Ogawa, H.; Fujioka, M.; Takusagawa, F. Catalytic mechanism of S-adenosylhomocysteine hydrolase: Roles of His 54, Asp130, Glu155, Lys185, and Asp189. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005, 37, 2417–2435.
241. Eymann, C.; Wachlin, G.; Albrecht, D.; Tiede, S.; Krummrei, U.; Jünger, M.; Hecker, M.; Daeschlein, G. Exoproteome Analysis of Human Pathogenic Dermatophyte Species and Identification of Immunoreactive Proteins. *Proteomics - Clin. Appl.* 2018, 12, 1–11.
242. de Oliveira, A.R.; Oliveira, L.N.; Chaves, E.G.A.; Weber, S.S.; Bailão, A.M.; Parente-Rocha, J.A.; Baeza, L.C.; de Almeida Soares, C.M.; Borges, C.L. Characterization of extracellular proteins in members of the Paracoccidioides complex. *Fungal Biol.* 2018, 122, 738–751.
243. Girard, V.; Dieryckx, C.; Job, C.; Job, D. Secretomes: The fungal strike force. *Proteomics* 2013, 13, 597–608.
244. Albuquerque, P.C.; Nakayasu, E.S.; Rodrigues, M.L.; Casadevall, A.; Zancopeliveira, R.M.; Almeida, I.C. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. 2009, 10, 1695–1710.
245. Rodrigues, M.L.; Nakayasu, E.S.; Oliveira, D.L.; Nimrichter, L.; Nosanchuk, J.D.; Almeida, I.C.; Casadevall, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot. Cell* 2008, 7, 58–67.
246. Weber, S.S.; Parente, A.F.A.; Borges, C.L.; Parente, J.A.; Bailão, A.M.; de Almeida Soares, C.M. Analysis of the Secretomes of Paracoccidioides Mycelia and Yeast Cells. *PLoS One* 2012, 7.
247. Chaves, E.G.A.; Weber, S.S.; Bão, S.N.; Pereira, L.A.; Bailão, A.M.; Borges, C.L.; Soares, C.M.D.A. Analysis of Paracoccidioides secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *BMC Microbiol.* 2015, 15, 1–14.
248. Burroughs, A.M.; Allen, K.N.; Dunaway-Mariano, D.; Aravind, L. Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. *J. Mol. Biol.* 2006, 361, 1003–1034.

249. Hernández, O.; Almeida, A.J.; Gonzalez, A.; Garcia, A.M.; Tamayo, D.; Cano, L.E.; Restrepo, A.; McEwen, J.G. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. *Infect. Immun.* 2010, 78, 5280–5286.
250. Jung, W.H.; Son, Y.E.; Oh, S.H.; Fu, C.; Kim, H.S.; Kwak, J.H.; Cardenas, M.E.; Heitman, J.; Park, H.S. Had1 is required for cell wall integrity and fungal virulence in *Cryptococcus neoformans*. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2018, 8, 643–652.
251. Gaderer, R.; Bonazza, K.; Seidl-Seiboth, V. Cerato-platanins: A fungal protein family with intriguing properties and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 4795–4803.
252. Namvar, S.; Warn, P.; Farnell, E.; Bromley, M.; Fraczek, M.; Bowyer, P.; Herrick, S. *Aspergillus fumigatus* proteases, Asp f 5 and Asp f 13, are essential for airway inflammation and remodelling in a murine inhalation model. *Clin. Exp. Allergy* 2015, 45, 982–993.
253. Helmstaedt, K.; Laubinger, K.; Voßkuhl, K.; Bayram, Ö.; Busch, S.; Hoppert, M.; Valerius, O.; Seiler, S.; Braus, G.H. The nuclear migration protein NUDF/LIS1 forms a complex with NUDC and BNFA at spindle pole bodies. *Eukaryot. Cell* 2008, 7, 1041–1052.
254. Virginio, E.D.; Kubitschek-Barreira, P.H.; Batista, M.V.; Schirmer, M.R.; Abdelhay, E.; Shikanai-Yasuda, M.A.; Lopes-Bezerra, L.M. Immunoproteome of *Aspergillus fumigatus* using sera of patients with invasive aspergillosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 14505–14530.
255. Bisio, L.C.; Silva, S.P.; Pereira, I.S.; Xavier, M.A.S.; Venâncio, E.J.; Puccia, R.; Soares, C.M.A.; Felipe, M.S.S. A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. *Med. Mycol.* 2005, 43, 495–503.
256. Kakeya, H.; Udono, H.; Maesaki, S.; Sasaki, E.; Kawamura, S.; Hossain, M.A.; Yamamoto, Y.; Sawai, T.; Fukuda, M.; Mitsutake, K.; et al. Heat shock protein 70 (hsp70) as a major target of the antibody response in patients with pulmonary cryptococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1999, 115, 485–490.
257. Heinemeyer, W.; Fischer, M.; Krimmer, T.; Stachon, U.; Wolf, D.H. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 1997.
258. Rementeria, A.; López-Molina, N.; Ludwig, A.; Vivanco, A.B.; Bikandi, J.; Pontón, J.; Garaizar, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005.

259. Lorenzini, J.; Scott Fites, J.; Nett, J.; Klein, B.S. Blastomyces dermatitidis serine protease dipeptidyl peptidase IVA (DppiVA) cleaves ELR+CXC chemokines altering their effects on neutrophils. *Cell. Microbiol.* 2017.
260. Katzmann, D.J.; Babst, M.; Emr, S.D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 2001, 106, 145–155.
261. Cornet, M.; Gaillardin, C.; Richard, M.L. Deletions of the endocytic components VPS28 and VPS32 in *Candida albicans* lead to echinocandin and azole hypersensitivity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 3492–3495.
262. Cornet, M.; Bidard, F.; Schwarz, P.; Da Costa, G.; Blanchin-Roland, S.; Dromer, F.; Gaillardin, C. Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 2005, 73, 7977–7987.
263. Schlenstedt, G.; Wong, D.H.; Koepf, D.M.; Silver, P.A. Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J.* 1995, 14, 5367–5378.
264. Manohar, K.; Acharya, N. Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from pathogenic yeast *Candida albicans* and its functional analyses in *S. Cerevisiae* Microbial genetics, genomics and proteomics. *BMC Microbiol.* 2015, 15, 1–15.
265. Kim, J.; Park, M.; Do, E.; Jung, W.H. Mitochondrial protein Nfu1 influences homeostasis of essential metals in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mycobiology* 2014, 42, 427–431.
266. Melber, A.; Na, U.; Vashisht, A.; Weiler, B.D.; Lill, R.; Wohlschlegel, J.A.; Winge, D.R. Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. *Elife* 2016, 5, 1–24.
267. Mizzen, L. Immune responses to stress proteins: Applications to infectious disease and cancer. *Biotherapy* 1998.
268. Pitarch, A.; Abian, J.; Carrascal, M.; Sánchez, M.; Nombela, C.; Gil, C. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics* 2004.
269. Sun, J.N.; Solis, N. V.; Phan, Q.T.; Bajwa, J.S.; Kashleva, H.; Thompson, A.; Liu, Y.; Dongari-Bagtzoglou, A.; Edgerton, M.; Filler, S.G. Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog.* 2010, 6.

270. Stie, J.; Bruni, G.; Fox, D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. *PLoS One* 2009, 4.
271. Raška, M.; Běláková, J.; Wudattu, N.K.; Kafková, L.; Růžičková, K.; Šebestová, M.; Kolář, Z.; Weigl, E. Comparison of protective effect of protein and DNA vaccines hsp90 in murine model of systemic candidiasis. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2005, 50, 77–82.
272. Barrios, C.; Lussow, A.R.; Embden, J. Van; Zee, R. Van Der; Rappuoli, R.; Costantino, P.; Louis, J.A.; Lambert, P. -H; Giudice, G. Del Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and *Bacillus Calmette Guérin* priming). *Eur. J. Immunol.* 1992, 22, 1365–1372.
273. Suzue, K.; Young, R.A. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *J. Immunol.* 1996, 156, 873–9.
274. Wang, Y.; Kelly, C.G.; Singh, M.; McGowan, E.G.; Carrara, A.-S.; Bergmeier, L.A.; Lehner, T. Stimulation of Th1-Polarizing Cytokines, C-C Chemokines, Maturation of Dendritic Cells, and Adjuvant Function by the Peptide Binding Fragment of Heat Shock Protein 70. *J. Immunol.* 2002, 169, 2422–2429.
275. Blatzer, M.; Blum, G.; Jukic, E.; Posch, W.; Gruber, P.; Nagl, M.; Binder, U.; Maurer, E.; Sarg, B.; Lindner, H.; et al. Blocking Hsp70 enhances the efficiency of amphotericin B treatment against resistant *Aspergillus terreus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 3778–3788.
276. Lamoth, F.; Juvvadi, P.R.; Gehrke, C.; Steinbach, W.J. In vitro activity of calcineurin and heat shock protein 90 inhibitors against *aspergillus fumigatus* azole- and echinocandin-resistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57, 1035–1039.
277. Ardizzoni, A.; Posteraro, B.; Baschieri, M.C.; Bugli, F.; Sáez-Rosón, A.; Manca, L.; Cacaci, M.; Paroni Sterbini, F.; De Waure, C.; Sevilla, M.J.; et al. An antibody reactivity-based assay for diagnosis of invasive candidiasis using protein array. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2014, 27, 403–412.
278. Ito, J.; Lyons, J. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. *J. Infect. Dis.* 2002, 186, 869–71.





---

**Material suplementario**

---











---

**Material osagarria**

---











Puntuazio totala	Egin beharreko ekintzak	Ondoeza-maila
0	Ekintzarik ez.	Arina
1 - 5	Gertuagotik behatu.	Arina
>5	Behaketen maiztasuna handitzea.	Moderatua
6-10	Sufrimendu esanguratsua izan dezake maiz behatu eta amaierako puntu humanitarioa kontsideratu (eutanasia barne).	Larria
> 10	Gehieneko sufrimendu-muga. Sufrimendu larria. Eutanasia egitea.	Larria