

## MI PROYECTO DE TESIS

### **Desarrollo de cepas atenuadas de *Rhodococcus equi* mediante la obtención de cepas afectadas en los sistemas de oxidación reducción**

Álvaro Mourenza Flórez

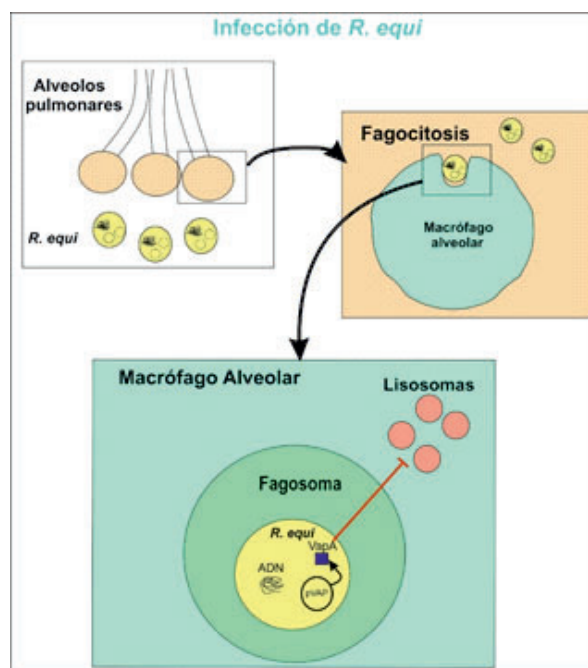
Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Facultad de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León.

La idea de esta Tesis surge por la confluencia de varios factores (i) la importancia del microorganismo en estudio, *Rhodococcus equi*, para la industria equina y para la salud humana; (ii) el incremento en la resistencia de los microorganismos a los diferentes antibióticos; (iii) la experiencia previa del grupo en el estudio de los sistemas de control Redox (oxidación/reducción) en algunos representantes del grupo de las actinobacterias. *R. equi* es una bacteria Gram positiva perteneciente al grupo de las actinobacterias presente en suelos de diferentes ambientes, entre ellos pastizales; la bacteria puede comportarse como un patógeno intracelular, causando bronconeumonía (y muerte) en potros, pero también ocasionalmente en pacientes inmuno-suprimidos. En seres humanos la bacteria no era muy conocida, aunque durante el presente siglo ha habido algunos casos de pacientes con carencias inmunes infectados por esa bacteria, aunque se cree que el número de pacientes con la enfermedad podría ser mayor al estar una parte importante de otros mal diagnosticados (enfermos de tuberculosis). La mortalidad adscrita a esta bacteria varía mucho entre pacientes inmunodeficientes enfermos de SIDA (50-55% de mortalidad), padeciendo otro tipo de inmunodeficiencias (20-25%) o en inmunocompetentes (11%). A lo largo de las últimas décadas han sido numerosos los grupos de investigación dedicados al estudio de los mecanismos de patogenicidad de *R. equi*, buscando nuevos fármacos y tratamientos para los enfermos, pero en ningún caso centrándose los estudios en los mecanismos de supervivencia de la bacteria en los macrófagos. Actualmente, la combinación de varios antibióticos (azitromicina, claritromicina o eritromicina con rifampicina principalmente) parece ser el mejor tratamiento, pero al tratarse de un patógeno intracelular (que infecta células animales, creciendo en su interior) de fácil dispersión en pequeñas partículas volátiles, hace

Forma de mencionar este artículo: Mourenza, A. 2018, Desarrollo de cepas atenuadas de *Rhodococcus equi* mediante la obtención de cepas afectadas en los sistemas de oxidación reducción. AmbioCiencias, 16, 99-101. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

que la mayoría de los tratamientos sean de larga duración, caros, y poco eficientes.

Durante el proceso de infección, *R. equi* es dirigido a los alveolos pulmonares, donde es reconocido y fagocitado por los macrófagos alveolares; en ese momento, *R. equi* será englobado en una vesícula fagosómica, y allí será sometido a condiciones de estrés por radicales libres (**Fig. 1**) que favorecerán la expresión de ciertos factores de virulencia por la bacteria. La mayoría de estos factores son codificados por genes presentes en un plásmido de gran tamaño denominado pVAP, siendo VapA el principal factor de virulencia, aunque hay otros factores de virulencia asociados tanto al plásmido como al cromosoma bacteriano. Se sabe que sin la presencia del factor Vap, *R. equi* no es capaz de infectar los macrófagos. El papel de VapA durante la infección es el de impedir que el fagosoma se una a los lisosomas, bloqueando así su maduración; esto imposibilita la disminución del pH de la vesícula, impidiendo que se formen más radicales libres, aspecto este que promueve la mortalidad para *R. equi*.



**Figura 1.** Mecanismo de infección de los macrófagos alveolares por *R. equi*.

El grupo de investigación al que pertenezco (grupo de investigación en corinebacterias del área de Microbiología) se ha centrado durante los últimos años en estudiar proteínas implicadas en controlar el estrés oxidativo en actinobacterias, proceso realizado mayoritariamente por los sistemas de enzimas tiorredoxinas y microrredoxinas. Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en el descubrimiento y descripción de las microrredoxinas en *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*, aunque su presencia es generalizada en todas las actinobacterias. En la mayoría de los casos

analizados las tiorredoxinas tienen un papel clave en la resistencia/sensibilidad frente a agentes oxidantes. Así, el proyecto en el que estoy implicado actualmente, se centra en estudiar la importancia de los diferentes tipos de microrredoxinas identificadas en la actinobacteria *R. equi* (la cual se encuentra estrechamente emparentada con los géneros *Corynebacterium* y *Mycobacterium*)

durante el proceso infeccioso en su desafío frente al macrófago; esto nos permitirá entender mejor algunos de los mecanismos que emplea este patógeno para colonizar un ambiente con elevadas concentraciones de radicales libres, como ocurre en el interior de los macrófagos. Nuestra hipótesis es que el sistema conformado por las micorredoxinas, conjuntamente con el compuesto de bajo peso molecular micotiol (equivalente al glutatión en el sistema de glutarredoxinas) jugaría un papel clave en dicha resistencia. Bajo esta hipótesis, se han desarrollado mutantes con deleciones en tres micorredoxinas localizadas mediante análisis *in silico* en el genoma de *R. equi*, así como para una de las posibles tiorredoxinas que ha resultado de interés, dado que presenta un dominio para ser exportada (extracelular). El fenotipo de los mutantes ha sido estudiado en nuestro laboratorio mediante ensayos de crecimiento frente a diferentes agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ; agua oxigenada) o hipoclorito sódico ( $NaClO$ ; lejía).

Los resultados han sido prometedores, viéndose una mayor sensibilidad en los mutantes respecto a la cepa silvestre. Esto nos ha permitido realizar ensayos de infección de macrófagos en colaboración con el grupo del Dr. Michal Letek de la Universidad de Roehampton (Londres). Estos ensayos sumados a otros en los que se ha estudiado la dinámica Redox de las micorredoxinas mediante su fusión a una molécula sensora fluorescente, nos está permitiendo entender el papel que juega cada una de las micorredoxinas durante la infección. El objetivo final de este proyecto sería la obtención de cepas atenuadas en su virulencia por alteración de las micorredoxinas, pero desencadenantes de una potente respuesta inmune por expresión de factores plasmídicos.

Directores de Tesis: Dr. Luis Mariano Mateos Delgado (ULE); Dr. José Antonio Gil Santos (ULE); Dr. Michal Letek Polberg (University of Roehampton, UK).

Imagen con D. Álvaro Mourenza en trabajo rutinario de laboratorio.

