

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE MEDICINA



**Universidad
Zaragoza**

Departamento de Microbiología,
Medicina Preventiva y Salud Pública

Trabajo Fin de Grado:

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES DE
PRODUCCIÓN DE GT Y SUS DERIVADOS COMO
MARCADORES ESPECÍFICOS DE ASPERGILLOSIS
INVASIVA**

**EVALUATION OF THE PRESENCE OF GT
PRODUCTION GENES AND THEIR DERIVATIVES
AS SPECIFIC MARKERS OF INVASIVE
ASPERGILLOYSIS**

Presentado por:

M^a del Carmen Baeyens Gracia

Directores:

Dr. Julián Pardo Jimeno

Dra. Eva M^a Gálvez Buerba



D. JULIAN PARDO JIMENO, Doctor en Ciencias e Investigador Aragón I+D, Profesor Asociado del Departamento de Microbiología, Salud Pública y Medicina Preventiva de la Universidad de Zaragoza y Dª. EVA GÁLVEZ BUERBA, Doctora en Ciencias y Científica Titular en el Instituto de Carboquímica (CSIC).

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado “Evaluación de la presencia de genes de producción de GT y sus derivados como marcadores específicos de Aspergilosis Invasiva”, ha sido realizado por Mª del Carmen Baeyens Gracia en el Departamento de Microbiología, Salud Pública y Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para su presentación.

Zaragoza, Mayo de 2018

Fdo.: D. Julian Pardo Jimeno

Dª. Eva Mª Galvez Buerba

TABLA DE CONTENIDOS

• Resumen y palabras clave / Abstract & key words-----	p. 5
• Introducción -----	p. 7
• Objetivos -----	p. 9
• Marco teórico -----	p. 9
.1 ¿Qué es Aspergillus? -----	p. 9
.2 Patogenia de Aspergillus -----	p. 10
.3 Diagnóstico de la enfermedad por Aspergillus -----	p. 16
.3.1 Métodos de diagnóstico tradicionales -----	p. 16
.3.2 Métodos de diagnóstico molecular -----	p. 18
.4 Relevancia del presente estudio: la gliotoxina y su ruta biosintética -----	p. 20
.4.1 Potencial como diana de diagnóstico molecular -----	p. 20
.4.2 Estructura y actividad -----	p. 20
.4.3 Ruta biosintética -----	p. 21
.4.4 ¿Quién produce gliotoxina? Precedentes bibliográficos	p. 24
• Materiales y métodos -----	p. 24
.1 Herramientas utilizadas -----	p. 24
.2 Proceso de obtención y gestión de la información -----	p. 25
.3 Trabajo en el laboratorio -----	p. 27
.3.1 Aislados utilizados -----	p. 27
.3.2 Extracción del ADN -----	p. 27
.3.3 PCR -----	p. 29
• Resultados y discusión -----	p. 30
• Conclusiones -----	p. 37
• Bibliografía -----	p. 39

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

- Figura 1. *Aspergillus fumigatus* al microscopio óptico (1). ----- p. 9
- Figura 2. *Aspergillus fumigatus* al microscopio óptico (2): conodióforos ----- p. 10
- Figura 3: *Aspergillus fumigatus* al microscopio óptico (3): hifas p. 10
- Figura 4: Aspergiloma, visión macroscópica ----- p. 11
- Figura 5: Aspergilosis invasiva, visión microscópica ----- p. 12
- Figura 6: Micosis rinosinusal invasiva ----- p. 13
- Figura 7: Úlcera corneal micótica -----p. 13
- Figura 8: Trombosis del seno venoso ----- p. 14
- Figura 9: Infección fúngica de material implantable ----- p. 15
- Figura 10: Signos del halo y del menisco aéreo ----- p. 18
- Figura 11: Estructura molecular de la gliotoxina ----- p. 20
- Figura 12: Cluster Gli en *Aspergillus fumigatus* ----- p. 22
- Figura 13: PCR ----- p. 29
- Figura 14: detalle del cladograma de NRPS ----- p. 32
- Figura 15: resultados electroforesis ----- p. 37
- Tabla 1: Definiciones de aspergilosis invasiva en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica ----- p. 16
- Tabla 2: Parámetros de búsqueda BLAST ----- p. 26
- Tabla 3: Cebadores utilizados----- p.29
- Tabla 4: Detalle del cladograma de NRPS ----- p. 32
- Tabla 5: Resultados búsqueda BLAST del clúster gli para ADN – p. 35
- Tabla 6: Resultados búsqueda BLAST del clúster Gli para proteínas -----p. 36

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo 1: cladograma de NRPS completo

RESUMEN

Aspergillus fumigatus es un conocido patógeno humano, responsable de una importante morbilidad entre pacientes inmunocomprometidos. Causa un amplio abanico de enfermedades, destacando la aspergilosis invasiva, quizá la más mortífera de todas. Sin embargo, los métodos de identificación y estudio del hongo en la clínica se basan mayormente en técnicas de diagnóstico fenotípicas que pueden ser lentas, equívocas o insuficientes y en ocasiones se debe recurrir a métodos invasivos como la biopsia para llegar al diagnóstico. Por ello, se plantea el uso de la gliotoxina como alternativa. Esta micotoxina es producida por *A. fumigatus*, pero existe discrepancia entre autores acerca de su presencia en otras especies fúngicas, tanto del género *Aspergillus* como otros ascomicetos, lo que genera dudas acerca de la especificidad de su detección en suero de pacientes. En este estudio se presenta un análisis bioinformático de los componentes del clúster responsable de la síntesis de gliotoxina para tratar de identificar cuáles son las especies capaces de producirla. Se realizaron búsquedas de los elementos del clúster en la base de datos del NCBI con la herramienta de búsqueda BLAST para hallar los elementos más similares al clúster de entre otras especies fúngicas. De este modo, se identificaron varias especies con una alta semejanza, y junto a otras de especial relevancia clínica se buscaron las que poseen moléculas más similares a GliP, por ser elemento indispensable para la síntesis de gliotoxina. Por otra parte, se analizaron muestras de un centro de referencia para estudiar la relación entre la producción de gliotoxina y la presencia de GtmA, el gen de una metilasa que inactiva la gliotoxina.

Los resultados mostraron que sólo algunas especies de la sección fumigati serían capaces de sintetizar gliotoxina al ser las únicas que contienen todos los elementos del clúster. En la segunda parte se vio que especies no productoras de gliotoxina sí lo son de GtmA, indicando que su presencia podría necesitarse para protegerse de la gliotoxina de otras especies.

Se concluye que, pese a las limitaciones, la gliotoxina podría ser un biomarcador útil de aspergilosis invasiva ya que *A. fumigatus* es el microorganismo responsable de la mayoría de los casos.

PALABRAS CLAVE: aspergilosis invasiva, *Aspergillus fumigatus*, gliotoxina, GliP, GtmA, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is a well-known human pathogen, responsible for important morbimortality among immunocompromised patients. It causes a wide spectrum of diseases, among which invasive aspergillosis may be the most deadly. However, the diagnostic procedures to identify the fungus in daily clinical practice are majorly based on phenotypical techniques that may result equivocal or insufficient, making it necessary to resort to invasive procedures like biopsy to reach a definite diagnosis. Therefore gliotoxin has been presented as an alternative diagnostic method. This mycotoxin is produced by *A. fumigatus* but there is discrepancy among authors about its presence in other fungal species, both *Aspergillus* genus and other ascomycetes, which raises doubts about the specificity of detection of this mycotoxin in patient's sera.

In this study we present a bioinformatic analysis of the cluster components responsible for gliotoxin biosynthesis to identify which species are capable of producing it. A search for these elements was carried out using the NCBI database and the BLAST search tool in order to find the elements belonging to other fungal species closest to those of the *A. fumigatus* cluster.

In this way several species with a high similarity were identified, and along with others of special clinical relevance, were searched for GliP-like molecules, since this is the first and essential element for the synthesis of gliotoxin. On the other hand, some clinical isolates from a reference centre were analyzed to study the relationship between the production of gliotoxin and the presence of GtmA, the gene of a methylase that inactivates gliotoxin. The results showed that only some species belonging to the fumigati section would be able to synthesize gliotoxin since they are the only ones that contain all the necessary elements of the cluster. In the second part, non gliotoxin producing species were found to produce GtmA, indicating that GtmA is not always related to the gliotoxin production, but could be used to protect

fungi against the gliotoxin from other species, supporting the hypothesis of its defensive function.

It is concluded that, despite the limitations, gliotoxin could be a useful biomarker of invasive aspergillosis since *A. fumigatus* is responsible for most cases.

KEY WORDS

Invasive aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, gliotoxin, GlIP, GtmA, molecular diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La aspergilosis invasiva (AI) es una enfermedad oportunista causada por diversas especies del género *Aspergillus* como pueden ser *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans* o *A. fumigatus*. Esta infección representa una causa importante de mortalidad en huéspedes inmunocomprometidos como son los sujetos trasplantados, sometidos a terapias inmunosupresoras e infectados por el virus de inmunodeficiencia humana.

Actualmente, los métodos de diagnóstico utilizados se basan en signos clínicos y biomarcadores que resultan insuficientes para el adecuado manejo de la enfermedad.

En el estado de hifa, *A. fumigatus* produce una gran variedad de compuestos llamados metabolitos secundarios como penicilina, lovastatina, aflatoxinas, bis-metiltiogliotoxina (bmGT) y gliotoxina (GT). Estos metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento del hongo, pero le pueden proporcionar ventajas competitivas para su supervivencia. La GT es producida por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Gliocladium* y *Penicillium* y aunque no todas las especies poseen la capacidad para producirla, sí la mayoría de las cepas de *A. fumigatus*.

El grupo de investigación actualmente está trabajando en la validación de la GT/bmGT como posible biomarcador de diagnóstico molecular de la AI causada por *Aspergillus*. Por ello en este trabajo vamos a analizar la presencia de genes (o cluster génicos) clave cuya expresión regulan enzimas implicadas en la producción de GT y

bmGT en *Aspergillus* y otros hongos oportunistas. Así, se ha llevado a cabo un análisis bioinformático de los diferentes componentes genéticos y proteicos relacionados con la síntesis de la GT, para identificar con el mayor grado de certeza posible qué especies de hongos patógenos la pueden producir, es decir su universalidad. Este análisis constituirá la base para determinar si una prueba basada en la detección de las secuencias de ADN implicadas podría ser útil en la práctica clínica habitual para ayudar a diagnosticar la AI. Y por otra parte poder conocer así también su especificidad para *Aspergillus spp.* frente a otros hongos.

En una primera parte del trabajo, se estudiaron mediante una base biomédica los doce genes del clúster *gli*, que codifica la información para la síntesis de gliotoxina, y la proteína que se traduce de cada uno de ellos, haciendo una búsqueda comparativa con otros hongos para detectar en cuáles están presentes bien dichos genes o estructuras similares a los mismos, y ver así, su grado de similitud con respecto a la cepa de referencia. En base a los resultados obtenidos, se hizo una búsqueda de las mismas características con las NRPS (péptido sintetasas no ribosomales) de las especies que resultaron ser más similares, para realizar unos cladogramas que nos den una idea más precisa de qué especies están más íntimamente relacionadas entre sí en su estructura genética y qué elementos son los más similares a GliP (elemento inicial necesario para la síntesis de gliotoxina). Por último, siguiendo la misma metodología se hizo una búsqueda y posterior cladograma de GtmA (enzima capaz de metilar la gliotoxina) en diversas especies, buscando la relación entre la presencia del clúster Gli y de GtmA.

Los resultados obtenidos reflejaron que el conjunto completo de elementos necesarios para la síntesis de GT solo se halla en *A. fumigatus* y algunas de las especies integrantes de la sección fumigati. Analizando las NRPS de las especies que, de acuerdo a la búsqueda realizada, son más afines a *Aspergillus* sección fumigati, los resultados reflejaron que GliP se hallaba presente en *Penicillium expansum* y *Trichoderma virens*, pero no en otras especies de *Aspergillus*. Analizando el conjunto de los datos se concluyó que, dentro del género *Aspergillus*, únicamente *A. fumigatus* y especies pertenecientes a la sección fumigati tienen la capacidad de producir GT, por lo que la GT sería un marcador eficaz para la detección de AI

causada por *Aspergillus fumigatus*, responsable en solitario de más del 90% de las infecciones causadas por *Aspergillus* en el ser humano. Por lo tanto, aunque no se detectarían aquellos casos producidos por otras especies, sí que se conseguiría detectar la mayoría de ellos puesto que son producidos por *A. fumigatus*.

OBJETIVOS

- Objetivo principal: decidir si la gliotoxina puede ser un marcador para la detección de aspergilosis invasiva.
- Objetivos secundarios:
 - o Detectar qué especies de *Aspergillus* producen gliotoxina, o cuáles podrían hacerlo
 - o Detectar qué especies de géneros distintos de *Aspergillus* producen gliotoxina, o cuáles podrían hacerlo.
 - o Estudiar la relación entre la producción de gliotoxina y la presencia de GtmA.

MARCO TEÓRICO

1. ¿Qué es *Aspergillus*?

Aspergillus es un género de hongos filamentosos ubícuos que producen infección en seres humanos y otros animales de manera oportunista. Es uno de los hongos que se conocen desde hace más tiempo. Descrito por vez primera por Micheli en 1729, aunque no se identificó como patógeno de animales hasta 1815 (Mayer) y aún hubieron de pasar varias décadas más hasta que se identificó en el ser humano (Sluyter, 1846). Desde entonces se han ido describiendo nuevas formas de causar enfermedad en nuestra especie, como los aspergilomas (Devé, 1938) y la enfermedad alérgica (Hinson y cols. 1952) (1).

Entre los sitios donde más frecuentemente se encuentra *Aspergillus* podemos destacar: polvo doméstico, suelos

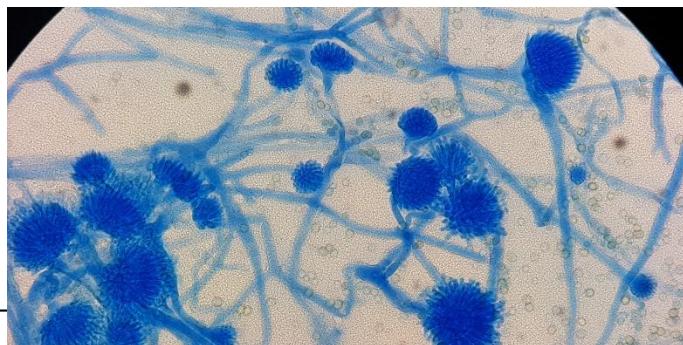


Fig. 1: *Aspergillus fumigatus* visto al microscopio óptico a 20 aumentos, teñido con azul de lactofenol.

(especialmente si hay plantas u otra materia orgánica en descomposición), zonas mal ventiladas, y lugares próximos a trabajos de derribo y construcción, habiéndose detectado brotes en hospitales donde había obras (2,3).

Los varios cientos de especies de *Aspergillus* existentes, sean patógenos o no, comparten una serie de características morfológicas comunes. Se reproducen por esporas de cuya germinación nacen unas hifas hialinas septadas con una separación pequeña (hasta 7 micras) y se ramifican en un ángulo aproximado de 90º. Son muy resistentes, pudiendo crecer en múltiples sustratos a temperaturas de hasta 45º C (2). Se tiñen con las tinciones más habituales para hongos (azul de lactofenol, metenamina plata) y para su detección invadiendo tejidos se puede utilizar hematoxilina eosina, siendo las hifas viables basófilas y las

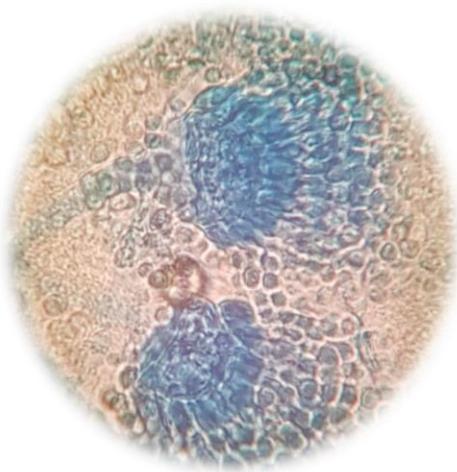
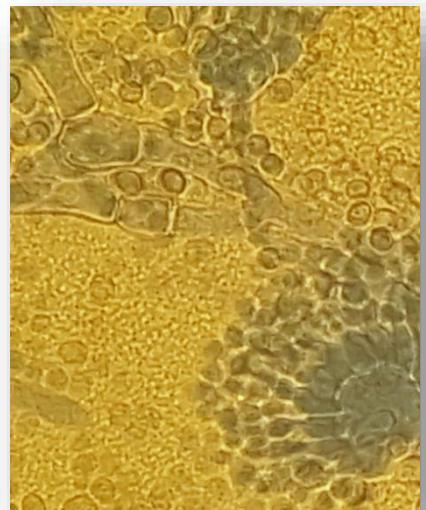


Fig 2 y 3:

Izquierdo: Conidióforos de *A. fumigatus* a 40 aumentos.

Derecha: detalle de ramificación de las hifas en *A. fumigatus*



maceradas e inviables más tendentes a la eosinofilia (3).

2. Patogenia de *Aspergillus*

Aspergillus es responsable de un amplio espectro de entidades clínicas, entre las que destacan:

- Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA): es una reacción de hipersensibilidad producida en el parénquima pulmonar frente a antígenos de la pared del hongo, por lo que no intervienen los factores de invasividad o

virulencia intrínsecos del hongo. El paciente en el que se produce esta enfermedad suele ser un asmático colonizado por *Aspergillus*, con buen estado de salud basal. Produce síntomas tanto generales (fiebre, malestar) como locales. La clínica más característica que acompaña a este cuadro es de obstrucción de bronquios tanto de calibre grande como pequeño a causa del taponamiento de las vías aéreas con expectoración de moldes mucosos en ocasiones acompañada de sangre, pudiendo complicarse en forma de bronquiectasias o atelectasia. El patrón espirométrico es de obstrucción con disminución de FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) y atrapamiento con aumento del volumen residual. (2,4).

- Aspergiloma: también llamado bola fúngica, es un crecimiento del hongo en el interior de una cavidad pulmonar preformada, siendo las enfermedades de base más habituales: EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), lesiones de origen tuberculoso y procesos neoplásicos. Se desarrolla de forma crónica. Es un proceso no invasivo que sucede en un paciente inmunocompetente o levemente inmunocomprometido que por su enfermedad de base encuentra dificultad para eliminar las hifas aspiradas. Se manifiesta como una masa de material fúngico y detritus en el interior de la cavidad. Suele ser un hallazgo radiológico casual, y si da clínica esta puede ser la eliminación con el esputo de un moco verde o una ligera hemoptisis, si la cavidad comunica con un bronquio. El aspergiloma puede evolucionar hacia una forma cavitada, fibrosante, o necrosante, siendo esta última más frecuente en pacientes más inmunocomprometidos (2,4).



Fig. 4: Aspergiloma ocupando toda una cavidad pulmonar preformada

- Aspergilosis pulmonar invasiva (AI): es una enfermedad infecciosa fúngica que sucede en pacientes inmunocomprometidos. Los macrófagos alveolares no son capaces de fagocitar y neutralizar las hifas y esporas inhaladas que llegan hasta los alveolos, que invaden los tejidos y proliferan en ellos. Los lugares donde más frecuentemente se inicia esta enfermedad son pulmón y senos paranasales. Los agentes causales más frecuentes son *Aspergillus fumigatus-complex*, seguido de lejos por *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. *Aspergillus* tiene una gran capacidad de invasión vascular, lo que permite su diseminación hacia otros territorios más allá del pulmón y, debido al tamaño de sus hifas, puede obstruir vasos de pequeño calibre provocando isquemia y necrosis distales a la obstrucción. La tríada clínica clásica, pese a ser bastante inconstante, consiste en dolor pleurítico, hemoptisis y fiebre. Los hallazgos radiológicos que se asocian con más frecuencia a esta enfermedad son el signo del halo y el signo del menisco o media luna aérea, aunque no son patognomónicos de esta entidad. Frecuentemente se manifiesta como uno o más nódulos pulmonares, que pueden o no asociar infiltrado peribronquial, derrame pleural, consolidación... (4).

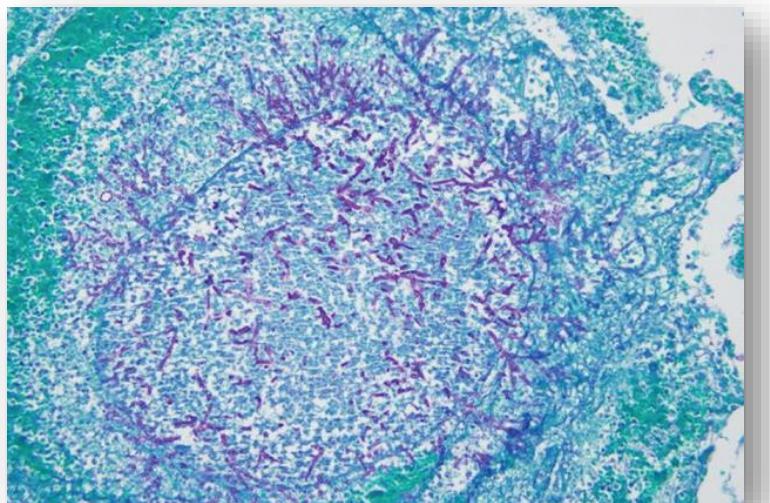


Fig.5: Aspergilosis pulmonar invasiva. Hifas en ramificación en parénquima pulmonar, tinción Grocott – metenamina plata.

- Aspergilosis rinosinusal invasiva: *Aspergillus* infecta los senos paranasales e invade los tejidos, causando una extensa necrosis cutánea y la deformidad consiguiente. Como complicaciones el hongo puede crear una solución de continuidad hacia el endocráneo, causando aspergilosis cerebral.

Clínicamente puede ser indistinguible de una mucormicosis rinosinusal, aunque hay autores que establecen que *Aspergillus spp.* causa escaras



Fig. 6: Escara necrótica en paciente con enfermedad sinusal invasiva de origen fúngico.

necróticas con menor frecuencia que *Mucor spp.* Es más característica en pacientes que han sufrido periodos prolongados de neutropenia, lo que puede llevar a una disminución de fenómenos inflamatorios y predominio de los necróticos (2,4).

- Enfermedades fuera del aparato respiratorio: pueden suceder como eventos principales por inoculación directa ante una herida contaminada o bien aparecer como consecuencia de la diseminación hematogena desde otro foco tras la angioinvasión.
 - Sistema Nervioso Central: Por diseminación hematogena o contigüidad desde un foco rinosinusal. Se puede manifestar en forma de abscesos, focalidad neurológica, isquemia, crisis comiciales, demencia... (4)
 - Facial: endoftalmitis, por inoculación directa mediante una herida contaminada o más raramente por diseminación hematogena. Provoca una gran destrucción de estructuras, lo que implica

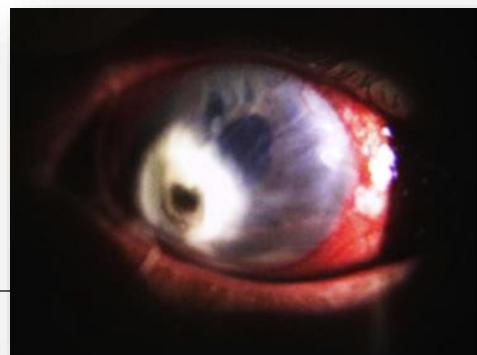


Fig. 7: Úlcera corneal micótica. Nótese los bordes mal delimitados y el aspecto algodonoso de la lesión, característico de la presencia de hifas maduras.

importantes secuelas estéticas y funcionales (2,4).

- Otras:

- Endocarditis: *Aspergillus* y otros hongos son agentes causales poco frecuentes, siendo ampliamente superados por agentes bacterianos. Entre los fúngicos, *Candida spp.* también es más frecuente que *Aspergillus*. Con mayor frecuencia asienta sobre válvulas protésicas (4).
- Abscesos de órganos sólidos: sobre todo en injertos de riñón o hígado.
- Infección cutánea: celulitis superficial si es por inoculación directa en una herida contaminada, o infección profunda con necrosis si sucede por diseminación hematogena (3,4).
- Trombosis del seno venoso: es una causa poco frecuente de accidente cerebrovascular (ACV), debido a la angioinvasión por las hifas desde un foco rinosinusal en su extensión hacia el



Fig. 8: Paciente inmunodeprimido con trombosis del seno venoso causada por una sinusitis fungica

sistema nervioso central (4).

- Contaminación de material protésico y de sutura. Infección de catéteres: Algunos autores recalcan la posibilidad de infección de las suturas de seda en las suturas bronquiales de los injertos

pulmonares. La infección de un catéter puede manifestarse en forma de una embolia séptica (3,4).

Fig. 9: masa fúngica contaminando partes de un marcapasos implantable.



Estas situaciones se dan en pacientes inmunodeprimidos, particularmente en los neutropénicos, aunque una dificultad en el aclaramiento o la inhalación de una gran cantidad de conidias pueden favorecer la infección en sujetos inmunocompetentes (3,4). Como causas de inmunosupresión frecuentemente implicadas en la AI encontramos (4):

- Enfermedad predisponente: neutropenia (siendo este el factor de riesgo aislado más frecuentemente enunciado en la literatura), VIH, cánceres hematológicos (particularmente leucemias y síndromes mielodisplásicos), infección por citomegalovirus.
- Intervenciones médicas: glucocorticoides a dosis altas, tratamiento con anti TNF- α , trasplante de progenitores hematopoyéticos, trasplante de órgano sólido.
- Situaciones basales de riesgo con compromiso del sistema inmune: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de injerto contra huésped, ingreso en unidad de cuidados intensivos.

La puerta de entrada del hongo suele ser el pulmón. En condiciones normales, los macrófagos alveolares reconocen y fagocitan las conidias inhaladas una vez llegan al alveolo, y tras el reconocimiento de antígenos, secretan mediadores que activan la

inmunidad (4). Sin embargo, si están disminuidos o resultan incompetentes no pueden fagocitar las hifas o esporas que colonizarán y más tarde invadirán los capilares alveolares desde donde se diseminarán (3).

3. Diagnóstico de la enfermedad por *Aspergillus*

El diagnóstico, ya complicado de por sí, requiere una alta sospecha diagnóstica, y tiene un grado de dificultad añadido por las propias características de los enfermos diana de *Aspergillus*. Además, hay que tener en cuenta que diferenciar entre el agente causal en una infección por hongos filamentosos puede ser difícil, ya que comparten manifestaciones clínicas y factores de riesgo (4).

Actualmente el diagnóstico en la clínica se realiza con la combinación de la sospecha diagnóstica, los métodos microbiológicos de diagnóstico fenotípico y las pruebas de imagen.

3.1. Métodos diagnósticos tradicionales

La sospecha clínica puede ser en ocasiones difícil de establecer debido a la propia naturaleza de los pacientes diana de la enfermedad, ya que a causa de su inmunosupresión tienden a no mostrar algunos de los signos de infección de manera típica (puede por ejemplo haber ausencia de fiebre). Además, en la experiencia clínica frecuentemente se piensa en los hongos como causantes de infección en último lugar. Como herramienta de ayuda al diagnóstico contamos con escalas para el diagnóstico de AI en grados de probabilidad (infección probada, probable o posible), aunque únicamente están validada para pacientes con EPOC.

Tabla 1: Definiciones de AI en pacientes con EPOC:

Tipo de API	Criterios
Probada	<p>Examen histológico o citológico por punción-aspiración con aguja o biopsia, obtenido de cualquier lesión pulmonar presente durante 3 meses, en el que se observan hifas compatibles con <i>Aspergillus</i> y evidencia de daño tisular, si es acompañado por cualquiera de los siguientes hallazgos:</p> <ol style="list-style-type: none">1) Cultivo positivo para <i>Aspergillus</i> de cualquier muestra del tracto respiratorio inferior2) Serología positiva para <i>A. fumigatus</i>

	3) Confirmación por biología molecular, métodos inmunológicos o cultivo de que las hifas observadas son de <i>Aspergillus</i>
Probable	Igual que API probada, pero sin confirmación de que <i>Aspergillus</i> sea el agente causal (puntos 1, 2 y 3 no presentes o testados), o paciente con EPOC generalmente tratado con esteroides y con la enfermedad en grado avanzado (GOLD III o IV) con exacerbación reciente de la disnea ^a , imagen indicativa en la placa o TC de tórax ^b de <3 meses ^c y una de las siguientes situaciones: 1) Imagen microscópica o cultivo positivo ^d de <i>Aspergillus</i> en una muestra del tracto respiratorio inferior 2) Serología positiva para <i>A. fumigatus</i> 3) Dos determinaciones positivas de galactomanano en suero
Possible	Paciente con EPOC normalmente tratado con esteroides, de grado avanzado (GOLD III o IV) con reciente exacerbación de la disnea ^a , imagen indicativa en la radiografía o TC de tórax ^b de <3 meses ^c , pero con serología o cultivo para <i>Aspergillus</i> negativos
Colonización	Cultivo positivo de <i>Aspergillus</i> en muestra de tracto respiratorio inferior sin exacerbación de la disnea, broncoespasmo ni nuevo infiltrado pulmonar

Extraído de Bulpa P et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2007 Oct;30(4):782-800. (5)

Las muestras que se utilizan habitualmente para el diagnóstico microbiológico son el esputo, el lavado broncoalveolar (BAL) y el hemocultivo. Estas muestras cuentan con la limitación de tener un bajo rendimiento (el riesgo de contaminación siempre presente dificulta la interpretación de los resultados positivos si no se conoce la situación del enfermo), y de que el diagnóstico de certeza se establecerá únicamente si se pueden visualizar hifas invadiendo el tejido profundo en una muestra histopatológica, ya que *Aspergillus* es un contaminante común y su resistencia le permite crecer en condiciones adversas a otros microorganismos, afectando por tanto a la fiabilidad de la muestra. Además, resulta interesante tener en cuenta que los hemocultivos pueden ser negativos en pacientes con una enfermedad invasiva ya que no todas cursarán con una fase hematógena que haga detectable el microorganismo en una muestra de sangre. Estos métodos microbiológicos exigen el cultivo (en medios selectivos como agar Sabouraud o de caldo de patata) y la visualización de las colonias al microscopio óptico teñidas con tinciones específicas (metenamina plata o azul de lactofenol). De esta manera se puede identificar el

organismo causal con cierta precisión en base a características morfológicas y tinteriales propias: la segmentación de las hifas, el ángulo de ramificación, el aspecto de conidias y conidióforos, etc. (6) En muestras procedentes de biopsia se puede hacer una tinción de hematoxilina eosina, en la que las hifas viables aparecerán basófilas y las inviables o maceradas tendrán aspecto eosinófilo (3). También se utilizan con frecuencia pruebas de imagen para apoyar el diagnóstico clínico. Se da uso a técnicas que van desde la radiología convencional hasta técnicas más novedosas como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada de alta resolución. Sin embargo, pese a lo frecuente de su uso no existe ningún hallazgo patognomónico que nos pueda llevar a dar un diagnóstico

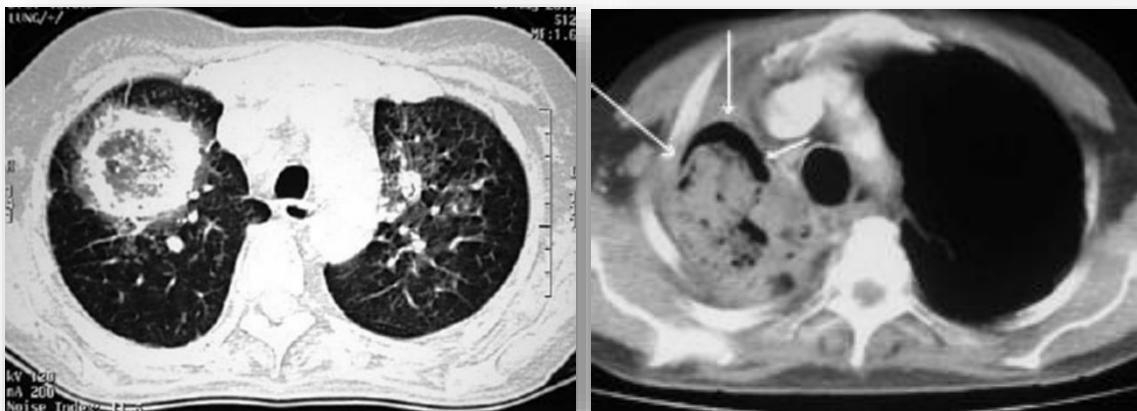


Fig.10: signos del halo (izquierda) y del menisco aéreo (derecha) en tomografía computarizada. Ambos son signos frecuentes pero no específicos de la patología pulmonar por *Aspergillus*.

definitivo solo mediante técnicas de imagen (6).

3.2. Métodos de diagnóstico molecular

Además de estas pruebas, contamos con métodos de detección de antígenos fúngicos: el galactomanano y el β -D-glucano. Ambos son productos procedentes de la degradación de la pared fúngica al ser digeridos por elementos del sistema inmune. Sin embargo, no son métodos específicos para la detección de *Aspergillus*, puesto que estas moléculas son elementos comunes en la pared de variedad de hongos, funcionando por tanto como marcadores panfúngicos (6).

El antígeno galactomanano se libera durante la invasión fúngica. Su detección mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) está validada para pacientes oncohematológicos y pre trasplante de progenitores hematopoyéticos que tengan una alta sospecha clínica de AI. Como limitación, es un método que pese a ser uniformemente específico en varios estudios, su sensibilidad varía mucho de unos a otros (E 90%, S 30% a 100%), lo que pone en duda su rentabilidad en la clínica para la detección de la enfermedad; en cambio resulta útil en el seguimiento de un paciente puesto que su concentración en suero se correlaciona con la carga fúngica. El galactomanano requiere unos días de progresión de la enfermedad para dar niveles positivos en suero, y por su propia naturaleza y origen, se puede deducir que en pacientes cuyo sistema inmune no sea capaz de destruir al hongo, los niveles podrían ser falsamente bajos. Otro problema que hallamos para su uso generalizado es que presenta reactividad cruzada en el caso de haber otra infección por hongos filamentosos (*Paecylomices* spp, *Penicillium* spp, *Alternaria* spp, *Cryptococcus* spp) o un tratamiento reciente con betalactámicos (particularmente amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam). Presenta también falsos positivos en pacientes pediátricos colonizados por especies de *Bifidobacterium*, pacientes con enfermedad del injerto contra huésped y en aquellos que sigan dietas ricas en soja. Pueden además producirse falsos negativos en caso de que la enfermedad aspergililar esté limitada a un territorio, y se ha descrito el hecho de que *A. fumigatus* produce menor concentración de galactomanano que otras especies (6).

El antígeno β -D-glucano es muy parecido al galactomanano, con un origen similar, por lo que sirve igualmente como marcador panfúngico de infección. Presenta ventajas respecto al galactomanano puesto que la bibliografía refiere sensibilidades mayores en el primero, con una especificidad muy similar (E 85% - 100%, S >60%). Sin embargo, pese a esta ventaja teórica y estar recomendado para todos los grupos de pacientes es menos utilizado, ya que hay menos experiencia con el β -D-glucano que con el antígeno galactomanano, salvo en centros hospitalarios de alto nivel. En su caso, existen falsos negativos en pacientes con un tratamiento reciente con azitromicina o pentamidina (6).

La detección de ácidos nucleicos de hongos con fines diagnósticos está en desarrollo, para detectar tanto *Aspergillus* como secuencias que sirvan de marcador panfúngico. Se describe en la literatura su alta sensibilidad en BAL, que puede llegar a superar la de sangre incluso una vez instaurado el tratamiento adecuado (6).

4. Relevancia del presente estudio: la Gliotoxina y su ruta biosintética

4.1 Potencial como diana de diagnóstico molecular

Por las razones previamente expuestas se ha postulado la detección de gliotoxina en suero como alternativa a las actuales dianas de diagnóstico molecular. La identificación molecular está actualmente justificada debido a que las técnicas convencionales pueden ser poco fiables para algunas especies y que en ocasiones lo que se considera tradicionalmente como una especie es en realidad un conjunto de especies, algunas de ellas crípticas. La gliotoxina es una micotoxina producida por algunos hongos filamentosos, aislada por primera vez en hongos del género *Gliocadium*¹ y producida por patógenos humanos como *Aspergillus fumigatus*. Como ventaja teórica frente a los antígenos galactomanano y β-D-glucano, destaca que se libera al medio conforme crecen las hifas, poco después de la apertura de la espora, lo que facilitaría la detección de la enfermedad en estadios más precoces.

4.2 Estructura y actividad

Estructuralmente es una epipolitiodioxopiperacina (ETP), familia de moléculas cicladas relativamente sencillas con un puente disulfuro interno responsable de sus propiedades reactivas (8). Se trata de un dipéptido que muestra tres anillos con insaturaciones y dos átomos de nitrógeno intraanulares. Su fórmula química es C₁₃H₁₄N₂O₄S₂, con un peso molecular de 326.325 g/mol. Su síntesis utiliza como sustrato una serina y una fenilalanina, comenzando mediante una péptido-sintasa



Fig. 11: Estructura molecular de la gliotoxina.

¹ Actualmente, mu
género *Trichoderm*

ente consideradas *Gliocladium* han sido adscritas al

no ribosomal (NRPS) que las une.

En la actualidad no se conoce con seguridad cuál es la función de la gliotoxina en *Aspergillus*, aunque hay estudios que establecen su papel como factor de virulencia favoreciendo el crecimiento del hongo e impidiendo el de otros microorganismos (9,10). Genera especies reactivas de oxígeno (ROS) al parecer mediante el paso de su forma oxidada a la reducida. También es capaz de activar el gen *Bak* (un prooncogén de la familia BCL-2) produciendo en él cambios conformacionales, inhibe el factor de transcripción nuclear NF κ B impidiendo la respuesta inflamatoria, inhibe la fagocitosis por los macrófagos, induce apoptosis en varias células del sistema inmune, e inhibe el ensamblaje de NADPH oxidasa (11). Tiene una alta reactividad intrínseca, siendo capaz además de unirse covalentemente a otras moléculas (destacando las proteínas) mediante su puente disulfuro, que reacciona con grupos tiol presentes en la otra molécula siendo así responsable de efectos deletéreos como inducción de apoptosis. También cuenta con la capacidad de dañar el epitelio respiratorio afectando a los cilios al disminuir la frecuencia con la que se mueven (12,13). Además, la producción de la toxina no es imprescindible para el crecimiento y desarrollo del hongo, que no se ve afectado a este respecto si se suprime la síntesis de gliotoxina (9,10).

4.3 Ruta biosintética

Los hongos que producen toxinas acostumbran a contener la información para su síntesis en clústeres (14) situados en regiones teloméricas hipervariables de sus cromosomas. Estos telómeros contienen un número de secuencias trasposónicas, que aumentan aún más la variabilidad génica de estas regiones. En el caso de la gliotoxina en *Aspergillus fumigatus*, la información completa para su síntesis y expresión se encuentra codificada en un clúster en una región telomérica hipervariante del cromosoma 6 del hongo, que contiene 12 genes funcionales de cuya totalidad no se conoce la función. Este clúster se identificó mediante análisis bioinformático por su similitud con el clúster de la sirodesmina (clúster Sir), en la especie *Leptosphaeria maculans*. En este hongo se produce una ETP diferente a la

gliotoxina, la sirodesmina. Las enzimas codificantes necesarias para su producción están situadas en un clúster que contiene ocho genes altamente conservados entre ambas especies, y a pesar de que no todos ellos tienen un equivalente en el otro clúster, son muy similares entre sí (8). Tras iniciarse la transcripción, los distintos genes van realizando modificaciones laterales a la molécula hasta llegar al producto final.

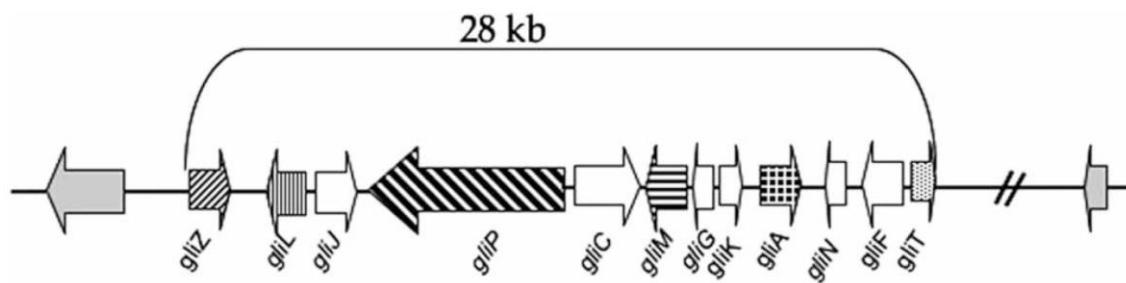


Fig. 12:Cluster gli en *A. fumigatus*. Extraído de Kyung et al. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? Med Mycol. 2009 ; 47(Suppl 1): S97–103.

En la especie de referencia estudiada, *Aspergillus fumigatus* Af293, el clúster está compuesto por los siguientes elementos:

- GliZ: localización 2,346,986 a 2,348,455. Un exón. Codifica una proteína tipo dedo de zinc. Factor de transcripción para todos los genes de la ruta.
- GliI: localización complementario de 2,349,175 a 2,350,602. Tres exones. Codifica una aminotransferasa.
- GliJ: localización 2,350,945 a 2,352,265. Cuatro exones. Codifica una dipeptidasa de membrana.
- GliP: localización complementario de 2,352,620 a 2,359,124. Tres exones. NRPS.
- GliC: localización 2,359,529 a 2,361,379. Siete exones. Codifica una óxidorreductasa citocromo P450.
- GliM: localización 2,361,663 a 2,363,014. Dos exones. Codifica una O metiltransferasa.

- GliG: localización complementario de 2,363,390 a 2,364,218. Tres exones. Codifica una glutatión S-transferasa.
- GliK: localización 2,364,470 a 2,365,341. Dos exones. Codifica una proteína necesaria para la biosíntesis de gliotoxina, de acción concreta no especificada.
- GliA: localización 2,365,930 a 2,367,558. Un exón. Codifica una bomba de expulsión MFS.
- GliN: localización complementario de 2,367,948 a 2,368,912. Tres exones. Codifica una metiltransferasa.
- GliF: localización inverso de 2,369,366 a 2,370,937. Dos exones. Codifica una óxidorreductasa citocromo p450.
- GliT: localización 2,371,240 a 2,372,302. Dos exones. Codifica una tiorredoxina reductasa.

Hay varios estudios que describen la necesidad de que varios de los componentes del clúster Gli estén presentes y sean funcionales para la síntesis de gliotoxina. Mediante la generación de especies *knock-out* para diversas proteínas de la ruta biosintética, se ha visto que, al menos, GliP (6,8), GliG (15), GliK (16), GliZ (17) y GliT (18) son imprescindibles para poder detectar gliotoxina en especies que la producen en condiciones normales, además de poder tener otros efectos. Según la ruta biosintética de la gliotoxina propuesta en (19), la síntesis de la gliotoxina (al igual que la de otras ETP (8)) comienza con una NRPS que, en su caso, es GliP. Las NRPS son proteínas capaces de sintetizar péptidos de una manera que no precisa un ARN mensajero. Estos péptidos, que reciben el nombre de péptidos no ribosomales, suelen ser metabolitos secundarios de bacterias y hongos. Poseen una estructura peculiar que los diferencian de las proteínas convencionales, pudiendo contener grupos químicos y estructuras que no se hallarían en otras proteínas funcionales. Hay estudios que postulan la necesidad de las NRPS para iniciar la síntesis de toxinas fúngicas, por lo que su estudio es útil para identificar micotoxinas a partir del genoma de una especie. Así pues, tras la activación de GliP se produce la unión de los dos sustratos (serina y fenilalanina) que las subsiguientes proteínas del clúster irán modificando hasta obtener el producto final. De los anteriormente mencionados,

GliG actuará añadiendo dos grupos glutatión a la molécula, GliK actuará inmediatamente después modificando los grupos glutatión, y GliT unirá los dos grupos tiol en el consabido puente disulfuro intraanular. Como vemos, en este modelo no hay una explicación acerca de la función exacta de GliZ. Dolan et al. (20) aclaran los últimos pasos en la creación de gliotoxina. La gliotoxina es capaz de estimular la creación de más moléculas. Sin embargo, presenta dos formas finales muy diferentes en actividad. Si el último paso está mediado por GliT, se generará una forma disulfuro, menos tóxica que la ditiol pero aún así capaz de reaccionar fácilmente con otras moléculas que contengan átomos de azufre. Sin embargo, alternativamente puede seguir una modificación final por una bistiometiltransferasa llamada GtmA. Esta molécula une un grupo metilo a cada grupo tiol, impidiendo la formación del puente disulfuro y resultando por tanto en la síntesis de una gliotoxina metilada inactiva. La GtmA es ajena al clúster Gli y está codificada en el cromosoma 2 de *A. fumigatus*. Esto sugiere de acuerdo al mismo estudio que no está implicada en la autoprotección frente a la gliotoxina a pesar de actuar como regulador negativo del ciclo (20).

4.4 ¿Quién produce gliotoxina? Antecedentes bibliográficos

La primera especie en la que se detectó producción de gliotoxina, y a la que debe su nombre, fue *Gliocladium deliquescent* (20). Sin embargo, actualmente el mayor representante de los productores de gliotoxina y sobre el cual no existe ninguna duda de que la produce, es *Aspergillus fumigatus*. Gardiner (8) publicó en 2005 que la gliotoxina es producida por *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium spp*, *Candida albicans* y *Trichoderma spp*. Kwon-Chung y Sugui (9) defienden la opinión de que *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. flavus* producen todas la toxina, si bien no todas la cepas estudiadas son capaces. Lewis (21) y Kupfahl (13) coinciden, estableciendo que *A. fumigatus* es con diferencia el mayor productor seguido de *A. terreus*, *A. niger* y por último *A. flavus*, aunque las frecuencias detectadas en cada uno de los estudios difieren. Además Kupfahl no halla diferencias entre especies ambientales y patógenas en lo que a producción de toxina respecta, al contrario que estudios anteriores (13).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Herramientas utilizadas

- Base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information): es parte de la National Library of Medicine (NLM). Contiene bases de datos de ámbito médico y un motor de búsqueda para encontrar la información deseada en ellas (22).
- BLAST (Basic Local Allignment Tool): BLAST es una herramienta de búsqueda perteneciente al NCBI que permite buscar una secuencia o secuencias, ya sea de ADN o proteína, en una macro base de datos que contiene la información de todas las secuencias, probadas o teóricas, de multitud de organismos estudiados que los investigadores hayan introducido en dicha base de datos. Además, permite interrelacionar su información con otras bases de datos (SwissProt, protein data bank, RefSeq y otras muchas). Así pues, BLAST contiene diversos algoritmos para buscar secuencias de acuerdo a su grado de similitud con la introducida en el motor de búsqueda, y calcula la relevancia estadística de los resultados obtenidos en base a porcentajes y logaritmos. El modo óptimo de utilizar esta herramienta, y el que se usó en el presente trabajo, consiste en realizar BLAST recíprocos. Esta resulta ser una estrategia particularmente útil en la búsqueda de ortólogos y consiste en, una vez hallado un resultado, se le realiza el BLAST a éste y se comprueba si devuelve como resultado la secuencia que se buscó en primer lugar (23).
- MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation): es una herramienta de alineamiento múltiple de secuencias (MSA, por sus siglas en inglés) del EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) que permite además expresar los resultados en forma de árbol filogenético para poder dilucidar, de un modo visual, la distancia genética que separa a un ortólogo de otro. La ventaja que posee este método de presentar los resultados es que permite identificar de un modo intuitivo qué elementos del árbol están separados por

una distancia genética mayor y cuáles están más conservados entre especies distintas, e intuir (basados en una hipótesis de origen común) en qué momentos se han podido producir eventos evolutivos que hayan resultado en una evolución divergente hacia, en nuestro caso, varias rutas biosintéticas de varias toxinas fúngicas. Se escogió esta herramienta debido a que el clúster gli se identificó a partir del clúster sir (ruta biosintética de la sirodesmina), basándose en técnicas de homología e hipótesis de un origen común de las toxinas fúngicas.

2. Proceso de obtención y gestión de la información

Se inició el proyecto buscando los componentes del clúster gli en *A. fumigatus Af293* y sus secuencias de ADN y proteínas, en la base de datos del NCBI. Una vez halladas, se buscaron y guardaron dichas secuencias en formato FASTA para su posterior utilización en la realización de los cladogramas. Puesto que en este trabajo se pretende estudiar el producto final de una ruta biosintética, se decidió que los resultados fueran expresados según la información obtenida acerca de las proteínas, aunque igualmente se estudiaron las secuencias de ADN para comprobar la congruencia entre ambas.

Una vez se tuvieron las secuencias de cada uno de los 12 genes del clúster y sus correspondientes péptidos, se introdujeron en la herramienta de búsqueda BLAST, a la que se accedió a través del propio motor de búsqueda del NCBI para hallar el grado de homología de los resultados obtenidos con respecto a la secuencia de referencia de *A. fumigatus*. Se realizaron BLAST recíprocos para todas ellas.

Estos son los parámetros de búsqueda que se utilizaron para la búsqueda de los elementos del clúster gli:

Tabla 2:	ADN	Proteína
Database	Nucleotide collection (nr/nt)	Non redundant protein sequences (nr)
Organism	Fungi (taxid: 4751)	Fungi (taxid: 4751)
	Exclude: Aspergillus fumigatus (taxid: 746128)	Exclude: Aspergillus fumigatus (taxid: 746128)

Optimize for	Somewhat similar sequences (blastn)	N/A
Algorithm	N/A	Blastp (protein-protein BLAST)

Se decidió excluir *A. fumigatus* de la búsqueda ya que obviamente al ser la especie de referencia y tener bien descrito su rol como productor de gliotoxina no iba a ser estudiado en este proyecto.

Una vez se hubieron obtenido los resultados para el clúster Gli, éstos se analizaron cualitativamente en busca de los organismos más repetidos en las 12 proteínas y se añadieron aquellas especies cuyo estudio revertía un interés especial para el proyecto. Se incluyeron las especies de *Aspergillus* que son patógenas con más frecuencia (*A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*), varios representantes de *Aspergillus* sección fumigati (*A. fischeri*, *A. udagawae*, *A. novofumigatus*, *A. lentulus*, *A. turcosus*, *A. thermomutatus*, *A. calidoustus*) y otras especies frecuentes (*A. clavatus*, *A. oryzae*), representantes de los géneros que aparecen en la bibliografía como productores de gliotoxina (*Penicillium expansum*, *Trichoderma reesei* y *T. virens*) y *Penicillopsis zonata*, que apareció repetidas veces entre los 15 primeros resultados de las búsquedas.

En una segunda fase del proyecto se escogieron los organismos de mayor interés clínico y se buscaron sus correspondientes NRPS en la base de datos del NCBI. De este modo se obtuvieron un total de 164 secuencias de ADN y sus correspondientes proteínas de un total de 8 organismos en los que se estimó una mayor probabilidad de que exista el clúster *gli* (*A. fumigatus* como referencia comparativa, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma virens*, *T. reesei* y *Penicillopsis zonata*). Las secuencias en formato FASTA de esas 164 NRPS, obtenidas de la base de datos del NCBI, se introdujeron en MUSCLE. Al obtener el cladograma completo, buscamos la rama correspondiente a GliP de *A. fumigatus* para hallar las NRPS de otras proteínas de especies distintas que sean más próximas a ella. Una vez detectadas, se utilizaron diversos métodos de los mencionados previamente para identificar con exactitud cada una de ellas.

3. Trabajo en el laboratorio

3.1 Aislados utilizados

Se utilizaron muestras tanto ambientales como clínicas de especies de *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. nidulans* identificados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) de Zaragoza. De *A. fumigatus* se estudiaron la cepa de referencia Af293 y un mutante $\Delta GliP$. El resto son procedentes de muestras clínicas de pacientes del HUMS obtenidas a lo largo de la segunda mitad del año 2015.

3.2 Extracción de ADN

Se realizó una extracción de ADN basada en fenol cloroformo y CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio). La disagregación de la muestra se realizó con medios físicos (se utilizaron bolas de sílice de 0.5 mm de diámetro en tubos agitados en un BeadBeater™). Además se utilizó como tampón de extracción (TE) de Sigma® una solución basada en CTAB con la cual se logra desestabilizar las membranas nuclear y celular y los restos de la pared fúngica. Una vez liberado el ADN se procede a añadir una mezcla de fenol cloroformo 50:50 con el objetivo de separar el contenido proteico del extracto. El fenol desnaturaliza las proteínas de la muestra, que quedan acumuladas entre la fase acuosa y la fase orgánica resultado de añadir la mezcla de fenol cloroformo al extracto. Puesto que el fenol es un potente inhibidor de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, de sus siglas en inglés) conviene eliminarlo totalmente del extracto utilizando cloroformo para disolver los posibles restos de fenol que contenga la fase acuosa (que porta el ADN). A continuación, se precipita el ADN haciendo uso de isopropanol frío de Panreac®.

Protocolo utilizado:

Procedimiento

Debe efectuarse en condiciones estériles. La contaminación durante la preparación de la muestra puede evitarse empleando material desechable y soluciones de descontaminación y evitando la formación de polvo.

- Depositar 100 GM de muestra homogénea en un tubo estéril de 1,5 ml para microcentrifuga;
- añadir 300 µl de agua desionizada estéril y mezclar con un asa;
- añadir 500 µl de tampón a base de CTAB y mezclar con un asa;
- añadir 20 µl de proteinasa K (20 GM/ml), agitar e incubar a 65°C durante 30-90 minutos*;
- añadir 20 µl de ribonucleasa A (10 GM/ml), agitar e incubar a 65°C durante 5-10 minutos*;
- centrifugar durante 10 minutos a 16 000 g aproximadamente;
- trasladar el sobrenadante a un tubo de microcentrifugación que contenga 500 µl de cloroformo y agitar durante 30 segundos;
- centrifugar durante 10 minutos a 16,000 g hasta que se separen las fases;
- trasladar 500 µl de la capa superior a otro tubo de microcentrifugación que contenga 500 µl de cloroformo y agitar;
- centrifugar durante 5 minutos a 16 000 g;
- trasladar la capa superior a otro tubo de microcentrifugación;
- añadir 2 volúmenes de solución de precipitación a base de CTAB y mezclar pipeteando;
- incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente;
- centrifugar durante 5 minutos a 16 000 g;
- desechar el sobrenadante;
- disolver el precipitado en 350 µl NaCl (1,2 M);
- añadir 350 µl de cloroformo y agitar durante 30 segundos;
- centrifugar durante 10 minutos a 16,000 g hasta que se separen las fases;
- trasladar la capa superior a otro tubo de microcentrifugación;
- añadir 0,6 volúmenes de isopropanol y agitar;
- centrifugar durante 10 minutos a 16 000 g;
- desechar el sobrenadante;
- añadir 500 µl de solución de etanol al 70 % y agitar con cuidado;
- centrifugar durante 10 minutos a 16 000 g;
- desechar el sobrenadante;
- secar los sedimentos y volver a disolver el ADN en 100 µl de agua desionizada estéril.

Extraido de: Somma M. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión nº4: Extracción y purificación de ADN (24)

3.3 PCR

Se amplificaron mediante PCR convencional los genes gtmA, gliP y, como control de extracción, el fragmento comprendido entre ITS1 e ITS4. El tamaño de los amplicones es de 293 bp para gtmA, de 495 bp para gliP, y de unas 350 bp para ITS (variable según especies).

La optimización de la PCR fue realizada previamente por el grupo de investigación. La temperatura de melting calculada para los cebadores utilizados es de unos 57°C

para todos, y la mejor temperatura de annealing obtenida experimentalmente fue de 56°C, siendo las empleadas rutinariamente por el equipo.

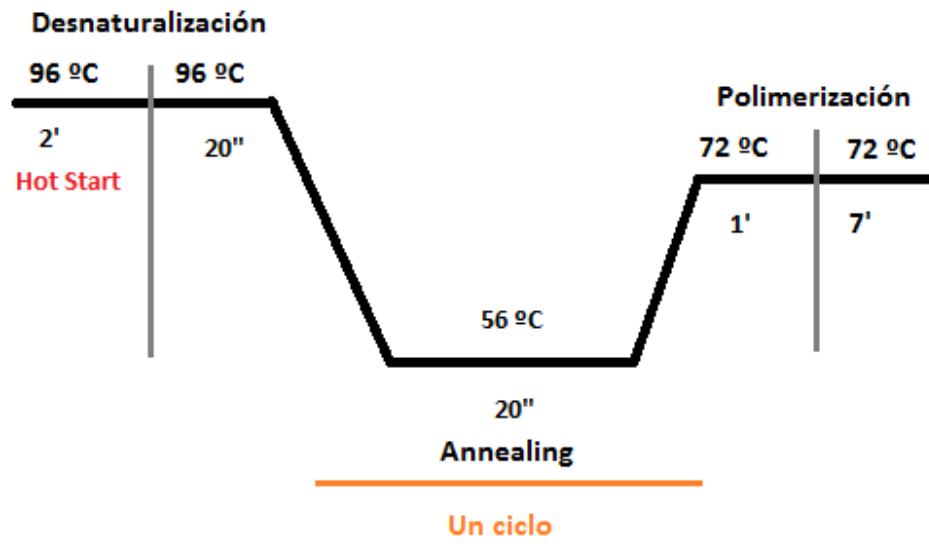


Fig. 13: PCR

Cebadores utilizados:

Tabla 3:	Forward	Reverse
GliP	5'- GTCGGCTGTCTTCTTCCATCG -3'	5' – TGTGCCCAAGAGATGAAGG -3'
Actina	5'- CACCCCTCAGATACCCCATCG – 3'	5' - CAGCGGTAGTGGAGAATGTG -3'
GtmA Terreus	5'-TCGGAGGCCCTAACCG-3'	5'-GGATTGGAAAGTCCAACAAAGG-3'
GtmA Flavus	5'-GGATTGGAAAGTCCAACAAAGG-3'	5'-TCGTC GGGAGAGATTAAAAGC-3'
GtmA Niger	5'-TCTAGTGCCCTTCATCGTGC-3'	5' -TCGTCAGGGAAAGAGGTTAAC-3'
GtmA Fumigatus	5'-TCCAGCGTACTCAACCACAC-3'	5'-CGTCTGGAAAGATCTGGAAAG-3'

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Los componentes del clúster Gli únicamente están presentes en su totalidad en algunas especies de la sección fumigati.

De acuerdo con la figura 2, solo hallamos coincidencias con la búsqueda de los elementos del clúster Gli en *A. fischeri*, *A. udagawae*, *A. novofumigatus*, *A. lentulus* y *A. thermomutatus*. Se puede observar que en el caso de *A. fischeri* y *A. udagawae* los elementos del clúster se localizan contiguos y en el mismo orden que en *A. fumigatus*. En cambio, en *A. novofumigatus* y *A. lentulus* se encuentran contiguos y en la misma secuencia, pero en orden inverso. En *A. thermomutatus* los elementos guardan un orden distinto al de *A. fumigatus*. Así pues, *A. fischeri* y *A. udagawae* son las especies más similares a *A. fumigatus*, seguidas por *A. novofumigatus* y *A. lentulus*. La inversión del clúster en *A. novofumigatus* y *A. lentulus* nos hace pensar (partiendo de la teoría de un origen común) que dichos genes se heredaron ligados sufriendo una inversión con respecto a su predecesor genético. *A. thermomutatus* es más diferente al contener el clúster en un orden alterado. Esto puede ser explicado por una mayor distancia genética con respecto a *A. fumigatus* que las otras especies, pero cabe destacar que de acuerdo con la notación de los genes éstos permanecen agrupados, si bien en dos agrupaciones en vez de una sola. Pese a todo, *A. thermomutatus* es más parecido a la especie de referencia que *A. turcosus*, quien no contiene la totalidad de los genes implicados: carece de GliZ pese a poseer los otros elementos del clúster, desordenados.

Además del número de genes hallados en estas especies, sus resultados de búsqueda arrojan coincidencias muy altas con respecto a *A. fumigatus*, con Query Cover (QC, el porcentaje de la secuencia resultado que se solapa con la buscada) y Identity (I, el porcentaje de similitud entre ambas secuencias en la porción solapada) superiores en promedio a 98% y 89%, respectivamente.

En cuanto a las demás especies estudiadas, en ninguna de ellas se obtuvieron resultados para todos los componentes. La que contiene más número de genes del clúster sería *T. virens*, para quien no hemos hallado coincidencias con GliA ni GliZ. (fig. 16)

Por ello, y teniendo en cuenta que numerosos componentes del clúster se consideran imprescindibles para la síntesis de la micotoxina (6, 8, 15-18), es razonable aseverar que, de acuerdo con los hallazgos obtenidos, *A. turcosus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *P. expansum*, *T. virens*, *T. reesei* y *P. zonata* son no productores de gliotoxina, o al menos de la misma gliotoxina producida por *A. fumigatus*. En este sentido destaca *A. turcosus*, el único componente estudiado de la sección fumigati que no es capaz, a nivel teórico, de producir gliotoxina.

Respecto a las otras tres especies patógenas principales (*A. terreus*, *A. niger* y *A. flavus*) hallamos dos tendencias diferentes: mientras que *A. terreus* y *A. flavus* devuelven coincidencias con respectivamente 6 y 5 elementos del clúster, *A. niger* lo hace con un único elemento: GliC (QC 93%, I 39%).

A. terreus posee GliZ, GliJ, GliP, GliC, GliF y GliT. Con excepciones que a continuación se detallarán, estos genes poseen QC del 93% o superior pero I del 51% o inferior, lo que implica que si bien una gran parte de las secuencias halladas se solapa con sus referentes de búsqueda, estas dos son idénticas en menos de la mitad de sus aminoácidos. Las excepciones son GliZ, con un QC alto pero considerablemente menor al resto (78%); y GliT, cuyo QC es del 100% y I del 81%, haciéndola casi idéntica a la GliT de *A. fumigatus*.

A. flavus se comporta de una manera similar. Posee coincidencias para GliI, GliJ, GliC, GliM y GliG. Sus QC son en todos los casos superiores a 81% y sus I entre 51% y 36%.

Con respecto a las especies distintas de *Aspergillus*, *T. virens* es la que tiene coincidencias con más elementos del clúster, diez de ellos.

2. Gli C es el elemento que aporta más coincidencias, GliA el que menos.

De las 17 especies estudiadas, Gli C nos ha proporcionado coincidencias en 15 de ellas (todas salvo *A. calidoustus* y *P. zonata*), lo que la convierte en la proteína del clúster más constante en este estudio. En cambio GliA y GliZ nos han devuelto menos coincidencias durante la búsqueda, con 8 resultados cada una.

3. Análisis de las NRPS más próximas a GliP de *A. fumigatus* en el cladograma:

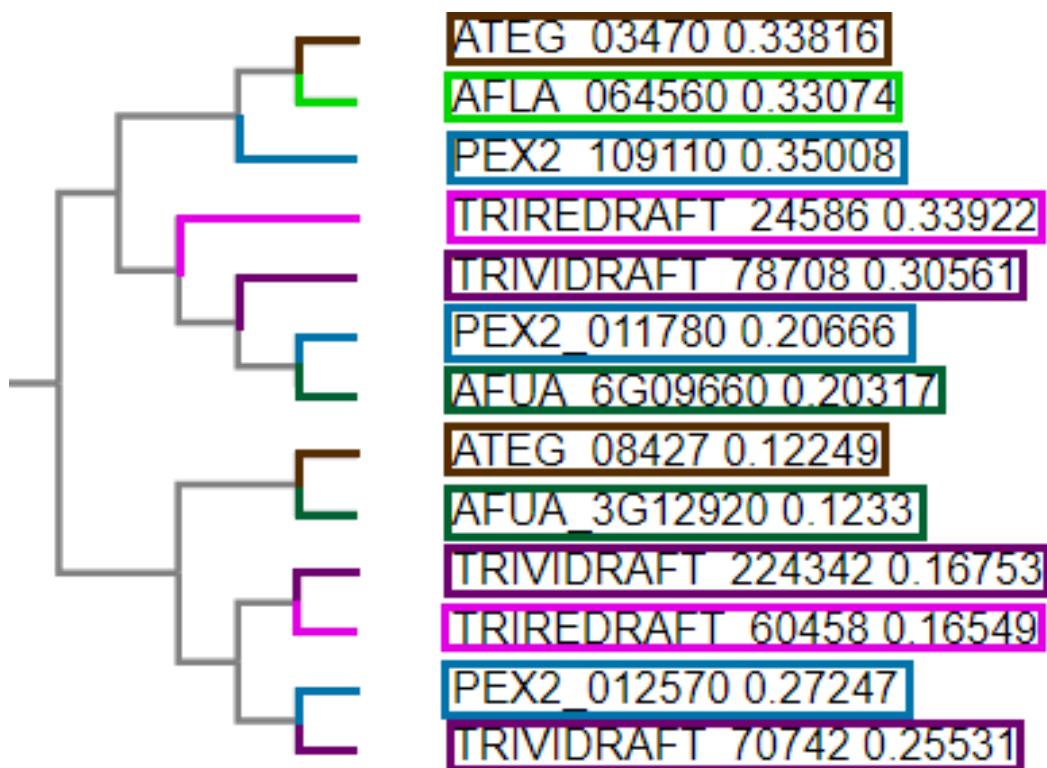


Fig 14: Rama del cladograma que muestra GliP de *A. fumigatus* (identificada como AFUA_6G09660), y NRPS adyacentes.

Detalles de las NRPS vecinas a GliP.

Tabla 4:	Microorganism o	Descripción	Tamaño (residuos)	Best BLAST	Comparació n con GliP	
					QC	Ident
AFUA_6G09660	<i>A. fumigatus</i>	NRPS GliP	2135		100	100
ATEG_03470	<i>A. terreus</i>	Proteína hipotética	1507	NRPS GliP [A. fumigatus A1163] EDP49541.1	96	30
AFLA_064560	<i>A. flavus</i>	NRPS GliP-like	1621	NRPS GliP [A. fumigatus A1163] EDP49541.1	95	29
PEX2_109110	<i>P. expansum</i>	Sintetasa/ligas a dependiente de AMP	1557	NRPS GliP [A. fumigatus var. RP-2014] KEY77192.1	98	30

TRIREDRAFT_24586	T. reesei	NRPS, parcial	2190	NRPS GliP [A. fumigatus Af293] XP_750855.1	100	40
TRIVIDRAFT_78708	T. virens	NRPS GliP	2032	hypothetical protein CDV57_08410 [A. fumigatus] OXN22217.1	98	44
PEX2_011780	P. expansum	Sintetasa/ligasa dependiente de AMP	2179	NRPS GliP [A.fumigatus Af293] XP_750855.1	99	61
ATEG_08427	A. terreus	Proteina hipotética	2152	hypothetical protein CDV58_05250 [A. fumigatus] OXN05566.1	99	30
AFUA_3G12920	A. fumigatus	NRPS GliP-like	2202	NRPS GliP-like (XP_754329.2)	96	30
TRIVIDRAFT_22434 2	T. virens	NRPS SirP	2151	Proteína hipotética CDV58_05250 [A. fumigatus] (OXN05566.1)	99	31
TRIREDRAFT_60458	T. reesei	NRPS	2146	NRPS GliP2 [A. fumigatus var. RP-2014] KEY80879.1	99	31
PEX2_012570	P. expansum	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase , class-II	2366	hypothetical protein CDV58_05250 [A.fumigatus] OXN05566.1	84	29
TRIVIDRAFT_70742	T. virens	NRPS SirP/GliP2	2038	hypothetical protein CDV58_05250 [A. fumigatus] OXN05566.1	98	29

Como se puede observar, mientras que todas ellas tienen un QC alto, sin embargo sus I son relativamente bajas, destacando que TRIVIDRAFT_78708 (QC 98%, I 44%) está identificada como GliP, mientras que AFLA_064560 y AFUA_3G12920 aparecen identificadas como "GliP like", a pesar de que sus QC son muy similares y sus I solo ligeramente inferiores a las del primero. Llama la atención que TRIVIDRAFT_78708 se considere GliP con I de 44%, puesto que este hecho implica que las coincidencias entre esta molécula y la GliP de *A. fumigatus* solo tienen en común el 44% de sus elementos.

Además, solo las proteínas incluidas en la rama más superior del fragmento mostrado en la Figura 1 nos devuelven GliP de *A. fumigatus* como mejor BLAST. Esto apoya que, efectivamente, están más próximas a GliP que el resto de las NRPS del cladograma, pero siguiendo la hipótesis de que GliP es necesaria para la síntesis de gliotoxina solo *T. virens* sería candidato a ser un verdadero productor, puesto que su NRPS es la única aparte de la de *A. fumigatus* identificada como GliP.

Tabla 5: Resultados de la búsqueda BLAST de los elementos del clúster *gli* (ADN)

		GliZ	GliI	GliJ	GliP	GliC	GliM	GliG	GliK	GliA	GliN	GliF	GliT	
<i>Aspergillus Fischeri</i>	query cover	100	91	96	100	94	96	100	97	100	93	96	.100	
identity		84	92	81	91	82	94	100	-	-	-	-	-	
código		XM_001258079.1	XM_001258080.1	XM_001258081.1	XM_001258082.1	XM_001258083.1	XM_001258084.1	XM_001258085.1	XM_001258086.1	XM_001258087.1	XM_001258088.1	XM_001258089.1	XM_001258090.1	88
<i>A. udagawae</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
identity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
código		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. novofumigatus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
identity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
código		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. lentulus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
identity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
código		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. turcosus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
identity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
código		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. thermomutatus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
identity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
código		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. calidoustus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
identity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
código		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. clavatus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
identity		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
código		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. oryzae</i>	query cover	1	-	-	-	2	-	14	-	-	-	-	12	
identity		93	-	-	-	82	-	76	-	-	-	-	78	
código		XM_001823989.3	-	-	-	XM_003712905.1	-	XM_023234347.1	-	-	-	-	XM_001820781.1	
<i>A. terreus</i>	query cover	-	2	-	-	5	14	5	-	-	3	35	3	
identity		-	67	-	-	73	73	82	-	-	84	66	.100	
código		-	XM_001212651.1	-	-	XM_001212652.1	XM_001212650.1	XM_001212650.1	-	-	XM_001215652.1	XM_001212649.1	XM_001214313.1	
<i>A. niger</i>	query cover	-	-	3	1	-	-	-	-	-	3	35	81	
identity		-	-	69	84	-	-	-	-	-	XM_001393304.2	-	XM_001393327.1	
código		-	XM_001393339.1	XM_001392935.2	-	2	14	-	-	-	-	-	12	
<i>A. flavus</i>	query cover	-	-	-	-	82	-	76	-	-	-	-	78	
identity		-	-	-	-	XM_002379973.1	-	XM_002379972.1	-	-	-	-	XM_002376515.1	
código		-	24	21	13	6	59	52	7	29	54	82	42	
<i>Trichoderma virens</i>	query cover	-	70	77	66	85	68	70	79	68	68	69	69	
identity		-	XM_014100719.1	XM_014100677.1	XM_014100723.1	XM_014100722.1	XM_014100716.1	XM_014100718.1	XM_014103102.1	XM_014100721.1	XM_014100717.1	XM_014100842.1	-	
código		-	XM_016738446.1	XM_016738456.1	XM_016738455.1	XM_016738454.1	XM_016738453.1	XM_016738452.1	XM_016738451.1	-	-	2	-	
<i>T. reesei</i>	query cover	7	-	18	11	5	21	-	4	54	-	85	-	
identity		70	-	76	72	79	70	-	86	68	-	-	-	
código		CP0162337.1	-	CP016236.1	CP016237.1	CP016237.1	-	-	CP016233.1	CP016236.1	-	CP016238.1	-	
<i>Penicillium expansum</i>	query cover	-	24	15	78	19	68	44	19	-	-	-	3	
identity		-	70	72	68	74	70	73	74	-	-	-	90	
código		-	XM_016738446.1	XM_016738456.1	XM_016738455.1	XM_016738454.1	XM_016738453.1	XM_016738452.1	XM_016738451.1	-	-	-	XM_016745435.1	
<i>P. liliaceoehrinulatum</i>	query cover	12	27	53	64	70	87	76	64	-	-	-	-	
identity		72	67	75	69	65	71	78	66	-	-	-	-	
código		EF429247.1	-	-	-	-								
<i>Penicillopsis zonata</i>	query cover	-	9	16	10	2	60	8	18	76	-	-	-	
identity		-	69	71	71	82	70	75	70	63	-	-	-	
código		-	XM_022729514.1	XM_022728486.1	XM_022726452.1	XM_022726835.1	XM_022728055.1	XM_02272701.1	XM_022723361.1	-	-	-	-	

Tabla 6: resultados de la búsqueda BLAST de los elementos del clúster Gli (proteínas)

		GliZ	GliI	GliP	GliC	GliM	GliG	GliK	GliA	GliN	GliF	GliT
<i>Aspergillus Fischeri</i>	query cover	100	99	100	95	95	96	98	99	100	95	97
identity	XP_0012580801	XP_0012580811	XP_0012580821	XP_0012580831	XP_0012580841	XP_0012580851	XP_0012580861	XP_0012580871	XP_0012580881	XP_0012580891	XP_0012580901	XP_0012580911
<i>A. udagawae</i>	query cover	93	92	100	99	100	99	98	98	100	96	100
identity	77	86	84	89	91	91	93	96	98	100	95	95
<i>A. novofumigatus</i>	query cover	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100
identity	76	87	91	92	93	94	96	96	94	94	95	92
<i>A. lenticulus</i>	query cover	96	99	99	91	93	93	94	96	98	100	100
identity	78	88	91	90	93	93	94	96	91	94	95	92
<i>A. turcosus</i>	query cover	-	100	98	100	100	99	100	99	96	100	100
identity	-	84	89	88	89	89	92	92	89	89	90	90
<i>A. thermomutatus</i>	query cover	93	97	100	100	99	99	100	96	100	100	100
identity	62	84	88	88	89	88	92	92	86	89	87	89
<i>A. calidoustus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
identity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. clavatus</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
identity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	query cover	-	89	89	-	-	-	-	-	-	-	-
identity	-	36	51	-	-	39	44	46	46	46	46	55
<i>A. terreus</i>	query cover	78	-	99	99	93	-	-	-	-	-	-
identity	24	-	51	30	40	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	query cover	-	-	-	-	93	-	-	-	-	-	-
identity	-	-	-	-	-	39	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	query cover	-	89	89	-	-	-	-	-	-	-	-
identity	-	36	51	-	-	38	43	47	-	-	-	-
<i>Trichoderma virens</i>	query cover	-	96	99	94	90	96	95	89	-	-	-
identity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. reesei</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
identity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. lilacinoechinatum</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
identity	36	56	60	69	66	73	81	64	-	-	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	query cover	-	90	95	99	80	95	98	53	-	-	-
identity	-	56	47	61	64	74	80	67	-	-	-	-
<i>P. lilacinoechinatum</i>	query cover	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
identity	82	97	97	99	98	100	98	92	-	-	-	-
<i>Penicillopsis zonata</i>	query cover	13	95	97	96	-	94	85	91	98	-	-
identity	54	44	55	43	-	-	55	48	43	51	-	-
código	XP_0022577236.1	XP_022580458.1	XP_022580459.1	XP_022580453.1	-	-	XP_022580455.1	XP_022580469.1	XP_022580456.1	XP_0225804352.1	-	-

4. Análisis mediante PCR de la presencia de GliP y GtmA en aislados clínicos

Los geles de electroforesis realizados muestran la presencia de GliP únicamente en la cepa de referencia *A. fumigatus* 293 (fig. 17). Cabe destacar que GtmA aparece en ambas muestras de *A. fumigatus* y ambas muestras de *A. terreus*, y no en *A. flavus*, *A. niger* ni *A. nidulans*. De acuerdo con la investigación bioinformática, *A. terreus* no es productor de gliotoxina, de lo que se infiere que ser productor de gliotoxina no es requisito necesario para la expresión de GtmA. Se puede reseñar que en su conjunto, los dos aislados de *A. flavus* estudiados aquí muestran una banda en el pocillo de GtmA que no se corresponde con la de *A. fumigatus* y que, en el caso del aislado marcado como B4, es muy intensa.

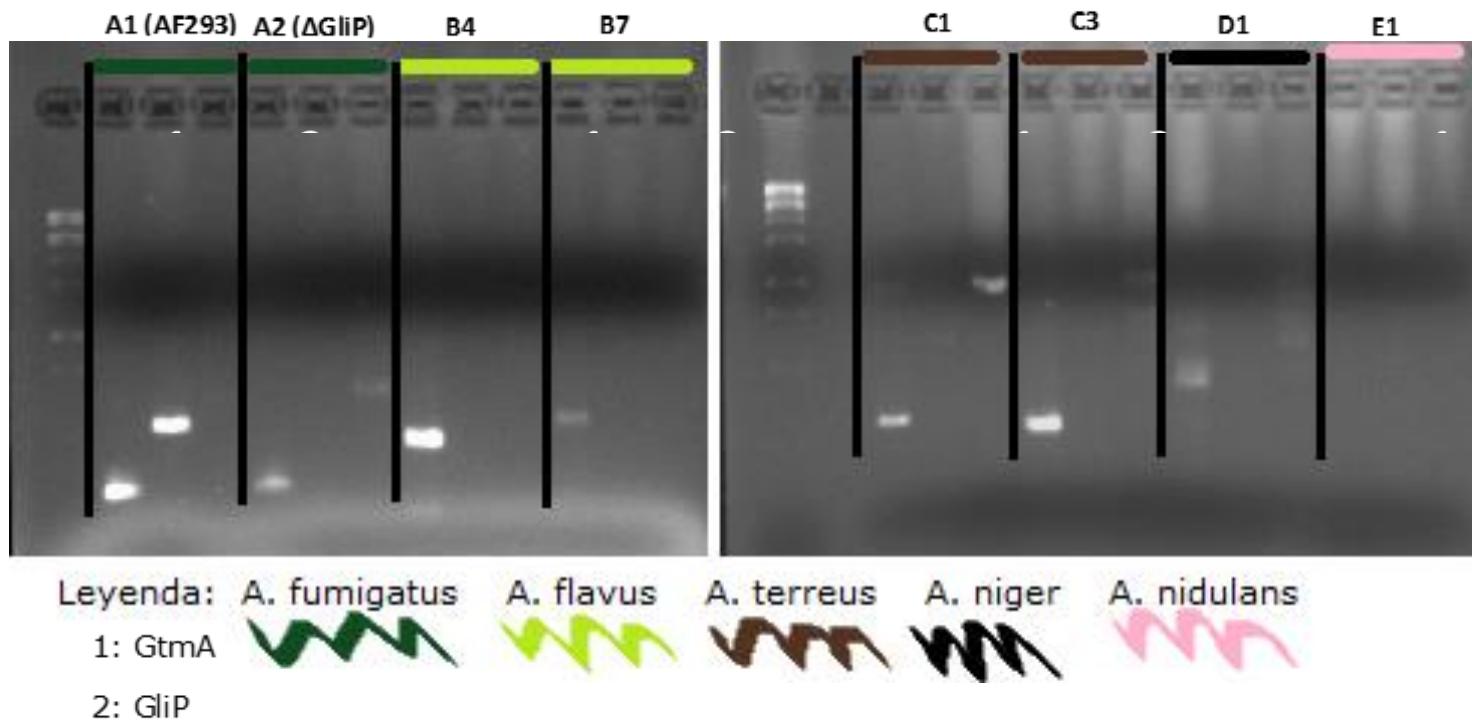


Fig 17: Aislados estudiados mediante PCR

CONCLUSIONES

Conclusión principal: La gliotoxina podría ser una diana de diagnóstico molecular de AI.

En base a los resultados no se puede afirmar con certeza que ninguna de las especies estudiadas no pertenecientes a la sección fumigati sea un productor de gliotoxina, puesto que todas ellas carecen de algún elemento

del clúster y/o ninguna de sus NRPS es claramente similar a GliP. Sin embargo, teniendo en cuenta que *A. fumigatus* y la sección fumigati son responsables de más del 90% de los casos de AI, una prueba diagnóstica basada en la gliotoxina que fuera perfecta detectaría con seguridad la inmensa mayoría de las infecciones, por lo que sería de suficiente utilidad en la práctica clínica para su uso en combinación con métodos diagnósticos tradicionales.

Otras conclusiones:

Las especies estudiadas poseen en mayor o menor medida parte de los elementos del clúster Gli, pero más allá de algunos hongos pertenecientes a la sección fumigati ninguna los posee todos. Este hecho apoya la idea de que ninguno es productor de gliotoxina en un sentido estricto, puesto que no serían capaces de producir la misma molécula que *A. fumigatus*. Sin embargo, hay autores que afirman la presencia de gliotoxina en algunas de ellas (por ejemplo, *A. terreus*, *A. niger* y *A. flavus*). Ello hace pensar que dichas especies, y particularmente aquellas que han mostrado una mayor similitud genética con respecto a *A. fumigatus* y que contienen mayor número de elementos del clúster, podrían producir una micotoxina similar ya sea en función o estructura a la gliotoxina, y serían necesarios estudios posteriores para dilucidar esta aparente contradicción.

La producción de Gtma y la de Gliotoxina son independientes. En vista de los resultados de PCR parece sensato asumir que GtmA puede aparecer en especies que no poseen gliotoxina (como *A. terreus*) y que además su expresión sería igualmente independiente de la de la toxina, puesto que *A. fumigatus ΔGliP* fue capaz de expresarla. Este hecho se podría justificar a nivel evolutivo como una estrategia de defensa frente a gliotoxina tanto propia como procedente de otros hongos, mediante una pérdida de la síntesis de gliotoxina en especies que sin embargo mantuvieron la capacidad de sintetizar GtmA por necesidad defensiva, ya que es bien conocida la función de esta toxina como factor de virulencia y potente oxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Torres Rodríguez JM, del Palacio Hernanz A, Guarro artigas J, Negroni Briz R, Pereiro Miguens M. Micología médica. 2^a ed. Elsevier Masson; 1993
- (2) Richardson MD, Johnson EM. Guía de infecciones fúngicas. Editores Médicos SA (Edimsa); 2001
- (3) Gil Aguado A, Lavilla Uriol P, Pintado García V. Micosis sistémicas. Actualización. 1^a ed. Madrid: Grupo aulamedica; 1997
- (4) Fortún J, Meije Y, Fresco G; Moreno S. Aspergillosis. Formas clínicas y tratamiento. Enferm Infect Microbiol Clin. 2012;30(4):201–208
- (5) Bulpa P et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2007 Oct;30(4):782-800
- (6) Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Enferm Infect Microbiol Clin. 2011; 29 (1): 39.e1 – 39.e15
- (7) <http://www.mycobank.org>
- (8) Gardiner DM, Howlett BJ. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxina biosynthetic gene cluster of *Aspergillus Fumigatus*. FEMS Microbiology Letters. 2005; 248:241-248
- (9) Cramer RA Jr, Gamcsik Mp, Brooking RM, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF et al. Disruption of a Nonribosomal Peptide Synthetase in *Aspergillus fumigatus* Eliminates Gliotoxin Production. Eukaryotic cell. 2006; 5 (6): p. 972-980
- (10) Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Zaremba KA, Nardone G, Gálvez EM et al. Gliotoxin Is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. EUKARYOTIC CELL. 2007: p. 1562–1569
- (11) Kwon-Chung KJ, Sugui JA. What do we know about the role of gliotoxina in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? Med Mycol. 2009; 47 (suppl 1):S97-103

- (12) S.Druzhinina, C.P.Kubicek Chapter Two - Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotoph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. *Advances in Applied Microbiology*, 2016 (95), p. 69-147
- (13) Kupfahl C, Michalka A, Lass-Flörl C, Fischer G, Haase G, Ruppert T et al. Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008; 298: 319-327
- (14) Keller, N.P., and Hohn, T.M. (1997) Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 21: 17–29
- (15) Davis C, Carberry S, Schrettl M, Singh I, Stephens JC, Barry SM et al. The Role of Glutathione S-Transferase GliG in Gliotoxin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chemistry & Biology*. 2011; 18: 542-552
- (16) Gallagher L, Owens RA, Dolan SK, O' Keefe G, Schrettl M, Kavanagh K et al. The *Aspergillus fumigatus* Protein GliK Protects against Oxidative Stress and Is Essentialfor Gliotoxin Biosynthesis. *Eukaryotic Cell*. 2012; 11 (10): 1226-1238
- (17) Bok JW, Chung DW, Balajee SA; Marr KA, Andes D, Nielsen KF et al. GliZ, a Transcriptional Regulator of Gliotoxin Biosynthesis, Contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infection and Immunuty*. 2006; 74 (12): 6761-6768
- (18) Schrettl M, Carberry S, Kavanagh K, Haas H, Jones GW, O' Brien J et al. Self-Protection against Gliotoxin – A Component of the Gliotoxin Biosynthetic Cluster, GliT, Completely protects *Aspergillus fumigatus* Against Exogenous Gliotoxin. *PloS Pathogens*. 2010; 6 (6): e1000952
- (19) <https://biocyc.org/>
- (20) Dolan SK, Owens RA, O' Keefe G, Hammel S, Fitzpatrick DA, Jones GW et al. Regulation of Nonribosomal Peptide Synthesis: bis-Thiomethylation Attenuates GLiotoxin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chemistry & Biology*. 2014; 21, p 999-1012
- (21) Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and Species Distribution on GLiotoxin-Producing *Aspergillus* Isolates Recovered from Patients at a Tertiary-Care Cancer Center. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (12): 6012-6122

- (22) Ncbi: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [Internet]. Bethesda. [citado 15 mar 2018]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (23) Ward N, Moreno-Hagelsieb G (2014) Quickly Finding Orthologs as Reciprocal Best Hits with BLAT, LAST, and UBLAST: How Much Do We Miss? PLoS ONE 9(7): e101850.
- (24) Somma M. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión nº4: Extracción y purificación de ADN

Anexo 1: cladograma completo de NRPS

