

**XXIII CONGRESO
NACIONAL DE
MICROBIOLOGÍA**

SEM

11-14 JULIO-2011

SALAMANCA

P.5. Biología de microorganismos patógenos

BP P5 Detección de TLR2 y TLR4 por RT-PCR en un modelo murino de actinomietoma por *Nocardia brasiliensis*

Millán-Chiu BE¹, Hernández-Hernández¹ F, Pérez-Torres A², Méndez-Tovar LJ³, López-Martínez R¹.

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM;
²Departamento de Biología Celular y Tissular, Facultad de Medicina, UNAM.
³Laboratorio de Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMMS, México D. F. México.

El proceso inflamatorio inicia con el reconocimiento de moléculas altamente conservadas en diversos microorganismos llamadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), por medio de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs). En la última década los PRRs más estudiados han sido los Receptores tipo Toll (TLRs). En mamíferos se han descrito trece TLRs capaces de reconocer moléculas derivadas de virus, bacterias, hongos y algunos parásitos.

El actinomietoma es una enfermedad común en países incluidos en el cinturón intertropical. En México es causado principalmente por *Nocardia brasiliensis*. Se caracteriza por una inflamación granulomatosa, crónica, localizada, que afecta la piel, tejido subcutáneo, músculo y en ocasiones hueso. Se desconoce el papel de los TLRs en la respuesta inmune contra *N. brasiliensis*.

El objetivo de este trabajo fue localizar y cuantificar la expresión de TLR2 y TLR4 en el sitio de infección por *N. brasiliensis*.

Diferentes lotes de ratones fueron inoculados con diversas sustancias (solución salina, carragenina o suspensión de *N. brasiliensis*) y sacrificados en diferentes tiempos (2, 4, 8, 48 h, y 10, 20, 50 días y 6 meses). Se incluyó un grupo de ratones sanos sin tratamiento para medir expresión basal. La expresión de ambos receptores fue determinada por RT-PCR e inmunohistoquímica.

Los resultados mostraron que TLR2 aumentó en el tejido infectado, mientras que TLR4 disminuyó. La presencia de ambos receptores fue demostrada en diferentes poblaciones celulares. En etapa temprana de la infección, TLR2 se expresó en neutrófilos y macrófagos en contacto directo con el inóculo, mientras que TLR4 se observó en mastocitos. En etapa tardía TLR2 se expresó en células espumosas y en fibroblastos, mientras que TLR4 estuvo disminuido. Se sugiere que TLR2 podría estar asociado con el reconocimiento de *N. brasiliensis* y de algunas señales de daño tisular, dando como consecuencia el mantenimiento del proceso inflamatorio, favoreciendo así la cronicidad de la enfermedad.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto No. 84272.

Referencias:

Janeway CA Jr & Medzhitov R. 2002. Annu Rev Immunol; 20: 197-216.
López-Martínez R et al. 2006. Monogr Dermatol 19: 5-12.

BP P6 Terapia contra los biofilmes de *Streptococcus pneumoniae* y otras especies bacterianas *in vitro*

Domenech, M., García, E., Moscoso, M. e-mail: mirid@cib.csic.es

Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, CIB/CSIC, Madrid.

Los biofilmes confieren protección y persistencia a las bacterias que los forman y ello, sumado al aumento de las resistencias a antibióticos, ha creado la necesidad de estudiar nuevas estrategias para su prevención y eliminación. En *Streptococcus pneumoniae* han aumentado las resistencias a muchos de los antibióticos de uso. La terapia con enzimas, enzimas líticas bacterianas y fágicas que actúan como agentes microbianos, podría ser una posible y prometedora alternativa a los antibióticos actuales o, al menos, una ayuda complementaria. Nosotros nos hemos planteado usar distintas hidrolasas de pared de *S. pneumoniae* (LytA, LytB y LytC), enzimas líticas de bacteriófagos de neumococo (Cpl-1, Cpl-7, Eji y Pal) y otros compuestos como el xilitol y la *N*-acetil-L-cisteína, para inhibir o disgregar los biofilmes de *S. pneumoniae*.

Se realizaron ensayos con la cepa *S. pneumoniae* P046 que es un doble mutante *lytA* y *lytC*. De todas las hidrolasas de pared usadas, la amidasa LytA produce la mayor disgregación del biofilm (alrededor de un 80%) seguida de las lisozimas fágicas Cpl-7 y Cpl-1 y la amidasa fágica Eji. Tras el tratamiento del biofilm con la enzima Pal y posterior tinción con cristal violeta, no se observó ningún efecto de disgregación sobre el biofilm neumocócico. Sin embargo, el recuento de bacterias viables nos indica que la amidasa Pal es capaz de producir una mortalidad del 90% de las bacterias que forman el biofilm neumocócico. La combinación de cantidades no efectivas en la disgregación del biofilm de neumococo de la amidasa LytA y la lisozima fágica Cpl-1 produjeron un efecto mayor que las enzimas aplicadas individualmente. Las lisozimas fágicas Cpl-1 y Cpl-7 fueron efectivas también en la disgregación de los biofilmes de *Streptococcus pseudopneumoniae* y *Streptococcus oralis*, pero no produjeron ningún efecto en el biofilm de *Streptococcus mitis* B6. La amidasa LytA también disgregó el biofilm de *S. pseudopneumoniae*. Todas estas enzimas se probaron en biofilmes de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, pero ninguna disgregó dichos biofilmes.

Para comprobar si neumococo forma menos biofilm en presencia de xilitol o *N*-acetil-L-cisteína (NAC) se realizaron ensayos de inhibición y disgregación del biofilm neumocócico con la cepa de *S. pneumoniae* R6. El xilitol es un alcohol de azúcar, obtenido por la reducción de la xilosa, no cariogénico. La NAC, derivado *N*-acetil del aminoácido L-cisteína, es un agente mucolítico y hepatoprotector, que posee propiedades antibacterianas. La NAC rompe los puentes disulfuro que unen las proteínas presentes en el moco y es un inhibidor competitivo de aminoácidos, se usa en medicina para el tratamiento de bronquitis crónica, cáncer e intoxicaciones por paracetamol. El xilitol y la NAC producen un efecto inhibitorio en el biofilm neumocócico y la NAC, además, lo disgrega. Tanto los enzimas como el xilitol y la NAC pueden ser un futuro tratamiento contra infecciones neumocócicas relacionadas con biofilmes.

BP P7 Una nueva diana antimicrobiana: La DNA Topoisomerasa I

María Teresa García¹, María Amparo Blázquez², María José Ferrándiz¹, María Jesús Sanz², Noella Silva-Martín³, Juan A. Hermoso³ and Adela G. de la Campa¹

Unidad de Genética Bacteriana, Centro Nacional de Microbiología y CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid¹, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia², Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural, Instituto de Química-Física "Rocasolano", CSIC, Madrid³

La prevención de la aparición y/o incremento de microorganismos resistentes a antibióticos es una tarea fundamental. Para ello es necesario el descubrimiento de nuevos antimicrobianos frente a nuevas dianas moleculares. Las DNA topoisomerasas son enzimas que mantienen la topología del DNA requerida para la transcripción y la replicación. Las DNA topoisomerasas de tipo II son dianas de fluoroquinolonas. Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado antibióticos eficaces frente a DNA topoisomerasas de tipo I. *Streptococcus pneumoniae* tiene dos DNA topoisomerasas tipo II (DNA-girasa y DNA topoisomerasa IV) y una única DNA topoisomerasa de tipo I (DNA topoisomerasa I, TopA). En este trabajo sobreespresamos y purificamos TopA tras clonación en *Escherichia coli* como una proteína de fusión con una cola de 6 Histidinas en su extremo N-terminal. La TopA purificada resultó activa al relajar DNA plasmídico con superenrollamiento negativo. Dos alcaloides fanantrénicos (seconeolitsina y *N*-metilseconeolitsina) fueron capaces de inhibir tanto la actividad *in vitro* de TopA, como el crecimiento de *S. pneumoniae* a dosis de 17 μ M. Esta inhibición se produjo incluso en aislados multiresistentes a distintos antibióticos, incluyendo fluoroquinolonas. Ninguno de estos compuestos afectó a la viabilidad de células humanas. La confirmación de la TopA como diana *in vivo* de estos alcaloides quedó demostrada por la ausencia de inhibición en cultivos con sobreespresión de TopA así como por el superenrollamiento negativo observado en plásmidos extraídos de bacterias tratadas con el inhibidor. Además, se realizó un modelado de la TopA de *S. pneumoniae* en base a la estructura cristalina disponible para la DNA topoisomerasa I de *E. coli*. Estudios de docking señalan fuertes interacciones entre los alcaloides y el sitio de unión a DNA de TopA en la conformación cerrada de la proteína como responsables de la inhibición.

Este trabajo presenta dos posibles nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones neumocócicas e identifica por primera vez a una DNA topoisomerasa tipo I como diana de antimicrobianos.

García, MT., et al., New alkaloid antibiotics that target the DNA topoisomerase I of *Streptococcus pneumoniae*. 2011. The Journal of Biological Chemistry, 286(8):6402-13.

BP P8 *In vivo* and *in vitro* effect of *Saccharomyces boulardii* in a mouse model of experimental DSS-induced colitis

Gozalbo, D., Falomir, M.P., Yáñez, A., Gil, M.L., Murciano, C.

e-mail: Daniel.gozalbo@uv.es

Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Burjassot

The probiotic yeast species *Saccharomyces boulardii* is effective in the prevention and/or treatment of various intestinal disorders. Our aim was to determine the usefulness of oral administration of *S. boulardii* to protect the gastrointestinal tract (GI) in a murine model of experimentally induced colitis. C57BL/6 mice were given dextran sulphate sodium salt (DSS) to induce experimental acute or sublethal colitis. Protection assays were performed by oral administration of viable yeasts cells, or PBS (control), starting either after or during the DSS treatment. The *in vitro* production of cytokines was measured in colon segments of selected mice, either in the presence or absence of heat-inactivated yeasts. In mice with experimental acute or sublethal colitis, no statistically significant differences were found between yeast-treated mice and controls, both for mortality and loss of weight. The mortality of mice with acute colitis treated with *S. boulardii* yeasts (87% by day ten) was not significantly different when compared with PBS-treated mice (83% by day ten). Mice with sublethal colitis showed a higher survival rate as compared with mice with experimentally acute colitis although no significant differences were found between treated and control mice. Similarly, no significant differences in the percentage of weight change during the treatments were observed both in acute and sublethal colitis between *S. boulardii*-administered and control mice. *In vitro* assays to determine cytokine production by colon segments from mice with sublethal colitis were also performed. The addition of heat-inactivated *S. boulardii* yeasts to the cultures did not produce any significant effect on the *in vitro* production of the cytokines assayed. The levels of IL-6 were higher as compared with the levels of TNF- α and IL-10. The *in vitro* production of cytokines in response to inactivated *S. boulardii* yeasts by colon segments from control healthy mice was also tested. In these mice the levels of all cytokines were lower as compared with mice with induced colitis, and again the addition of heat-inactivated yeasts did not cause any statistically significant effect on the production of cytokines. As a conclusion, our results indicate that the oral administration of viable yeasts has no effect in the amelioration of the disease in this model of colitis in immunocompetent mice.

Supported by grant PI080556 (Instituto de Salud Carlos III; Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).