



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

---

# TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

---

IDENTIFICACIÓN DE LOS  
ANTÍGENOS RECONOCIDOS POR  
SUEROS HUMANOS SANOS EN  
HIFAS DE HONGOS DEL GRUPO  
*Scedosporium/Lomentospora*

**Alumna:** *Ugarte Lucas, Paula*

**Fecha:** Junio 2016

**Director**

*Dr. Fernando Luis Hernando Echevarría*

**Curso Académico**

*2015/2016*

**Codirector**

*Dr. Andoni Ramírez García*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Taxonomía.....	1
1.2. Características morfológicas .....	2
1.3. Relevancia clínica de <i>Lomentospora</i> y <i>Scedosporium</i> .....	4
1.4. Tratamiento de infecciones fúngicas.....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	6
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	7
3.1. Cepa y condiciones de cultivo.....	7
3.2. Colección de muestras de suero .....	7
3.3. Obtención de hifas.....	8
3.4. Extracción de proteínas .....	8
3.5. Electroforesis bidimensional .....	9
3.6. Detección de antígenos reconocidos por IgG de sueros humanos .....	9
<b>4. RESULTADOS</b> .....	10
4.1. Detección de proteínas inmunoreactivas frente a muestras de sueros.....	10
4.1.1. Detección de antígenos de <i>Lomentospora prolificans</i> .....	11
4.1.2. Detección de antígenos de <i>Scedosporium apiospermum</i> .....	12
4.1.3. Detección de antígenos de <i>Scedosporium aurantiacum</i> .....	14
4.2. Análisis comparativo del patrón de proteínas inmunoreactivas.....	15
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	18
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	22

## 1. INTRODUCCIÓN

*Lomentospora prolificans* es un hongo saprófito filamentoso que se describió por primera vez en 1974 por Hennebert y Desai (Hennebert y Desai, 1974) y una década más tarde fue asociado con infecciones humanas por Malloch y Salkin (Malloch y Salkin, 1984). Este hongo, junto con los pertenecientes al género *Scedosporium*, son patógenos que se encuentran en zonas humanizadas, tales como áreas industriales, tierras agrícolas o parques infantiles (Kaltseis *et al.*, 2009).

Con respecto a la distribución geográfica de estas especies, se ha descrito que están ampliamente distribuidas, preferentemente en regiones con climas templados, pudiendo tolerar altas temperaturas y concentraciones de sal y crecer con bajas presiones parciales de oxígeno (Cortez *et al.*, 2008). A pesar de estas características en común, la prevalencia en diferentes áreas geográficas depende de cada especie.

El incremento de la población susceptible a las infecciones fúngicas está asociado al aumento de la esperanza de vida y a la mejora en el tratamiento de enfermedades en pacientes críticos o con inmunodeficiencias severas, lo que ha hecho que las infecciones causadas por hongos filamentosos aumenten. Concretamente, las especies de hongos de los géneros *Lomentospora* y *Scedosporium* se consideran emergentes, siendo ambos la segunda causa de infecciones fúngicas por hongos filamentosos en España, únicamente por detrás del género *Aspergillus* (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013).

A pesar de su baja prevalencia, estos hongos se consideran de interés por su alta mortalidad, que puede llegar a ser de entre el 70 y el 100% (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2009), asociada al cuadro clínico del paciente, a la dificultad de un diagnóstico certero rápido y a la resistencia que presentan estas especies frente a los agentes antifúngicos.

### 1.1. TAXONOMÍA

Hasta el año 2011, los micólogos siguieron la clásica nomenclatura basada principalmente en técnicas morfológicas y de cultivo. Por lo tanto, algunas especies fueron clasificadas mediante distintos nombres, dependiendo, por ejemplo, de las distintas fases sexual y asexual. Sin embargo, ese mismo año la comunidad científica

micológica alcanzó un acuerdo general para eliminar paulatinamente esta doble nomenclatura, según lo establecido en el “*Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature*” (Hawksworth, 2011). En la mayoría de los casos se recomendó utilizar el nombre más antiguo para denominar a la especie fúngica, a no ser que el nombre más conocido y utilizado fuera el más reciente.

En el caso de *L. prolificans*, ha sufrido cambios en su clasificación y, por ende, en su denominación. En un principio se propuso el uso de *Scedosporium* como nombre único para el género, por ser el término más antiguo (Guého y de Hoog, 1991). No obstante, algunos autores destacaron las significativas diferencias entre *S. prolificans* y las otras especies del género, a nivel morfológico, genético y clínico. Por lo tanto, esta especie fue excluida del género *Scedosporium* y se renombró como *L. prolificans* (Lackner *et al.*, 2014), nombre con el que fue descrito cuando se descubrió en 1974 (Hennebert y Desai, 1974).

Actualmente, *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum* pertenecen al Phylum *Ascomycota*, Clase *Euascomycetes*, Orden *Microascales* y Familia *Microascaceae*. Dentro de esta familia se encuentran además los géneros *Enterocarpus*, *Lophotrichus*, *Parascedosporium*, *Petriella* y *Petriellopsis*.

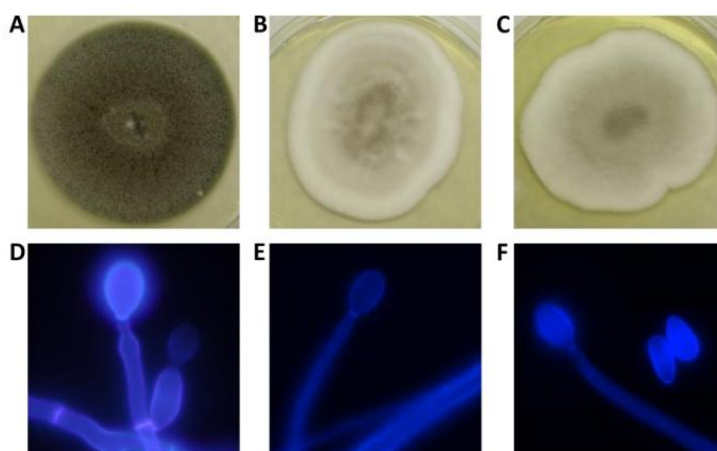
## 1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

*L. prolificans* es capaz de crecer en una amplia variedad de medios de cultivo sólidos y líquidos, en los cuales forma colonias moderadamente rápido a 25°C en agar Sabouraud. Éstas maduran en 5 días, pudiendo medir en una semana más de 3 cm. Son planas y difusas y muestran una superficie aterciopelada y húmeda con color blanquecino al principio, para tornarse a color oliva o negro cuando la conidiación es evidente (Cortez *et al.*, 2008) (**Figura 1 A**).

Microscópicamente, *L. prolificans* produce hifas septadas, hialinas y basalmente infladas con conidióforos en forma de matraz, de los cuales emerge un único conidio o un pequeño racimo de ellos (**Figura 1 D**). Los conidios unicelulares son de color hialino a marrón pálido, de forma ovoide a piriforme, con la base truncada y con tamaño de 2 a 5 por 3 a 13  $\mu\text{m}$ .

Por su parte, *S. apiospermum* forma colonias aterciopeladas de color gris a negro con micelio incoloro (**Figura 1 B**) y crecen rápidamente a 25°C, aunque este hongo tolera temperaturas de hasta 42°C y es capaz de crecer en situaciones con baja concentración de oxígeno, incluso en anaerobiosis. Por otro lado, crece produciendo hifas hialinas en forma de cilindro, de donde emergen conidios marrones con forma ovoide con tamaño de 4 a 9 por 6 a 10  $\mu\text{m}$  (Guarro *et al.*, 2006) (**Figura 1 E**).

En cuanto al hongo filamentoso *S. aurantiacum*, las colonias llegan a tener un diámetro de 40 a 50 mm después de 14 días en agar patata dextrosa a 25°C, aunque la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C a 40°C. Las colonias son densas y algodonosas con crecimiento concéntrico de micelio aéreo de color gris amarillento y marrón en algunas zonas (Gilgado *et al.*, 2005) (**Figura 1 C**). Microscópicamente, los conidióforos de este hongo crecen de forma solitaria con conidios subhialinos ovoides de tamaño de 2 a 5 por 5 a 14  $\mu\text{m}$ , o formando sinema con conidios cilíndricos hialinos de 3 a 5 por 6 a 12  $\mu\text{m}$  (**Figura 1 F**).



**Figura 1.** Imágenes macroscópicas y microscópicas de *Lomentospora prolificans* (A, D), *Scedosporium apiospermum* (B, E) y *Scedosporium aurantiacum* (C, F). Todas las fotografías han sido tomadas tras 7 días de crecimiento a 37°C en agar patata dextrosa y las micrografías se han tomado usando blanco de calcofluor.

En la tabla que se expone a continuación (**Tabla 1**) se presentan las diferencias morfológicas y fisiológicas de los principales hongos de la familia *Microascaceae* tras ser cultivados en agar patata, que pueden ayudar en su diferenciación. Ésta es compleja ya que las diferencias entre estos hongos son sutiles y difíciles de apreciar.

Tabla 1. Principales características morfológicas y fisiológicas de los hongos patógenos más representativos de la familia *Microascaceae*.

Especie	Tª de crecimiento		Pigmento difusible	Colonia		Microscopía		
	40°C	45°C		Anverso	Reverso	Células conidiógenas	Conidio	Sinema/Ascoma
<i>L. prolificans</i>	Sí	No	No	Negra, Húmeda Penachos blancos	Negro	Matraz	Globo	No/No
<i>S. apiospermum</i>	Sí	Sí	Sí	Algodonosa Marrón/ amarillento	Marrón Naranja	Cilíndrica	Globo	Sí/No
<i>S. aurantiacum</i>	Sí	No	No	Algodonosa, Marrón	Negro	Cilíndrica/ matraz	Ovoide	Sí/No

### 1.3. RELEVANCIA CLÍNICA DE *Lomentospora* Y *Scedosporium*

Las infecciones causadas por hongos pertenecientes a *Scedosporium* y *Lomentospora* pueden ser desde localizadas a sistémicas y así pueden presentar una amplia variedad de síntomas en diferentes zonas del cuerpo, dependiendo del órgano en el que se establezcan (Cortez *et al.*, 2008). Las lesiones de la piel, el dolor muscular o la endocarditis (Fernández Guerrero *et al.*, 2011) son lesiones comunes. Sin embargo, el sistema nervioso central (SNC) es, sobre todo, el área más frecuentemente infectada (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2009), siendo *Scedosporium* spp. y *L. prolificans* hongos neurotrópicos por su tendencia a dicha infección (Marco de Lucas *et al.*, 2006; Kantarcioglu *et al.*, 2008).

Concretamente, *L. prolificans* ha sido descrito como agente causal de infecciones cutáneas y subcutáneas, oculares, pulmonares, osteoarticulares, endocarditis, peritonitis y meningoencefalitis. Además, esta especie se ha asociado a la colonización del sistema respiratorio en pacientes con fibrosis quística (FQ) o SIDA, así como en individuos que han recibido trasplantes de hígado o pulmón (Idigoras *et al.*, 2001).

En cuanto a *S. apiospermum*, éste está asociado principalmente a cuadros clínicos de pacientes que han sufrido síndrome de casi ahogamiento, tras el cual sufren abscesos cerebrales, así como micetomas eumicóticos (Guarro *et al.*, 2006). El papel de esta especie es especialmente relevante en pacientes con FQ, puesto que se ha descrito como el principal hongo patógeno dentro del género (Sedlacek *et al.*, 2015).

Finalmente, *S. aurantiacum* presenta un mayor grado de virulencia que *S. apiospermum* (Gilgado *et al.*, 2009), en ocasiones comparable con la de *L. prolificans*, causando infecciones similares como otitis externa maligna, osteomielitis, sinusitis invasiva, queratitis y neumonía (Heath *et al.*, 2009). Cabe destacar que, a pesar de su alta virulencia, la mortalidad de los pacientes infectados depende en gran medida de la cepa (Harun *et al.*, 2010).

#### 1.4. TRATAMIENTO DE INFECCIONES FÚNGICAS

En lo que respecta al tratamiento de las infecciones causadas por las cepas previamente mencionadas con antifúngicos, se ha demostrado la eficacia del voriconazol frente a *Scedosporium*, especialmente frente a *S. aurantiacum*, mientras que *L. prolificans* resulta ser resistente (Sedlacek *et al.*, 2015). Igualmente, el hongo es resistente a otros triazoles, tales como el itraconazol o el posaconazol, a los cuales *S. apiospermum* y, en mayor medida, *S. aurantiacum* son más susceptibles (Araujo *et al.*, 2015). En cambio, antifúngicos como anfotericina B o terbinafina no tienen efectos sobre *Scedosporium* (Cortez *et al.*, 2008). No obstante, parece una adecuada estrategia el emplear combinaciones de antifúngicos ya que se ha demostrado que presentan un efecto sinérgico. Ejemplos de este tratamiento son la combinación de terbinafina con azoles y de micafungina con posaconazol o con anfotericina B (Lackner *et al.*, 2012; Yustes y Guarro, 2005).

No obstante, hay otra vía interesante para lograr mayor eficacia terapéutica: el estudio del sistema inmunitario. En efecto, éste juega un papel importante en la evolución de las enfermedades causadas por los géneros *Lomentospora* y *Scedosporium*. El control de la enfermedad en individuos inmunocompetentes sugiere que el sistema inmunitario es capaz de producir mecanismos de defensa contra ellos, incluyendo la respuesta inmune innata y la adaptativa.

Algunos estudios demuestran que es imprescindible recuperar el nivel normal de neutrófilos para superar la enfermedad, puesto que en caso de neutropenia el desenlace suele ser la muerte, a pesar del uso combinado de antifúngicos (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2009). Debido a ello, una opción interesante podría ser la administración de moduladores del sistema inmune como las citocinas, entre ellas GM-CSF e IFN- $\gamma$  (Blyth *et al.*, 2014), además de los antifúngicos.

Por otra parte, se han realizado otros estudios con tratamientos basados en inmunoterapia que resultan prometedores, tales como la transfusión de leucocitos o terapias inmunomoduladoras. Entre éstos se encuentra el uso de anticuerpos antifúngicos contra hongos patógenos, que administrados solos o en combinación con otros antifúngicos convencionales podrían constituir agentes para profilaxis en pacientes inmunodeficientes gracias a la inducción de fagocitosis o la activación del complemento (Casadevall y Pirofski, 2012). De esta forma, los estudios proteómicos como el que se expone en el presente trabajo resultan fundamentales para la identificación de los antígenos fúngicos más relevantes considerados como dianas terapéuticas para nuevos fármacos, desarrollar vacunas o producir anticuerpos específicos para inmunoterapia pasiva.

## 2. OBJETIVOS

La importancia que están tomando las especies emergentes de hongos patógenos *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*, junto con el alto grado de virulencia que presentan, hace imprescindible un estudio exhaustivo de sus respectivos inmunomas con objeto de identificar los antígenos más importantes de cada una de ellas. Estos antígenos pueden ser útiles como dianas terapéuticas o diagnósticas, constituyendo una herramienta básica para la búsqueda de métodos novedosos de diagnóstico rápido y fiable, así como para el desarrollo de tratamientos alternativos a los antifúngicos actualmente disponibles, los cuales resultan en muchas ocasiones ineficaces.

Durante los últimos años, el grupo de investigación “*Fungal and Bacterial Biomics Research Group*” del departamento donde se ha realizado el presente trabajo ha llevado a cabo el estudio de la respuesta humoral tanto de saliva como suero de individuos inmunocompetentes, principalmente con el género *Lomentospora*. Actualmente el grupo está interesado en el estudio de las especies filogenéticamente relacionadas.

A la vista de lo comentado, el presente trabajo tiene por objeto la caracterización antigénica de *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum* mediante el reconocimiento por sueros humanos.



La consecución de este objetivo principal lleva consigo tres objetivos parciales:

1. Estudiar el proteoma de las tres especies utilizadas en el trabajo.
2. Estudiar el inmunoma de cada una de las especies de hongos patógenos en función del volumen relativo de los antígenos reconocidos por las IgG.
3. Realizar un estudio comparativo de los proteomas e inmunomas de las tres especies.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. CEPA Y CONDICIONES DE CULTIVO**

Para la caracterización antigénica objeto de estudio se utilizó la cepa CECT20842 de *Lomentospora prolificans* procedente de un paciente con infección diseminada del Hospital Marqués de Valdecilla (Santander, España), la cepa 93-251 de *Scedosporium apiospermum* y la cepa 116910 de *Scedosporium aurantiacum*. Todas ellas se criopreservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se subcultivaron en agar patata dextrosa (Pronadisa, Madrid, España) a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2. COLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUEROS**

Los sueros se obtuvieron de donaciones de sangre de 10 individuos voluntarios inmunocompetentes (5 mujeres y 5 hombres) de entre 24 y 50 años, nacidos y residentes en el País Vasco. Tras la extracción de sangre, las muestras se coagularon y centrifugaron en tubos de vidrio de 5 mL (Vacutainer; BD Biosciences, Madrid, España), obteniendo así los sueros limpios. Con ellos se realizaron los *pools*, tomando 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra de suero en concentración 1/100 en tampón TBS con 5% leche y 0,1% Tween 20. A continuación se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Todos los procedimientos y métodos para la obtención de sueros y su manipulación, fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad del País Vasco (CEIAB/132/2012/HERNANDOECHEVARRÍA y CEISH/131/2012/HERNANDOECHEVARRÍA).

### 3.3. OBTENCIÓN DE HIFAS

Las tres especies de hongos se cultivaron durante siete días en placas de agar patata dextrosa a 37°C. Se llevaron a cabo tres réplicas de cada experimento, por lo que se hicieron tres cultivos distintos de cada hongo.

Para cosechar las hifas se lavaron las placas con solución salina estéril (0,9% (p/v) NaCl), una única vez para *L. prolificans* y dos veces para *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*, haciendo uso de un asa de siembra estéril y desechable. Después se realizó una filtración a través de una jeringa con gasas para separar los conidios de las hifas y se ajustó la concentración a  $10^7$  conidiosporas/mL utilizando un hemocitómetro. Se centrifugó a 11.419 g durante 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante para obtener la pastilla de conidios, que se resuspendió en 5 mL de solución salina y se inoculó en 150 mL de caldo patata dextrosa. Este volumen se incubó durante siete días en agitación (120 rpm) a 37°C, tiempo tras el cual se filtraron los medios por duplicado para separar las hifas de los conidios mediante una doble filtración. El filtrado corresponde con los conidios, y éstos se ajustaron a una concentración de  $10^8$  conidiosporas/mL y se inocularon en un volumen de 200 mL (por triplicado). Dicho volumen se incubó durante 9 horas en agitación (120 rpm) a 37°C, tras lo cual se centrifugó a 11.419 g durante 5 minutos a 4°C obteniendo así la pastilla de hifas.

### 3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de las proteínas presentes en las pastillas de hifas se realizó suspendiéndolas en 1 mL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, pH 7,4) y se añadieron a tubos con bolas de vidrio (0,5 mm de diámetro). Se añadió, además, un 2% de anfólitos (GE Healthcare) y un 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Steinheib, Alemania). La ruptura de las pastillas se llevó a cabo en el homogenizador MillMix20 (Tehtnica, Eslovenia) durante 20 minutos a una frecuencia de 30 Hz. El homogenado se centrifugó a 14.100 g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares, obteniendo en el sobrenadante las proteínas de interés.

Dichas proteínas extraídas se precipitaron en 4 volúmenes de acetona, 10% (p/v) de ácido tricloroacético y 0,07% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol durante 1 hora a -20°C y

después, se centrifugaron durante 20 minutos a 14.100 g para obtener la pastilla de proteínas precipitadas. Éstas se lavaron con acetona, se resuspendieron en tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 20 mM Tris, 4% (p/v) CHAPS) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

### **3.5. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

La primera dimensión de la electroforesis bidimensional (2-DE) se realizó añadiendo al extracto de proteínas en tampón de rehidratación un 1% (v/v) de anfolitos y un 1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol. A continuación, se añadió 0,002% (p/v) de bromofenol azul obteniendo una disolución de 350  $\mu$ L de proteína, la cual se introdujo en los cofres de isoelectroenfoque para separar las proteínas por su punto isoeléctrico. Tras añadir la muestra se colocaron las tiras de isoelectroenfoque de 18 cm con gradiente de pH de 3 a 10 (Immobiline DryStrip, GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y se añadió 1 mL de vaselina para evitar la evaporación de la muestra. El sistema utilizado fue Ettan IPGphor (GE Healthcare) según el siguiente protocolo: 12 horas de rehidratación, 500 V a 2.000 Vhr, 1.000 V a 9.000 Vhr, 8000 V a 20.000 Vhr, 8.000 V a 100.000 Vhr y 8.000 V a 10.000 Vhr.

Tras el isoelectroenfoque es necesario reducir las proteínas, para lo cual se incubaron durante 15 minutos en tampón de equilibrado (6 M urea, 75 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25,5% (p/p) glicerol, 2% (p/v) SDS, 0,002% (p/v) bromofenol azul) con 1% (p/v) de ditiotreitól. A continuación, se realizó otra incubación de 15 minutos en tampón de equilibrado con 2,5% (p/v) de iodoacetamida.

Para la segunda dimensión de la electroforesis se utilizó el sistema PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad) a 45 mA con geles de acrilamida al 12,5% en condiciones de refrigeración. Como marcadores de pesos moleculares se utilizaron Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards (Bio-Rad).

### **3.6. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS RECONOCIDOS POR IgG DE SUEROS HUMANOS**

Después de la 2-DE se realizó la electrotransferencia de las proteínas de los geles de acrilamida a la membrana Hybond-P PVDF (GE Healthcare) en el sistema de

transferencia Nova Blot (Pharmacia Biotech, Suecia) a 150 mA durante 20 horas. Tras ello, se tiñeron las membranas para asegurar la correcta transferencia, utilizando la tinción de rojo Ponceau (0,2% (p/v) rojo Ponceau, 1% (v/v) ácido acético).

La detección de las proteínas inmunogénicas se realizó por Western blot con sueros humanos. Primero se bloquearon las membranas con tampón TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl), 5% leche en polvo y 0,1% Tween 20 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, se incubaron las membranas en sueros diluidos 1/100, en 50 mL de TBS, 5% leche y 0,1% Tween 20 a 4°C durante toda la noche. El exceso de anticuerpos se retiró realizando 4 lavados de 5 minutos de las membranas con TBS, para luego incubarlas con el anticuerpo secundario durante 30 minutos. El anticuerpo secundario utilizado es el anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1/10.000 en tampón TBS con 5% de leche y 0,1% Tween 20. A continuación, se realizaron otros 4 lavados de 5 minutos con TBS. Las proteínas inmunogénicas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) en el sistema G: BOXChemi (Syngene, Cambridge, Reino Unido). Finalmente, las membranas de Western blot se analizaron con el software ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE Healthcare) para detectar y cuantificar la intensidad de los antígenos reconocidos.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOREACTIVAS FRENTE A MUESTRAS DE SUEROS**

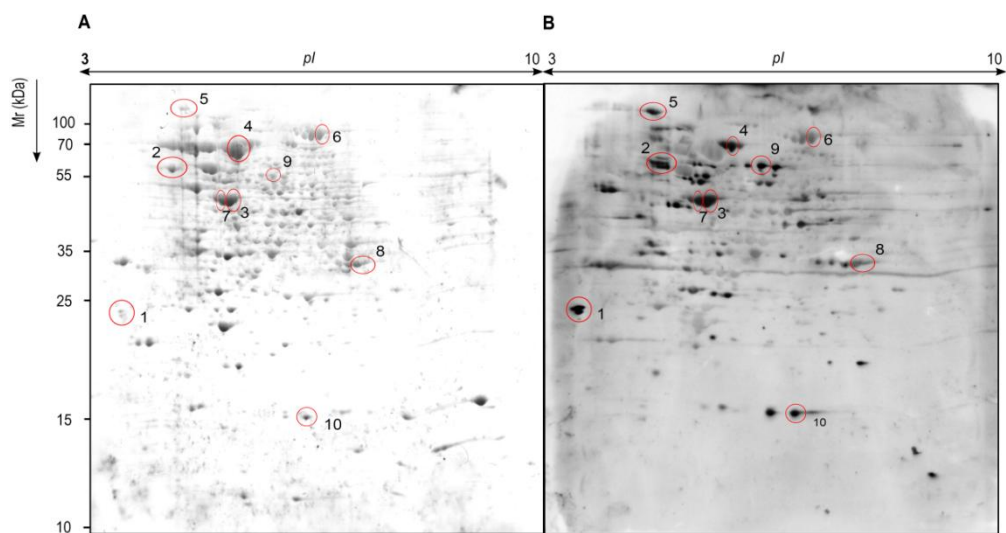
El proteoma de los hongos patógenos estudiados se resolvió por triplicado mediante 2-DE y electrotransferencia para detectar los antígenos reconocidos por IgG de sueros humanos de personas inmunocompetentes mediante Western blot. Se obtuvieron las imágenes de quimioluminiscencia y se analizaron las proteínas inmunogénicas estimando su punto isoeléctrico (*pI*) y peso molecular (*Mr*) mediante el análisis bioinformático de las imágenes. Además, se calcularon los valores de volumen relativo como medida de la capacidad antigénica.

#### 4.1.1. Detección de antígenos de *Lomentospora prolificans*

El proteoma de *L. prolificans* presenta 254 proteínas en todo el rango de  $pI$  y peso molecular, de las cuales un total de 224 son reconocidas por IgG de sueros de individuos inmunocompetentes. El área con mayor número de puntos y más intensos se encuentra entre 3,5 y 8 de  $pI$  y entre 13,8 y 106,6 kDa de peso molecular.

En cuanto al inmunoma, se realizó un estudio con 90 puntos que resultaron ser los que presentan mayor reacción con IgG en función del volumen relativo de cada punto, valor que tiene en cuenta área e intensidad. De entre esos puntos se seleccionaron los 10 más voluminosos. Éstos pueden apreciarse en la **Figura 2** señalados en la membrana (**Figura 2A**) y en el Western blot (**Figura 2B**).

Los datos de volumen relativo,  $pI$  y peso molecular de los antígenos más intensamente reconocidos se presentan en la **Tabla 2**. Entre ellos, hay 6 que se habían identificado previamente por el grupo de investigación mediante espectrometría de masas.



**Figura 2.** Análisis bidimensional del proteoma (A) e inmunoma (B) de *Lomentospora prolificans*. Los 10 puntos de mayor volumen relativo y, en consecuencia, más intensamente reconocidos por las IgG están marcados con un círculo rojo, numerados en orden de volumen relativo, tanto en la membrana (A) como en el Western blot (B). En el margen izquierdo se muestra el peso molecular y en el superior el punto isoeléctrico.

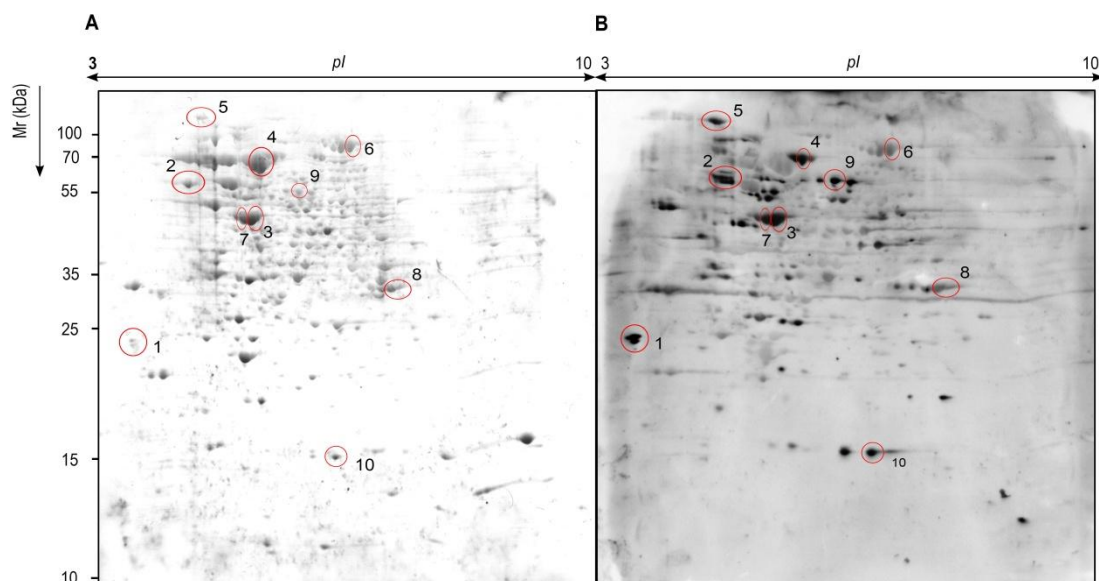
**Tabla 2. Datos relativos a los puntos más voluminosos reconocidos en el inmunoma de *Lomentospora prolificans*.** Los puntos están ordenados en función del volumen relativo y se presentan el punto isoeléctrico, peso molecular (kDa), intensidad, área, volumen y volumen relativo de cada proteína. Asimismo, se nombran las proteínas que están identificadas, donde Hsp hace referencia a proteína de shock térmico.

Nº punto	Proteína	pI	Mr (kDa)	Intensidad	Área	Volumen	%Volumen
1	-	5,25	13,81	165	138,51	16722	5,25
2	Hsp90	5,13	64,10	88	176,72	13510	4,24
3	-	3,57	106,66	120	128,34	11024	3,46
4	Subunidad $\beta$ de la ATP sintasa putativa	4,82	32,39	107	176,87	10897	3,42
5	-	6,18	26,35	92	164,46	10098	3,17
6	Subunidad $\beta$ de la ATPasa mitocondrial	5,32	36,74	96	161,01	9647	3,03
7	Subunidad $\beta$ de la proteína G	7,98	24,54	108	116,06	7988	2,51
8	Subunidad $\alpha$ de la ATP sintasa	4,38	36,74	89	136,44	7602	2,39
9	-	3,49	66,35	88	112,07	7205	2,26
10	Hsp70	5,32	72,43	100	96,82	6920	2,17

#### 4.1.2. Detección de antígenos de *Scedosporium apiospermum*

El proteoma de *S. apiospermum* presenta 649 puntos, tal y como se muestra en la **Figura 3 A**. Un total de 232 puntos son reconocidos como antígenos por las IgG de sueros humanos, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo de todo el rango de pI y pesos moleculares de la membrana (**Figura 3 B**). La zona más reactiva se encuentra en un rango de pI de entre 3,8 y 7,6 y peso molecular de entre 15,7 y 124,4 kDa.

En la **Figura 3** se señalan los 10 puntos que se reconocieron con mayor intensidad por las IgG del *pool* de sueros utilizados, y sus datos de intensidad, pI y peso molecular, entre otros, se indican en la **Tabla 3**.



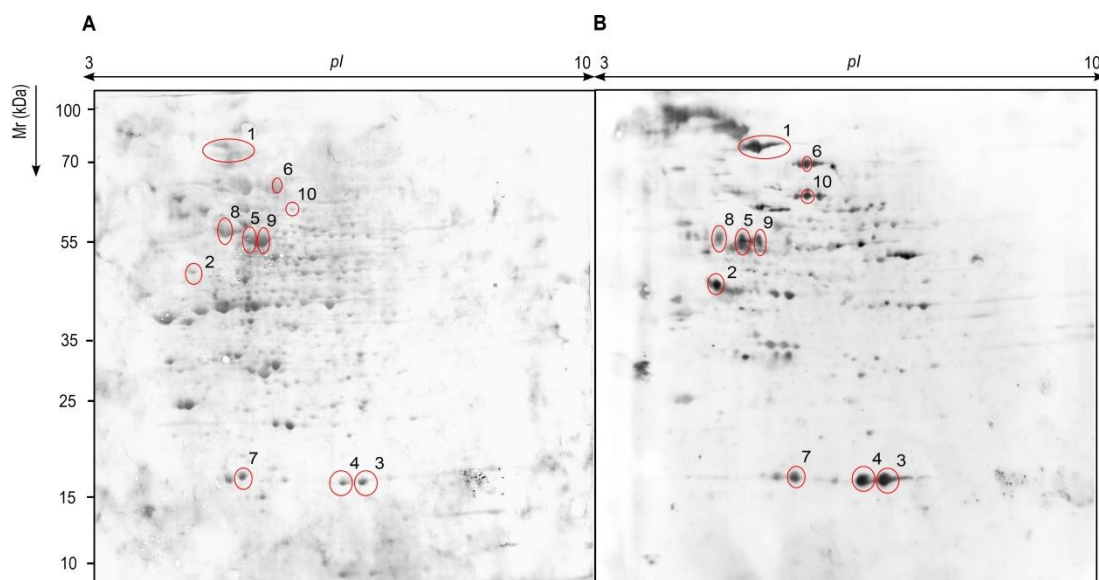
**Figura 3.** Análisis bidimensional del proteoma (A) e inmunoma (B) de *Scedosporium apiospermum*. Los 10 puntos de mayor volumen relativo y, en consecuencia, más intensamente reconocidos por las IgG, están marcados con un círculo rojo y numerados en orden de volumen relativo, tanto en la membrana (A) como en el Western blot (B). En el margen izquierdo se muestra el peso molecular y en el superior el punto isoeléctrico.

**Tabla 3.** Datos relativos a los puntos más voluminosos reconocidos en el inmunoma de *Scedosporium apiospermum*. Los puntos están ordenados en función del volumen relativo y se presentan el punto isoeléctrico, peso molecular (kDa), intensidad, área, volumen y volumen relativo de cada proteína.

Nº punto	pI	Mr (kDa)	Intensidad	Área	Volumen	%Volumen
1	3,78	24,14	159	120,5	16301	3,80
2	4,92	59,60	130	152,7	14988	3,49
3	5,59	47,62	103	154,6	13144	3,06
4	5,91	67,66	132	98,1	9676	2,26
5	4,81	124,42	147	104,4	9010	2,10
6	7,01	74,18	98	126,7	8002	1,87
7	5,45	47,62	122	75,6	7953	1,85
8	7,64	32,23	94	128,3	7526	1,75
9	6,31	59,60	141	61,0	7060	1,65
10	6,77	15,69	140	71,5	6974	1,63

#### 4.1.3. Detección de antígenos de *Scedosporium aurantiacum*

*S. aurantiacum* presenta un proteoma con 536 proteínas y es el hongo que más proteínas inmunoreactivas presenta, en concreto 286. En este caso, la zona más reactiva del inmunoma se encuentra en la misma zona que en *S. apiospermum*, perteneciente al mismo género. Este hecho se refleja en la **Figura 4**, en la cual se señalan los 10 puntos de mayor volumen relativo que son reconocidos por las IgG y que se encuentran en el rango de *pI* de entre 4,6 y 7 y peso molecular de entre 16,3 y 88 kDa. Los datos relativos a dichos puntos se presentan en la **Tabla 4**.



**Figura 4.** Análisis bidimensional del proteoma (A) e inmunoma (B) de *Scedosporium aurantiacum*. Los 10 puntos de mayor volumen relativo y, en consecuencia, más intensamente reconocidos por las IgG están marcados con un círculo rojo y numerados en orden de volumen relativo, tanto en la membrana (A) como en el Western blot (B). En el margen izquierdo se muestra el peso molecular y en el superior el punto isoelectrico.



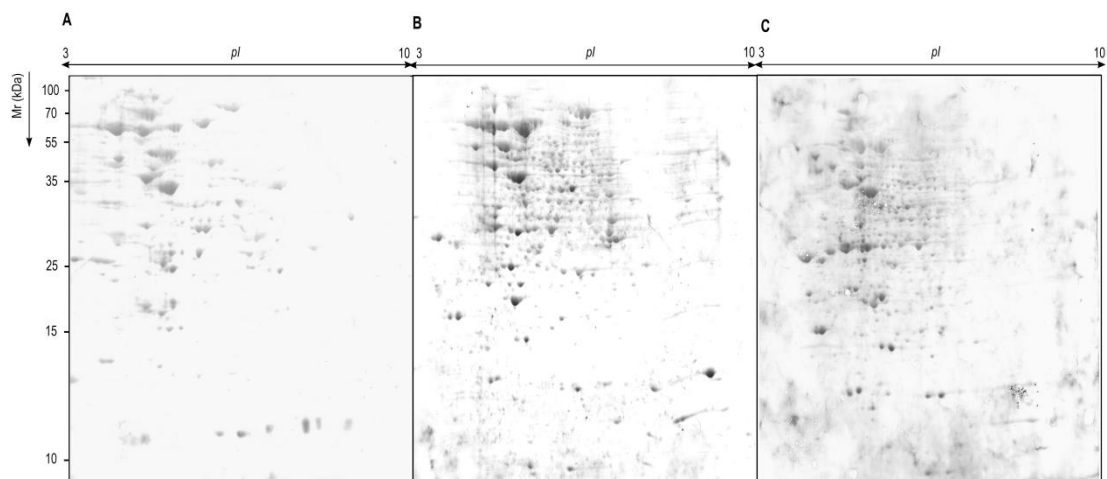
**Tabla 4. Datos relativos a los puntos más voluminosos reconocidos en el inmunoma de *Scedosporium aurantiacum*.** Los puntos están ordenados en función del volumen relativo y se presentan el punto isoeléctrico, peso molecular (kDa), intensidad, área, volumen y volumen relativo de cada proteína.

Nº punto	pI	Mr (kDa)	Intensidad	Área	Volumen	%Volumen
1	5,16	88,02	190	313,5	37670	5,48
2	4,65	44,99	188	306,8	25958	3,78
3	6,89	16,39	165	257,3	25634	3,73
4	6,55	16,31	167	198,0	19855	2,89
5	4,93	56,55	160	107,6	11202	1,63
6	5,80	80,99	162	87,0	9429	1,37
7	5,64	16,55	140	139,2	9205	1,34
8	4,63	56,89	110	143,2	7956	1,16
9	5,17	56,34	142	88,3	7844	1,14
10	5,81	69,58	163	70,5	7487	1,08

#### 4.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PATRÓN DE PROTEÍNAS INMUNOREACTIVAS

Para proceder a un estudio comparativo con el fin de localizar los antígenos más relevantes comunes para las tres especies fúngicas se llevó a cabo el análisis de las tres réplicas de proteomas e inmunomas de *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*.

En primer lugar, se analizaron los proteomas de las tres especies para establecer el patrón mostrado por cada una de ellas (**Figura 5**). Las diferencias son evidentes, lo cual deja poco lugar para una comparación directa y, por tanto, para encontrar coincidencias. A pesar de ello, se puede afirmar que *L. prolificans* es la especie que menor número de puntos presenta (254), mientras que *S. apiospermum* y *S. aurantiacum* tienen un número mayor, 649 y 536, respectivamente, tal y como se ha mencionado anteriormente.



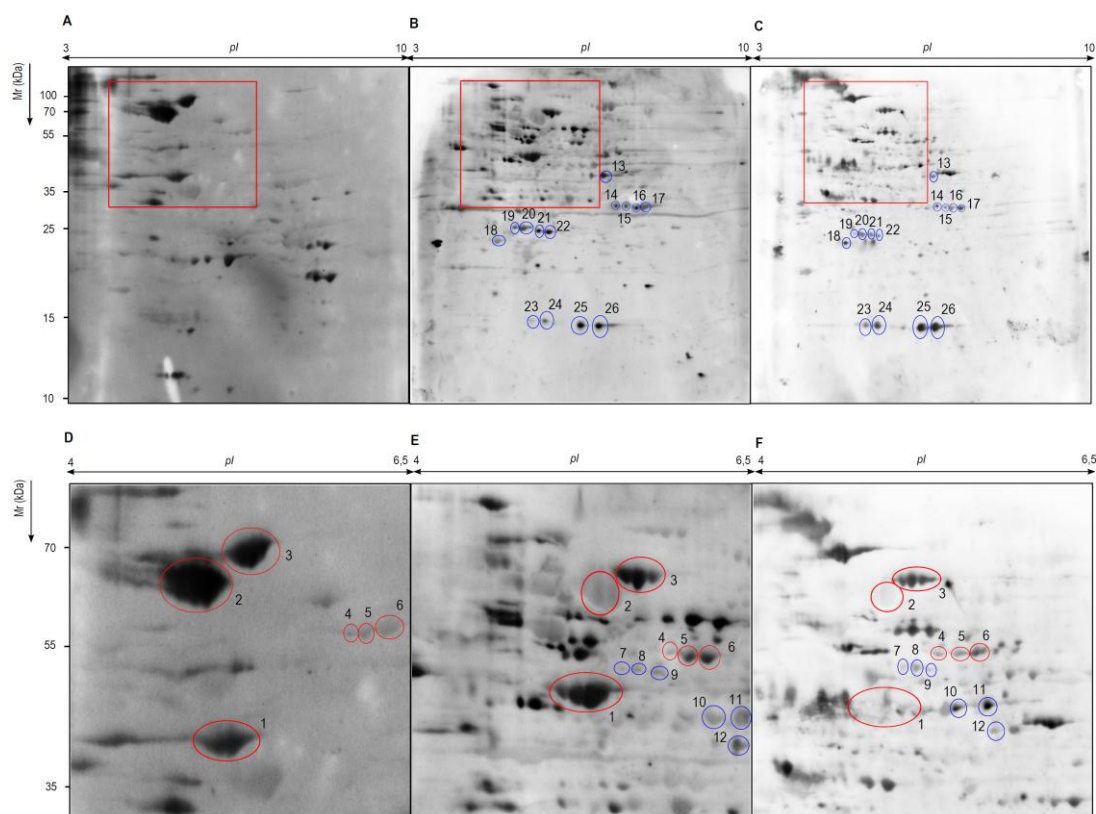
**Figura 5.** Proteomas de *Lomentospora prolificans* (A), *Scedosporium apiospermum* (B) y *Scedosporium aurantiacum* (C). En el margen izquierdo se muestra el peso molecular y en el superior el punto isoeléctrico.

En segundo lugar, se estudiaron los inmunomas de las tres especies. A pesar de las grandes diferencias entre ellos, se observó que aparecían varias proteínas que seguían el mismo patrón en todas las especies, principalmente en la zona ácida y de elevado peso molecular (**Figura 6**).

Se determinaron 26 antígenos como comunes a las tres especies. Tres de ellos, los puntos 1, 2 y 3, habían sido previamente identificados por el grupo de investigación por su alta prevalencia, y se corresponden con las proteínas subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial, Hsp90 y Hsp70, respectivamente.

Las dos especies del género *Scedosporium* estudiadas tienen un inmunoma más similar entre ellas y, en consecuencia, más antígenos en común además de los compartidos por las tres especies. Estos antígenos se encuentran tanto en la zona en común con *Lomentospora* (puntos 7, 8, 9, 10, 11 y 12), como fuera de la misma (puntos 13 a 26).

La zona común a las tres especies resulta ser la zona más reactiva de los inmunomas de *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*. Los datos relativos a los puntos comunes a las tres especies se indican en la **Tabla 5** y los datos relativos a los puntos compartidos por las especies del género *Scedosporium* se indican en la **Tabla 1** del **Anexo I**.



**Figura 6.** Inmunoma de *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium apiospermum* y *Scedosporium aurantiacum*. Se muestra el inmunoma y se encuadra la zona en la que se centró el estudio comparativo de *L. prolificans* (A, D), *S. apiospermum* (B, E) y *S. aurantiacum* (C, F). Los puntos comunes para las tres especies aparecen marcados con un círculo rojo y los comunes para los géneros de *Scedosporium* con un círculo azul. En el margen izquierdo se muestra el peso molecular y en el superior el punto isoeléctrico.

**Tabla 5.** Datos relativos a los puntos compartidos por *Lomentospora prolificans* y los dos géneros de *Scedosporium* estudiados. Punto isoeléctrico y peso molecular (kDa) de los puntos reconocidos por IgG de sueros humanos en las tres especies. Los números de los puntos se corresponden con los de la Figura 6.

Nº punto	<i>L. prolificans</i>		<i>S. apiospermum</i>		<i>S. aurantiacum</i>	
	pI	Mr (kDa)	pI	Mr (kDa)	pI	Mr (kDa)
1	5,25	36,54	5,50	47,89	5,35	42,59
2	4,97	64,71	5,62	65,90	5,56	77,93
3	5,41	73,82	5,88	68,08	5,82	80,99
4	6,20	56,39	6,13	54,08	6,06	64,80
5	6,33	56,49	6,29	53,17	6,27	64,80
6	6,49	57,37	6,41	53,02	6,41	65,04

Para seguir con esta línea de trabajo sería interesante la identificación de todos los antígenos compartidos entre especies mediante espectrometría de masas para poder confirmar los resultados obtenidos por el análisis de imagen realizado. Debido al limitado tiempo no se ha realizado, pero será llevado a cabo en los próximos meses.

## 5. DISCUSIÓN

Los hongos filamentosos *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum* son patógenos emergentes que, pese a su baja prevalencia, presentan una gran relevancia clínica, ya que causan enfermedades diseminadas, muy agresivas y con una elevada mortalidad en pacientes inmunodeprimidos. Esta mortalidad está asociada principalmente a la resistencia intrínseca del hongo a los antifúngicos comúnmente utilizados, al estado clínico del paciente y a las actuales técnicas de diagnóstico. Es por ello que en los últimos años se han realizado estudios centrados en la caracterización de nuevos biomarcadores que podrían ser útiles como dianas terapéuticas o diagnósticas (Mina *et al.*, 2015). Asimismo, las técnicas inmunoproteómicas han permitido el estudio de proteínas que intervienen en la interacción patógeno-hospedador, tales como antígenos o adhesinas (Doyle, 2011; Kniemeyer, 2011).

El estudio ambiental de estos hongos indica que se encuentran ampliamente distribuidos en lugares humanizados, por lo que es de esperar que el contacto con el ser humano sea habitual. Así, tras la inhalación de conidios, en las mucosas de las personas inmunocompetentes se desarrolla una respuesta inmune capaz de evitar la germinación de las hifas y, por lo tanto, enfermar por dicho hongo. Esto parece indicar que el sistema inmunitario de estos individuos ejerce un papel protector eficaz. Teniendo en cuenta esto, el principal objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la respuesta humoral de individuos inmunocompetentes frente a estos hongos. Para tal efecto se ha profundizado en el estudio del reconocimiento antigénico de hifas por las IgG de sueros mediante técnicas proteómicas, caracterizando e identificando los principales antígenos.

El análisis de los resultados revela el gran número de proteínas que reaccionan con IgG de pacientes sanos en los tres hongos estudiados. Esto pone de manifiesto la alta

respuesta humoral existente frente a estos patógenos, siendo *S. aurantiacum* el que mayor número de proteínas reconocidas mostró, mientras que *L. prolificans* fue el que menos.

Estudios realizados con anterioridad por Pellon *et al.* (2014; 2016) han mostrado la existencia de una importante respuesta humoral en personas inmunocompetentes frente a *L. prolificans*. Con este trabajo se corroboran dichos estudios y se comprueba que existe además una respuesta humoral frente a los dos hongos con mayor relevancia clínica del género *Scedosporium*. De esta manera, los individuos de los cuales proceden los sueros empleados habrían podido desarrollar un mayor número de anticuerpos frente a los antígenos de los hongos más frecuentes en su entorno, pudiendo ofrecer protección frente a varias especies mediante la reactividad cruzada de sus antígenos más conservados.

Con respecto al estudio del inmunoma de *L. prolificans*, entre los 10 puntos antigénicos que mostraron mayor volumen relativo, se encontraron 6 que habían sido identificados previamente por el grupo de investigación por ser proteínas altamente prevalentes, habiéndose descrito que más del 70% de las personas inmunocompetentes poseen anticuerpos frente a ellas. Entre esas proteínas se encuentran la Heat shock protein 90 (Hsp90), Heat shock protein 70 (Hsp70), subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa putativa, subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial, subunidad  $\beta$  de la proteína G y subunidad  $\alpha$  de la ATP sintasa.

En cuanto a los estudios comparativos entre los inmunomas de los tres hongos, se encontraron 26 antígenos únicamente compartidos entre las dos especies de *Scedosporium* estudiadas, mientras que la distribución de *Lomentospora* varía en mayor grado, lo cual era de esperar ya que recientemente se categorizó dentro de otro género (Lackner *et al.*, 2014). A pesar estas notables diferencias, se detectó una zona del inmunoma que repetía su patrón en las tres especies. Se trata de la zona ácida correspondiente a un pI de entre 4,9 y 6,5 y un peso molecular de entre 36,5 y 73,8 kDa. En ella se encontraron 6 proteínas comunes, entre las que se encuentran la Hsp70, Hsp90 y la subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial.

Teniendo en cuenta que estos antígenos identificados son ampliamente conservados entre hongos patógenos, estos resultados sugieren que podría existir una reactividad

cruzada entre especies, de forma que la respuesta inmune detectada podría no ser específica frente a los hongos estudiados.

De todas las proteínas previamente citadas, la Hsp70 merece especial atención. Se trata de un antígeno seroprevalente tanto en conidios como en hifas, siendo en el primer caso reconocido por el 100% de las muestras de individuos sanos y en el segundo caso por el 70%. Además, es reconocida tanto por saliva como por suero de individuos inmunocompetentes. Esto la hace especialmente relevante para el desarrollo de terapias profilácticas como las vacunas, ya que con el uso de estos antígenos los pacientes podrían desarrollar anticuerpos antifúngicos para protegerse frente a *L. prolificans* a diferentes niveles. Finalmente, el grupo de investigación ha demostrado que esta proteína es sobreexpresada por el hongo en presencia de voriconazol, lo que puede estar relacionado con su resistencia (resultados todavía no publicados).

La Hsp70 es una chaperona dependiente de ATP presente en organismos procariotas y eucariotas con la función de mantener la estructura de las proteínas en condiciones de estrés ambiental, proporcionando termotolerancia a las células (Mogk *et al.*, 2015). Además, las proteínas de choque térmico se han descrito como antígenos en otros hongos como *Candida albicans* (Eroles *et al.*, 1997), *Aspergillus fumigatus* (Asif *et al.*, 2010), *Histoplasma capsulatum* (Deepe y Gibbons, 2002) y *Cryptococcus neoformans* (Kakeya *et al.*, 1997). Asimismo, se han realizado estudios con proteínas de su misma familia como dianas terapéuticas, entre las que se encuentra la Hsp60 de *Histoplasma capsulatum* contra la que se generaron anticuerpos monoclonales prolongando la vida de los ratones infectados por este hongo (Guimarães *et al.*, 2009). Así, se podría seguir esta línea de investigación para desarrollar fármacos frente a Hsp70.

Con todo ello, la realización de este trabajo ha permitido la identificación de antígenos reconocidos por anticuerpos de sueros de individuos sanos frente a *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*. Esta investigación es un paso más en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y de tratamiento eficaces contra las infecciones producidas por estos hongos. Es importante la persistencia en esta línea de investigación debido fundamentalmente a la resistencia intrínseca a los

antifúngicos que presenta *L. prolificans* haciendo que los tratamientos habituales fracasen en numerosas ocasiones.

Por tanto, el estudio del reconocimiento antigénico puede proporcionar el desarrollo de técnicas serológicas específicas y de anticuerpos monoclonales antifúngicos que combinados con los tratamientos actualmente disponibles pueden suponer una terapia eficaz contra este hongo patógeno tan resistente a los antifúngicos actualmente disponibles. Por otro lado, estos antígenos podrían ser utilizados para el diseño de vacunas específicas frente a un hongo o, en caso de confirmarse la reactividad cruzada, frente a varias especies fúngicas simultáneamente.

## **6. CONCLUSIONES**

Mediante el estudio inmunoproteómico desarrollado en este trabajo se ha comprobado la existencia de una elevada respuesta humoral por parte de individuos inmunocompetentes frente a las hifas de los hongos patógenos *L. prolificans*, *S. apiospermum* y *S. aurantiacum*. Las diferencias tanto en el proteoma como en el inmunoma de estos géneros han quedado evidenciados, de acuerdo a las diferencias filogenéticas entre ellos. Pese a ello, se ha observado la existencia de varios antígenos reconocidos por la IgG sérica que se repiten en las tres especies objeto de estudio. Esto hace pensar en una posible reactividad cruzada entre estos antígenos.

A la vista de lo expuesto, este estudio supone un claro avance para el desarrollo de técnicas diagnósticas y de tratamiento novedosas y eficaces contra las infecciones fúngicas causadas por estos hongos multirresistentes. En caso de que se demuestre la reactividad cruzada, podrían diseñarse fármacos contra las tres especies estudiadas, lo cual es relevante debido a la resistencia que presentan estos hongos frente a los agentes antifúngicos actualmente disponibles.

La continuidad de esta línea de investigación será la identificación y caracterización de todos los antígenos comunes a las tres especies fúngicas para poder ser utilizados como dianas terapéuticas o para producir vacunas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E., Pelaez, T., Pemán, J., Zapico, S., Alvarez, M., Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., FILPOP StudyGrp. 2013. Population Based Survey of Filamentous Fungi and Antifungal Resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob. Agents. Chemother.* 57: 3380–4604.

Araujo, R., Oliveira, M., Amorim, A., Sampaio-Maia, B. 2015. Unpredictable susceptibility of emerging clinical moulds to tri-azoles: review of the literature and upcoming challenges for mould identification. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 1289–1301.

Asif, A.R., Oellerich, M., Amstrong, V.W., Gross, U., Reichard, U. 2010. Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. *Electrophoresis.* 31: 1947–1958

Blyth, C.C., Gilroy, N.M., Guy, S.D., Chambers, S.T., Cheong, E.Y., Gottlieb, T., McGuinness, S.L., Thursky, K.A. 2014. Consensus guidelines for the treatment of invasive mould infections in haematological malignancy and haemopoietic stem cell transplantation. *Intern. Med. J.* 44: 1333–1349.

Casadevall, A., Pirofski, L.A. 2012. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe.* 11: 447–456.

Cortez, K.J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., Buchanan, W., Milanovich, J., Sutton, D.A., Fothergill, A., Rinaldi, M.G., Shea, Y.R., Zaoutis, T., Kottitil, S., Walsh, T. J. 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 157–197.

Deepe, G. S. Jr, Gibbons, R.S. 2002. Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 70: 3759–3767.

Doyle, S. 2011. Fungal proteomics: from identification to function. *FEMS Microbiol. Lett.* 321: 1–9.



- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V., Sentandreu, R. 1997. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology*. 143: 313–320.
- Fernandez Guerrero, M.L., Askari, E., Prieto, E., Gadea, I., and Román, A. 2011. Emerging infectious endocarditis due to *Scedosporium prolificans*: a model of therapeutic complexity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 1321–1324.
- Gilgado, F., Cano, J., Gené, J., Guarro, J. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4930–4942.
- Gilgado, F., Cano, J., Gené, J., Serena, C., Guarro, J. 2009. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med. Mycol.* 47: 371–374
- Guarro, J., Kantarcioglu, A.S., Horré, R., Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca Estrella, M., Berenguer, J., de Hoog, G.S. 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* 44: 295–327.
- Guého, E., de Hoog, G.S. 1991. Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J. Mycol. Méd.* 1: 3–9.
- Guimarães, A.J., Frases, S., Gomez, F.J., Zancopé-Oliveira, R.M., Nosanchuk, J.D. 2009. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 77: 1357–1367.
- Hawksworth, D.L. 2011. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus.* 2: 155–162
- Harun, A., Serena, C., Gilgado, F., Chen, S.C., Meyer, W. 2010. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med. Mycol.* 48: S45–S51.
- Heath, C.H., Slavin, M.A., Sorrell, T.C., Handke, R., Harun, A., Phillips, M., Nguyen, Q., Delhaes, L., Ellis, D., Meyer, W., Chen, S.C.A., Australian *Scedosporium* Study Group. 2009. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 689–693.

- Hennebert, G.L., Desai, B.G. 1974. *Lomentospora prolificans*, a new hyphomycete from greenhouse soil. Mycotaxon. 1: 45–50.
- Idigoras, P., Pérez-Trallero, E., Piñeiro, L., Larruskain, J., López-Lopategui, M.C., Rodríguez, N., González, J.M. 2001. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990–1999. Clin. Infect. Dis. 32: 158–165.
- Takeya, H., Udono, H., Ikuno, N., Yamamoto, Y., Mitsutake, K., Miyazaki, T., Tomono, K., Koga, H., Tashiro, T., Nakayama, E., Kohno, S. 1997. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. Infect. Immun. 65: 1653–1658
- Kaltseis, J., Rainer, J., De Hoog, G.S. 2009. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. Med. Mycol. 47: 398–405.
- Kantarcioglu, A.S., Guarro, J., and Hoog, G.S. De. 2008. Central nervous system infections by members of the *Pseudallescheria boydii* species complex in healthy and immunocompromised hosts: Epidemiology, clinical characteristics and outcome. Mycoses 51: 275–290.
- Kniemeyer, O. 2011. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. Proteomics.11: 3232–43.
- Lackner, M., de Hoog, G.S., Verweij, P.E., Najafzadeh, M.J., Curfs-Breuker, I., Klaassen, C.H., Meis, J.F. 2012. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. Antimicrob. Agents. Chemother. 56: 2635–2642.
- Lackner, M., de Hoog, G.S., Yang, L., Moreno, L.F., Ahmed, S.A. et al. 2014. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. Fungal Divers. 67: 1–10.
- Malloch, D., Salkin, I.F. 1984. A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans. Mycotaxon. 21: 247–255.

- Marco de Lucas, E., Sádaba, P., Lastra García-Barón, P., Ruiz Delgado, M.L., Cuevas, J., Salesa, R., et al. 2006. Cerebral scedosporiosis: An emerging fungal infection in severe neutropenic patients. *Eur. Radiol.* 16: 496–502.
- Mina, S., Marot-Leblond, A., Cimon, B., Fleury, M.J., Larcher, G., Bouchara, J.P., Robert, R. 2015. Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 22: 37–45.
- Mogk, A., Kummer, E., Bukau, B. 2015. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front. Mol. Biosci.* 2: 22.
- Pellon, A., Ramirez-Garcia, A., Antoran, A., Fernandez-Molina, J.V., Abad-Diaz-deCerio, A., Montañez, D., Sevilla, M.J., Rementeria, A., Hernando, F.L. 2014. *Scedosporium prolificans* immunomes against human salivary immunoglobulin A. *Fungal Biol.* 118: 94–105.
- Pellon, A., Ramirez-Garcia, A., Buldain, I., Antoran, A., Rementeria, A., Hernando, F.L. 2016. Immunoproteomics-based analysis of the immunocompetent serological response to *Lomentospora prolificans*. *J. Proteome Res.* 15: 595–607.
- Rodriguez-Tudela, J.L., Berenguer, J., Guarro, J., Kantarcioglu, A.S., Horre, R., de Hoog, G.S., Cuenca-Estrella, M. 2009. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med. Mycol.* 47: 359–370.
- Sedlacek, L., Graf, B., Schwarz, C., Albert, F., Peter, S., Würstl, B., Wagner, S., Klotz, M., Becker, A., Haase, G., Laniado, G., Kahl, B., Suerbaum, S., Seibold, M., Tintelnot, K. 2015. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J. Cyst. Fibros.* 14: 237–241.
- Yustes, C., Guarro, J. 2005. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49: 3498–3500.

# **ANEXO I**

**Tabla 1. Datos relativos a los puntos compartidos por *Scedosporium apiospermum* y *Scedosporium aurantiacum*.** Punto isoeléctrico y peso molecular (kDa) de los puntos reconocidos por IgG de sueros humanos en las dos especies de *Scedosporium* estudiadas. Los números de los puntos se corresponden con los de la Figura 6.

Nº punto	<i>S. apiospermum</i>		<i>S. aurantiacum</i>	
	pI	Mr (kDa)	pI	Mr (kDa)
7	5,79	51,54	5,72	62,12
8	5,89	51,39	5,84	62,04
9	6,05	50,96	5,96	61,75
10	6,46	44,57	6,23	54,86
11	6,68	44,81	6,53	55,33
12	6,64	41,46	6,60	51,13
13	6,84	41,52	6,78	51,26
14	7,09	32,74	6,88	41,46
15	7,27	32,58	7,05	40,99
16	7,47	32,17	7,18	40,74
17	7,64	32,22	7,36	40,79
18	4,89	24,42	4,98	31,30
19	5,22	27,15	5,17	33,80
20	5,35	26,97	5,31	33,60
21	5,65	26,30	5,51	33,51
22	5,85	26,13	5,67	33,17
23	5,52	16,12	5,41	16,60
24	5,77	16,09	5,64	16,54
25	6,43	15,72	6,55	16,31
26	6,77	15,69	6,89	16,39