

Estudio del papel de las ferroxidasas en la virulencia del hongo *Mucor circinelloides*

M. I. Navarro-Mendoza¹, A. López-Muñoz², M. A. Hernández-Oñate⁴, A. Herrera-Estrella³, V. Mulero², S. Torres-Martínez¹, R. M. Ruiz-Vázquez¹, V. Garre¹, F. E. Nicolás¹

¹ Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia, España, mariaisabel.navarro3@um.es

² Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad de Murcia, España

³ Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV-IPN, Irapurato, México

⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México

La mucormicosis es una infección fúngica emergente producida por distintas especies del orden Mucorales (Roden *et al.*, 2005). Los mucorales son hongos filamentosos saprófitos de distribución ubicua, pero algunas estirpes pueden comportarse como patógenos oportunistas que infectan a pacientes con patologías previas. Esta enfermedad suele afectar a pacientes inmunodeprimidos, aunque se han descrito casos de infecciones en pacientes inmunocompetentes (Bitar *et al.*, 2009; Neblett Fanfair *et al.*, 2012). Los factores de riesgo incluyen diabetes con cetoacidosis, tratamientos con corticosteroides, trasplantes de órganos y progenitores hematopoyéticos, neutropenias, traumas, quemaduras, cánceres hematológicos y tratamiento con deferoxamina (Ibrahim *et al.*, 2012). Actualmente sigue aumentando drásticamente el número de personas en riesgo de contraer la enfermedad, más aún cuando se ha observado un aumento de casos de mucormicosis en individuos sanos. No obstante, el aspecto más preocupante de la enfermedad es la alta tasa de mortalidad que presenta, con una tasa media general en torno al 50%, que se aproxima al 90% en el caso de infecciones diseminadas, neutropenias persistentes o infecciones cerebrales (Spellberg *et al.*, 2005; Ibrahim, 2011; Skiada *et al.*, 2011). Una de las razones que explican estas elevadas tasas de mortalidad es que los antifúngicos utilizados actualmente en clínica tienen una eficacia nula o muy reducida contra los mucorales. Por tanto, parece imprescindible desarrollar nuevos compuestos eficaces contra la mucormicosis, que podrían también ser útiles para combatir otras infecciones fúngicas. Varias especies de mucorales pueden producir mucormicosis, ocupando el primer lugar en incidencia las especies del género *Rhizopus*, seguidas por las especies del género *Mucor*, incluyendo *Mucor circinelloides* (Álvarez *et al.*, 2009). Se ha empleado *M. circinelloides* f. *lusitanicus* como modelo de mucormicosis, ya que, a diferencia de otros mucorales, dispone de numerosas herramientas genéticas y moleculares, entre las que se incluye la disponibilidad de su secuencia genómica, un método eficaz de transformación genética, la generación de mutantes por reemplazamiento génico y la supresión de la expresión génica mediante silenciamiento génico (RNAi).

Para el desarrollo de la mucormicosis *M. circinelloides* requiere un medio rico en hierro, evadir los mecanismos de defensa del organismo hospedador y acceder al sistema vascular para su diseminación. Para el desarrollo de nuevos fármacos capaces de controlar esta enfermedad es esencial la identificación de factores de virulencia, que incluyan rutas y procesos implicados en la capacidad de los hongos mucorales para producir mucormicosis. En estudios previos se han descrito algunos factores de virulencia de *M. circinelloides*, como son el dimorfismo en el tamaño de las esporas ligado al tipo

sexual (Li *et al.*, 2011), la transición de levadura a micelio filamentoso mediada por calcineurina (Lee *et al.*, 2013) y la adquisición de resistencia a antifúngicos a través del mecanismo de silenciamiento génico presente en *M. circinelloides* (Calo *et al.*, 2014). Uno de los factores de virulencia clave durante la patogénesis de los mucorales es la captación de hierro del suero del hospedador durante la infección. El hierro está presente en dos estados de ionización, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}), por lo que tiene la capacidad de aceptar y donar electrones y es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo celular, contribuyendo en numerosos procesos fisiológicos como cofactor. En mamíferos, el hierro está unido a proteínas transportadoras, como transferrina, ferritina y lactoferrina. Este secuestro es un mecanismo de defensa universal contra patógenos, siendo los pacientes más susceptibles aquellos que presentan altos niveles de hierro libre en sangre. En consecuencia, los organismos patógenos han desarrollado múltiples mecanismos para adquirir hierro del hospedador, ya que es un factor limitante de crecimiento. De todos los

mecanismos de adquisición de hierro identificados en hongos patógenos, el mecanismo reductivo es el más importante. Este sistema está formado por la acción consecutiva y coordinada de tres proteínas que catalizan la reducción y captación de hierro en dos pasos (**Figura 1**). En primer lugar, la reductasa de hierro de alta afinidad (Fre) reduce iones Fe^{3+} libres en plasma a Fe^{2+} . El Fe^{2+} generado es captado por un complejo proteico de la membrana plasmática formado por una multicobre oxidasa de hierro (Fet3) y una permeasa de hierro de alta afinidad (Ftr1) (Stearman *et al.*, 1996). Fet3 presenta actividad ferroxidasa, por lo que oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} permitiendo que este atraviese Ftr1 hacia el interior celular.

Actualmente, se está utilizando el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de infección de mucormicosis para caracterizar la virulencia de distintas estirpes del hongo (datos sin publicar).

A partir de estudios de transcriptómica comparada entre estirpes virulentas y avirulentas de *M. circinelloides* se han identificado genes con patrones diferenciales de expresión durante el proceso de infección de *D. rerio*. Estos genes están sobreexpresados o reprimidos durante la infección y podrían ser candidatos a participar en la patogénesis del hongo. Entre los genes inducidos en *M. circinelloides* en la patogénesis, tanto en estirpes virulentas como avirulentas, destacan algunos que codifican proteínas implicadas en el mecanismo reductivo de captación de hierro, lo que indica la importancia de este sistema

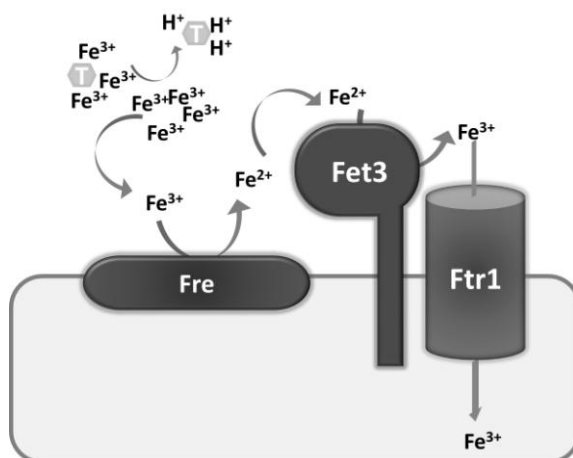


Figura 1. Esquema del sistema de captación reductivo de hierro en hongos patógenos. Fe^{3+} es liberado de la transferrina (T) por la acidificación del suero, y es reducido por una reductasa de membrana (Fre) hasta Fe^{2+} , que es captado por el complejo ferroxidasa/permeasa donde Fet3 oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} permitiendo su paso a través de Ftr1.

para el crecimiento del hongo y el desarrollo de la infección. En concreto, se ve inducida la expresión del gen que codifica Fet3a, una proteína que presenta una alta homología con la ferroxidasa Fet3 caracterizada en *S. cerevisiae*. Este trabajo parte de estos análisis de transcriptómica para validar y analizar el papel de las proteínas multicobre oxidasa con actividad ferroxidasa en la captación de hierro en *M. circinelloides*, describiendo su implicación en la patogénesis del hongo mediante la caracterización fenotípica de mutantes nulos y la realización de ensayos de virulencia empleando el modelo invertebrado de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*).

En primer lugar, se generó un mutante nulo para el gen de la ferroxidasa Fet3a, aunque no mostró alteración de la capacidad infectiva en los ensayos de virulencia realizados en larvas de *G. mellonella*. Estudios de homología y expresión génica permitieron identificar dos genes de *M. circinelloides* homólogos a *fet3a*, denominados *fet3b* y *fet3c*, que se expresan en condiciones de falta de hierro. Estos resultados indicaron un papel relevante de los tres genes en la captación de hierro, debido a la alta homología que hay entre ellos y a la inducción que presentan ante condiciones de baja concentración de hierro. Esto validó los resultados de transcriptómica comparada obtenidos de muestras del hongo durante la infección del pez cebra. La sobreexpresión de *fet3b* y *fet3c* explicaría la no disminución de la capacidad infectiva del mutante *fet3aΔ*, ya que estos dos genes podrían suplir la falta de función Fet3a de la estirpe.

Para validar los resultados observados en los análisis de expresión y comprobar el papel de los homólogos de *fet3a* con actividad ferroxidasa en la patogénesis de *M. circinelloides* se silenciaron mediante RNA de interferencia los genes *fet3b* y *fet3c* en el fondo genético *fet3aΔ*, obteniéndose estirpes que presentan falta de función para los tres genes. Para ello se utilizaron vectores de silenciamiento que activan el mecanismo de RNAi propio de *M. circinelloides* y se validó que los genes *fet3* no se estaban expresando en esa estirpe del hongo. En los ensayos de infección con *G. mellonella* la estirpe carente de proteínas con función ferroxidasa presentó una disminución significativa de su capacidad infectiva, siendo menos virulenta que el mutante nulo en *fet3a* y que una estirpe virulenta silvestre. Estos resultados confirmaron la implicación de los homólogos de *fet3a* en la captación de hierro y patogénesis de *M. circinelloides*, ya que al silenciar los genes *fet3b* y *fet3c* la capacidad de infección era significativamente menor.

En *M. circinelloides* es habitual la presencia de genes parálogos, ya que son frecuentes los eventos de duplicación de pequeñas porciones del genoma y las duplicaciones de genes individuales (Ocampo *et al.*, 2009). Esto explica la existencia de tres genes *fet3a*, *fet3b* y *fet3c* con alta homología entre ellos y funciones redundantes en el mecanismo de captación de hierro reductivo de *M. circinelloides*. Las proteínas multicobre oxidasa Fet3b y Fet3c, complementan la carencia de función en la estirpe *fet3aΔ*, por lo que no se observa un fenotipo menos virulento en los ensayos *in vivo*. Esto se ha validado con los ensayos de virulencia usando estirpes donde se ha silenciado la expresión de estos genes homólogos y se ha observado un descenso relevante de la virulencia. Las proteínas Fet3 en *M. circinelloides* son, por tanto, un factor de virulencia implicado en el desarrollo de la mucormicosis, y podrían ser diana de nuevos antifúngicos, ya que la captación de hierro durante la infección es un punto clave en su patogénesis.

Referencias

- Álvarez, E., Sutton, D. A., Cano, J., Fothergill, A. W., Stchigel, A., *et al.* (2009). *Journal of clinical microbiology* 47, 1650-1656.
- Bitar, D., Van Cauteren, D., Lanternier, F., Dannaoui, E., Che, D., *et al.* (2009). *Emerging infectious diseases* 15, 1395-1401.
- Calo, S., Shertz-Wall, C., Lee, S. C., Bastidas, R. J., Nicolás, F. E., *et al.* (2014). *Nature* 513, 555-558.
- Ibrahim, A. S. (2011). *Current opinion in microbiology* 14, 406-411.
- Ibrahim, A. S., Spellberg, B., Walsh, T. J. & Kontoyiannis, D. P. (2012). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54 Suppl 1, S16-22.
- Lee, S. C., Li, A., Calo, S. & Heitman, J. (2013). *PLoS pathogens* 9, e1003625.
- Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D. J., Boekhout, T., Ruiz-Vázquez, R. M., *et al.* (2011). *PLoS pathogens* 7, e1002086.
- Neblett Fanfair, R., Benedict, K., Bos, J., Bennett, S. D., Lo, Y. C., *et al.* (2012). *The New England journal of medicine* 367, 2214-2225.
- Ocampo, J., Fernández Núñez, L., Silva, F., Pereyra, E., Moreno, S., *et al.* (2009). *Eukaryotic cell* 8, 933-944.
- Roden, M. M., Zaoutis, T. E., Buchanan, W. L., Knudsen, T. A., Sarkisova, T. A., *et al.* (2005). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41, 634-653.
- Skiada, A., Pagano, L., Groll, A., Zimmerli, S., Dupont, B., *et al.* (2011). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 1859-1867.
- Spellberg, B., Edwards, J., Jr. & Ibrahim, A. (2005). *Clinical microbiology reviews* 18, 556-569.
- Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D. & Dancis, A. (1996). *Science* 271, 1552-1557.