

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE AISLADOS CLÍNICOS Y
NO CLÍNICOS DE *S. CEREVISIAE* Y SU PAPEL COMO
PATÓGENO EMERGENTE

ROSA DE LLANOS FRUTOS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de Març de 2007 davant un tribunal format per:

- D. José Pontón San Emeterio
- D^a. Concha Gil García
- D^a. María Molina Martín
- D. Carlos Rodríguez Vázquez de Aldana
- D^a. M^a Luisa Gil Herrero

Va ser dirigida per:

D^a. Amparo Querol Simón

D^a. M^a Teresa Fernández-Espinar González

©Copyright: Servei de Publicacions
Rosa de Llanos Frutos

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6834-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología y Ecología



Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

Departamento de Biotecnología



**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE AISLADOS CLÍNICOS Y NO
CLÍNICOS DE *Saccharomyces cerevisiae* Y SU PAPEL COMO
PATÓGENO EMERGENTE**

Trabajo presentado por Dña. ROSA DE LLANOS FRUTOS para optar al grado de doctor por la Universitat de València.

Valencia, 2007

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de la siguiente ayuda:

- ❖ Beca de Formación de Personal Investigador I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

El trabajo aquí descrito se enmarca dentro del proyecto que lleva por título “La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como patógeno emergente: estudio comparativo entre aislados de alimentos y clínicos” del Programa Nacional de Alimentación (INIA) GAL02-071.

A mis padres,

Daniel y Rosa

Llegado este momento, me siento muy feliz de haber cumplido con una de mis ilusiones, sin embargo, es un sentimiento que tiene una pizca de nostalgia y tristeza, ya que se acaba una etapa que me ha permitido conocer a muchas personas, que sin duda forman ya, parte de mi vida. A todas ellas, tanto las que han participado directamente en el desarrollo de esta tesis, como las que lo han hecho de forma indirecta, al ofrecerme el apoyo necesario para llegar hasta aquí, va dedicada esta tesis y mis más sinceros agradecimientos:

Gracias Amparo y Teresa, por darme la oportunidad de hacer este trabajo, que ha sido todo un reto y que ha tenido muchos momentos llenos de satisfacciones y otros que han sido algo difíciles, y en éstos, siempre os he sentido a mi lado. Gracias Amparo por ese optimismo que transmites y que muchas veces me ha ayudado a seguir. Y gracias Teresa por la confianza que siempre has depositado en mí. Gracias a las dos, por ser en muchos momentos más que mis directoras de Tesis y por haberme dejado formar parte de vuestro grupo, el Laboratorio 307.

También quería agradecer a Esperanza y M^a Jesús la oportunidad que me ofrecieron de dar mis primeros pasos por la investigación.

A Eladio, por toda su paciencia y ayuda en la elaboración de esta tesis, siempre me has dado buenos consejos.

Muchas gracias a todas mis compañeras del Laboratorio 307: Amparo G, Silvia, Patricia R, Sara, Carmela, M^a José y Patri. Y como no, a Laura y Armando, que aunque no compartimos laboratorio, siempre he sentido vuestra cercanía y cariño. Carmela, gracias por esos momentos distendidos, menudas carcajadas! Amparo G, te deseo mucha suerte en este camino que acabas de empezar. Patricia R o mejor dicho profesora Roig, gracias por tu apoyo. Sara, que vas a ser mamá!! Gracias por ser tan cariñosa conmigo y espero que seas muy feliz. M^a José, gracias por cuidarme tanto en esos momentos difíciles. Silvi, pequeña, ha sido un gusto trabajar contigo, gracias por preocuparte tanto por mí, sé que todo va a ir muy bien porque te lo mereces. Y por fin mi Patri, quiero agradecerte todo el apoyo que siempre me has dado, por ser una amiga dentro y fuera del trabajo, espero que nuestros caminos vuelvan a cruzarse.

Sin embargo, el laboratorio 307 se caracteriza por su hospitalidad, han pasado tantas personas, que espero no olvidarme de ninguno, de tod@s guardo un bonito recuerdo: la última visita, el croata, Sandi, gracias por tus clases de inglés. Mariana, mi amiga argentina, sigo recibiendo tu cariño, aunque con muchos kilómetros de distancia. Cristian, siempre

pusiste un punto de humor en tus estancias varias por nuestro laboratorio! Y muchos otros, Manolo, André, Vicent, Clara, Rosiña, Bill, Noé, Teresa (la portuguesa), Lorena y Maite.

Quería dar las gracias también al resto de mis compañeros vecinos, que formáis el Departamento de Biotecnología, por las palabras y muestras de cariño que siempre he recibido. Los vecinos del 309: A Michell, Marga, Andrew (gracias por sacarme siempre una sonrisa), Luisa (muchas gracias por escucharme, y darme tanto cariño, no olvidaré nuestras conversaciones). Juanan y Óscar (por el apoyo y ánimos que me habéis dado). Los vecinos del 308: Paloma y Salvador, gracias por vuestros consejos. María, María S, Fernando, Pedro, Encarna, por vuestro cariño. Estefil, muchas gracias por hacernos el trabajo más fácil. Que decir de las vecinas del 306: Rosa, Empar (compañera de batalla, mucha suerte y muchos ánimos), Patri, Juan, Pepa, Meritxell. Pedro C, gracias por dedicarme un ratito cada día. A José Vicente por esos momentazos que nos has hecho pasar y por estar siempre dispuesto a ayudarme. A los que ya no están en el IATA, muchas gracias también por vuestro cariño (Begoña, Benito, Bea, Marian, Edu, Claudia, Viky, José María, Adela, Fernando...).

A mis compañer@s de seminarios matutinos, gracias por escucharme y darme buenas ideas. A Marcel·li, Emilia, Carmen, Agustín, Fernando, Geno, Aurora (gracias por tus ánimos), Roberto, Mariola, Marisa, Rocio, Elena (menudas charlas eh!! Suerte). También al grupo de Antonio Abad.

A Daniel y a todas las personas que forman parte de Biopolis (siento no poder nombraros a tod@s!!).

Me gustaría dar las gracias también, a todas las personas de los distintos Departamentos del IATA, que siempre me han ayudado de una manera u otra, cuando lo he necesitado.

No puedo olvidarme de mis tres amigos, Josep, Boro y Pili, gracias por estar siempre ahí, por escucharme y por vuestras palabras de ánimo.

A Paqui y José, por vuestros consejos. A Quino por enseñarme el manejo del “Chiti”. A Amalia, por toda la ayuda que me has dado. A Pascual, por amenizar las comidas, no sabes las cosas que he aprendido escuchándote. Y también a Elena, Sonia, M^a José, Ana y Jaime.

En estos agradecimientos no podían faltar todas las personas que conocí durante mi estancia en el Departamento de Micro II de la Facultad de Farmacia, de la Complutense de Madrid. De todas guardo un recuerdo increíble, gracias a todos y todas por el cariño que recibí, en todo momento me hicisteis sentir como en casa:

A María Molina, por todos lo que me has enseñado, por dedicarme parte de tu tiempo y mostrarme tanto cariño. A la Unidad 3: Marta y Eva, gracias por la paciencia que tuvisteis, enseñándome a manejar esos minigeles! A María J, Humberto, Víctor, Isabel, Inma, siempre estuvisteis dispuestos a ayudarme, de verdad, muchas gracias.

A Concha Gil, por abrirme de par en par las puertas de la Unidad 1, de la confianza que me distes y gracias por ayudarme en el desarrollo de este trabajo. Gracias también a Gloria por descubrirme el maravilloso mundo de los ratones y a Lucía, por su cariño. Y como no, a mis chicas, con vosotras he compartido una época que nunca podré olvidar, me sentí una más, como si hubiese estado desde el principio. Gracias por ser tan buenas amigas y por seguir a mi lado, aunque sea a través del Skype!! A Irene, Rosa, Elena F., Laura, Virginia, Raquel F, Elena L, María S, María I y Raquel M (eres una gran amiga). Gracias también, a todas las personas que forman el Servicio de Proteómica. A Montse, por ayudarme tanto con los geles 2D!! Y también a Amalia por esos ratos tan divertidos que pasamos mientras estábamos frente al citómetro!!

Gracias Chac y Marisol por acogerme y cuidarme tanto durante mi etapa madrileña.

A mi primo Fernando por la ayuda prestada en el diseño de la portada de esta Tesis.

A mis amig@s. Se me hace muy difícil no nombraros a todos, de verdad. Formáis parte de mí, y de este trabajo. Gracias a los incondicionales, Ceci, Jose, Paco, Consue, María y Ricardo, por estar SIEMPRE a mi lado. A mis chicas, Rocío, Olga, María, Carla y Bea, sois muy especiales. A TODOS, gracias por los buenos momentos vividos.

A Óscar, conocerte ha significado mucho para mí, eres una persona muy especial. Gracias por el cariño y el apoyo que me has demostrado en todo este tiempo, gracias por ser como eres.

Y al final de estos largos agradecimientos, está mi familia, una gran familia a la que agradezco todo el amor que recibo cada día de ellos. A mis hermanos, Dani y Carlos por vuestra comprensión y ánimos que me han ayudado a seguir. Y a mis padres, a ellos va dedicada esta tesis. Gracias por enseñarme tantas cosas, por apoyarme, por animarme en los momentos más difíciles y por la ilusión que le ponéis a todas nuestras cosas. Gracias a vosotros he llegado hasta aquí. Os quiero!!

Índice

INTRODUCCIÓN	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1. Considerada tradicionalmente como una levadura segura	1
1.1. Aspectos generales	1
1.2. El papel de <i>S. cerevisiae</i> en la industria agroalimentaria	2
1.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bouardii</i> como agente probiótico	4
1.3. El papel de <i>S. cerevisiae</i> en el sector biotecnológico	6
2. Considerada actualmente como una levadura patógena, emergente y oportunista de baja virulencia	6
2.1. Aspectos generales de las levaduras patógenas emergentes y oportunistas.	6
Nuevas consideraciones	
2.1.1. Causas del incremento de los patógenos emergentes	7
2.1.2. Orígenes de infección	8
2.1.3. Tratamientos	9
2.1.4. Factores de virulencia en los patógenos oportunistas	10
2.1.5. Nuevas consideraciones	11
2.2. Epidemiología de <i>S. cerevisiae</i>	12
2.2.1. Causas del aumento de las infecciones atribuidas a <i>S. cerevisiae</i>	13
2.2.2. Vías de entrada	13
2.2.3. Tipos de infecciones	15
2.2.4. Tratamientos	17
2.3. Factores de virulencia asociados con levaduras y hongos patógenos	18
2.3.1. Secreción de hidrolasas extracelulares	18
2.3.2. Crecimiento a altas temperaturas	19
2.3.3. Variación fenotípica o “switching”	19
2.3.4. Dimorfismo	20
2.3.5. Genes y rutas implicados en la supervivencia <i>in vivo</i> de <i>S. cerevisiae</i>	26
3. Las técnicas moleculares, herramientas útiles para el estudio de la epidemiología de <i>S. cerevisiae</i>	30
3.1. Métodos moleculares para la identificación de levaduras a nivel de especie	30

3.2. Métodos moleculares para la diferenciación a nivel de cepa	32
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Cepas microbianas	39
1.1. Aislados clínicos de <i>S. cerevisiae</i>	39
1.2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> de uso industrial	39
2. Medios de cultivo	42
2.1. Adición de compuestos al medio de cultivo	42
2.1.1. Estudio de resistencia/sensibilidad a compuestos alterantes de la pared celular	43
3. Condiciones de cultivo	43
3.1. Determinación del crecimiento	43
3.2. Ensayos de sensibilidad en placa	43
4. Rasgos fenotípicos asociados con virulencia	44
4.1. Crecimiento a diferentes temperaturas	44
4.2. Producción de proteasas y fosfolipasas	44
4.3. Crecimiento pseudofilamentoso	45
4.4. Crecimiento invasivo	45
5. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	45
5.1. Aislamiento del DNA genómico de las levaduras	45
5.2. Amplificación mediante PCR	46
5.2.1. Oligonucleótidos	46
5.2.2. Amplificación de la región 5,8-ITS del DNA ribosómico	47
5.2.3. Amplificación de elementos delta (δ)	48
5.2.4. Amplificación del gen <i>SLT2</i>	48
5.2.5. Amplificación del gen mitocondrial <i>COX II</i>	49
5.3. Secuenciación de DNA	49
5.3.1. Obtención de secuencias	49
5.3.2. Análisis de secuencias	50
5.4. Tratamientos enzimáticos del DNA	50

5.4.1. Digestión del producto de amplificación de la región 5,8S-ITS del DNA ribosómico	50
5.4.2. Digestión del DNA mitocondrial	51
5.5. Técnicas electroforéticas para el DNA	51
5.5.1. Electroforesis en geles de campo pulsado	51
6. Propiedades de las cepas comerciales de panadería	52
6.1. Crecimiento en placas de medio melaza para la obtención de biomasa	52
6.2. Ensayos de fermentación	52
6.3. Determinación del gas desprendido durante la fermentación	52
6.3.1. Funcionamiento del aparato Chittick	52
6.3.2. Lectura del gas producido	52
6.4. Actividad enzimática maltasa	55
6.4.1. Rotura celular y extracción proteica en tampón KPP	55
6.4.2. Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford	56
6.4.3. Actividad maltasa	56
7. Modelos murinos de infección sistémica en <i>S. cerevisiae</i>	57
7.1. Infección sistémica empleando ratones inmunocompetentes BALB/c y ratones inmunodeficientes en el factor C5 del complemento DBA/2N	57
7.2. Infección sistémica empleando ratones ICR/Swiss inmunosuprimidos con ciclofosfamida	59
7.3. Estudios de histopatología en cerebros de ratones	60
8. Obtención y análisis de proteínas por 2D-Western Blotting del suero de ratones infectados	60
8.1. Obtención de extractos proteicos de la cepa silvestre de <i>S. cerevisiae</i> BY 4741	60
8.2. Transferencia de proteínas	61
8.3. Identificación de proteínas mediante inmunodetección (<i>Western-Blotting</i>)	61
9. Detección de las Map quinasas Slt2 y Kss1 mediante Western-blottin	62
9.1. Obtención de extractos proteicos y preparación de muestras para electroforesis (SDS-PAGE)	62
9.2. Electroforesis de proteínas	63

9.3. Transferencia de proteínas de membrana de nitrocelulosa	63
9.4. Inmunodetección (<i>Western-Blotting</i>)	64
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
I. ESTUDIO DEL ORIGEN DE COLONIZACIÓN DE LOS AISLADOS CLÍNICOS DE <i>S. cerevisiae</i>	65
1. Identificación de los aislados clínicos mediante RFLPs de la región 5,8S-ITS	66
2. Caracterización molecular de los aislados clínicos y no clínicos de <i>S. cerevisiae</i>	67
2.1. Análisis de restricción del DNA mitocondrial	67
2.2. Amplificación mediante PCR de secuencias delta	69
2.3. Combinación de ambas técnicas	70
3. Estudio de las relaciones filogenéticas mediante el análisis de secuencias del gen mitocondrial <i>COX2</i>	72
4. La cepa probiótica de <i>S. boulardii</i> y las cepas de panadería como posibles orígenes de infección en humanos	75
4.1. Posible origen de panadería de los aislados clínicos que comparten el mismo patrón molecular que Cinta roja	77
4.1.1. Selección de cepas	77
4.1.2. Propiedades de las cepas de panadería relacionadas con el proceso de obtención industrial de la levadura	78
5. Discusión	81
II. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PATOGENICIDAD POTENCIAL DE AISLADOS CLÍNICOS Y NO CLÍNICOS DE <i>S. cerevisiae</i>	89
1. Estudio de rasgos fenotípicos asociados con virulencia	90
1.1. Crecimiento a altas temperaturas	90
1.2. Secreción extracelular de enzimas proteasas y fosfolipasas	93
1.3. Crecimiento pseudofilamentoso	97
1.4. Crecimiento invasivo	99

1.5. Comparación entre las cepas industriales y los aislados clínicos potencialmente virulento	101
2. Estudios de virulencia mediante sistema murino	104
2.1. Infecciones sistémicas de <i>S. cerevisiae</i>	105
2.1.1. Selección de las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	107
2.1.2. Modelo murino de infección sistémica en ratones inmunocompetentes BALB/c	108
2.1.3. Modelo murino de infección en ratones DBA/2N, deficientes en el factor C5 del sistema del complemento	113
2.1.4. Modelo murino neutropénico de infección en ratones ICR/Swiss inmunosuprimidos con ciclofosfamida	117
2.1.5. Determinación del grado de virulencia de las cepas ensayadas	121
2.1.6. Estudio histológico	125
2.1.7. Aplicación de técnicas moleculares para la comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de los ratones infectados	128
3. Estudio de la respuesta serológica tras la infección sistémica de <i>S. cerevisiae</i>	132
4. Discusión	136
III. ESTUDIO DEL GRADO DE ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR LAS MAPK Slt2 y Kss1	155
1. Estudio del grado de activación por fosforilación de las MAPK Kss1, Slt2 y Fus3 en condiciones de no activación	157
1.1. Activación de Slt2 superior a la mostrada por la cepa silvestre BY	160
1.2. Activación de Kss1 en <i>S. boulardii</i> y el aislado clínico de sangre F3	161
1.3. Doble banda observada para Slt2	162
2. Estudio de la sensibilidad o resistencia ante agentes que alteran la pared celular	163
3. Caracterización molecular del gen <i>SLT2</i>	166
3.1. Amplificación de la zona de repeticiones (microsatélites) mediante PCR	169

4. Secuenciación de las bandas amplificadas para la región de las repeticiones	170
4.1. Aislados con doble banda para la proteína Slt2: N° 60, 70 y 102	170
4.2. “Cinta roja” y el grupo de aislados clínicos con origen de panadería	175
5. Discusión	181
CONCLUSIONES	191
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	195
ANEXO I	201
BIBLIOGRAFÍA	205

Abreviaturas

A	Adenina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
COX	Citocromo-c oxidasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi-nucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
ETS	Espaciador externo transcrito (<i>External transcribed spacer</i>)
FRE	Elementos receptivos de filamentación (<i>Filamentation Responsive Element</i>)
G	Gramo
G	Guanina
GDP	Guanosín difosfato
GRAS	Considerados generalmente como seguros (<i>Generally Regarded As Safe</i>)
GTP	Guanosín trifosfato
h	Hora
HSP	Proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
IGS	Espaciador intergénico (<i>Intergenic spacer</i>)
ITS	Espaciador interno transcrito (<i>Internal transcribed spacer</i>)
Kb	Kilobases
Kg	Kilogramo
L	Litro
Log	Logaritmo en base 10
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
M	Molar
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MAPK	Quinasa de tipo MAP

ABREVIATURAS

MAPKK	Proteínquinasa de una MAPK
MAPKKK	Proteínquinasa de una MAPKK
nm	nanómetros
p/v	Peso/volumen
P	Fosfato (<i>Phosphate</i>)
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR-DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
Ph	Pseudohifal
PKA	Proteínquinasa A
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado al azar (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polimorphism</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
S	Subunidad
SAP	Aspartil proteinasas (<i>Secreted Aspartyl Proteinases</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
SLAD	Medio de dextrosa sintético de bajo amonio (<i>Synthetic Low Ammonium Dextrose</i>)
T	Timina
tRNA	RNA de transferencia
U	Unidades
UV	Ultravioleta
UFC	Unidades Formadoras de colonias
Δ	Delección
::	Interrupción
μg	Microgramo
μL	Microlitro
2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida
5-FC	5- fluorocitosina

Introducción

Saccharomyces cerevisiae

Es una levadura ascomiceta, que se conoce comúnmente como “levadura de cerveza o de panadería”, debido precisamente al papel que ha desempeñado y sigue haciéndolo, dentro de la industria agroalimentaria, participando en numerosos procesos fermentativos. Además, se considera el organismo eucariota modelo por excelencia, siendo muy utilizado en el sector biotecnológico. Teniendo en cuenta los diferentes usos que el hombre ha hecho de esta levadura, junto con su carácter ubicuo en la naturaleza, no es de extrañar, que *S. cerevisiae* se considere una levadura comercialmente segura.

Sin embargo, durante los últimos 20 años el número de casos de infecciones causadas por *S. cerevisiae* se ha incrementado considerablemente, relacionándose principalmente con pacientes inmunocomprometidos. Esta aparición en el ámbito hospitalario ha hecho que se reconsidere el concepto de *S. cerevisiae* como levadura no patógena y se proponga como una levadura patógena emergente oportunista de baja virulencia (Murphy y Kavanagh, 1999).

A continuación se hace una breve descripción del papel que tiene *S. cerevisiae* dentro de la industria agroalimentaria, destacando los procesos en los cuales interviene, así como su papel dentro del sector biotecnológico. Posteriormente se abordan más detalladamente los aspectos que han hecho que esta levadura se considere actualmente un microorganismo patógeno oportunista, haciendo hincapié tanto en los aspectos virulentos y clínicos, así como en los tratamientos empleados en la actualidad.

1. Considerada tradicionalmente como una levadura segura

1.1. Aspectos generales de *S. cerevisiae*

S. cerevisiae es una levadura que se muestra generalmente en su forma vegetativa como una célula ovoide, aunque bajo ciertas circunstancias de limitación de nutrientes las células se elongan, dando lugar al crecimiento pseudohifal (Gimeno y col., 1992). Las colonias suelen ser blancas y cremosas (Barnett y col., 2000), aunque también se ha descrito que ciertas cepas pueden crecer dando lugar a colonias rugosas, con aspecto irregular (Gimeno y col., 1992). Es una levadura que se encuentra en el ambiente como célula haploide o diploide creciendo vegetativamente cuando hay abundancia de nutrientes. Sin embargo, cuando se encuentra ante limitación de nutrientes tiene dos posibilidades, crecer

en forma de pseudohifas o esporular dando lugar a ascas permanentes conteniendo de 1 a 4 ascosporas. Estas ascosporas germinarán dando lugar a células haploides a o α que se unirán rápidamente para dar lugar a una célula diploide, pudiendo reproducirse vegetativamente por gemación o iniciar el ciclo sexual. En la Figura 1 se muestran los distintos estados en los que puede encontrarse la levadura *S. cerevisiae*, de acuerdo con las condiciones del ambiente que la rodea.

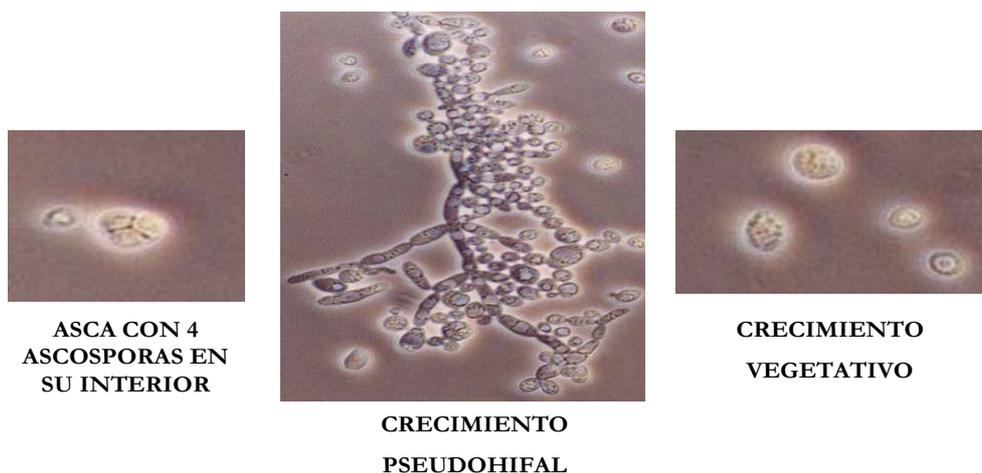


Figura 1. Morfologías observadas para la levadura *S. cerevisiae*

S. cerevisiae está taxonómicamente bien definida y teniendo en cuenta la última revisión taxonómica llevada a cabo por Barnett y col., (2000), se clasifica dentro del Género *Saccharomyces* Meyen ex Reess; la Familia Saccharomycetaceae; el Orden Saccharomycetales; la Clase: Hemiascomycetes y el *Phylum*: Ascomycota.

Por otro lado *S. cerevisiae* junto con las especies *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* y *S. mikatae*, constituyen actualmente el género *Saccharomyces* (Kurtzman, 2003).

1.2. El papel de *S. cerevisiae* en la industria agroalimentaria

Las levaduras han jugado un papel importantísimo en la producción de bebidas y alimentos desde las civilizaciones más antiguas de forma inadvertida y hasta nuestros días donde su manipulación está completamente dirigida y controlada. En concreto, *S. cerevisiae* es una levadura ampliamente explotada en la industria agroalimentaria precisamente por la capacidad fermentativa que muestra sobre diferentes sustratos.

Sin embargo, a parte del papel positivo que tiene *S. cerevisiae* en la producción de bebidas y alimentos, tiene un papel como alterante de ciertos productos alimenticios. Entre los efectos no deseados que provoca, destaca la producción de CO₂ en productos lácticos, dando lugar a la rotura de los envases (Frölich-Wyder, 2003), la fermentación de refrescos, la alteración de olivas, el crecimiento en superficie sobre rebanadas de pan (Tudor y Borrada, 1993) y el crecimiento durante el almacenamiento del vino entre otros (Dequin y col., 2003).

Entre los aspectos beneficiosos, destaca el papel que juega durante la producción de las fermentaciones alcohólicas tanto de bebidas como el vino, cerveza, sake, sidra, así como de alimentos, destacando las fermentaciones del pan, queso, etc. Como ejemplo de bebida fermentada, puede destacarse el caso concreto de las fermentaciones vínicas. Existe una variedad de microorganismos que participan en su producción, pero es *S. cerevisiae*, la que lleva en último término la fermentación alcohólica (Fleet, 2003). Además, esta levadura produce una gran variedad de productos secundarios que contribuirán significativamente a las propiedades organolépticas del vino, incluyendo el glicerol, que proporciona la consistencia y cuerpo al vino, así como los alcoholes superiores y ésteres que participan en el aroma final del producto (Dequin y col., 2003).

Entre los alimentos que sufren una fermentación por parte de *S. cerevisiae*, podemos destacar el proceso de panificación. En las masas panarias las levaduras producen etanol y CO₂ tras el metabolismo fermentativo de maltosa, glucosa, fructosa y otros componentes, dando lugar al proceso de levantamiento de la masa y contribuyendo a su vez en el sabor final del pan por los componentes generados de su metabolismo (alcohol, ácidos grasos, aldehído, etc.) (Torner y col., 1992).

Sin embargo, *S. cerevisiae* también se emplea en otros procesos industriales que no requieren de su metabolismo fermentativo, sino que se emplea como fuente de ingredientes o aditivos, como es el caso de la obtención de la vanilina o del coenzima A (Fleet, 2006). Quizás una de las aplicaciones de *S. cerevisiae* como aditivo alimentario, es a través de los suplementos nutricionales comercializados bajo el nombre de “levadura de cerveza”, por su gran contenido en vitamina B, proteína, péptidos, aminoácidos y minerales, empleados entre los deportista como complemento de su dieta rica en proteínas. Y por último, destacar el empleo de *S. cerevisiae* como probiótico, concretamente a través de la levadura *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Ésta es una de las pocas levaduras que se emplea en la industria agroalimentaria con este fin, por ello se analiza en profundidad a continuación.

1.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* como agente probiótico

Los probióticos, son microorganismos viables, beneficiosos para el hospedador, cuando se consumen en las cantidades apropiadas. Se entiende por beneficios, la reducción en la duración de las diarreas, la estimulación del sistema inmune, la reducción de los niveles de colesterol, así como el aumento en la absorción de nutrientes (Marteau y Boutron-Ruault, 2002). Entre las especies que mayor aplicación tienen como probiótico se encuentran las bacterias lácticas (ej., *Lactobacillus acidophilum* o *Bifidobacterium* spp.), que pueden encontrarse en un amplio abanico de productos lácteos comerciales. Sin embargo, el empleo de levaduras como probiótico humano es más reciente y su uso como agente adicionado a ciertos alimentos, se encuentra actualmente en desarrollo. Como se ha mencionado anteriormente, el empleo de *S. cerevisiae*, “levadura de cerveza o de panadería”, como suplemento en la dieta es habitual, principalmente como complemento de piensos de animales, ya que incrementa el crecimiento y la salud de los mismos (Dawson, 2002). E incluso existe un interés creciente en el uso de esta levadura como probiótico en acuicultura (Tovar y col., 2002). Pero la inclusión de *S. cerevisiae*, concretamente *S. cerevisiae* var. *boulardii*, en la literatura como probiótico es muy reciente (Fleet, 2006).

S. cerevisiae var. *boulardii* fue aislado originariamente del fruto del lychee, en Indochina, y no fue hasta principios de los años 50 cuando se empleó en Francia para tratar un caso de desorden diarreico (McFaland y Bernasconi, 1993). Esta levadura se encuentra disponible comercialmente como un preparado liofilizado, y se distribuye en forma de cápsulas o en paquetes en Europa, USA, Sudáfrica, y África (McFarland y Bernasconi, 1993), bajo diferentes designaciones como Ultralevura[®], Precosa[®], Perentecol[®], Codex[®], Floratil[®], y Florastor[™]. Y a diferencia de los suplementos dietéticos que se identifican bajo el nombre de “levadura de cerveza o de panadería”, este probiótico se distribuye como agente bioterapéutico, para el tratamiento y prevención de enfermedades específicas y puede obtenerse bajo prescripción médica o por cuenta propia como un medicamento (Mombelli y col., 2000; Periti y Tonelli, 2001).

La administración de *S. cerevisiae* var. *boulardii* como agente probiótico se recomienda para el tratamiento de diarreas, que pueden tener a su vez múltiples orígenes, como son las causadas por el uso de tratamientos prolongados de antibióticos, diarreas crónicas en pacientes VIH, las causadas por *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, y varias *Enterobacteriaceae* (Czerucka y Rampal, 2002), diarreas asociadas a la enfermedad de Chron, a desórdenes por inflamaciones del intestino (Guslandi y col., 2000), diarreas asociadas al “síndrome del

viajero” (Kirchelle y col., 1996) y a gastroenteritis agudas que suceden tanto en adultos como en niños.

Los mecanismos de actuación de *S. cerevisiae* var. *boulardii* como agente probiótico o bioterapéutico no se conocen con exactitud. En el caso del tratamiento de las diarreas causadas por *Clostridium difficile*, parece ser que la levadura produce proteasas que degradan específicamente las toxinas producidas por la bacteria, así como los receptores para estas toxinas en la mucosa del colon. Además, la levadura parece estimular actividades enzimáticas concretas de la mucosa del intestino, así como la respuesta inmunitaria del hospedador (Czerucka y Rampal, 2002).

La selección de cepas de *S. cerevisiae* var. *boulardii* como posibles agentes probióticos, se realiza en base a criterios fisiológicos (Ouwehand y col., 1999), como son la tolerancia a bajos pH (2,5) y a las sales biliares, que les permitirá sobrevivir en el tracto gastrointestinal y la adhesión a la mucosa intestinal, un prerequisite que permitirá prolongar la permanencia del probiótico en el tracto intestinal durante un largo periodo de tiempo y de ese modo colonizar el intestino. Todo ello permitirá que los agentes probióticos puedan influenciar en la microbiota y en el sistema inmune del hospedador. Sin embargo, la adhesión a la mucosa intestinal no parece ser una propiedad extendida entre las cepas probióticas de *S. cerevisiae* var. *boulardii* (van der Aa Kuhle y col., 2005).

A parte de estos criterios fisiológicos, existen otros criterios tecnológicos de selección de probióticos, si se van a incluir como parte de alimentos o bebidas, ya que éstos no deberían causar ningún impacto negativo en las propiedades sensoriales del producto final, además de permanecer viables y funcionalmente estables hasta que el alimento/bebida sea consumido. De hecho, son muchos los estudios que se están llevando a cabo para determinar cómo afecta la adición de *S. cerevisiae* var. *boulardii* en alimentos, tanto en cultivos puros como mixtos con otros microorganismos (Betoret y col., 2003), y garantizar su viabilidad y funcionalidad bajo diferentes condiciones de almacenamiento (Psomas y col., 2003).

Sin embargo, el agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii* también causa efectos secundarios, negativos para la salud. Son muchos los casos clínicos que relacionan a esta levadura con casos de fungemia, lo cual hace que su uso como probiótico actualmente sea un tema controvertido (Cassone y col., 2003). El aspecto clínico de *S. cerevisiae* var. *boulardii* se aborda con mayor detalle en el apartado 2 de la presente Introducción.

1.3. El papel de *S. cerevisiae* en el sector biotecnológico

Como se ha comentado anteriormente, *S. cerevisiae*, es el modelo eucariota por excelencia, de hecho es uno de los organismos más estudiados y mejor caracterizados del planeta, siendo el primer organismo eucariota del que se conoció la secuencia completa de su genoma (Goffeau y col., 1996). Este amplio conocimiento, así como la facilidad para cultivarla y manipularla, ha hecho de esta levadura una herramienta fundamental de estudio en el campo de la biotecnología, donde igual que en el sector agroalimentario tiene el estatus de levadura “GRAS” (Generally Regarded As Safe). Dentro de este sector, esta levadura ha sido empleada para numerosas finalidades, como sistema de clonación, como sistema de expresión heteróloga, secretando al medio de cultivo proteínas que serán recuperadas directamente del medio o bien permanecerán retenidas en la pared celular (Schreuder y col., 1996). También se emplea para producir interferón o citoquinas, que son muy importantes en la regulación de la respuesta del sistema inmune ante ciertas infecciones (Murphy y Kavanagh, 1999).

Con todo ello lo que queda claro es que *S. cerevisiae*, es una levadura muy utilizada por el hombre con diferentes finalidades, lo que ha hecho que se tenga un amplio conocimiento de sus características biológicas, y de ahí su amplia aplicación industrial y biotecnológica. Sin embargo, parece que todavía quedan cosas por saber de esta levadura, y entre ellas está el papel que juega como patógeno oportunista para el hombre. Una posibilidad que se había pasado por alto en el pasado y durante mucho tiempo, quizás por el concepto asumido y generalizado que se tenía de *S. cerevisiae*, “la levadura de pan o cerveza” siempre beneficiosa para el hombre.

2. Considerada actualmente como una levadura patógena, emergente y oportunista de baja virulencia

2.1. Aspectos generales de las levaduras patógenas emergentes y oportunistas. Nuevas consideraciones

Desde las dos últimas décadas las infecciones fúngicas oportunistas constituyen una importante causa de mortalidad y morbilidad entre los pacientes hospitalizados, a lo largo de todo el mundo. Aunque la mayoría de las infecciones fúngicas invasivas las causan hongos dimórficos como *C. albicans*, aislados de *Aspergillus* y *Cryptococcus neoformans*, existen

otras especies fúngicas que están emergiendo como patógenos importantes, principalmente entre los pacientes inmunodeprimidos (Hazen, 1995). Entre las levaduras emergentes se encuentran especies del género *Candida*, no-*albicans*, entre las que destacan *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* (Krcmery y Barnes, 2002) y especies del género *Cryptococcus* como *C. albidus* y *C. laurentii*. Sin embargo, también hay que añadir otras especies de levaduras reconocidas previamente como inocuas, patógenas de plantas o asociadas al ámbito industrial, así como otras levaduras raramente asociadas a infecciones y siempre bajo condiciones específicas, que han visto aumentada su presencia en el ámbito hospitalario (Hazen, 1995; Pontón y col., 2000). En la Tabla 1, se detallan las levaduras no-*Candida* y *Cryptococcus* consideradas emergentes, junto a las referencias de las publicaciones donde se las mencionan (Fleet y Roostita, 2006).

Tabla 1. Especies de levaduras no-*Candida* y *Cryptococcus*, que causan infecciones oportunistas en humanos.

Especies	Referencias
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eschete y West (1980); Aucota y col., (1990); Bassetti y col., (1998); McCullough y col (1998a); Murphy y Kavanagh (1999); Wheeler y col., (2003); de Llanos (2004); Enache-Angoulvant y Hennequin, (2005)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	McCullough y col (1998b); Piarroux y col (1999); Lherm y col., (2002); Cassone y col., (2003); Enache-Angoulvant y Hennequin, (2005); de Llanos y col., (2006b).
<i>Rhodotorula</i> spp.	Papadogeorgakis y col (1999); Petrocheilou-Paschou y col., (2001); Braun y Kaufmann (1999); Diekema y col., (2005)
<i>Pichia anomala</i>	Murphy y col., (1986); Haron y col., (1988); Klein y col., (1988); Yamada y col., (1995); García-Martos y col., (1996); Cermeño-Vivas y col., (1999);
<i>Pichia farinosa</i>	García-Martos y col., (1996)
<i>Pichia membranifaciens</i>	García-Martos y col., (1996)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lutwick y col., (1980); Nielsen y col., (1990); García-Martos y col., (1996)
<i>Hanseniospora uvarum</i>	García-Martos y col., (1996)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Shin y col., (2000)

2.1.1. Causas del incremento de los patógenos emergentes

Puesto que las personas inmunodeprimidas son la principal diana de los patógenos oportunistas, el incremento de individuos que sufren enfermedades como el SIDA o el cáncer han contribuido al incremento de las infecciones fúngicas oportunistas de los últimos 20 años. Sin embargo, una gran parte de dicho incremento ha tenido lugar como consecuencia de los propios avances médicos, como son el desarrollo de nuevas técnicas de

identificación de microorganismos patógenos, así como la aplicación de nuevas terapias inmunosupresoras que aumentan la probabilidad de vida de pacientes inmunodeprimidos, como son los pacientes transplantados y pacientes con cáncer. Sin embargo, estos avances tienen su cara negativa, el aumento de individuos con diversas inmunodeficiencias que van a ser susceptibles de sufrir una infección fúngica oportunista (Hazen, 1995; Singh, 2001). Todos estos factores de predisposición, así como sus consecuencias se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores que contribuyen a las infecciones humanas causadas por patógenos oportunistas, y las consecuencias que se derivan de ellos.

Factores que han incrementado las infecciones fúngicas oportunistas
Desarrollo de técnicas nuevas de detección e identificación de patógenos
Hospitalización- aumenta la posibilidad de sufrir una infección nosocomial
Incremento de pacientes con cáncer o SIDA- mayor número de individuos susceptibles de sufrir una infección fúngica oportunista
Uso de nuevos agentes inmunosupresores para aumentar el éxito de los transplantes- aumenta el número de personas inmunodeprimidas y por tanto susceptibles de sufrir una infección fúngica oportunista
Uso de quimioterapia para el tratamiento de cáncer- aumenta el número de personas inmunodeprimidas
Tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro- debilitan el estado inmunitario de los pacientes
Inserción de catéteres- una nueva vía de entrada de patógenos oportunistas

2.1.2. Orígenes de infección

Las levaduras patógenas oportunistas causan fungemia como principal patología. La infección de la sangre es la fuente de diseminación a través del cuerpo humano, logrando llegar a cualquier órgano (corazón, pulmones, hígado, riñón, cerebro) y pudiendo tener consecuencias fatales. A este tipo de infecciones se las denomina profundas o invasivas, pero las levaduras oportunistas también pueden causar infecciones superficiales en la piel, áreas membranosas, cavidad oral, vagina y el tracto respiratorio (Fleet y Roostita, 2006b).

Uno de los puntos más difíciles de concretar, es determinar cual es el origen de estas levaduras inusualmente patógenas, puesto que la mayoría se encuentran de forma normal en el ambiente que nos rodea, e incluso en algunos casos pueden formar parte de

las mucosas normales del hospedador. Concretamente ciertas especies de *Candida* han sido aisladas del tracto gastrointestinal o de la vagina (Odds, 1988; Sobel y col., 1993). Otro punto de entrada es a través de la cauterización, que como resultado rompe la integridad de la barrera cutánea y deja una puerta de entrada para los microorganismos. Éstos a su vez pueden provenir de la piel de las manos y de las uñas, de hecho se ha demostrado que un porcentaje muy alto del personal sanitario esconde levaduras en sus manos (Strausbaugh y col., 1994). Por último, también se ha considerado como origen de infección la ingestión de alimentos o bebidas que contengan este tipo de microorganismo, y junto a una translocación a la sangre puedan causar fungemia, concretamente ha sido descrito para el caso de especies de *Candida* (Cole y col., 1996). Las translocaciones a su vez pueden verse favorecidas por una alteración de la mucosa del tracto gastrointestinal, que pueden venir como consecuencia del uso de antibióticos u agentes quimioterápicos que alteran la mucosa y las defensas del hospedador. O incluso se ha descrito que en ocasiones los focos de infección están sobre las superficies de los catéteres, las levaduras son capaces de crecer formando una capa o biofilm y de esta manera entrar en el hospedador (Kojic y Darovivhe, 2004).

2.1.3. Tratamientos

Los tratamientos empleados para vencer las infecciones causadas por estas levaduras inusuales, presentan ciertas dificultades. Puesto que las levaduras patógenas emergentes causan infecciones principalmente entre individuos inmunodeprimidos, una de las primeras líneas de actuación sería mejorar el estado inmunológico del hospedador, pero desafortunadamente esto no siempre es posible. Existen por tanto otras modalidades de tratamiento, bien mediante el uso de terapias antifúngicas o bien mediante una modalidad alternativa, denominada “tratamiento por retirada de catéteres” (Hazen, 1995). Puesto que la fungemia es la principal infección de las levaduras oportunistas y se sabe que uno de los focos de infección es el uso de catéteres intravenosos, se plantea como una buena terapia la retirada de los catéteres presentes en el paciente, si se considera la posibilidad que esté sufriendo una infección fúngica. En muchas ocasiones se combina esta terapia con el uso de agentes antifúngicos. La eficacia de estos agentes para el tratamiento de levaduras emergentes es un tema de continuo estudio; muchas veces no existe el suficiente número de casos que proporcionen indicaciones útiles sobre la eficacia que pueden tener o no sobre ciertas levaduras. De hecho, al igual que están emergiendo nuevas levaduras patógenas,

también emergen nuevos patrones de susceptibilidad frente a los agentes antifúngicos. En términos generales los antifúngicos que se emplean mayoritariamente contra las levaduras patógenas emergentes oportunistas son, la anfotericina B (cuya diana es el ergosterol y otros esteroides de membrana), la 5- fluorocitosina (5-CF) (que actúa sobre la síntesis de proteínas), los azoles (que actúan inhibiendo la biosíntesis de ergosterol en diferentes puntos) como el fluconazol, el itraconazol, el ketoconazol y los triazoles derivados voriconazol y posaconazol (Carrillo-Muñoz y col., 2006; Hazen, 1995), así como las equinocandinas (metabolitos secundarios fúngicos que inhiben la síntesis de beta 1-2-glucano), caspofungina y micafungina. Con objeto de superar los problemas derivados del abuso de los azoles, macrólidos y equinocandinas, se han explorado nuevas dianas y posibles antifúngicos frente a ellas, como son los inhibidores de la N-miristilación de las proteínas fúngicas, por ejemplo miristato y análogos de la histidina o derivados miristoil peptídicos, aminobenzotiazoles, quinolinas y benzofuranos. La polimerización de los hidratos de carbono de la pared celular procedentes de azúcares uridina difosfato es otra posible diana. (Carrillo-Muñoz y col., 2006).

2.1.4. Factores de virulencia en los patógenos oportunistas

La virulencia fúngica es un proceso polivalente, complejo, que requiere la expresión de múltiples genes en las diferentes etapas y sitios de la infección. Sin embargo, esta definición se complica cuando se añade el término de virulencia fúngica oportunista, puesto que la respuesta del hospedador juega un papel tan importante como el papel que juega el patógeno oportunista por sí mismo. Los patógenos oportunistas causan infecciones principalmente en personas inmunodeprimidas, y precisamente el estado inmunitario del hospedador modificará la expresión de los factores de virulencia y su capacidad para causar daño en la interacción hospedador-patógeno que se establezca (Casadevall y Pirofski, 2001). Además, la diversidad en la patogenicidad causada por las diferentes especies de patógenos oportunistas, hace que sea imposible sacar conclusiones comunes sobre los atributos de virulencia necesarios para establecer una infección. En general pueden establecerse algunos requerimientos comunes entre los patógenos oportunistas, relacionados con la capacidad de liberar enzimas al medio, de adhesión, de crecer a altas temperaturas, de alterar su morfología para causar daño, en general factores que van a permitir al patógeno evadir las defensas del hospedador, de invadir y colonizar los tejidos y finalmente de causar daño. En la Tabla 3 se resumen algunos de los factores de virulencia,

relacionados con la patogenicidad de algunos patógenos oportunistas (Alonso-Monge, 2003; Del Poeta, 2004; Gow y col., 2002; Hogan y col., 1996; Navarro-García y col., 2001; van Burick y Megee, 2001).

Tabla 3. Factores de virulencia entre los patógenos oportunistas más importantes.

Factor de virulencia	
Patógeno oportunista	Rasgo asociado
Morfología de infección	
<i>C. albicans</i>	Hifas verdaderas, pseudohifas y células vegetativas
<i>C. glabrata</i>	Crecimiento vegetativo. Pseudohifas solo <i>in vitro</i>
<i>C. neoformans</i>	Célula vegetativa con cápsula
<i>Aspergillus sp</i>	Conidias que germinan dando hifas
Enzimas hidrolíticas extracelulares	
<i>C. albicans</i>	Proteasas SAP y fosfolipasas.
<i>C. glabrata</i>	Proteasas y fosfolipasas
<i>C. neoformans</i>	Proteasas y fosfolipasas, fenoloxidasas
<i>Aspergillus sp</i>	Elastasas, proteasas SAP
Variación fenotípica o “Switching”	
<i>C. albicans</i>	Colonias blancas/opacas
<i>C. glabrata</i>	Colonias blancas/marrones/marrones oscuras (en agar con CuSO ₄)
<i>C. neoformans</i>	Variante “lisa”/”arrugada”/pseudohifal
Adhesión	
<i>C. albicans</i>	Adhesinas (Hw1, Ala1/Als5 y Als1)
<i>C. glabrata</i>	Epa1
Genes y rutas metabólicas	
<i>C. albicans</i>	Ciclo del glioxilato; síntesis de trehalosa; Ruta HOG de MAPK; Biosíntesis de aminoácidos
<i>C. neoformans</i>	Ciclo del glioxilato; Biosíntesis de aminoácidos, Ruta HOG de MAPK
<i>Aspergillus sp</i>	Ruta HOG de MAPK

2.1.5. Nuevas consideraciones

El hecho en sí de ser levaduras no consideradas típicamente patógenas, dificulta el conocimiento de su epidemiología, de sus mecanismos de infección, es decir, de la capacidad patógena que tengan en sí mismas para causar una infección. Estas levaduras patógenas oportunistas, como cualquier microorganismo oportunista, dependerán principalmente del estado inmunitario del hospedador para que puedan llegar a causar una infección. Esta variedad de microorganismos emergentes ha hecho que muchos de los conceptos de virulencia, patogénesis, rasgo de virulencia, etc., sean reconsiderados. De manera que actualmente se propone considerar los términos de virulencia y patogenicidad en base al resultado de la interacción microorganismo-patógeno. El resultado final puede ser causar daño en el hospedador, que a su vez se define en términos generales, como la

rotura de la estructura normal de un tejido/ o función del hospedador. Este daño podrá desencadenar una infección cuando interfiera en la homeostasis del hospedador (Casadevall y Pirofski, 2002). E incluso, la naturaleza de estas nuevas interacciones entre patógenos oportunistas y hospedador inmunodeprimido, ha hecho que ciertas teorías, como son los Postulados de Koch deban ser reconsiderados (Casadevall y Pirofski, 2001).

2.2. Epidemiología de *S. cerevisiae*

S. cerevisiae es un ejemplo de levadura patógena emergente oportunista. Ha sido relacionada con diversos casos de fungemia, vaginitis e infección de órganos desde los años 50, de hecho el primer estudio fue en 1943, en el que describían que *S. cerevisiae* colonizaba el tracto respiratorio de un 7% de los pacientes que sufrían enfermedades pulmonares crónicas (Greer y Gemoets, 1943). El primer caso se describió en el año 1970, en un paciente con una prótesis en la válvula mitral (Stein y col., 1970); a partir de aquí el número de casos en los que se relaciona a esta levadura con la etiología de la enfermedad ha ido aumentando, incrementándose significativamente desde los años 90. Enache-Angouvant y Hennequin, (2005) determinaron un total de 92 casos documentados de infección invasiva causados por *Saccharomyces*, de los cuales 15 casos habían sido diagnosticados antes de los años 90 y 76 casos se diagnosticaron posteriormente. Observaron como todos los pacientes tenían al menos un factor de riesgo, de hecho 47 pacientes habían sufrido cateterismo y a 45 pacientes se les había administrado terapia antibiótica, principales factores de predisposición para *S. cerevisiae*. Del total de los casos, en 37 se había determinado que el agente etiológico era *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Estos casos se confirmaron mediante técnicas de tipificación para la identificación del patógeno y/o bien se tenía conocimiento de que dichos pacientes habían recibido un tratamiento con este probiótico. En la Anexo I se recogen los casos clínicos en los que se ha relacionado a *S. cerevisiae*, así como al agente probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii*, desde los años 70 hasta el 2006, detallando tanto la enfermedad subyacente, los factores de predisposición, las fuentes de aislamiento y el resultado de la infecciones (de Llanos y col., 2006b; Enache-Angouvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005;).

2.2.1. Causas del aumento de las infecciones atribuidas a *S. cerevisiae*

Anteriormente se comentaron cuales han sido las razones que explicarían el aumento de las levaduras patógenas oportunistas, en general. En el caso particular de *S. cerevisiae*, las razones son las mismas, sin duda el aumento de pacientes inmunodeprimidos, es la clave fundamental del aumento de los casos de infección por parte de esta levadura. Específicamente por el aumento del número de enfermos con SIDA (Pontón y col., 2000), pero también lo ha favorecido el empleo de agentes y terapias inmunosupresoras, como es el uso de terapias antimicrobianas continuadas en el tiempo, que debilitan el estado inmunitario de los pacientes, así como el uso de los catéteres intravasculares (Zerva y col., 1996). Y con este tipo de individuos se plantea como factor de riesgo, la administración de preparados que contengan células vivas de *S. cerevisiae* o el agente probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii* como parte de la dieta, para prevenir o tratar diarreas que puedan sufrir este tipo de pacientes (Muñoz y col., 2005).

Sin embargo, para *S. cerevisiae* ha sido muy importante el desarrollo de nuevos sistemas comerciales de identificación y caracterización de patógenos, como el sistema Vitek Yeast Biochemical Card y API 20C (de Llanos y col., 2004). Aunque existen otros métodos para este mismo fin como son el Uni Yeast Tek, ID 32C, MicroScan Yeast Identification (Hazen, 1995). En cualquier caso este tipo de sistemas, siempre mostrará cierta identificación insuficiente para los casos de levaduras inusuales que van emergiendo con el tiempo.

Además, es importante destacar que en el caso de *S. cerevisiae*, existe otro factor que ha limitado su visión como patógeno oportunista, y es precisamente la falta de acuerdo en la comunidad científica, sobre si la presencia clínica de esta levadura, es como consecuencia de una contaminación, o por que realmente es el agente causal de la infección (Byron y col., 1995; Pontón y col., 2000). De hecho en el ámbito hospitalario, existió durante mucho tiempo, la tendencia a identificar arbitrariamente cualquier aislado levaduriforme que se obtenía de muestras clínicas, dentro del género *Candida* antes que buscar quien era realmente el agente causal (Smith, 1996; Sobel y col., 1993).

2.2.2. Vías de entrada

Las características epidemiológicas de *S. cerevisiae* no se conocen todavía. Se sabe que esta levadura puede colonizar el tracto respiratorio, genitourinario y gastrointestinal de

forma inocua en el hombre (Kwon-Chung y Bennet, 1992; Salonen y col., 2000), sin causar enfermedad alguna, por lo menos aparentemente. Sin embargo, se desconoce si forma parte de la microbiota del aparato digestivo o se comporta como un comensal transitorio relacionado con la ingestión de alimentos contaminados con esta levadura (Enache-Angouvant y Hennequin, 2005).

Se plantea que existen dos puertas de entrada de *S. cerevisiae* a la sangre, y pueda así desarrollar una fungemia:

a) Translocación a través de la barrera intestinal

Se cree que la translocación a partir de lesiones en la mucosa del tubo digestivo, tras la ingestión de células vivas de *S. cerevisiae* (Muñoz y col., 2004), podría ser una vía de entrada, de la misma manera que ha sido documentado para algunas bacterias (Wells y col., 1988) y en estudios experimentales empleando *C. albicans* (Cole y col., 1996). Estas células vivas pueden ingerirse de forma inadvertida con alimentos y bebidas que hayan sufrido algún problema en la cadena de esterilización, o con alimentos fermentados de forma tradicional y bebidas no filtradas o contaminadas. O bien a través de una ingestión consciente de productos dietéticos o del agente probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Este modo de transmisión se facilita cuando suceden condiciones que incrementan la población de levaduras en el tracto intestinal (Ej. la dieta o tratamiento con antibióticos antibacterianos) o que dañen la mucosa intestinal (Ej. episodios de diarreas, el uso de inmunosupresores) (Fleet y Roostita, 2006).

b) Adquisición nosocomial

La segunda puerta de entrada es la adquisición nosocomial a través de los sitios de inserción de los catéteres intravenosos (Hennequin y col., 2000). Una manipulación inapropiada por parte del personal sanitario, puede causar una contaminación de los catéteres que se emplean habitualmente en la nutrición parenteral (Bouakline y col., 2000; Salonen y col., 2000), aunque también se han descrito casos en los que los trabajadores mostraban una colonización persistente en sus manos de esta levadura, incluso después de un lavado vigoroso (Hennequin y col., 2000). Sin embargo, la infección nosocomial de *S. cerevisiae* no solo ocurre a través de los catéteres, sino que se han descrito casos de transmisión a través de ambiente o incluso una transmisión persona a persona (Cassone y

col., 2003; Olver y col., 2002; Zerva y col., 1996). Incluso se han descrito casos de autoinoculación (Fung y col., 1996; Jensen y col., 1976). En relación a las infecciones nosocomiales, un factor de riesgo importantísimo es la administración del probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii*, principalmente entre los pacientes inmunodeprimidos, pero no solo por el riesgo que supone administrarlo, que de hecho existen numerosos casos clínicos en los que se ha demostrado que hay una relación directa entre la infección de los enfermos y la administración del probiótico (Basseti y col., 1998; Cimolai y col., 1987; Cesaro y col., 2000; Cairoli y col., 1995; Fredenucci y col., 1998; Hennequin y col., 2000; Lherm y col., 2002; Manzella y col., 1989; Niault y col., 1999; Pletincx y col., 1995; Rijnders y col., 2000; Riquelme y col., 2003; Sethi y Mandell, 1988; Viggiano y col., 1995), sino porque la manipulación hospitalaria de los paquetes o capsulas en los que se distribuye, haya sido foco de infección. Se sabe que cuando se abren las capsulas del probiótico para la administración a través de un tubo nasogástrico, células viables se dispersan por el aire hasta 1 metro de distancia, pudiendo transmitirse a través del aire, ya que las células de levadura persistirán durante 2 horas sobre la superficie de las habitaciones o contaminando las manos del personal. De hecho hay algunos casos en los que se ha descrito como pacientes de camas contiguas a otros a los que se les administró el probiótico sufrieron una infección por éste (Cassone y col., 2003; Lherm y col., 2002; Perapoch y col., 2000).

2.2.3. Tipos de infecciones

Las infecciones causadas por *S. cerevisiae* están principalmente relacionadas con personas que muestran los factores de riesgo comentados anteriormente, y por tanto muestran cierta inmunodepresión, haciéndoles más vulnerables para sufrir una infección oportunista. Sin embargo, en el pasado se registraron infecciones graves producidas por *S. cerevisiae* en pacientes que no mostraban factores de predisposición obvios, únicamente haber ingerido alimentos dietéticos que contenían células viables de esta levadura (Jensen y col., 1976), aunque recientemente también se ha presentado algún caso, en concreto Smith y colaboradores (2002) mostraron un caso de fungemia e infección en un injerto de la aorta en un adulto inmunocompetente causado por *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae puede causar una gran variedad de síndromes clínicos, que van desde infecciones superficiales a invasivas, muchas veces indistinguibles de los observados para la candidiasis invasiva (Enache-Angouvant y Hennequin, 2005). En la Tabla 4 se detallan algunos de estos síndromes, así como las referencias de los casos clínicos en los que se

describen (Bouza y Muñoz, 2004; Enache-Angouvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005; Murphy y Kavanagh, 1999).

Tabla 4. Síndromes causados por *S. cerevisiae*.

Síndrome	Referencia
Neumonía	Tawfik y col., 1989; Aucott y col., 1990; Doyle y col., 1999
Empiema	Chertow y col., 1991
Obstrucción uretral bilateral por bolas mitóticas	Senneville y col., 1996
Infección hepatobiliar	Aucott y col., 1990; Heath y col., 2000
Peritonitis	Dougherty y col., 1982; Tiballi y col., 1995; Snyder, 1992; Mydlik y col., 1996
Vaginitis	Posteraro y col., 1999; McCullough y col., 1998b; García-Martos y col., 1996; Nyirjesy y col., 1995
Esofagitis	Doyle y col., 1990; van Doorn y col., 1995; Konecny y col., 1999
Infección del tracto urinario	Eng y col., 1984; Senneville y col., 1996
Celulitis	Almanza y col., 1998;
Choque séptico con fiebre	Chertow y col., 1991
Asociada a la enfermedad de Crohn	Bernstein y col., 2001; Darroch y col., 1999; Candelli y col., 2003; Main y col., 1988; Halfvarson y col., 2005
Enfermedades autoinmunes	Barnes y col., 1990; McKenzie y col., 1990; Giaffer y col., 1992; Lindberg y col., 1992; Barta y col., 2003; Saibeni y col., 2003; Teml y col., 2003; Walter y col., 2004; Krause y col., 2003; Czaja y col., 2004
Asma	Belchi-Hernandez y col., 1996
Diarreas	Candelli y col., 2003
Infección oral en niños	Debelian y col., 1997; Fiore y col., 1998
Fungemia	Cimolai y col., 1987

Entre las infecciones superficiales *S. cerevisiae* se ha descrito como causa de vaginitis y de balanitis en sus parejas (García-Marcos y col., 1996; McCullough y col., 1998b; Posteraro y col., 1999; Wilson y col., 1988). La incidencia en la población varía según el estudio realizado, variando desde un 0,45% a un 1,06% (Murphy y Kavanagh, 1999). Las vaginitis causadas por *S. cerevisiae* pueden ser tanto sintomáticas como asintomáticas (Agatensi y col., 1991), e incluso se considera que esta levadura puede ser la responsable de algunos casos diagnosticados como candidiasis, ya que los síntomas son idénticos. Quizás el caso más llamativo, por la naturaleza de la infección, fue un caso en que pudo demostrarse que la cepa causal de un episodio de vaginitis era la misma que se obtenía de los dedos del esposo de la paciente y de la levadura con que éste elaboraba pan en un establecimiento de su propiedad (Nyirjesy y col., 1995).

La fungemia es la manifestación clínica probablemente más grave y más indiscutible de la infección invasiva por *S. cerevisiae*, y la mejor demostración de su papel patógeno

(Cimolai y col., 1987). Suele ocurrir en pacientes en situación crítica, incluyendo pacientes con SIDA, cáncer, transplantados, ingresados en unidades de cuidados intensivos, politraumatizados y portadores de catéteres intravasculares (Bouza y Muñoz, 2005). Aunque, ocasionalmente ocurre en pacientes sin situación aparente de riesgo (Rijnders y col., 2000). Y la administración del probiótico *S. cerevisiae* var. *bouardii* ocurre como antecedente en un elevado porcentaje de los pacientes con fungemia por *Saccharomyces*, o que se encuentren en las proximidades de pacientes que reciben estos preparados. En algunos casos la fungemia puede complicarse con endocarditis que puede ocurrir tanto sobre válvulas naturales como prostéticas (Ruiz-Esquide y col., 2002; Ubeda y col., 2000).

Por último es importante señalar que no se conocen los síntomas específicos asociados a una infección por *S. cerevisiae*. En la mayoría de los casos se observa fiebre, náuseas, malestar y sudores que suelen desaparecer cuando se suspende la administración oral del agente probiótico o cualquier producto dietético, en el que esté incluida la levadura *S. cerevisiae* (Jensen y col., 1975).

2.2.4. Tratamientos

Los estudios de sensibilidad frente a antifúngicos de *S. cerevisiae* son escasos y en general demuestran una buena respuesta *in vitro* a anfotericina B y 5-fluorocitosina, y algo más variable a los derivados azólicos (Barchiesi y col., 1998; Kontoyiannis y May 2000; Pfaller y col., 1997; Salonen y col., 2000; Sobel y col., 1993; Zerva y col., 1996). Los datos referentes al tratamiento más adecuado para las infecciones causadas por esta levadura, provienen de experiencias individuales, de manera que es difícil establecer un agente antifúngico de elección. Por ello se cree que para controlar la infección de algunos enfermos, bastaría con la retirada de los catéteres, el factor que constituye una de las puertas de entrada de *S. cerevisiae*. De hecho se establecen como medidas preventivas la retirada de los catéteres intravenosos y la suspensión de la administración de *S. bouardii* por vía enteral (Bouza y Muñoz, 2005). Y como tratamiento empírico, hasta que no conozca la actividad de otros antifúngicos, es la administración de anfotericina B o fluconazol (Enache-Angouvant y Hennequin, 2005).

Aunque la mayoría de los pacientes con fungemia por *S. cerevisiae* tienen buena evolución (Cassone y col., 2003), se han descrito casos en los que la muerte sobrevino como consecuencia de un choque séptico (Perapoch y col., 2000; Piarroux y col., 1999; Ubeda y col., 2000).

2.3. Factores de virulencia

Los factores de virulencia, que pueden participar en las infecciones causadas por la levadura oportunista *S. cerevisiae*, no se conocen con exactitud, su reciente introducción en el ámbito hospitalario y su carácter oportunista de baja virulencia, ha dificultado el estudio de los mecanismos de virulencia que emplea esta levadura. De hecho la información disponible aborda principalmente estudios *in vitro*, donde se han ensayado diversos rasgos fenotípicos, comparando la respuesta que tienen los aislados clínicos frente a cepas industriales, a priori no virulentas. A continuación se detallan los rasgos fenotípicos que potencialmente se relacionan con el origen clínico y/o la virulencia de *S. cerevisiae*.

2.3.1. Secreción de hidrolasas extracelulares

La secreción de enzimas hidrolíticas proporciona a la célula fúngica acceso a nutrientes del medio. En este proceso, las enzimas actuarán degradando las barreras estructurales de las células del hospedador alterando la función y/o viabilidad de las mismas, y de esta manera se facilitará la invasión a los tejidos (van Buril y Magee, 2001). Entre las enzimas hidrolíticas estudiadas por la posible implicación con la virulencia de *S. cerevisiae*, se encuentran las proteasas y las fosfolipasas (de Llanos y col., 2006a; McCusker y col., 1994a).

a) Proteasas

Estas enzimas hidrolíticas no constituyen un factor relacionado directamente con la virulencia de *S. cerevisiae*, ni tampoco con el carácter clínico de las cepas recuperadas de enfermos (de Llanos y col., 2006a; McCusker y col., 1994a). Los estudios realizados hasta el momento han empleado diversos sustratos, como la gelatina, caseína y el BSA, y han demostrado que aunque parece existir una mayor tendencia a que produzcan y secreten proteasas los aislados clínicos frente a las cepas industriales, no es significativa. Los ensayos de virulencia realizados en modelos murinos, no mostraron una relación directa entre este factor y la virulencia observada *in vivo* (McCusker y col., 1994b).

b) Fosfolipasas

Dicha actividad facilita la penetración inicial del hongo, ya que son capaces de degradar superficies celulares, permitiendo así la adhesión e invasión posterior. Dependiendo del modo de actuación y la molécula de fosfolípido diana, las fosfolipasas se dividen en diferentes subclases: fosfolipasa A, B, C y D, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa-transacilasa. *S. cerevisiae* posee el gen *PLB1*, que codifica una proteína con funciones lisofosfolipasa y fosfolipasa B (Lee y col., 1994). Incluso, se ha visto que esta misma proteína podría tener también una función aciltransferasa (Witt y col., 1984a y b). De manera que *S. cerevisiae*, cuenta con la actividad enzimática necesaria para degradar un medio empleado para su detección, la yema de huevo (Ghannoum, 2000).

2.3.2. Crecimiento a altas temperaturas

La capacidad de crecer a la temperatura del cuerpo, 37° C, y más aún dentro del rango de temperaturas indicativas de fiebre, 38-42° C, es un requisito para que tengan lugar las infecciones sistémicas (van Burik y Magee, 2001). Estudios realizados en base a la capacidad de crecer a altas temperaturas de 42° C, mostraron que se trata de un factor asociado tanto al carácter clínico de los aislados recuperados de enfermos (de Llanos y col., 2006a; Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994a), así como a la virulencia de los mismos, ya que eran capaces de persistir y colonizar ratones sanos CD-1 (McCusker y col., 1994b).

2.3.3. Variación fenotípica o “switching”

Se trata de un mecanismo de plasticidad fenotípica desarrollado para adaptarse rápidamente a las diferentes condiciones ambientales, que muestran muchos patógenos fúngicos, que como resultado se observa un cambio en el aspecto colonial. Este fenómeno es reversible y muestra una frecuencia de entre 10^{-3} y 10^{-5} por división celular. Aunque, parece proporcionar ventajas a los patógenos en la invasión del hospedador y evasión de las defensas del mismo, no se conoce con exactitud el papel que juega en la infección (van Burik y Magee, 2001).

Dicho fenómeno se observa de forma espontánea en *S. cerevisiae*, sin necesidad de mutagénesis. Esta variación fenotípica ocurre con mayor frecuencia entre los aislados clínicos y virulentos de *S. cerevisiae in vitro*, con independencia de la temperatura empleada, dando lugar a varios fenotipos coloniales e irreversible (Clemons y col., 1997). Sin embargo, entre las cepas avirulentas se observa un único fenotipo variable de colonia y mayor frecuencia de mutaciones “petites”, no reversibles. Se ha determinado que la formación de células “petites” está inversamente correlacionada con la virulencia, siendo éstas menos virulentas en modelos murinos. Además la formación de “petites” *in vivo*, es significativamente menor para las cepas parentales con mayor virulencia (Weger y col., 2002). Sin embargo, no se tiene conocimiento sobre el papel que puede tener la variación fenotípica en la virulencia de *S. cerevisiae* (Murphy y Kavanagh, 1999).

2.3.4. Dimorfismo

El dimorfismo o morfogénesis, se refiere a la capacidad que muchas especies fúngicas tienen de interconvertirse de una forma levaduriforme a filamentosa, como hifas verdaderas o pseudohifas. Este cambio sucede como respuesta a cambios que ocurren en el medio que los rodea, y para muchos patógenos de plantas y animales es determinante en su virulencia (Wittenberg y La Valle, 2003).

En el caso de *S. cerevisiae*, la diferenciación de levadura a la forma pseudohifal puede permitir a las células vegetativas buscar nutrientes bajo condiciones ambientales adversas, de manera que las células pasan de tener un patrón de gemación bipolar a otro unipolar, alargándose y dando lugar al crecimiento pseudohifal (Gimeno y col., 1992). Algunas cepas diploides cambian a su morfología pseudohifal, en condiciones de limitación de nitrógeno y ausencia de una fuente de carbono abundante, mientras que en las cepas haploides el ayuno en nitrógeno produce una invasión del medio sólido en que se encuentren (Roberts y Fink, 1994). Además, se ha descrito que el crecimiento pseudohifal en *S. cerevisiae* puede inducirse ante la presencia de algunos alcoholes, los cuales pueden venir del propio metabolismo de la levadura (Lorenzo y col., 2000), ante la presencia de antibióticos como el acivicin, un inhibidor de la γ - glutamil transpeptidasa (Miyake y col., 2003), ante una limitación de oxígeno y como respuesta a otros estreses no nutricionales, altas temperaturas y choque osmótico (Gagiano y col., 2002). Este crecimiento en forma de pseudohifas implica una dramática remodelación de la morfología celular y de la dinámica del ciclo celular (Gancedo, 2001).

Aunque la pseudofilamentación es un mecanismo de respuesta que sucede principalmente ante condiciones limitantes de nutrientes, se ha demostrado que los aislados clínicos de esta levadura muestran una mayor tendencia a desarrollar un crecimiento pseudohifal ante dichas condiciones limitantes, que otros aislados no clínicos (de Llanos y col., 2006a; Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b). La relación de este fenómeno con la virulencia *in vivo*, no parece ser clara. Las cepas más virulentas muestran mayor crecimiento pseudohifal (McCusker y col., 1994b), sin embargo, podría ser que *in vivo* las fuentes de nitrógeno no sean limitantes para *S. cerevisiae*, y no vea favorecido el desarrollo del crecimiento pseudohifal (Kingsbury y col., 2006).

Bases moleculares del dimorfismo

Una respuesta rápida ante cambios en el estado nutricional del medio, es esencial para la supervivencia de los organismos. Las rutas de señalización utilizadas para este propósito, perciben la señal del cambio, la transmiten al núcleo para regular finalmente la expresión de genes específicos. El resultado final es una respuesta fenotípica para adaptarse al cambio nutricional señalizado (Gagiano y col., 2002). En *S. cerevisiae*, el crecimiento pseudohifal que se desarrolla bajo limitación de nutrientes, está regulado por al menos dos rutas interconectadas, la ruta del cAMP-PKA y una de las rutas de las MAP kinasas envuelta en el crecimiento pseudohifal, que confluyen finalmente en la regulación del gen *FLO11*, responsable del crecimiento pseudohifal, la adhesión célula-célula, la adhesión a sustratos y la invasión del agar (Gancedo, 2001).

a) Ruta de las MAP Kinasas (Mitogen Activated protein Kinasas) implicada en crecimiento pseudohifal e invasivo

Las rutas de MAP Kinasas están implicadas en diferentes aspectos de la regulación celular y se encuentran muy conservadas en la evolución. Se encargan de la transmisión de señales que la célula recibe desde el exterior (cambios en la composición del medio, temperatura, presencia de determinados compuestos u hormonas, estrés físico, etc.) al núcleo activando finalmente los mecanismos necesarios para conseguir la adaptación y supervivencia celular. Los elementos básicos de este tipo de rutas son la MAPK, la kinasa de la MAPK (MAPKK, MKK o MEK) y la kinasa de la MAPKK (MAPKKK o MEKK) y su activación se produce por fosforilación sucesiva de estos tres elementos (Widmann y

col., 1999). Además de este módulo básico de MAPKs también intervienen otros elementos dentro de estas rutas, como son los receptores situados en la superficie celular, unas proteínas intermedias entre el receptor y el módulo de las MAPKs, encargadas de transmitir la señal, que generalmente son del tipo GTPasa o proteína quinasa (Widmann y col., 1999). Las primeras, también denominadas proteínas G, pueden encontrarse en dos conformaciones: unidas a GTP o unidas a GDP. La forma unida a GTP es la activa y por tanto es capaz de transmitir la señal correspondiente. Además, estas proteínas tienen capacidad GTPásica, hidrolizando el GTP a GDP y quedando de forma inactivada.

Una vez activada la MAPK, ésta transmite la señal fosforilando otras proteínas, generalmente proteínas quinasas y factores de transcripción que desencadenarán la respuesta necesaria. Además existen otras proteínas que no están implicadas directamente en la transmisión de la señal a través de estas rutas, pero que influye en su actividad y regulación. En *S. cerevisiae* se conocen cinco MAPKs involucradas en la respuesta a diversos estímulos celulares y se denominan Hog1, Fus3, Kss1, Slt2 y Smk1, tal y como se muestra en la Figura 2. Todas ellas juegan papeles fundamentales, si bien delecciones múltiples no implican la letalidad de la célula (Madhani y Fink, 1997). Hog1 está encargada de la respuesta celular que se produce cuando se detecta alta osmolaridad en el medio. Fus3 está relacionada con el apareamiento y la respuesta a feromonas. Slt2 se encarga de generar la respuesta necesaria para mantener la integridad celular. Smk1, está implicada en la formación de la pared de la espora y Kss1 está involucrada en el crecimiento pseudofilamentoso o invasivo (Gancedo, 2001). Aunque también se describió una posible nueva ruta de MAPK que estaría implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular durante el crecimiento vegetativo, y que actuaría en paralelo con la de Slt2 (Lee y Elion, 1999). La ruta conocida por las siglas SVG (de “STE-vegetative growth”) estaría constituida por las quinasas Ste20, Ste11, Ste7, la MAPK Kss1 y el factor de transcripción Ste12, todas ellas proteínas comunes también a las rutas de respuesta a feromonas y de crecimiento invasivo.

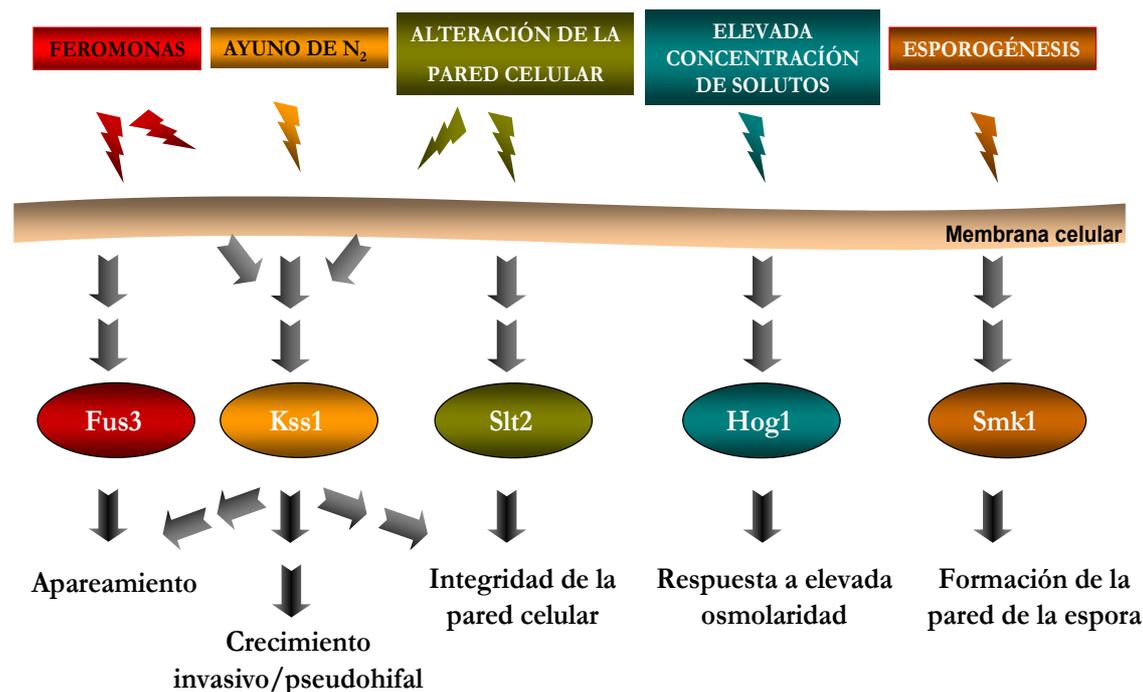


Figura 2. MAPKs descritas en *S. cerevisiae*. Estímulos que las activan y respuestas que generan.

Ruta de pseudofilamentación e invasión

El crecimiento pseudohifal de las células diploides de *S. cerevisiae* se induce en condiciones de ayuno de nitrógeno, o ante fuentes de carbono pobres en el medio de cultivo, de forma que las células pasan de tener un patrón de gemación bipolar a otro unipolar, alargándose y dando lugar a un crecimiento pseudofilamentoso (Gimeno y col., 1992). En el caso de las células haploides, el ayuno de nitrógeno produce una invasividad del medio sólido en el que se encuentran (Roberts y Fink, 1994).

La ruta del crecimiento pseudohifal e invasivo, mediada por Kss1, comparte elementos comunes con la ruta de apareamiento (Liu y col., 1993), y se ha propuesto que un posible sensor de esta ruta, podría ser Sho1, ya que se requiere para el crecimiento pseudohifal (O'Rourke y Herskowitz, 1998) (Figura 3). La señal sería transmitida desde el sensor de la membrana plasmática hasta la GTPasa Ras2 (Gimeno y col., 1992), que necesita las proteínas Bmh1 y 2, para transmitirla de nuevo (Gelperin y col., 1995). En esta ruta también actúa la GTPasa Cdc42, por debajo de Ras2 (Mösch y col., 1996), siendo esencial su presencia para activar a la PAK Ste20 (Meter y col., 1996). A continuación, Ste20 transmite la señal al módulo de MAPK compuesto por Ste11, Ste7 y Kss1. Finalmente, la

MAPK Kss1 promueve la transcripción de numerosos genes implicados en la pseudofilamentación o el crecimiento invasivo (entre ellos el gen *FLO11/MUC1*), cuya modulación se produce a través de la unión conjunta de los factores de transcripción Ste12 y Tec1 a una secuencia que posee en la zona promotora, denominada FRE (de Filamentation Responsive Element). Dig1 y Dig2 actúan como represoras de Ste12 también en esta ruta, por lo que mutantes *dig1 dig2* muestran una activación constitutiva de la transcripción (Cook y col., 1996; Tedford y col., 1997).

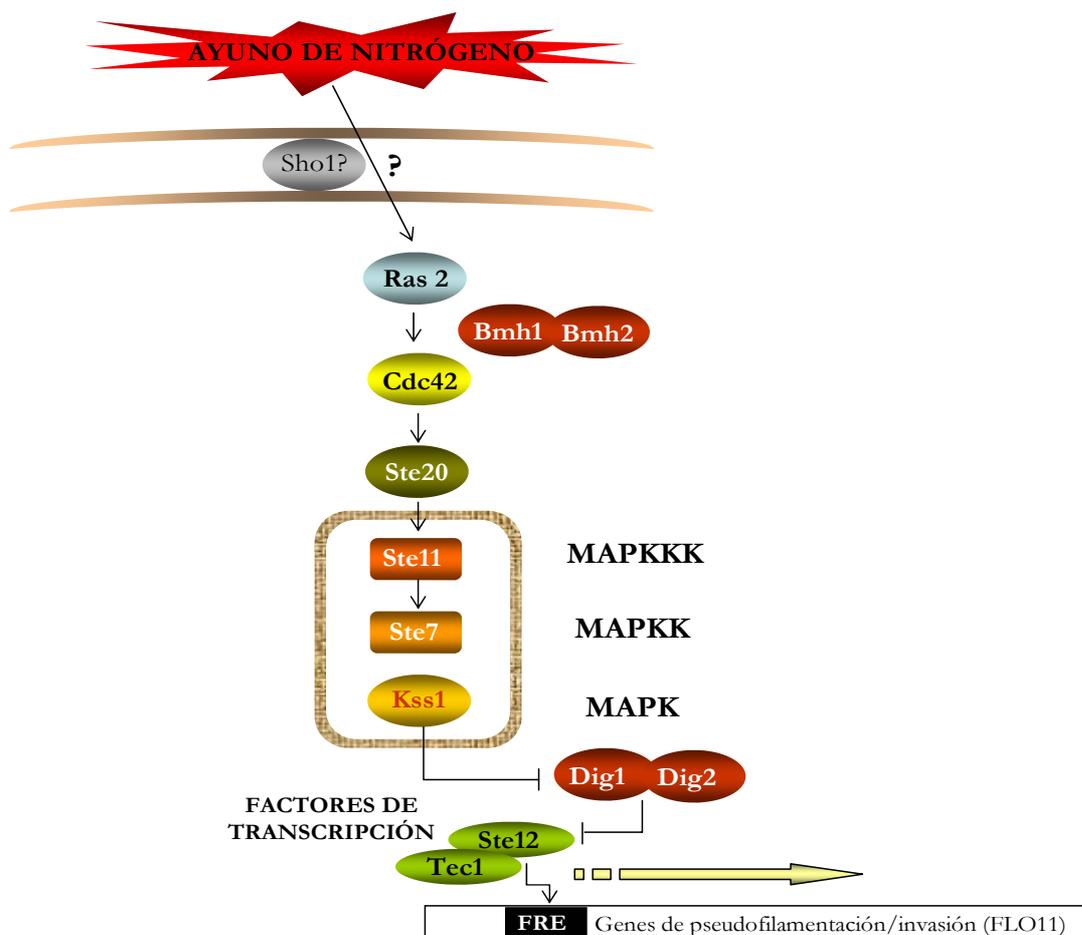


Figura 3. Esquema de la ruta del crecimiento pseudohifal e invasivo en *S. cerevisiae*

b) Ruta del AMP cíclico (AMPc)

El papel central de esta ruta, es el de detectar nutrientes del medio y regular diversos procesos biológicos incluyendo el crecimiento, metabolismo, resistencia a estrés y la diferenciación pseudohifal. En la membrana celular existen numerosos receptores que

recientemente se han relacionado con la regulación del crecimiento pseudohifal, a través de esta ruta de transducción. Entre ellos destaca el sistema receptor GPCR y la permeasa de amonio Mep2, que percibirán las condiciones nutricionales de medio y transmitirán la señal al interior celular, activando la adenilato ciclasa a través de la subunidad α Gpa2 del sistema GPCR y la GTPasa Ras2 (Figura 4) (Xuewen y col., 2000). La síntesis de AMPc por la adenilato ciclasa modula positivamente la actividad de las proteínas quinasas (PKA), Tpk1, Tpk2 y Tpk3, las cuales controlan la activación del factor de transcripción Flo8, que se encarga de regular en último término la expresión del gen *FLO11/MUC1* (Xuewen y col., 2000). El mecanismo exacto por el cual este factor de transcripción estimula la activación de sus genes diana, no se conoce todavía, pero debe ser a través de una unión con las regiones promotoras de dichos genes (Gagiano y col., 2002).

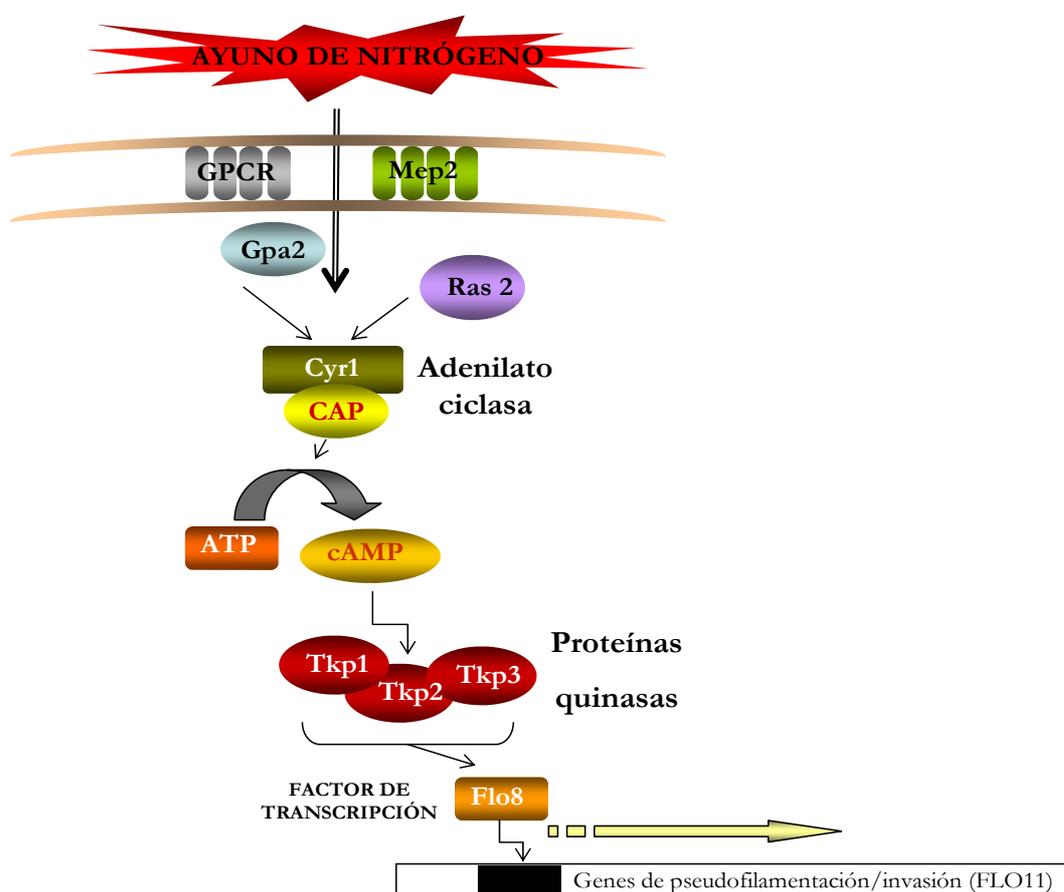


Figura 4. Esquema de la ruta del cAMP en *S. cerevisiae*

2.3.5. Genes y rutas implicados en la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae*

Muchas señales de transducción y rutas metabólicas conservadas, son críticas para la patogénesis de hongos (Lengeler y col., 2000). Estas mismas rutas se conocen perfectamente en *S. cerevisiae*, en parte porque es un microorganismo muy bien caracterizado y que permite ser manipulado fácilmente, al contrario que ocurre en otras levaduras patógenas como *C. albicans*. Teniendo en cuenta el amplio conocimiento genético que se tiene de *S. cerevisiae*, junto con el hecho de ser una levadura que muestra una estrecha relación filogenética con especies patógenas del género *Candida* (Bowman y col., 1992; Lott y col., 1993), ha permitido estudiar los factores genéticos necesarios para la supervivencia *in vivo* de otros patógenos fúngicos. Sin embargo, el aumento de casos clínicos causados por *S. cerevisiae*, su capacidad para infectar ratones (Byron y col., 1995; Clemons y col., 1994), también ha permitido estudiar los genes y las rutas de señalización y metabólicas que pueden estar involucradas en su supervivencia *in vivo* empleando modelos murinos (Goldstein y McCusker, 2001; Kingsbury y col., 2006).

a) Auxotrofías y supervivencia *in vivo*

El estudio de las mutaciones de auxotrofia, permiten valorar *in vivo*, aspectos clave de la biología del hongo, como por ejemplo, la concentración de un nutriente requerido, combinado con la capacidad de consumo de dicho nutriente *in vivo*, el efecto fenotípico de la limitación de nutrientes necesarios, *in vivo*, y posiblemente el bloqueo específico de algunas rutas, ya que indicarán algún fenotipo de auxotrofia (Goldstein y McCusker, 2001). A continuación se detallan las auxotrofías que muestran una relación directa con la supervivencia de *S. cerevisiae*, *in vivo*:

- ✿ El mutante *ade2 Δ* , que bloquea el último paso de la ruta de biosíntesis de purinas, muestra un defecto en la supervivencia *in vivo*.
- ✿ El mutante autotrófico para leucina (*leu2 Δ*), causa una severa disminución de la supervivencia *in vivo*.

b) Dimorfismo y supervivencia *in vivo*

Como se comentó anteriormente, el dimorfismo es un factor de virulencia muy importante para muchos de los patógenos fúngicos, en la infección de humanos. El cambio reversible entre célula levaduriforme y pseudohifa ha sido caracterizado en *S. cerevisiae*. Este fenómeno está regulado por la ruta de transducción de las MAPKs, mediada por el factor de transcripción Tec1 y la ruta de transducción del AMP cíclico, mediado por el factor de transcripción Flo8. Ambos factores de transcripción finalmente activan la transcripción del gen *FLO11* (Rupp y col., 1999), entre otros, que codifica la floculina Flo11 (Lambrechts y col., 1996).

✿ Los mutantes simples *flo8Δ*, *tec1Δ* y el doble mutante *flo8Δ tec1Δ*, muestran cierta deficiencia en la supervivencia *in vivo*. Sin embargo, esta deficiencia no es tan crítica como la que experimentan mutantes deficientes en dimorfismo de *C. albicans* (Schweizer y col., 2000).

Existen rasgos de virulencia, importantes en la supervivencia de ciertas especies, en concreto, como es el caso de la presencia de capsula para *C. neoformans*. De la misma manera se plantea que el dimorfismo puede ser importante para la supervivencia de ciertas especies de *Candida*. Sin embargo, otras especies como *C. glabrata*, considerada una levadura patógena oportunista, causante actualmente del 20% de los casos de candidemia sintomática (Dickema y col., 2002), muestra una capacidad limitada de pseudofilamentar *in vitro* (Csank y Haynes, 2000), mientras que *in vivo*, no forma pseudohifas (Fidel y col., 1999). Este comportamiento es muy similar a lo que se observa *in vivo*, para *S. cerevisiae* (Clemons y col., 1994), lo cual no es de extrañar, si se tiene en cuenta la estrecha relación filogenética de estas dos levaduras (Lott y col., 1993). Estas observaciones permitieron abordar el papel de las rutas y los genes implicados en la captación, transporte y metabolismo del nitrógeno y compuestos de carbono, en la supervivencia *in vivo* (Kingsbury y col., 2006). Se ha descrito que, teniendo en cuenta las fuentes potenciales de nitrógeno que *S. cerevisiae* puede encontrar *in vivo* (amonio, urea y aminoácidos), no necesitará cambiar a su forma pseudohifal para sobrevivir, ya que puede emplear una gran variedad de fuentes de nitrógeno, que no limitarán su crecimiento, como para que sufra el cambio dimórfico. Por otro lado, fuentes de carbono pobres presentes en el medio, también pueden llevar a dicho cambio. Sin embargo, puesto que en el suero murino la glucosa es el azúcar predominante y es también la fuente de carbono preferida para las levaduras, *S. cerevisiae* no tendrá que alterar su crecimiento vegetativo para sobrevivir *in vivo*. De manera que la incapacidad de

S. cerevisiae (y *C. glabrata*) de formar pseudohifas *in vivo*, se atribuye a las condiciones ambientales que puede encontrar. Pero de todos modos, se plantea que algunos genes de regulación del nitrógeno serán importantes *in vivo* para estas levaduras, de manera que la transición dimórfica es importante en la patogenicidad.

c) Metabolismo de carbohidratos

La hidrólisis de carbohidratos de almacenamiento como el glucógeno, parece tener una contribución en la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la hidrólisis de la trehalosa parece tener una gran influencia. Esta levadura acumula ambos carbohidratos en condiciones de limitación de nitrógeno, bajas concentraciones de carbohidratos y estrés osmótico y térmico (Eleuterio y col., 1993; Hottiger y col., 1987; Lillie y Pringue, 1980; Parrou y col., 1999). Puesto que la hidrólisis de glucógeno y trehalosa puede aumentar la supervivencia durante una limitación de carbono (Sillje y col., 1999), el gran papel que tiene *in vivo* solo la hidrólisis de trehalosa sugiere que la importante función de la trehalosa puede deberse a un papel adicional en la correcta renaturalización de las proteínas en la recuperación tras sufrir estrés (De Virgilio y col., 1994; Parrou y col., 1997; Singer y Lindquist, 1998).

d) Biosíntesis de aminoácidos

Entre los genes críticos para la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae*, destacan aquellos requeridos en la biosíntesis de aminoácidos. Concretamente los genes *ARO7* para la síntesis de aminoácidos aromáticos, *HOM3* para la biosíntesis de la metionina y treonina e *ILV2*, de la ruta de biosíntesis de isoleucina y/o valina, parecen ser esenciales para *S. cerevisiae in vivo*, ya que mutantes de estos genes dan lugar a una disminución de su supervivencia. Sin embargo, otros genes muestran un bajo o nulo requerimiento, como es el gen *MET3*, involucrado en la biosíntesis de metionina, *LYS9* para la lisina o *SPE3* para la espermidina (Kingsbury y col., 2006), así como los genes para la histidina (*HIS3*) y el triptófano (*TRP1*) (Goldstein y McCusker, 2001). No obstante, estos fenotipos de supervivencia para *S. cerevisiae* contrastan con otras levaduras como *C. neoformans*, donde los mutantes *met3*Δ, *lys9*Δ y *spe3*Δ ven atenuada tanto la supervivencia como la virulencia *in vivo* (Kingsbury y col., 2006). Estas diferencias de supervivencia *in vivo* podrían deberse a las diferencias entre

especies en cuanto a los principales nichos habitados *in vivo*, al transporte de compuestos de nitrógenos u otros requerimientos.

La necesidad de los genes *ARO7*, *HOM3* e *ILV2* para la supervivencia de *S. cerevisiae in vivo*, indicaría que la presencia y el transporte de la treonina, aminoácidos aromáticos, la isoleucina y/o la valina sucede a bajas concentraciones *in vivo*, o bien que los mutantes *aro7*Δ, *hom3*Δ o *ilv2*Δ den lugar a otros fenotipos que influyan en la supervivencia (Kingsbury y col., 2006).

e) Las proteínas de shock térmico, HSP

La exposición a elevadas temperaturas y otras formas de estrés a células y tejidos de una gran variedad de organismos, se produce la síntesis de proteínas conocidas como Hsp, o de “shock” térmico. De esta manera los organismos se vuelven más tolerantes a temperaturas extremas. *S. cerevisiae* produce proteínas estrechamente relacionadas con la familia de las Hsp90, Hsc82 y Hsp82, las cuales difieren en el patrón de expresión (Hsc82, expresa constitutivamente altos niveles, mientras que Hsp82 es más fuertemente inducible por calor), aunque presentan la misma función, crecer a altas temperaturas, requiriendo para ello altas concentraciones de cada proteína (Borkovich y col., 1989). El papel de estas proteínas en la patogénesis de *S. cerevisiae* ha sido investigado, estableciéndose que la sobreexpresión de Hsp90 (Hodgetts y col., 1996), aumenta la virulencia de cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, permitiendo la proliferación y persistencia en los órganos, de manera similar a los aislados clínicos de esta levadura (Clemons y col., 1994). Aunque no se ha establecido el papel que puedan tener estas proteínas en las patogénesis de esta levadura, quizás tenga que ver con el hecho de que estas proteínas son antígenos inmunodominantes y están asociadas con la inmunidad humoral protectora, como ocurre en el caso de *C. albicans* (Matthews y col., 1991).

3. Las técnicas moleculares, herramientas útiles para el estudio de la epidemiología de *S. cerevisiae*

La aparición de *S. cerevisiae* dentro del ámbito hospitalario, así como el incremento de los casos clínicos de diferentes infecciones causadas por esta levadura, ha impulsado la necesidad de emplear métodos fiables para confirmar la identidad de los aislados que se recuperan de los pacientes, como *S. cerevisiae*, así como distinguir entre cepas de esta especie. Además, estas técnicas se aplican para estudiar casos de recaídas, confirmando si la reinfección viene dada por una nueva cepa o por la persistencia de la cepa inicial, e incluso permiten estudiar el origen de la infección, principalmente en los casos donde se administra el probiótico *S. boulardii* (Hennequin y col., 2001). Además, hay que añadir que debido a la controversia que durante muchos años se mantuvo sobre la correcta nomenclatura y clasificación taxonómica de *S. boulardii* (McCullough y col., 1998b; McFaland, 1996; Mitterdorfer y col., 2002), puesto que en base a criterios fenotípicos es muy difícil la diferenciación entre esta levadura y *S. cerevisiae*, se han empleado numerosas técnicas moleculares, que han permitido distinguir claramente entre *S. boulardii* y otras cepas de *S. cerevisiae*, asumiendo que la asignación correcta del agente probiótico es *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Posterato y col., 2005; van der Aa Kuhle y Jespersen, 2003).

3.1. Métodos moleculares para la identificación de levaduras a nivel de especie

La biología molecular ha proporcionado métodos para caracterizar las levaduras a nivel de especie, técnicas basadas en el análisis de las regiones ribosomales, PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), PCR a tiempo real y otras como el empleo de microchips de DNA. Sin embargo, la metodología más utilizada para la identificación de aislados clínicos de *S. cerevisiae* se ha basado en las regiones ribosomales:

Métodos basados en el análisis de regiones ribosómicas

Los genes ribosómicos (5,8S, 18S, y 26S) se agrupan en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma entre 100 y 200 veces. En cada unidad de transcripción existen otras dos regiones, los espaciadores internos (ITS) y los externos (ETS), que se transcriben pero son procesadas y no forman parte de la molécula de rRNA final. A su vez, las unidades codificantes están separadas por los espaciadores intergénicos

IGS también llamados NTS. El gen 5S no se incluye en la unidad de transcripción previamente descrita pero aparece adyacente en la misma unidad de repetición en tándem en el caso de las levaduras (Figura 5). Estas regiones constituyen poderosas herramientas para el establecimiento de relaciones filogenéticas y la identificación de especies (Kurtzman y Robnett, 1998) por contener secuencias conservadas, así como una evolución concertada. Esto significa que la similitud entre las unidades de transcripción repetidas es mayor dentro de especies que entre unidades de distintas especies, debido a mecanismos como el entrecruzamiento desigual o la conversión genética (Li, 1997). Usando la información de estas regiones se han desarrollado distintos métodos para la identificación de especies de levaduras, bien mediante el estudio de secuencias de estas regiones o mediante el análisis de restricción de las mismas.

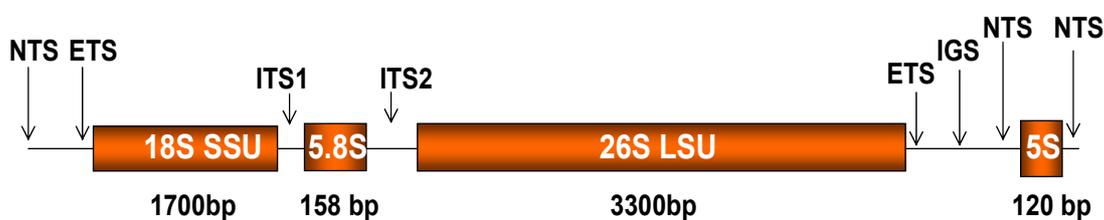


Figura 5. Esquema de la organización de los genes ribosomales.

En los estudios basados en la secuenciación de estas regiones, las dos regiones más utilizadas son las correspondientes a los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S (Kurtzman y Robnett, 1998) y el gen 18S (James y col., 1997). La disponibilidad de las secuencias en bases de datos, sobre todo en el caso de la región D1/D2 del gen 26S, hacen que esta técnica sea muy útil para asignar una levadura desconocida a una especie concreta cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99% (Kurtzman y Robnett, 1998).

Estudios de secuencias de las regiones ITS han permitido diferenciar entre cepas de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* (Piarroux y col., 1999; Posterato y col., 2005), así como la comparación de secuencias del gen ribosomal 18S (Smith y col., 2002), que permitieron identificar que el agente causal de una infección en un paciente sano, se debía a una cepa de la especie *S. cerevisiae*.

El análisis de restricción de estas regiones, se caracteriza por su fácil manipulación y su reproducibilidad. En muchos casos los tamaños de amplificado son específicos de especie, permitiendo la identificación y diferenciación de las mismas. Cuando los amplificados son del mismo tamaño no siempre corresponden a la misma especie y es necesario recurrir a la digestión de estos fragmentos para llegar a la definitiva identificación. En base a estas regiones se han desarrollado diferentes metodologías para estudiar levaduras asociadas con alimentos, por ejemplo la amplificación el gen ribosómico 18S y la región intergénica ITS1 (Dlauchy y col.,1999), o la amplificación de la región que incluye el gen 5,8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2, muy utilizada para diferenciar a nivel de especie levaduras industriales, muchas relacionadas con alimentos y bebidas (de Llanos y col., 2004; Esteve-Zarzoso y col., 1999; Fernández-Espinar y col. 2000; Guillamón y col., 1998).

Estas técnicas además se han empleado para la identificación a nivel de especies, de una amplia variedad de levaduras y hongos (Baleiras Couto y col., 1996), así como en el estudio de las especies que conforman el complejo *sensu stricto*, dentro del género *Saccharomyces* (Huffman y col., 1992). También han sido empleadas para en la identificación de aislados clínicos como la especie *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2004; McCullough y col., 1998c). Estas técnicas tienen un gran poder de resolución a nivel de especie, sin embargo muestran suficiente grado de polimorfismo dentro de especie, de hecho estas técnicas no permiten diferenciar entre *S. boulardii* y *S. cerevisiae* (McCullough y col., 1998b).

3.2. Métodos moleculares para la diferenciación a nivel de cepa

Para profundizar en las infecciones causadas por *Saccharomyces*, han sido de gran ayuda las técnicas que permiten caracterizar a nivel de cepa, pudiendo tener una aplicación en clínica, para estudiar casos de recaídas, o en estudios donde se busca el origen de infección. Entre las técnicas moleculares existentes para estudiar a nivel de cepa, empleadas para un fin clínico, destacan: el análisis de restricción del DNA mitocondrial, el estudio del perfil de cromosomas mediante la electroforesis de campo pulsante, el estudio de microsatélites, la amplificación por PCR de secuencias delta y otras técnicas como RFLPs generados de la digestión del DNA total con el enzima *Eco* RI, y la hibridación con el retrotransposon Ty917. Todas estas técnicas han permitido aclarar la epidemiología de las infecciones causadas por *S. cerevisiae*, permitiendo a su vez diferenciar las infecciones causadas específicamente por el preparado probiótico *S. boulardii*. Cada técnica muestra

distinto grado de polimorfismo, de manera que no existe una única técnica posible para discriminar una cepa (Baleiras Couto y col., 1996), sino que será necesaria la combinación de varias técnicas moleculares que permitirán llevar a cabo los estudios epidemiológicos (Mitterdorfer y col., 2002; Posterato y col., 2005) y que se detallan a continuación.

a) Análisis de restricción del DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* es una pequeña molécula de 65 a 80 kb cuyo grado de variabilidad puede ser puesto de manifiesto por restricción, mediante el empleo de enzimas del tipo GCAT utilizados para digerir el DNA total, no reconocen las secuencias ricas en GC ni ricas en AT del mtDNA. Por tanto, dado el bajo número de puntos de corte en el mtDNA, este da lugar a fragmentos de mayor tamaño que se puede visualizar claramente como bandas definidas, por encima de los fragmentos degradados del DNA nuclear. No todos los enzimas revelan el mismo grado de polimorfismo y es muy dependiente de la especie. En el caso concreto de *S. cerevisiae* los enzimas más apropiados para diferenciar a nivel de cepa son *HinfI* y *HaeIII* (Guillamón y col., 1994). La utilización del análisis de restricción no queda restringida a *Saccharomyces* (Querol y col., 1992b), ya que ha sido aplicada con gran éxito a otras especies de levaduras: *Candida zeylanoides* y *Debaryomyces. hansenii* (Romano y col., 1996), *Dekkera/Brettanomyces* (Ibeas y col., 1996), *Kluyveromyces* (Belloch y col., 1997) y *Zygosaccharomyces* (Esteve-Zarzoso y col., 2003; Guillamón y col., 1997).

Además, ha sido empleado para estudiar el origen de colonización de aislados clínicos de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* (de Llanos y col., 2004 y 2006b; Perapoch y col., 2000). Un estudio similar donde emplearon mayor número de enzimas para realizar la restricción de DNA mitocondrial y nuclear, permitió esclarecer que 7 casos de fungemia se debían específicamente a *S. boulardii* (Lherm y col., 2002).

b) Amplificación de secuencias δ

Las secuencias delta son elementos de 0,3 kb que flanquean los retrotransposones Ty1 (Cameron y col., 1979). En el genoma de levadura están presentes cerca de 100 copias de delta como parte de retrotransposones Ty1 o como elementos aislados. Sin embargo, estas secuencias delta están concentradas en regiones genómicas contiguas a los genes tRNA (Eigel y Feldmann, 1982). El número y la localización de estos elementos posee una cierta variabilidad intraespecífica, que fue aprovechada por Ness y colaboradores (1993)

para desarrollar cebadores específicos ($\delta 1$ y $\delta 2$) útiles para diferenciar cepas de *S. cerevisiae*. Estos autores muestran que la estabilidad de los elementos δ es suficiente para aplicar esta técnica como método de identificación de cepas de *S. cerevisiae* a nivel industrial. Algunos de estos trabajos muestran la gran variabilidad que revela esta técnica entre aislados de la especie *S. cerevisiae* con respecto a otras técnicas muy resolutivas como el análisis de restricción del mtDNA y la electroforesis de cromosomas (Fernández- Espinar y col., 2001; Pramateftaki y col., 2000).

c) Electroforesis de cromosomas en campo pulsante

En esta técnica, la aplicación alterna de dos campos eléctricos transversos provoca que los cromosomas cambien continuamente su dirección de migración, evitando que queden retenidos en el entramado del gel de agarosa y permitiendo separar los fragmentos de DNA de gran tamaño (Lai y col., 1989). Los parámetros que condicionan la resolución de las bandas son los intervalos de variación de la fuerza del campo eléctrico, la concentración de agarosa, la temperatura y el ángulo entre los campos eléctricos. El uso de la técnica ha resultado de gran interés para determinar las relaciones taxonómicas en levaduras (Belloch y col., 2000) y en la identificación de cepas de interés en las fermentaciones vínicas (Puig y col., 2000). Así, en cepas de *S. cerevisiae* el polimorfismo revelado es resultado de la adición o eliminación de largos fragmentos de DNA en cromosomas homólogos durante la evolución del genoma de las levaduras (Casaregola y col., 1998; Keogh y col., 1998; Wolfe y Shields, 1997).

El empleo de esta técnica, en combinación con otras técnicas ha sido utilizado en estudios de caracterización del origen de infección de cepas de *S. boulardii*, confirmando casos de fungemia por la administración directa de probiótico (Nyirjesky y col., 1995; Fredenucci y col., 1998; Perapoch y col., 2000; Piarroux y col., 1999), o por una infección nosocomial, al ser administrado a pacientes cercanos (Cassone y col., 2003). En base a esta técnica se han desarrollado otras que han permitido abordar estudios de diversidad entre aislados clínicos, como es el caso de Zerva y colaboradores (1996), quienes emplearon esta técnica tras digerir en DNA cromosómico con el enzima de restricción *Not I*, y observaron que entre los aislados clínicos analizados existía gran variabilidad genética, además de confirmar algunos posibles casos de transmisión nosocomial.

d) PCR de zonas repetitivas del genoma, los microsatélites

Existen zonas repetidas en el genoma que representan dianas potenciales para la identificación molecular a nivel de cepa por mostrar mucha variabilidad. Estas zonas son los microsatélites, de longitud variable que se repiten en tándem y al azar a lo largo del genoma. Los microsatélites tienen una longitud normalmente inferior a 10 pb. Los productos de amplificación generados presentan tamaños comprendidos entre 700 y 3500 pb aproximadamente, por lo que se pueden visualizar en geles de agarosa. La variabilidad presentada por estas zonas puede determinarse mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos (Lieckfeldt y col., 1993), o secuencias como cebadores en una reacción de PCR. Esta técnica ha sido utilizada para la caracterización de cepas de levadura aisladas de cerveza (Laidlaw y col., 1996) y vino (Quesada y Cenis, 1995), así como la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* alterantes de bebidas alcohólicas (Baleiras Couto y col., 1996).

Sin embargo, los microsatélites también se han empleado para tipificar otras especies de levaduras de interés clínico, como es el caso de *C. albicans* (Lunel y col., 1998) o *Aspergillus fumigatus* (Bart-Delabesse y col., 1998), siendo además una herramienta muy utilizada para caracterizar aislados clínicos de *S. cerevisiae*. Hennequin y colaboradores (2001), fueron los primeros en aplicar los microsatélites como método de tipificación entre aislados clínicos de *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, encontrando que la secuencia (CAG)⁹ en el locus 4 era específica para *S. boulardii*, pudiendo ser una rápida alternativa para la identificación de esta cepa. Posteriormente, diferentes secuencias de microsatélites se han empleado para estudiar la variabilidad genética entre aislados clínicos y de referencia de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* (Malgoire y col., 2005).

e) Digestión del DNA total con el enzima *Eco* RI

Clemons y colaboradores (1997), emplearon esta técnica para caracterizar un total de 60 aislados clínicos y no clínico. Y determinaron dos grupos en base a la presencia o ausencia de una banda de 3 Kb. Los aislados clínicos mostraron mucha heterogeneidad, exhibiendo baja clonalidad. Además mostraron que se trataba de una técnica que proporcionaba patrones muy estables y reproducibles. Esta misma técnica se aplicó posteriormente para estudiar la relación epidemiológica entre aislados clínicos y cepas comerciales de *S. cerevisiae* (McCullough y col., 1998a). En este estudio observaron que muchos de los pacientes habían sido infectados con cepas diferentes. Confirmaron que

para algunos pacientes que habían sufrido diferentes episodios de vaginitis, las cepas que habían ido causando las recaídas, eran diferentes. En este estudio determinaron también tres casos de infección nosocomial, y como en uno de los casos la cepa causante de vaginitis, compartía el mismo perfil que una cepa comercial. Por último esta misma metodología fue empleada por estos mismos investigadores (McCullough y col., 1998b), y demostraron que las cepas comerciales de *S. boulardii* compartía el mismo patrón entre sí y con respecto a otros aislados de *S. cerevisiae*, sugiriendo un cambio en la nomenclatura empleada al comercializar los productos que contienen *S. boulardii*, por el de *S. cerevisiae* var. *boulardii*, término aceptado en los manuales de taxonomía (Barnett y col., 1990; Vaughn-Martini y Martín, 1998), así como por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) (Greuter y col., 1994).

f) Hibridación con el retrotransposon Ty917

Esta técnica fue empleada en primer lugar por el grupo de Posterato y colaboradores (1999) y posteriormente se ha comprobado su eficacia junto con otras técnicas moleculares, como marcadores moleculares fiables para diferenciar cepas de *S. boulardii* de *S. cerevisiae* (Posterato y col., 2005). Básicamente su fundamento radica en una primera digestión del DNA total de levaduras con el enzima *Hind* I, la transferencia de los productos de la digestión a una membrana y a continuación la realización de un Southern blot, empleando como sonda la secuencia del retrotransposón Ty917. Esta metodología demostró una gran eficacia para diferenciar entre aislados no relacionados, principalmente para identificar correctamente cepas de *S. boulardii* y por tanto es aplicable en estudios epidemiológicos.

Antecedentes y objetivos

Durante mucho tiempo nuestro grupo de investigación ha trabajado con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por su interés agroalimentario. Los trabajos se han basado en análisis moleculares para el seguimiento de esta levadura en algunos procesos industriales como las fermentaciones vínicas. Además, también se ha dedicado especial atención al papel alterante que puede tener esta levadura en la industrial agroalimentaria, permitiendo el desarrollo de nuevas técnicas de detección rápida de ésta y otras levaduras con interés industrial. Sin embargo, el papel de esta levadura como posible patógeno emergente no surgió como posible tema de trabajo, hasta que el hospital Vall d'Hebron de Barcelona contactó con el grupo para resolver un problema de fungemia, en un neonato, asociada con el uso del agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Viendo el interés que empezaban a suscitar los casos de infecciones por *S. cerevisiae* y teniendo en cuenta la escasez de trabajos al respecto, el grupo decidió iniciar una nueva línea de investigación centrada en el estudio de esta especie de levadura desde el punto de vista patógeno. En el presente trabajo se aborda un estudio comparativo entre aislados clínicos y no clínicos desde diferentes puntos de vista, para intentar conocer más sobre el origen de colonización, mecanismos de infección, así como estudios moleculares que nos permitan diferenciar entre cepas patógenas y no patógenas. Creemos que estos estudios pueden ser de gran interés para todas aquellas industrias de alimentos que incluyen a *S. cerevisiae* en sus preparados. Para la realización de este trabajo, se contó con la colaboración del Hospital Val d'Hebron de Barcelona y el Hospital La Fe de Valencia a la hora de proporcionar aislados clínicos de *S. cerevisiae*. Además, se contó con un número variado de cepas industriales procedentes de la colección de cepas industriales generada por nuestro grupo durante años de estudio. De este modo, se pudo abordar un estudio comparativo entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*, con el fin de conocer el posible papel de esta levadura como patógeno emergente.

Estas consideraciones nos llevaron a plantear los siguientes objetivos en la presente Tesis Doctoral:

1. Estudio del origen de colonización de los aislados clínicos de *S. cerevisiae*

- 1.1. Identificación de los aislados clínicos mediante el análisis de restricción de la región 5,8S-ITS
- 1.2. Caracterización molecular de los aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*
- 1.3. Estudio de las relaciones filogenéticas mediante el análisis de secuencias del gen mitocondrial COX2

2. Estudio comparativo de la patogenicidad potencial de los aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*

- 2.1. Estudio de rasgos fenotípicos asociados con virulencia
- 2.2. Estudios de virulencia en sistemas *in vivo*
- 2.3. Estudio de la respuesta serológica tras la infección sistémica de *S. cerevisiae*

3. Estudio del grado de activación de las rutas de transducción de señales mediadas por las MAP quinasas Slt2 y Kss1.

- 3.1 Estudio del grado de activación/fosforilación de las MAPK Kss1 y Slt2 relacionadas con el crecimiento pseudohifal y la integridad de la pared celular.

Materiales y Métodos

1. Cepas microbianas

1.1. Aislados clínicos de *S. cerevisiae*

Para la realización de este trabajo se ha contando con un total de 105 aislados clínicos proporcionados por dos hospitales españoles. El servicio de Microbiología del hospital Vall d' Hebrón de Barcelona, suministró 101 aislados que habían sido recuperados de 89 pacientes externos y hospitalizados. Por otro lado el servicio de Microbiología del hospital La Fe de Valencia, proporcionó 4 aislados procedentes de 4 pacientes hospitalizados. En la Tabla 5 se detalla el origen de aislamiento y el hospital de origen de los 105 aislados totales. También se han incluido en el trabajo 3 cepas (YJM 128, YJM332 e YJM 223) como control de virulencia. El grado de virulencia de estas cepas fue descrito por Clemons y colaboradores (1994).

1.2. Cepas de *S. cerevisiae* de uso industrial

En este trabajo también se han incluido 16 cepas no clínicas, entre las que se encuentran 1 cepa comercial de *S. cerevisiae* var. *boulardii* de uso probiótico (Ultralevura) y 15 cepas de alimentos (7 cepas de referencia, proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y 8 cepas comerciales). Todas estas cepas se muestran en la Tabla 6, donde se incluyen dos cepas silvestres de laboratorio de *S. cerevisiae* y algunos mutantes para esta especie que se han utilizado como controles en el estudio de la activación de las MAPK Slt2, Fus3 y Kss1 (Capítulo 3).

Tabla 5. Aislados clínicos de *S. cerevisiae*

Nº aislados	Numeración	Origen de aislamiento
<i>Aislados clínicos del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona)</i>		
43	8-31; 34-48; 67, 68; 82,83.	Heces
31	5,6; 49-66; 71-81	Vagina
10	84; 86, 87; 89; 91, 92; 96; 98, 99; 104	Espustos
7	7; 32; 88; 90; 94, 95; 97	Faringe
2	33; 101	Aspirado traqueal
1	85	Exudado oral
1	93	Lavado broncoalveolar
1	100	Cavidad oral
1	102	Fluido pleural
1	103	Aspirado bronquial
1	105	Tracto respiratorio bajo
1	106	Orina
1	107	Líquido biliar
<i>Aislados clínicos del Hospital La Fe (Valencia)</i>		
4	F3; F15; F20; F27	Sangre
<i>Cepas de control de virulencia (California, USA)</i>		
1	YJM128	Pulmón
1	YJM223	Sangre
1	YJM223	Vino

Tabla 6. Aislados no clínicos de *S. cerevisiae*

Nº de aislado	Fuente	Ciudad/País
<i>Aislado probiótico</i>		
<i>S. boulardii</i> (Ultralevura)	UPSA (Biocodex) Lot R-08	Madrid, España
<i>Cepas industriales de referencia</i>		
CECT 1895	Fermentación natural de vino	España
CECT 1462	Bodega	Inglaterra
CECT 1942	Cerveza	Países Bajos
CECT 10.334	Vino de Jerez	España
CECT 10.551	Vino de Jerez	España
CECT 10.338	Vino de Jerez	España
CECT 1479	Vino de Jerez	España
<i>Cepas vínicas comerciales</i>		
ICV-3	Uvaferm CEG	Alemania
ICV-16	Cryoaromae	Francia
ICV-17	Fermivin crio 7303	ND
ICV-30	Uvaferm 71B	Francia
ICV-32	Uvaferm PM	Francia
T73	Lallemand	Sax, Alicante/España
<i>Cepas comerciales de panadería</i>		
Cinta Roja	Burns Philip	Australia
Plus Vital	Lesaffre International	Francia
<i>Cepas de laboratorio</i>		
BY 4741 (<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>)	EUROSCARF	Madrid/España
<i>Mutantes para S. cerevisiae</i>		
<i>Fus3Δ</i> (Isogénica BY4741, <i>FUS3::KanMX4</i>)	EUROSCARF	Madrid/España
<i>Sl2Δ</i> (Isogénica BY4741, <i>SLT2::kanMX4</i>)	EUROSCARF	Madrid/España
<i>Kss1Δ</i> (Isogénica BY4741, <i>KSS1::KanMX4</i>)	EUROSCARF	Madrid/España
<i>ITC1Δ</i> (Isogénica BY4741, <i>MATa; ITC1::KanMX4</i>)	EUROSCARF	Madrid/España

ND: no se conoce en origen de esta cepa.

2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121° C durante 20 minutos. Para la obtención de medios de cultivo sólidos se añadió bacto-agar a una concentración final de 20g/L, con excepción de los medios líquidos GPY e YPD. La composición y utilidad de cada medio se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Medios de cultivo

Medio	Composición
Crecimiento levaduras	
GPYA	5 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona, 40 g/L glucosa.
YPD	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L glucosa.
GPY	5 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona, 40 g/L glucosa.
Inducción de la esporulación de levaduras	
ACETATO	10 g/L acetato potásico, 1 g/L extracto de levadura, 0,5 g/L glucosa.
Producción de actividad proteasa	
“PROTEASA” Aoki y colaboradores (1994)	0,5 g/L MgSO ₄ · 7H ₂ O, 8,3 g/L K ₂ HPO ₄ , 16,66 g/L NaCl, 3,33 g/L extracto de levadura, 66,6 g/L glucosa y 8,3 g/L BSA (Fraction V, Sigma, USA) ^a . Ajustar pH 5 con 1 N HCl.
Determinación de la actividad fosolipasa	
YEMA DE HUEVO Prize y colaboradores (1982)	70,62 g/L agar Sabouraud Dextrose (Difco), 63,6 g/L NaCl, 0,6 g/L CaCl ₂ . Una vez estéril se añade un 10% de emulsión yema de huevo estéril (Pronadisa)
Inducir el crecimiento pseudofilamentoso por ser un medio de ayuno en nitrógeno.	
SLAD Gimeno y colaboradores (1992)	6,7 g/L base nitrogenada de levaduras (YNB) ^a sin amino ácidos y sulfato amónico, 0,05 mM sulfato amónico ^a , 20 g/L glucosa.
Crecimiento y producción de biomasa de cepas comerciales de panadería	
MELAZA	5g/L melaza, 0,5 g/L (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 26 g/L agar ^b . Ajustar pH 5-5,5 con HCl.

^a Estos componentes se esterilizan por filtración (filtros de 0,2 µm, Millipore, Bedford, Ma, USA).

^b El porcentaje de agar es mayor, ya que las placas Petri empleadas tienen mayor dimensión.

2.1. Adición de compuestos al medio de cultivo

Para la realización de ciertas pruebas fenotípicas fue necesaria la adición de diversos compuestos al medio de cultivo.

2.1.1. Estudio de resistencia/sensibilidad a compuestos alterantes de la pared celular

Blanco de Calcoflúor y rojo Congo

Se añadió al medio general de crecimiento de levaduras GPYA esterilizado y atemperado a 45-55° C, la cantidad necesaria de cada compuesto para mostrar una concentración final de 50 y 100 µg/mL respectivamente.

3. Condiciones de cultivo

3.1. Determinación del crecimiento

Las cepas de levadura se incubaron rutinariamente a 28-30° C durante 24-48 h en placas del medio general GPYA. De forma general la determinación del crecimiento se llevó a cabo mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro UV mini-1240 (SHIMADZU) a partir del crecimiento de los cultivos en YPD o GPY. Las muestras fueron diluidas convenientemente con el fin de conseguir que la absorbancia se encuentre en un intervalo de valores tal que existiera linealidad entre la lectura de la densidad óptica y el número de células del cultivo.

3.2. Ensayos de sensibilidad en placa

Los ensayos para determinar la sensibilidad o resistencia a diversos compuestos se realizaron mediante la siembra por goteo en placas. Los cultivos se crecieron toda la noche en medio líquido GPY a 28° C. Posteriormente se diluyeron hasta una absorbancia a 600 nm de 0,3 y se dejaron crecer hasta una densidad óptica a 600 nm de 1. En este momento los cultivos se ajustaron a una DO de 0,3 y se realizaron 5 diluciones decimales seriadas. A continuación se depositaron gotas de 5 µL de cada suspensión de levadura en placas de GPYA suplementadas con los compuestos que se detallan en el apartado 2.1.1.

4. Rasgos fenotípicos asociados con virulencia

4.1 Crecimientos a diferentes temperaturas

Para la medida de viabilidad a las temperaturas ensayadas de 28, 37, 39 y 42° C, se utilizaron cultivos crecidos en medio GPY toda la noche a 28° C. Se diluyeron hasta una absorbancia a 600 nm de 0,1 y se dejaron crecer hasta 0,3-0,4 (fase exponencial temprana), siguiendo con la misma metodología que se ha explicado en el apartado anterior. En este momento se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembraron por goteo 5 µL de las diluciones específicas de cada cepa en placas de GPYA para cada temperatura (Tabla 8). Las placas se incubaron durante 48 h.

Tabla 8. Diluciones sembradas en las placas de GPYA para cada temperatura

Temperaturas	Diluciones sembradas para cada temperatura					
28° C	5x10 ⁻³	10 ⁻³	5x10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
37° C	10 ⁻²	10 ⁻³	5x10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
39° C	5x10 ⁻²	10 ⁻²	5x10 ⁻³	10 ⁻³	5x10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
42° C	Directa	5x10 ⁻¹	10 ⁻¹	5x10 ⁻²	10 ⁻²	5x10 ⁻³

4.2 Producción de proteasas y fosfolipasas

Para determinar las actividades enzimáticas proteasa y fosfolipasa se utilizaron placas de medio “Proteasa” y Yema de huevo respectivamente (ver tabla 7). Las levaduras se cultivaron en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, de manera que una vez que los cultivos alcanzaron una DO a 600 nm de 0,3-0,4, se recogieron alícuotas de cada cultivo y se realizaron lavados con solución salina estéril para eliminar los residuos del medio de cultivo GPY. A continuación se depositaron gotas de 5µl de cada cepa, con un máximo de 4 cepas por placa, para evitar el solapamiento de los halos de opacidad que aparecen como resultado de ambas actividades enzimáticas. Tras incubar las placas de proteasa a 37° C durante 4 días y las placas de fosfolipasa 10 días a 30° C, se midieron los halos de opacidad que aparecieron alrededor del crecimiento de cada cepa y se calculó el parámetro llamado Pz (Price y col., 1982), tal y como se describe en la Figura 6.

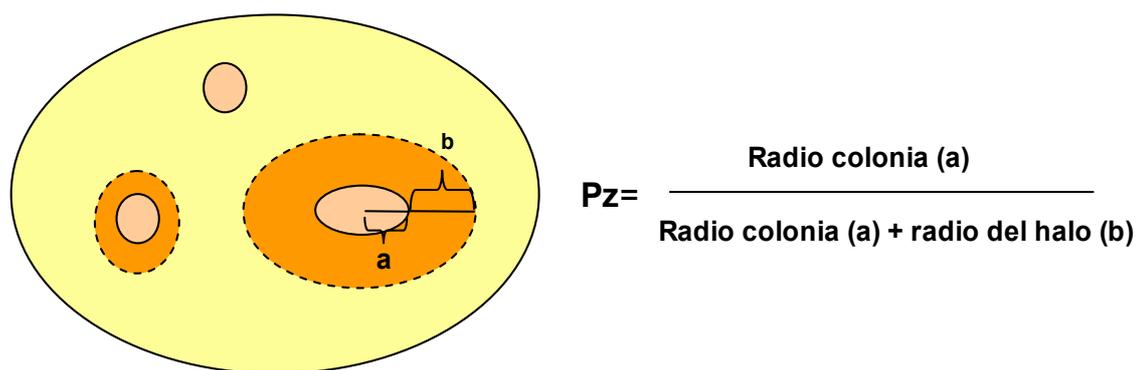


Figura 6. Cálculo del parámetro Pz, según el crecimiento de las colonias y el halo de opacidad

4.3 Crecimiento pseudofilamentoso

Para analizar la formación de pseudohifas, las cepas se sembraron en placas de medio SLAD (ver Tabla 7), de forma que se obtuviesen colonias aisladas. Se incubaron a 30° C durante 4 días, momento en el cual las colonias aisladas se observaron al microscopio y se determinó la aparición o no de pseudohifas, así como la morfología y longitud de las mismas.

4.4 Crecimiento invasivo

Para el estudio del crecimiento invasivo las cepas se cultivaron en césped en placas de GPYA y se incubaron 5 días a 28° C. En ese momento las placas se lavaron con agua abundante a cierta presión. De esta manera se eliminaron aquellas cepas no adheridas vigorosamente al agar. Las placas se fotografiaron antes y después de los lavados, determinándose así la presencia de colonias sujetas a la superficie del agar.

5. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

5.1 Aislamiento de DNA genómico de levaduras

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el método descrito por Sherman y colaboradores (1986) y adaptado por Querol y colaboradores (1992a). Las células de levadura se cultivaron en 5 mL de medio GPY durante 12 horas a 28° C y se recogieron por centrifugación. El sedimento se resuspendió en 0,5 mL de solución 1 M sorbitol-0,1 M

EDTA a pH 7,5. Para obtener los protoplastos, se añadieron 30 μ L de “Zimoliasa” 20T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japan) (1 mg/mL), incubándose a 37° C entre 30 y 60 minutos. Una vez transferida la muestra a un tubo de centrifuga de 1,5 mL, los protoplastos se recogieron por centrifugación y se incubaron 5 minutos a 65° C en 0,5 mL de solución 50 mM Tris-HCl (USB, Cleveland, USA) pH 8 y 20 mM EDTA (Panreac) pH 7,4, añadiendo 13 μ L de SDS al 10%. Posteriormente se añadieron 0,2 mL de acetato potásico 5 M, manteniendo los tubos en hielo durante 10 minutos para precipitar las proteínas. Se centrifugó 5 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde el DNA se precipitó mediante adición de 1 volumen de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. El DNA se lavó con etanol al 70% (v/v), se centrifugó, se secó al vacío y se resuspendió en 50 μ L de agua miliQ.

5.2 Amplificación mediante PCR

5.2.1. Oligonucleótidos

En este trabajo se han utilizado un conjunto de oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 9. Algunos de estos oligonucleótidos se emplearon para la identificación de especies de levaduras, para la caracterización de cepas dentro de la misma especie de levaduras o bien para amplificar una región determinada. En dicha Tabla, se describe la secuencia de cada cebador y la región diana. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Roche Diagnostics S.L. y Amersham Pharmacia Biotech.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'3')	Región diana	T (°C) ^e	Procedencia
its1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	5,8S-ITS rDNA	55,5	White y col., 1990
its4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	5,8S-ITS rDNA	55,5	White y col., 1990
δ1	CAA AAT TCA CCT ATW TCT CA	Secuencias δ	45	Ness y col., 1993
δ2	GTG GAT TTT TAT TCC AAC A	Secuencias δ	45	Ness y col., 1993
cox23	ATT TAT TGT TCR TTT AAT CA	Gen COX II	45	White y col., 1990
cox25	GGT ATT TTA GAA TTA CAT GA	Gen COX II	45	White y col., 1990
cox23 i	TCT TAA TTG ACC ATC TTC TAA	Gen COX II	45	White y col., 1990
cox25 i	TTA TTA TAT TTA TGT GAT GAA GT	Gen COX II	45	White y col., 1990
slt2 5	GGC TCG AGA TGG CTG ATA AGA TAG AG	Gen MAPK SLT2	55,5	El presente trabajo
slt2 3	GGC TCG AGA AAA TAT TTT CTA TCT AAT CC	Gen MAPK SLT2	55,5	El presente trabajo
slt2 5i	AAT GAT ATG GAG GAC TTA AAR ATG GT	Gen MAPK SLT2	55,5	El presente trabajo
slt2 3i	TGT ATA ACC ATT TGT TTT AAR TCY TCC AT	Gen MAPK SLT2	55,5	El presente trabajo

^eTemperatura de hibridación empleada en el protocolo de PCR.

5.2.2 Amplificación de la región 5,8-ITS del DNA ribosómico

La amplificación del gen ribosomal 5,8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 se amplificaron empleando los oligonucleótidos its1 e its4 (White y col., 1990), descritos en la Tabla 9.

Las células procedentes de una colonia se resuspendieron en la mezcla de PCR. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las descritas por Esteve-Zarzoso y colaboradores (1999). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 µL, añadiendo 2 unidades de *Taq* polimerasa DyNAzyme™ II (Finnzymes OY, Espoo, Finland), 10X tampón de reacción, 0,3 µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), y la muestra de DNA. La amplificación se realizó en un termociclador Progene (Techne, Cambridge, UK) con el siguiente programa: 95° C durante 5 min para la desnaturalización, 40 ciclos de 95° C durante 1 min, 55,5° C durante 2 min y 72° C durante 2 min. Finalmente, se añadió una incubación a 72° C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4%, estimando el tamaño de los

fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 100 pb (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA).

5.2.3 Amplificación de elementos delta (δ)

La amplificación de elementos delta se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos $\delta 1$ y $\delta 2$, (Ness y col., 1993), descritos en la Tabla 9.

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 μ L con 5 μ L de DNA (1-50 ng/ μ L), 0,5 μ M de cada oligonucleótido, 25 μ M de cada desoxinucleótido, 1 unidad de Taq polimerasa DyNAzyme™ II (Finnzymes YO, Espoo, Finlandia), tampón de reacción 1x y agua miliQ hasta completar el volumen indicado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, California, USA), con el siguiente programa: 95° C durante 30 segundos para la desnaturalización, 4 ciclos de 42° C durante 30 segundos, 30 ciclos de 45° C durante 30 segundos y 72° C durante 2 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 %, estimando el tamaño de los fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 100 pb (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA). A continuación se compara visualmente el número y tamaño de los fragmentos, obteniendo así patrones distintivos para cada cepa analizada.

5.2.4 Amplificación del gen *SLT2*

El gen *SLT2* codifica para la proteína MAPK Slt2. Se ha empleado la combinación de 4 oligonucleótidos para amplificar tres zonas de dicho gen. Por un lado se amplificó el gen completo empleando los oligonucleótidos slt2 5 y slt2 3 (Tabla 9). Por otra parte se amplificó una región de microsátélites que se encuentra en las últimas 500 pb del gen, empleando para ello los oligonucleótidos slt2 5i y slt2 3i. Y por último se amplificó la región anterior a la zona de los microsátélites empleando los oligonucleótidos slt2 5' y slt2 3'. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 μ L, añadiéndose 2 unidades de Taq polimerasa DyNAzyme™ II (Finnzymes OY, Espoo, Finlandia), 10x tampón de reacción, 0,3 μ M de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), y la muestra de DNA. La amplificación se realizó en un termociclador Progene (Techne, Cambridge, UK) con el siguiente programa: 95° C durante 5min para la desnaturalización, 40 ciclos de 95° C durante 1min, 55,5° C durante 2min y 72° C durante 2 min. Finalmente, se añadió una incubación a 72° C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles

de agarosa al 1% para el gen completo y la región anterior a las repeticiones y al 3% para la región de microsátélites, estimando el tamaño de los fragmentos generados al amplificar la zona de los microsátélites, por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 100 pb (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA). El tamaño de los fragmentos generados en las dos amplificaciones restantes se calculó con el marcador de DNA de fago λ digerido con la endonucleasa *Pst*I.

5.2.5. Amplificación del gen mitocondrial *COXII*

La amplificación de la subunidad II del gen mitocondrial *COX II* se realizó empleando los oligonucleótidos *cox 25* y *cox 23* (Belloch y col., 2000) descritos en la Tabla 9. En algunos casos fue necesario emplear la combinación de estos oligonucleótidos con dos oligonucleótidos internos, *cox 25i* y *cox 23i*, para conseguir la posterior secuenciación total de dicho gen.

Las células procedentes de una colonia se resuspendieron en la mezcla de PCR. Las condiciones de amplificación fueron descritas por Belloch y colaboradores (2000). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 μ L, añadiéndose 2 unidades de *Taq* polimerasa DyNAzyme™ II (Finnzymes OY, Espoo, Finlandia), 10X tampón de reacción, 0,3 μ M de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), y la muestra de DNA. La amplificación se realizó en un termociclador Progene (Techne, Cambridge, UK) con el siguiente programa: 95° C durante 5 min para la desnaturalización, 45 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 45° C durante 35 segundos y 72° C durante 35 segundos Finalmente, se añadió una incubación a 72° C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4%, estimando el tamaño de los fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 100 pb (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA).

5.3 Secuenciación de DNA

5.3.1 Obtención de secuencias

La amplificación del gen *SLT2* y del gen mitocondrial *COX II* se llevaron a cabo por PCR tal y como se describe en los apartados 5.2.4 y 5.2.5. Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando el “kit” UltraClean™ PCR Clean-up (Mo Bio Laboratories, Inc.,

Solana Beach, CA). Para su secuenciación, los fragmentos de DNA se marcaron con fluorocromos utilizando el “kit” BigDye™ Terminator Cycle v 3.1 (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU.), secuenciándose ambas hebras en un secuenciador automático 310 de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.). El volumen de las reacciones de secuenciación fue de 10 µL, donde se emplearon entre 20 y 30 ng de DNA purificado (1-2 µL), 1µL de una solución de nucleótidos marcados con fluorescencia, 1,5 µL de tampón 5X, 1µL de un cebador (3,2 µM) y agua miliQ hasta el volumen final indicado. La reacción de amplificación comprende un primer ciclo de desnaturalización de 3 minutos a 94° C, seguido de 99 ciclos que consisten en una desnaturalización a 96° C durante 10 segundos, un paso de hibridación a 50° C durante 5 segundos, seguido de una extensión de 4 minutos a 60° C.

5.3.2. Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, los errores se eliminaron por comparación de ambas hebras de DNA usando el programa informático Chromas V 1.43 (Brisbane, Australia). Las secuencias se alinearon utilizando la versión 3.1 del programa informático MEGA.

5.4 Tratamientos enzimáticos del DNA

5.4.1. Digestión del producto de amplificación de la región 5,8S-ITS del DNA ribosómico

Los amplificados de DNA obtenidos por PCR de la región 5,8S-ITS (ver apartado 6.2.1.), fueron digeridos con las endonucleasas de restricción, *Cfo* I, *Hae* III y *Hinf* I (Boehringer Mannheim, Darmstadt, Germany). La reacción de digestión contenía 15 µL del producto de amplificado, sin necesidad de ser purificado, 2 µL de tampón 10X específico para cada endonucleasa, 1 µL de la endonucleasa (5 u/µL) y 2 µL de agua miliQ. Las digestiones se incubaron a 37° C durante toda la noche. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3% en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) y se visualizaron con luz UV tras la tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/µL) (Sigma). Como marcador de peso molecular se utilizó el “100-bp DNA ladder” (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

5.4.2. Digestión del DNA mitocondrial

El análisis de restricción del DNA mitocondrial se realizó siguiendo la metodología descrita por Querol y colaboradores (1992b). El DNA genómico se digirió con la endonucleasa de restricción de corte infrecuente *Hinf* I (Boehringer Mannheim, Darmstadt, Germany). Para realizar la mezcla de digestión se emplearon 15 μ L de DNA genómico (20-30 μ g), 2 μ L de RNAsa 500 μ g/mL (Boehringer Mannheim), 1,5 μ L de la endonucleasa y 2,5 μ L del tampón 10X específico para dicha endonucleasa. Las digestiones se incubaron a 37° C durante toda la noche. Los fragmentos de restricción del DNA mitocondrial se separaron en geles de agarosa (Pronadisa) al 1% (p/v) en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) a 100 V. Posteriormente se realizó una tinción en bromuro de etidio (0,5 μ g/ μ L), y los fragmentos se visualizaron con luz UV. El tamaño de los fragmentos se calculó con el marcador de DNA de fago λ digerido con *Pst*I. A continuación se compara visualmente el número y tamaño de los fragmentos, obteniendo así patrones distintivos para cada cepa analizada.

5.5. Técnicas electroforéticas para el DNA

5.5.1. Electroforesis en geles de campo pulsado

Para llevar a cabo el cariotipado de las cepas, los cromosomas se separaron en bloques de agarosa siguiendo la metodología propuesta por Carle y Olson (1985), se lavaron tres veces a 50° C durante 30 minutos con tampón TE y una vez durante 30 minutos a temperatura ambiente. La separación de los cromosomas se realizó en un equipo CHEF-DRIII (Bio-Rad California, USA). Los bloques de agarosa con las muestras se incluyeron en los pocillos de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Bio-Rad) en tampón 0,5X TBE (44 mM Tris; 44,5mM ácido bórico; 1 mM EDTA pH 8,3%). La electroforesis se llevó a cabo a 15° C con una corriente de 6 V/cm con dos intervalos: 14h con un pulso inicial de 60 seg y 11 h con un pulso de 120 segundos. Una vez terminada la separación de los cromosomas, el gel se tiñó durante 20 ó 30 minutos con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL). El marcador de peso molecular utilizado fue DNA cromosómico de *S. cerevisiae* (cepa YN295) (Bio-Rad).

6. Propiedades de las cepas comerciales de panadería

6.1. Crecimiento en placas de medio melaza para la obtención de biomasa

Las levaduras se cultivaron en medio YPD durante toda la noche a 28° C. A continuación se midió la densidad óptica a 600 nm y se realizó la dilución correspondiente con YPD fresco, para conseguir cultivos con una DO de 0,3 que se incubaron en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO de 1-1,5, momento en el cual se recogió el volumen de cultivo correspondiente a una concentración de levaduras de 20 mg de biomasa, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica a 600 nm equivale a 0,35 mg de células por mL. Se centrifugó el volumen de cultivo recogido durante 2 minutos a 4200 rpm, desechando el sobrenadante y se lavaron varias veces las células con agua estéril. Las células se resuspendieron en un volumen de 3 ml de agua estéril y se añadieron 20 µL de biotina (0,8 mg/mL). A continuación se inocularon 3 placas de melaza (ver Tabla 7) por cepa de levadura, con 400 µL de cada suspensión celular, distribuyendo el cultivo uniformemente mediante un asa de Digralsky. Las placas se incubaron a 30° C durante 20-24 horas. Posteriormente se recogió el cultivo crecido en las 3 placas con 30 mL de agua fría y se centrifugó a 4200 rpm durante 2 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células se lavaron con agua estéril. Las células se resuspendieron en 20 mL de agua estéril y se midió la densidad óptica a 600 nm, para calcular la biomasa conseguida de cada cepa crecida en el medio melaza.

6.2. Ensayos de fermentación

A continuación se prepararon las muestras para realizar los ensayos de fermentación. Para ello se calculó el volumen necesario del cultivo de levadura para tener una concentración celular de 20 mg por mL (una unidad de densidad óptica a 600 nm equivale a 0,35 mg de células por mL), dicha concentración celular es la apropiada para fermentar masas panarias, tanto si se emplean masas panarias de harina de trigo (concretamente 20 g de harina de trigo), como si se utilizan 15 mL de una solución líquida libre de harina (Sistema modelo, LD). Se centrifugó a 4200 rpm durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 15 mL de la solución S1 (NaCl al 2,7% estéril). Seguidamente, la suspensión celular contenida en los 15 mL de la solución S1 fue depositada en botellas de 250 mL con tapón perforado (ver Figura 7), y se situaron en un baño de agua a 30° C con

agitación suave (80 rpm). Después de 15 minutos, se añadieron a cada botella 15 mL de la solución líquida libre de harina (LD), que mimetiza las masas panarias tradicionales (Sistema modelo LD: la solución líquida LD se preparó de acuerdo con la fórmula proporcionada por Lesaffre Internacional, Lille, Francia). En primer lugar se preparó la solución de nutrientes concentrada 5X, que contiene 5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de KCl, 11,75 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 4 mg de tiamina, 4 mg de piridoxina y 40 mg de ácido nicotínico, en un volumen final de 250 mL de 0,75 M de tampón citrato, pH 5,5. A continuación se mezclaron 25 mL de esta solución de nutrientes 5X junto con 0,5 g de extracto de levadura, 3 g de glucosa, 9 g de maltosa y 12 g de sorbitol. La mezcla se disolvió en un volumen final de 100 mL de agua destilada y se esterilizó por filtración (filtros de 0,2 μm , Millipore, Bedford, Ma, USA). La mezcla contenida en cada botella de 250 mL (15 mL de la solución LD y los 15 mL del cultivo) se incubaron en el baño de agua a 30° C, con agitación suave, procediendo a continuación a las medidas de la producción de gas para cada cepa.

6.3. Determinación del gas desprendido durante la fermentación

La determinación del gas producido durante la fermentación se realizó empleando un aparato Chittick. Se trata de un “fermentómetro” manufacturado, mediante el cual se midió la producción de CO_2 producido durante la fermentación, como el volumen desplazado de una solución manométrica contenida en una bureta graduada.

6.3.1. Funcionamiento del aparato Chittick

El “fermentómetro” consta de 4 buretas graduadas situadas verticalmente en un panel (en la Figura 7 se muestra el esquema de una de esas buretas). Cada bureta está conectada por su parte superior a tubos de teflón de 2 mm de diámetro interno y 75 cm de longitud, unidos a su vez a un tubo metálico soldado a las tapas de las botellas de 250 mL, donde se produce la fermentación. A su vez cada bureta está unida por la parte inferior, a través de tubos de teflón de las mismas dimensiones anteriores, a un frasco nivelador que contiene una solución de desplazamiento (10% de CaCl_2 y 0,5% de CuCl_2 a pH < 5, adquiriendo un color verdoso). Antes de comenzar con las medidas de producción de gas, las buretas se enrasan a cero mL, para ello se levanta el frasco nivelador a la altura conveniente, en ese momento la llave situada en la parte superior se cierra tras enrasar las buretas. En ese instante los frascos con la mezcla a fermentar se tapan con las tapas perforadas y se

introducen en el baño a 30° C y en agitación. Inmediatamente se abre la llave que permite el paso del gas hasta la bureta y la solución de desplazamiento desciende por la presión del gas. Las medidas de producción de gas se realizaron cada 20 minutos.

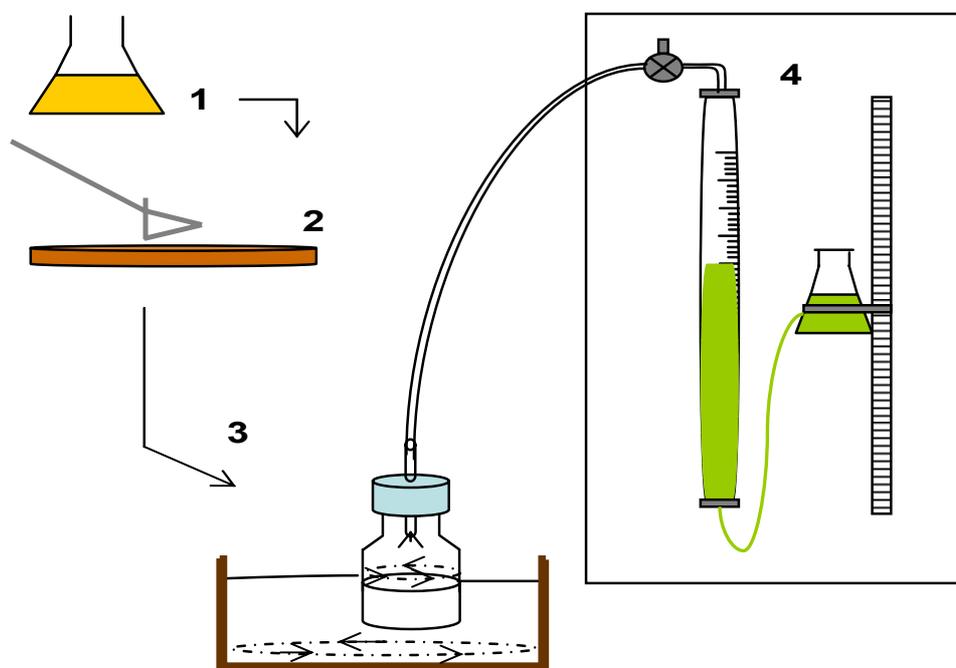


Figura 7. Esquema del proceso de obtención de biomasa y funcionamiento del “fermentómetro”.

1. Crecimiento de la levadura en medio YPD hasta conseguir una concentración de levaduras adecuada.
2. Obtención de biomasa a partir de placas de melaza.
3. Mezcla del cultivo celular adecuado junto con el medio sintético LD e incubación a 30° C a 80 rpm.
4. Medidas de producción de gas en el fermentómetro (Chittick): se realiza midiendo el volumen desplazado de la solución manométrica a través de la bureta graduada. Las mediciones se realizan cada 20 minutos, hasta un total de 200.

6.3.2. Lectura del gas producido

Para realizar la medida cada 20 minutos, se enrasó la solución de desplazamiento de cada bureta con ayuda del frasco nivelador, desplazando éste a lo largo del carril situado en el panel y paralelo a cada bureta. En la bureta puede leerse el volumen de líquido desplazado

(en cc), que equivale al volumen de gas producido por la levadura al fermentar los azúcares de la solución LD.

Para evitar una posible pérdida de CO₂ desde la bureta al aire, los frascos niveladores se mantienen durante todo el ensayo a una altura inferior al nivel del líquido en la bureta, excepto en el momento en que se realizaron las medidas. Éstas se hicieron a los 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 minutos desde el comienzo del ensayo.

Cuando el volumen del líquido desplazado en la bureta alcanza el máximo de su capacidad (100 mL) se cierra la llave y se vuelve a enrasar la bureta a cero mL. A continuación se abre de nuevo la llave y se continúa con el ensayo.

La lectura de la bureta del volumen de líquido desplazado, da directamente la cantidad de gas producido en la fermentación de los 15 mL de sistema modelo LD. Los resultados se expresan en mL de CO₂ producido por gramo de levadura húmeda en minutos.

6.4. Actividad enzimática maltasa

6.4.1. Rotura celular y extracción proteica en tampón KPP

La medida de las actividades enzimáticas se realizó a partir del mismo cultivo de levaduras cultivado en las placas de melaza que se emplearon en el ensayo de fermentación (ver apartado 6.1 y 6.2). Se recogió el volumen necesario para obtener una DO de 25 y se centrifugó a 4000 rpm durante 3 minutos. El sedimento celular se transfirió a un tubo eppendorf y se lavó un par de veces con tampón homogenizador KKP 0,1 M (K₂HPO₄ 1 M, KH₂PO₄ 1 M, pH 6,5). En este momento el sedimento celular puede congelarse sin tampón KPP a -20 ° C o proceder a su rotura.

Para obtener los extractos proteicos, las células se resuspendieron en 200 µL del tampón KPP 0,1 M y se añadió 0,1 g de bolas de vidrio (0,4 mm de diámetro). La mezcla fue agitada en vortex durante 3 periodos de 1 minuto (30 segundos en vortex y 30 segundos en hielo). Posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm a 4° C durante 10 minutos y el sobrenadante clarificado se recogió para realizar la medición de ambas actividades enzimáticas.

6.4.2. Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford

Las actividades enzimáticas se determinaron siempre en relación a la cantidad total de proteína. Para ello se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976), empleando el sistema comercial de Bio Rad y el anticuerpo IgG de conejo como estándar. Para realizar la recta patrón se utilizó una solución de seroalbúmina bovina de concentración conocida (1,33 mg/mL) y se realizaron diluciones entre 3 y 30 mg/mL.

6.4.3. Actividad maltasa

La actividad maltasa se determinó a partir del extracto crudo de proteínas, en tampón KPP 0,1 M, tal y como describe Okada y Halvorso (1964). Se utilizaron diluciones 1/10 del extracto crudo de proteínas en tampón KPP, 0,1 M. Para realizar las medidas se emplearon tubos eppendorfs donde se mezclaron 50 μ L de la dilución de la muestra y 500 μ L de tampón KPP, 0,1 M. Dicha mezcla se atemperó durante 30 minutos a 30° C. A continuación se inició la reacción añadiendo 50 μ L del sustrato de la reacción, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG), manteniendo la incubación a 30° C. La reacción se paró cuando apareció un color amarillo, momento en el que se anotó el tiempo transcurrido y se añadieron 0,250 mL de Na₂CO₃, 1M, para finalizar la reacción. A continuación se midió la absorbancia a 400 nm. La actividad maltasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de pNPG / min/ mg de proteína bajo las condiciones de ensayo. Para calcular los valores de actividad maltasa se empleó la formula que se describe a continuación:

$$\text{Actividad Maltasa} = (0,86 / c) \times d \text{ E} / dt \times I$$

c: valor de cantidad total de proteína para cada muestra.

E: valor de la absorbancia a 400 nm.

t: tiempo transcurrido desde el comienzo de la reacción hasta la aparición del color amarillo.

I: Inversa de la dilución empleada.

ϵ 400 nm del pNPG = 19,75 cm²/μrol.

7. Modelos murinos de infección sistémica en *S. cerevisiae*

Para estudiar la capacidad infectiva de diferentes cepas de *S. cerevisiae* se ensayaron tres modelos de infección sistémica que difieren en el estado inmunitario del ratón. Se utilizaron ratones inmunocompetentes de la cepa de ratones cosanguínea BALB/c; ratones inmunodeficientes en el factor C5 del complemento, de la cepa no cosanguínea DBA/2N y ratones de la cepa no cosanguínea ICR/Swiss inmunosuprimidos con ciclofosfamida. Dichas cepas de ratones fueron proporcionadas por los laboratorios Harlan France (Sarl, Francia). En todos los ensayos se utilizaron hembras de entre 12 y 16 semanas de edad y un peso comprendido entre 18-20 gramos.

7.1. Infección sistémica empleando ratones inmunocompetentes BALB/c y ratones inmunodeficientes en el factor C5 del complemento DBA/2N

Para realizar la infección sistémica en los dos primeros modelos se siguió el mismo procedimiento, tal y como se muestra en la Figura 8. Las cepas de *S. cerevisiae* a ensayar fueron crecidas en placas de GPYA a 28° C durante 48 h. Los ratones se mantuvieron en cuarentena dos días, tras los cuales se pesaron y se dividieron en grupos de 10 ratones por jaula. El día de la infección, las células de levadura se lavaron dos veces con tampón PBS y se diluyeron en el mismo tampón, hasta conseguir la densidad óptica adecuada para realizar un correcto recuento de las mismas mediante cámara de Neubauer. Tras realizar dicho recuento celular, se ajustó la dilución en función de la dosis a inyectar de 2×10^7 UFCs /mL, teniendo en cuenta que el volumen inyectado en el ratón en todos los casos fue de 0,5 mL. Dichas diluciones fueron inyectadas en la vena lateral caudal del ratón que previamente había sido dilatada mediante exposición a calor durante 2-3 minutos.

Dentro del ensayo general de infección sistémica y que incluye a los dos primeros modelos, se estudian dos parámetros:

a) Curva de supervivencia:

Tras la infección de los ratones con las cepas de *S. cerevisiae*, se monitorizó durante 30 días la muerte/supervivencia de los ratones.

b) Estudio del alojamiento a lo largo del ensayo y obtención de sueros:

Para estudiar la capacidad colonizadora de las cepas de *S. cerevisiae* se determinó el alojamiento en cerebro y riñón a los días 7, 15 y 30 postinfección, para ello se sacrificaron por dislocación cervical 2 ratones por cepa a los 7 y 15 días, mientras que a los 30 días se sacrificaron los ratones supervivientes. Inmediatamente después del sacrificio de los ratones, los órganos se extrajeron asépticamente para minimizar los efectos de la lisis tisular. A día 15, además se procedió a la extracción de suero mediante punción cardiaca, provocando la muerte de los ratones por hipoglobulemia. A los sueros extraídos se les realizó un tratamiento térmico de 2 horas a 37° C, posteriormente se mantuvieron a 4° C durante 4 horas y seguidamente se realizaron al menos 2 centrifugaciones consecutivas a 13000 rpm a 4° C durante 15 minutos, hasta conseguir un sobrenadante libre de células. Los sueros se guardaron a -20° C hasta su posterior utilización (ver apartado 9.4).

Los órganos se homogenizaron con el sistema Politrón con un vástago de 10 mm y entre cada homogenización el vástago era limpiado con 2 lavados sucesivos de alcohol absoluto, seguido de un lavado con una mezcla de agua y alcohol (V/V). Posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas de los homogenizados para sembrarlas en placas de GPYA con cloranfenicol, que se incubaron a 28° C durante 48 h. Y a continuación se realizaron los recuentos de las placas correspondientes.

Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las normas éticas dictadas por la Comunidad Europea.

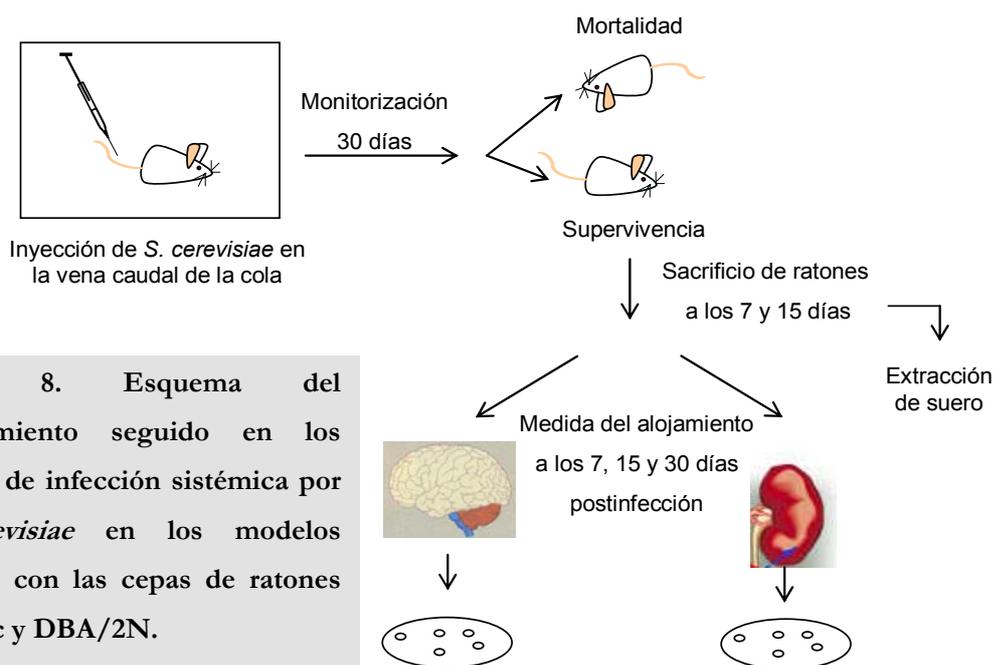


Figura 8. Esquema del procedimiento seguido en los ensayos de infección sistémica por *S. cerevisiae* en los modelos murinos con las cepas de ratones BALB/c y DBA/2N.

7.2. Infección sistémica empleando ratones ICR/Swiss inmunosuprimidos con ciclofosfamida

En este modelo la infección con *S. cerevisiae* se realiza tal y como se describe en el apartado anterior, pero 1 día antes de la infección de los ratones, se procede a la inmunosupresión de los mismos, induciendo la neutropenia por inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (200 mg/Kg de peso del ratón, resuspendida en tampón PBS) (Sigma). A partir de este momento los ratones se manipularon en cámara de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad y se les mantuvo en cajas con aireación independiente, administrando comida, agua y serrín estériles.

En este modelo se infectaron 5 ratones por cepa de *S. cerevisiae* ensayada, mediante la inyección en la vena caudal de una dosis de 2×10^7 UFCs/mL. A partir de este momento se realiza un seguimiento de mortalidad/supervivencia a lo largo de los 10 días de duración del ensayo.

Para mantener la inmunosupresión inducida por ciclofosfamida durante los 10 días de duración del ensayo, se realizó una segunda inyección intraperitoneal al 5º día post infección, con la misma dosis anterior de ciclofosfamida. En el último día del ensayo se sacrificaron los ratones supervivientes, procediendo tanto a la extracción del suero y órganos, tal y como se explicó en el modelo anterior (Figura 9).

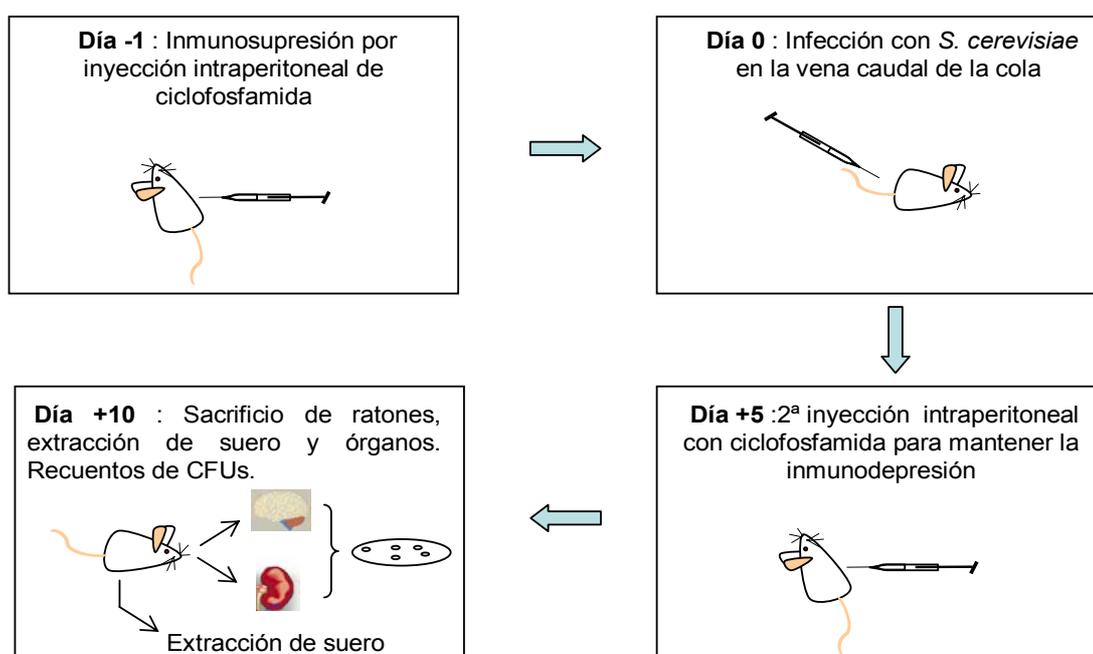


Figura 9. Esquema del procedimiento seguido en el ensayo de inmunosupresión con ciclofosfamida de los ratones ICR/Swiss.

7.3. Estudios de histopatología en cerebros de ratones

Algunos de los cerebros extraídos pertenecientes a los ratones BALB/c e ICR/Swiss infectados con las cepas de *S. cerevisiae* se emplearon para estudiar la histopatología de los mismos. Los cerebros se extrajeron con mucho cuidado y se introdujeron en formamida diluida neutra. El proceso posterior de fijado de la muestra, cortes y tinción de Shift con ácido periódico, se realizó en el Servicio de Patología de la Facultad de Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid.

8. Obtención y análisis de proteínas por 2D-Western Blotting del suero de ratones infectados

Este apartado fue llevado a cabo en colaboración con la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense – Parque científico de Madrid (www.ucm.es/proteomica). El personal de dicha unidad se encargó de realizar la electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y de la posterior identificación de las proteínas por espectrofotometría de masas de tipo MALDI-T/TOF (Matriz Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight).

8.1. Obtención de extractos proteicos de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY 4741

Las células de levadura se cultivaron en medio líquido GPY toda la noche para utilizarse como precultivo. Al día siguiente se diluyó el cultivo hasta una DO a 600 nm de 0,2-0,3 en medio GPY fresco hasta un volumen final de 100 mL y se dejó crecer durante 4 horas. Transcurrido dicho periodo se recogieron unos 20 mL del cultivo y se procedió a la obtención del extracto proteico por rotura celular con perlas de vidrio en tampón de lisis (50 mM Tris HCl pH 7,5, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100, 0,1% de SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasa (“Complete Mini EDTA-free”, Roche), mediante el sistema Fast Prep (FP120; Bio101 SAVANT) realizando 2 pulsos de 20 segundos a velocidad 5. El lisado se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4° C obteniéndose un sobrenadante que constituye el extracto proteico.

8.2. Transferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), las proteínas presentes en los geles de acrilamida fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) en tampón Towbin (Towbin y col., 1979). Las transferencias se llevaron a cabo en una cubeta de transferencia Trans-Blot Cell (Bio-Rad) a una intensidad de corriente constante de 50 mA durante 14 horas.

8.3. Identificación de proteínas mediante inmunodetección (*Western-Blotting*)

La técnica de inmunoblot se llevó a cabo siguiendo protocolos Standard (Ausubel). En primer lugar la membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL Amersham), a la cual se habían transferido todas las proteínas, se bloqueó con leche al 5% en TTBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, Tween 0,05%) durante 2 horas. Posteriormente se procedió al lavado de la membrana con TTBS, durante 15 minutos, 3 veces. A continuación se realizó la hibridación de los anticuerpos presentes en los diferentes sueros obtenidos de ratón, en una dilución 1:100 en TTBS al 0,5% de leche desnatada en polvo para minimizar las uniones inespecíficas, y se dejó incubando 2 horas en agitación. Posteriormente se procedió al lavado de la membrana con TTBS, durante 15-20 minutos, 3 veces. Se utilizaron los anticuerpos policlonales IgG_s (Stressgen) e IgG2a (Cultek) anti-ratón en una dilución 1:2000 disuelto en las mismas soluciones que el primero y se dejó incubando 2 horas en agitación. Las manchas proteicas reactivas fueron detectadas con Ig_s anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham Bioscience), utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Bioscience) (Figura 10).

Las membranas pueden reutilizarse hasta tres veces, para ello es necesario deshibridarlas con un tampón de “stripping” (7,5 g/L de glicina (Panreac), pH 2,2, 5 mL de SDS 10%, 5 mL de NP40 al 10%, llevando a un volumen final de 1 L con agua miliQ), durante 2 horas en agitación.

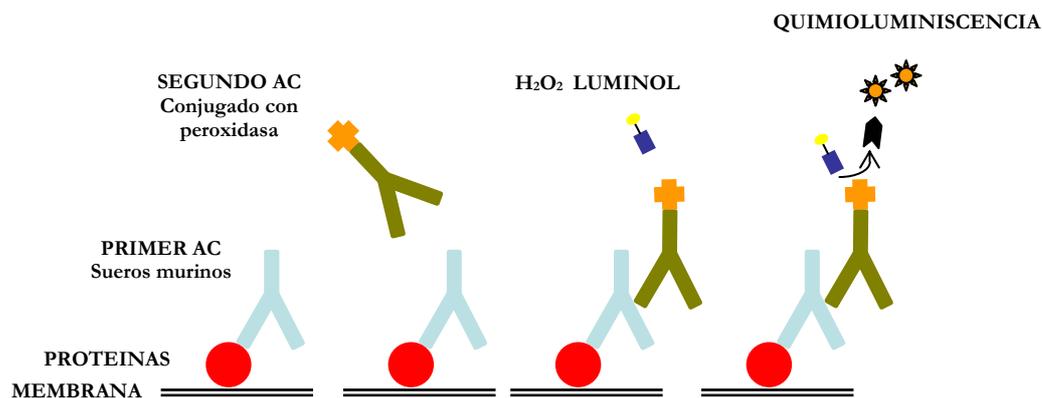


Figura 10. Esquema de la técnica de Western-Blotting para la detección de las proteínas inmunogénicas.

9. Detección de las MAP quinasas Slt2 y Kss1 mediante Western-blotting

9.1 Obtención de extractos proteicos y preparación de muestras para electroforesis (SDS-PAGE)

Las células de levaduras se crecieron en medio líquido GPY toda la noche para utilizarse como precultivo. Al día siguiente se diluyeron hasta una DO a 600 nm de 0,2-0,3 en medio GPY fresco hasta un volumen final de 25 mL y se dejaron crecer durante 4 horas. Las células se recogieron en tubos de centrifuga Falcon o en tubos de plástico de 10 mL que contenían hielo y se centrifugaron a 4° C a 2.500 rpm durante 2 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 0,5 mL de agua fría y fue transferido a un tubo eppendorf, volviendo a centrifugar para eliminar el sobrenadante. Así, las células se congelaron directamente en hielo seco para romperlas posteriormente o conservarlas a -80° C hasta su rotura.

A continuación se añadió la cantidad necesaria de tampón de lisis (50 mM Tris HCl pH 7,5, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100, 0,1% de SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, inhibidores de proteasas 1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y tosil-fenil-alanín-clorometil-cetona (TPCK), tosil-lisín-clorometil-cetona (TLCK), leupeptina, pepstatina A, antipain y aprotinina, todos ellos a 25 µg/mL. También se añadieron inhibidores de fosfatasa con el fin de evitar la desfosforilación de las proteínas durante el proceso de rotura celular. Se utilizó para este fin 50 mM NaF, 50mM β-glicerol-fosfato, 5 mM pirofosfato sódico y 1 mM de ortovanadato sódico), junto con perlas de vidrio de Ballotino de 1 mm

(Braun Biotech) y se agitó la mezcla en un aparato homogeneizador de células Fast-Prep (FP120; Bio101 SAVANT), intensidad 5,5 durante 25 segundos.

Tras centrifugar a 4° C a 13000 rpm durante 15 minutos, se separaron los extractos proteicos de los restos celulares y de las perlas de vidrio. Para determinar la cantidad de proteína solubilizada en los extractos se midió la absorbancia a 280 nm de una dilución de los mismos en un espectrofotómetro Beckman DV 640 (1 unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 1 mg/mL de proteína). A continuación se ajustó la cantidad de proteína en todas las muestras, aumentando el volumen cuando era necesario con tampón de lisis. A los extractos equilibrados se les añadió tampón de carga SDS-PAGE 2X (125 mM Tris HCl pH 6,8, 5% SDS, 25% glicerol, azul de bromofenol; se añade 1/5 del volumen final de DTT 1 M justo antes de usar), y fueron hervidos durante 5 minutos para desnaturalizar. Las muestras así procesadas están listas para electroforesis, aunque también pueden conservarse a -20° C para su posterior utilización.

9.2. Electroforesis de proteínas

Para la separación de las proteínas del extracto se utilizó SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 10%. Se realizó en cubetas Mini Protean II Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 150-180 voltios. Se utilizó tampón de electroforesis (3,028 g/L Tris, 14, 46 g/L de glicina y 1 g/L de SDS) y como patrón de pesos moleculares se utilizó el suministrado por Invitrogen.

9.3. Transferencia de proteínas de membrana de nitrocelulosa

Se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham) para transferir las proteínas. Como protectores y absorbentes se utilizó papel Whatman 3MM Chr. La transferencia fue realizada en cubetas de transferencia Mini Trans-Blot Transfer-Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora. Se utilizó para ello tampón de transferencia (5,8 g/L Tris, 2,9 g/L de glicina y 0,37 g/L de SDS) al cual se le añadió un 20% del volumen final de metanol o etanol justo antes de su utilización.

9.4. Inmunodetección (*Western-Blotting*)

Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con leche desnatada al 5% en TTBS (29, 2 g/L de NaCl; 24, 2 g/L de Tris; pH 7,5 y 500 μ L de Tween 20) durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó la solución bloqueante y se lavaron dos veces con tampón TTBS durante 5 minutos. A continuación las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente en presencia de leche al 1% en TTBS durante hora y media a temperatura ambiente, en agitación o durante toda la noche a 4° C. Tras la incubación las membranas se lavaron con tampón TTBS durante 30 minutos, cambiando el tampón varias veces. Para que el anticuerpo primario fuese detectado se utilizó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa que se incubó en las mismas condiciones que el primario, pero se mantuvo 45 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado de las membranas fue utilizado el sistema de detección ECL de Amersham.

Las membranas pueden ser reutilizadas con otros anticuerpos, para ello deben ser tratadas con el tampón de “stripping” (7,5 g/L de glicina, 0,5 mL/L NP-40, 1% SDS y pH ajustado a 2,2 con HCl), en agitación durante dos horas a temperatura ambiente. En la Tabla 10 se detallan los anticuerpos utilizados en este trabajo.

Tabla 10. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Proteína que reconoce	Dilución de trabajo	Origen	Procedencia
anti-GST-Slt2	MAPK Slt2	1:2000	Conejo	Dr. Martín
anti-P-p44/42	MAPK fosforilada en TEY	1:2000	Conejo	Amersham Pharmacia Biotech
anti- β -actin	β -actina	1:1000	Ratón	Sigma
anti-Ig conejo conjugado peroxidasa	Ac. Primario de conejo	1:3000	Burro	Amersham Pharmacia Biotech
anti-IgG Ratón conjugado peroxidasa	Ac. Primario de ratón	1:3000	Oveja	Amersham Pharmacia Biotech

Resultados y Discusión

Capítulo I

Estudio del origen de colonización de los
aislados clínicos de *S. cerevisiae*

S. cerevisiae siempre se ha considerado un microorganismo seguro, sin embargo, esta levadura puede ser origen de infecciones superficiales y, bajo determinadas condiciones del hospedador, puede diseminarse dando lugar a infecciones sistémicas. Las razones por las cuales el número de infecciones por *S. cerevisiae* ha aumentado considerablemente en los últimos años se discute con detalle en la Introducción y se documenta con una revisión de los casos clínicos publicados hasta el momento.

Se conoce muy poco acerca del papel de *S. cerevisiae* en el desarrollo de infecciones humanas. Esto es debido fundamentalmente a que el interés por *S. cerevisiae* como patógeno emergente es muy reciente y existen muy pocos trabajos al respecto (Kwon-Chung y Bennet, 1992; Eng y col., 1984; Murphy y Kavanagh, 1999; Jensen y col., 1976; Smith y col., 2002; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005). Sin embargo, existe un interés creciente por parte de los microbiólogos clínicos y de alimentos por aclarar el origen de colonización de los aislados clínicos teniendo en cuenta que la colonización es el paso previo a la infección. En este sentido, puesto que las exposiciones exógenas a *S. cerevisiae* ocurren principalmente a través de alimentos, bebidas y suplementos nutricionales, la caracterización del mayor número posibles de aislados clínicos y su comparación con aislados no clínicos es necesaria para establecer si los aislados clínicos son específicos en humanos o si es posible una entrada exógena. Para ello, es fundamental disponer de métodos precisos que permitan la caracterización a nivel de cepa, siendo las técnicas moleculares las mejores alternativas para tal fin. En el presente trabajo, se han aplicado dos técnicas moleculares, el análisis de restricción del mtDNA y la amplificación por PCR de secuencias δ del genoma, para estudiar la variabilidad genética de un gran número de aislados de *S. cerevisiae* que habían sido capaces de colonizar distintos órganos de individuos con diferentes condiciones y compararlas con la de aislados no clínicos. En este estudio se pretende conocer la relación que existe entre ambos tipos de aislados y así poder entender mejor cual es el origen de colonización en infecciones por *S. cerevisiae* como agente causal.

1. Identificación de los aislados clínicos mediante RFLPs de la región 5,8S-ITS

Los aislados clínicos incluidos en este trabajo fueron proporcionados por dos hospitales españoles (ver tabla 5 de materiales y métodos). La mayoría de los aislados fueron proporcionados por el hospital Vall d'Hebrón de Barcelona, concretamente 101 aislados clínicos, que el servicio de Microbiología de dicho hospital recuperó de 89 pacientes (hospitalizados y pacientes externos) entre los años 1996 y 2001. La mayoría de los aislados provienen de sitios colonizados por microbiota comensal (43 aislados de heces, 31 aislados de vagina y 21 del tracto respiratorio) y únicamente 6 aislados (nº 102, 103, 104, 105, 106 y 107) se recuperaron de sitios estériles (fluido pleural, tracto respiratorio profundo, orina y líquido biliar, respectivamente). Entre los 89 pacientes, 62 se consideraron pacientes sanos, mientras que los 27 pacientes restantes mostraban distintos factores de riesgo (SIDA, cáncer, desórdenes digestivos y respiratorios, post-traumatismos).

Por otro lado el Hospital La Fe de Valencia nos proporcionó 4 aislados recuperados de sangre entre los años 1996-2002. En este caso, los pacientes también mostraban ciertos factores de predisposición: enfermedad crítica, sin previa inmunodepresión severa (para los aislados F3, F27 y F15), con terapia antibiótica previa (los 4 aislados), inmunosupresión por quimioterapia (F20) y catéter intravenoso (los 4 aislados).

El hospital Vall d'Hebrón identificó inicialmente todos los aislados clínicos como *S. cerevisiae*, empleando para ello el sistema comercial AMS-Vitek Yeast-Card (BioMérieux), mientras que el hospital La Fe los identificó como *S. cerevisiae* empleando el sistema API-32C. Para confirmar la adscripción de los 105 aislados clínicos a la especie *S. cerevisiae*, se utilizó el análisis de restricción del gen ribosomal 5,8S y los dos espaciadores internos transcritos flanqueantes, ITS 1 e ITS 2 (ver materiales y métodos). Los resultados mostraron que 100 de los 105 aislados clínicos totales, pertenecían a la especie *S. cerevisiae*, ya que exhibían el producto de amplificado (850 pb) y los perfiles de restricción (*Cfo* I (375+325+150), *Hae* III (325+230+170+125) y *Hinf* I (375+365+110)) típicos de la especie *S. cerevisiae* (Esteve-Zarzoso y col., 1999). Los 5 aislados clínicos restantes nº 45, 63, 86, 93 y 100 (ver Tabla 5 en materiales y métodos), mostraron productos de amplificado de 600, 740, 900, 740 y 900 pb respectivamente, indicando la adscripción de los mismos a especies distintas de *S. cerevisiae*. La reidentificación de los 5 aislados fue posible tras comparar el tamaño de los productos de amplificado, así como el perfil de restricción de los mismos, con los disponibles en la base de datos <http://yeast-id.com/> (Tabla 11). Como resultado los aislados nº 86 y 100

correspondieron a la especie *Candida glabrata*, el n° 45 a la especie *Candida cantarellii* y los aislados n° 63 y 93 a la especie de *Kluyveromyces lactis*.

Tabla 11. Tamaño de los productos de amplificado y perfiles de restricción de la región 5'8S-ITS para los aislados clínicos no *S. cerevisiae*

N° aislado	PCR (pb)	Perfil de restricción			Identificación
		<i>Cfo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	
86, 100	900	400+170+150+140	620+230	360+260+260	<i>C. glabrata</i>
45	600	300+300	500+90	310+190+90	<i>C. cantarellii</i>
63, 93	740	285+190+165+90	655+80	290+180+120+80+65	<i>K. lactis</i>

2. Caracterización molecular de los aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*

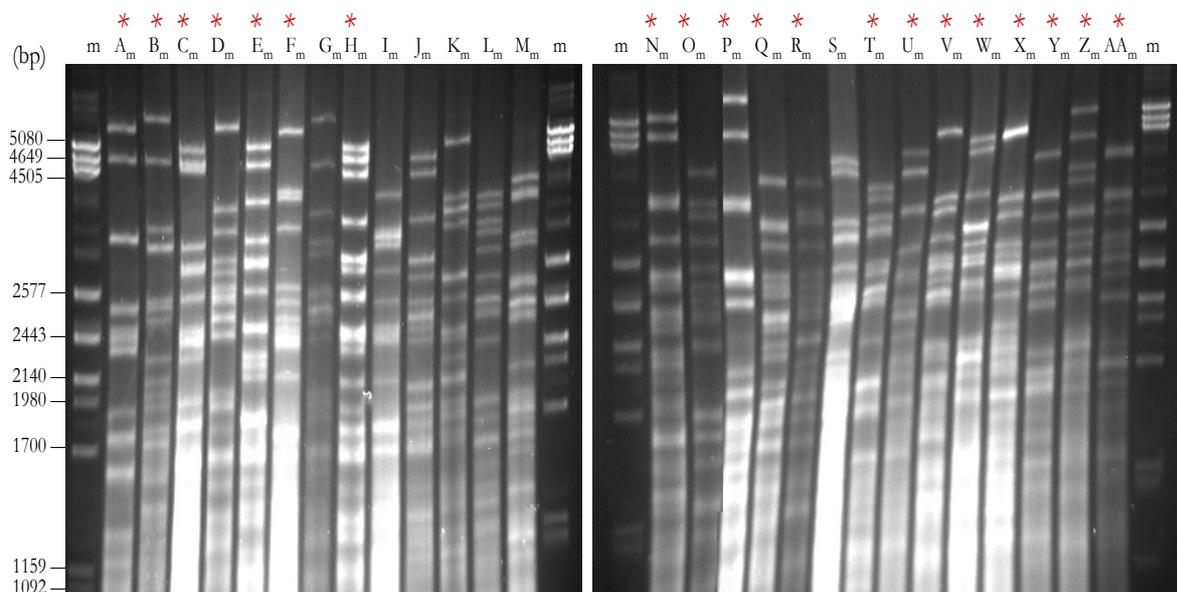
Los estudios de caracterización a nivel de cepa requieren la utilización de técnicas con gran poder de discriminación. Existen numerosos trabajos que muestran la eficiencia de distintas técnicas moleculares para la caracterización de aislados no clínicos de *S. cerevisiae*. Estas técnicas son el análisis de restricción del mtDNA, la electroforesis de cromosomas y técnicas basadas en la amplificación por PCR (RAPDs, elementos δ , zonas de escisión de intrones). Puesto que varios estudios concluyen que para llegar a la discriminación definitiva a nivel de cepa es necesaria la combinación de varias técnicas moleculares (Baleiras Couto y col., 1996; Fernández-Espinar y col., 2001), en el presente trabajo se han aplicado dos de estas técnicas, (el análisis de restricción del mtDNA y la amplificación de secuencias delta por PCR) para la caracterización de los 100 aislados clínicos de *S. cerevisiae* identificados en el apartado anterior y 7 cepas no clínicas (T73, CECT 1895, CECT 1462, CECT 1942, Cinta roja, Plus vital y el preparado farmacológico ultralevura, (ver Tabla 6 del apartado de materiales y métodos). Trabajos previos mostraron la utilidad de ambas técnicas para la caracterización de cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Querol, 1992 a,b y Querol 1994; Guillamón, 1996; Fernández-Espinar, 2001)

2.1. Análisis de restricción del DNA mitocondrial

En primer lugar realizamos el análisis de restricción del DNA mitocondrial, usando la endonucleasa *Hinf* I. Como resultado se obtuvieron 28 patrones de restricción diferentes.

Estos datos se resumen en la Tabla 12 y la Figura 11 muestra ejemplos de los patrones de restricción obtenidos.

A



B

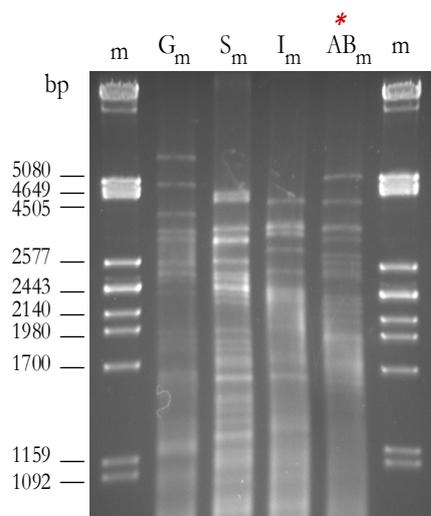


Figura 11. Análisis de restricción del DNA mitocondrial.

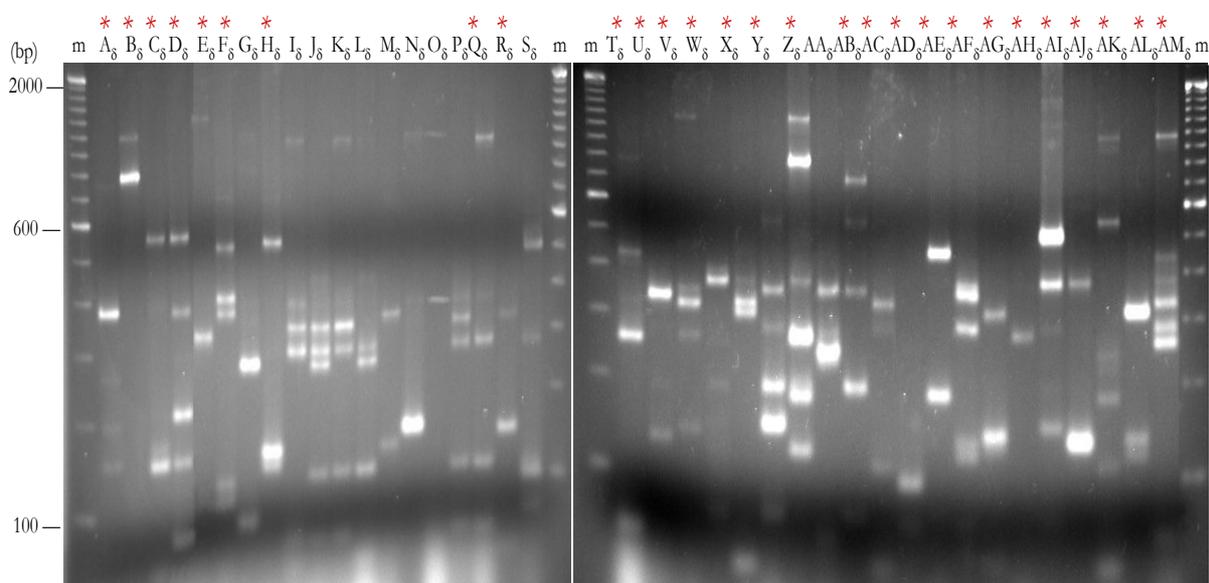
Ejemplos de los patrones de restricción de DNA mitocondrial obtenidos al digerir con *Hinf* I el DNA de 96 aislados clínicos de *S. cerevisiae* proporcionados por el hospital Vall d' Hebrón, de 6 cepas industriales, y de la cepa probiótica *S. cerevisiae* var. *boulardii* (A) y patrones obtenidos al digerir el DNA de 4 aislados clínicos proporcionados por el hospital La Fe (B). En la Tabla 12 se muestran que cepas presentan cada uno de los patrones observados. Se ha marcado con un asterisco aquellas cepas que presentan un patrón único. Se ha usado como marcador λ DNA digerido con la endonucleasa *Pst* I (carrera m).

Veintiún patrones de restricción correspondieron a una única cepa (marcados con un asterisco en la Figura 11) y los restantes 7 patrones de restricción comprendían un número variable de cepas: el grupo G_m se compone de 21 cepas, el grupo mayoritario I_m , que se compone de 54 cepas, el grupo K_m que contiene 3 cepas y los grupos J_m , L_m , M_m y S_m que contienen 2 cepas cada uno.

2.2. Amplificación por PCR de elementos delta

Tal y como se describe en la Introducción, otra técnica muy utilizada para la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* es la amplificación por PCR de elementos δ . Cuando aplicamos esta técnica a las mismas cepas que en el apartado anterior se observaron un total de 40 patrones de amplificación distintos y de la misma manera que en el caso anterior, se nombraron con una letra distinta cuando se trataba de patrones distintos. Los resultados se resumen en la Tabla 12 y la Figura 12 muestra ejemplos de los perfiles de amplificación obtenidos. 30 patrones de amplificación correspondieron a una única cepa (marcados con un asterisco en la Figura 12) y las 74 cepas restantes se incluyeron en grupos (G_{δ} : 22 cepas; J_{δ} : 34 cepas; K_{δ} : 5 cepas; N_{δ} : 3 cepas, I_{δ} , L_{δ} , M_{δ} , O_{δ} , P_{δ} , S_{δ} y AA_{δ} : 2 cepas cada uno).

A



B

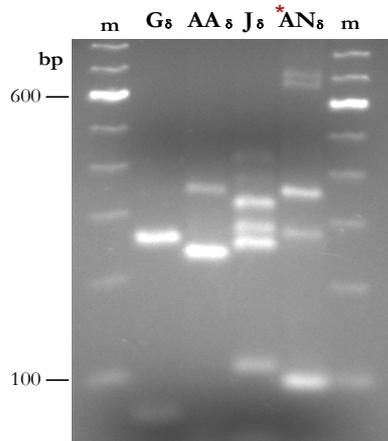


Figura 12. Amplificación de elementos delta. Los productos de PCR obtenidos tras la amplificación con los cebadores $\delta 1$ y $\delta 2$, de los 7 aislados no clínicos y los aislados clínicos de *S. cerevisiae*, proporcionados por el Hospital Vall d'Hebrón (A) y de los 4 aislados proporcionados por el hospital La Fe (B). Las cepas con un único patrón de amplificación se marcaron con un asterisco. Se ha usado como marcador de peso molecular “100 bp DNA Ladder” de Gibco BRL (carrera m).

2.3. Combinación de ambas técnicas

Al comparar el número de patrones diferentes que se obtuvieron con cada una de las técnicas, observamos que la amplificación por PCR de los elementos δ dio lugar a un mayor nivel de discriminación que el análisis de restricción del mtDNA. De hecho, de las 54 cepas que forman el patrón de mitocondrial I_m , 33 fueron idénticas (grupo J_δ), tras aplicar la amplificación por PCR de los elementos δ , mientras que 20 se agruparon en 2 patrones diferentes (ver Tabla 12). Ya que el nivel de discriminación era diferente entre ambas técnicas, decidimos combinar los resultados de ambas, obteniéndose un total de 41 patrones compuestos: 30 fueron cepas individuales y 11 fueron grupos (Tabla 12). Entre las cepas individuales encontramos 4 de las cepas no clínicas (T73, CECT 1895, CECT 1462, CECT 1492) y el resto correspondieron a aislados clínicos. Los 11 grupos difieren en el número de cepas que los componen, desde 21 y 34 para los grupos G_m/G_δ y I_m/J_δ respectivamente, a 5 para el grupo I_m/K_δ , 3 para el grupo K_m/N_δ y 2 para los grupos I_m/I_δ , I_m/L_δ , J_m/M_δ , L_m/O_δ , I_m/P_δ , M_m/S_δ y S_m/AA_δ . Algunos de estos grupos también difieren en el origen de las cepas, de hecho entre las 21 cepas que forman el grupo compuesto G_m/G_δ , la mayoría son aislados de heces, excepto las cepas N° 7, 81 y F3 que fueron aislados de faringe, vagina y sangre respectivamente. En este patrón también se encuentra la cepa probiótica de *S. boulardii*, recuperada de una preparación comercial.

Por lo que respecta al segundo grupo mayoritario, el patrón compuesto I_m/J_δ , de entre las 34 cepas que lo componen, 15 provienen de heces, 10 de vagina, 6 del sistema respiratorio y 1 de sangre. Estas cepas comparten patrón compuesto con dos cepas de panadería de este estudio (Cinta Roja y Plus Vital).

Por otro lado hemos encontrado que 5 cepas (n° 12, 18, 26, 41 y 42) que provienen del tracto gastrointestinal y presumiblemente se las puede considerar cepas comensales, también han sido aisladas de otros sitios del cuerpo. En concreto, la cepa n° 18 comparte patrón compuesto (I_m/K_δ) con las cepas de origen vaginal n° 59, 64 y 66 y también con la cepa de origen respiratorio n° 87; las cepas 41 y 42 comparten el patrón compuesto K_m/N_δ con la cepa n° 106, un aislado de orina del mismo paciente; la cepa n° 26 comparte el patrón compuesto I_m/L_δ con la cepa de vagina n° 62; la cepa n° 12 con la cepa de vagina n° 57 (I_m/I_δ) y finalmente las cepas de origen respiratorio n° 84 y el aislado de sangre F20 comparten el patrón compuesto S_m/AA_δ . Sin embargo, también encontramos grupos homogéneos para el origen de aislamiento, como es el caso del grupo J_m/M_δ , que incluye

cepas aisladas del tracto respiratorio y los grupos I_m/P_δ , L_m/O_δ y M_m/S_δ que incluyen aislados de vagina.

Tabla 12. Patrones tipo obtenidos al aplicar la técnica de análisis de restricción del mtDNA y la amplificación por PCR de secuencias δ , así como patrones compuestos resultado de la combinación de las mismas

Patrón mtDNA	Patrón δ PCR	Patrón compuesto	Código de las cepas
A_m	A_δ	A_m/A_δ	T73
B_m	B_δ	B_m/B_δ	CECT1895
C_m	C_δ	C_m/C_δ	CECT1462
D_m	D_δ	D_m/D_δ	CECT1942
E_m	E_δ	E_m/E_δ	5
F_m	F_δ	F_m/F_δ	6
G_m	G_δ	G_m/G_δ	7, 8, 9, 10, 23, 24, 25, 29, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 44, 46, 47, 48, 81, F3, Ultralevura
H_m	H_δ	H_m/H_δ	11
I_m	I_δ	I_m/I_δ	12, 57
I_m	J_δ	I_m/J_δ	13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 30, 31, 38, 43, 54, 55, 58, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 85, 91, 94, 95, 96, 97, F27, Cinta roja, Plus vital.
I_m	K_δ	I_m/K_δ	18, 59, 64, 66, 87
I_m	L_δ	I_m/L_δ	26, 62
J_m	M_δ	J_m/M_δ	32, 33
K_m	N_δ	K_m/N_δ	41, 42, 106
L_m	O_δ	L_m/O_δ	49, 80
I_m	P_δ	I_m/P_δ	50, 56
I_m	Q_δ	I_m/Q_δ	51
I_m	R_δ	I_m/R_δ	52
I_m	G_δ	I_m/G_δ	53
M_m	S_δ	M_m/S_δ	60, 61
I_m	T_δ	I_m/T_δ	65
N_m	U_δ	N_m/U_δ	67
O_m	V_δ	Q_m/V_δ	68
P_m	W_δ	P_m/W_δ	71
I_m	X_δ	I_m/X_δ	78
Q_m	Y_δ	Q_m/Y_δ	82
R_m	Z_δ	R_m/Z_δ	83
S_m	AA_δ	S_m/AA_δ	84, F20
T_m	AB_δ	T_m/AB_δ	88
I_m	AC_δ	I_m/AC_δ	89
U_m	AD_δ	U_m/AD_δ	90
V_m	AE_δ	V_m/AE_δ	92
W_m	AF_δ	W_m/AF_δ	98
X_m	AG_δ	X_m/AG_δ	99
I_m	AH_δ	I_m/AH_δ	101
Y_m	AI_δ	Y_m/AI_δ	102
Z_m	AJ_δ	Z_m/AJ_δ	103
AA_m	AK_δ	AA_m/AK_δ	104
I_m	AL_δ	I_m/AL_δ	105
I_m	AM_δ	I_m/AM_δ	107
AB_m	AN_δ	AB_m/AN_δ	F15

3. Estudio de las relaciones filogenéticas mediante el análisis de secuencias del gen mitocondrial *COX2*

Tal y como describe en la Introducción, existen numerosas técnicas empleadas para estudiar la diversidad genética entre aislados clínicos e industriales de *S. cerevisiae* (amplificación por PCR de elementos δ , análisis de microsatélites y el análisis de RFLP). Dichas técnicas basan su metodología en la tipificación de su DNA, obteniendo de ese modo patrones de DNA para cada cepa, que proporcionan información del grado de polimorfismo genético entre las cepas en estudio. Además, estas técnicas permiten también estimar el grado de relación entre microorganismos, de hecho muchos de los estudios realizados hasta el momento sobre biodiversidad de aislados clínicos presentan árboles filogenéticos inferidos por comparación de patrones de DNA (Hennequin y col., 2001; McCullough y col., 1998a; Posteraro y col., 1999; Posteraro y col., 2005). Sin embargo, las estimaciones basadas en la tipificación del DNA son menos precisas que las que se derivan de la comparación de secuencias, ya que constituyen medidas indirectas de la divergencia genética que no cumplen las premisas necesarias para su utilización en el análisis filogenético (Swofford y col., 1996).

Por todo ello, en este estudio decidimos profundizar en las relaciones filogenéticas que podrían existir entre los aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*, caracterizados previamente en el apartado anterior (de Llanos y col., 2004; 2006a). Para ello se seleccionó el gen mitocondrial *COX2* que codifica para la subunidad II del complejo citocromo-c oxidasa. Las filogenias basadas en las secuencias de dicho gen proporcionan relaciones filogenéticas más estrechas que cuando se emplean otras secuencias como las de rRNA. Además trabajos previos basados en el análisis de secuencias del gen *COX2* (Belloch y col., 2000) o de secuencias de multigenes (Kurtzman y Robnett, 2003), han mostrado que este tipo de análisis proporcionan una gran resolución para establecer relaciones filogenéticas entre las especies del género *Saccharomyces* y otros géneros de levaduras como *Kluyveromyces*.

Análisis filogenético de secuencias del gen *COX2*

Para abordar dicho estudio se seleccionaron 22 cepas industriales, entre las que se encuentran las cepas comerciales de panadería y la cepa probiótica de *S. boulardii*, puesto que con el análisis genético anterior, habían mostrado el mismo patrón molecular que otros aislados clínicos. Entre los 101 aislados clínicos también se seleccionaron 36, en base a los patrones moleculares compuestos establecidos anteriormente tras combinar los patrones proporcionados por el análisis restricción del mtDNA y la amplificación de secuencias delta.

Para la obtención de las secuencias del gen *COX2*, seguimos la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos. En la Figura 13 se muestra un árbol Neighbor-Joining construido a partir de las distancias nucleotídicas entre genes *COX2* corregidas mediante el modelo de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1981) con una distribución gamma de tasas de sustitución ($\alpha = 1.38$). El mejor modelo de evolución fue determinado mediante el test de relaciones de verosimilitud, utilizando los programas PAUP* y MODELTEST.

Tal y como puede observarse a partir del árbol, no existen grupos filogenéticos bien diferenciados, es decir los aislados clínicos y las cepas industriales no forman poblaciones genéticas diferenciadas, sino que se encuentran entremezclados. Únicamente se observan dos grupos definidos, el formado por el grupo de cepas industriales ICV-17, 1479, 1882, 11.757, 11.761 e ICV-16, que muestra un valor “bootstrap” del 99%, donde se incluye también el aislado genital N° 52. El segundo grupo está formado por 3 aislados clínicos (N° 60 y 62 e YJM 128), con un valor de “bootstrap” del 94%. Es muy interesante señalar que el aislado YJM 128 fue caracterizado en un trabajo previo como virulento (Clemons y col., 1994). Aunque para el resto de los aislados clínicos y las cepas industriales no se establecen grupos filogenéticamente claros, cabe destacar que con los datos de secuencias del gen *COX2*, se confirman los resultados establecidos en el apartado anterior al emplear las 2 técnicas moleculares. Las cepas industriales *S. boulardii* y las cepas panaderas de nuevo vuelven a encontrarse entremezcladas con un grupo de aislados clínicos de diferentes orígenes, mostrando cada grupo niveles de “bootstrap” suficientemente elevados (85% y 86% respectivamente), lo cual indica que los aislados que forman cada grupo podrían considerarse la misma cepa o bien cepas filogenéticamente muy cercanas, entre ellas y con las cepas industriales de panadería o *S. boulardii*, con las que se agrupan en cada caso.

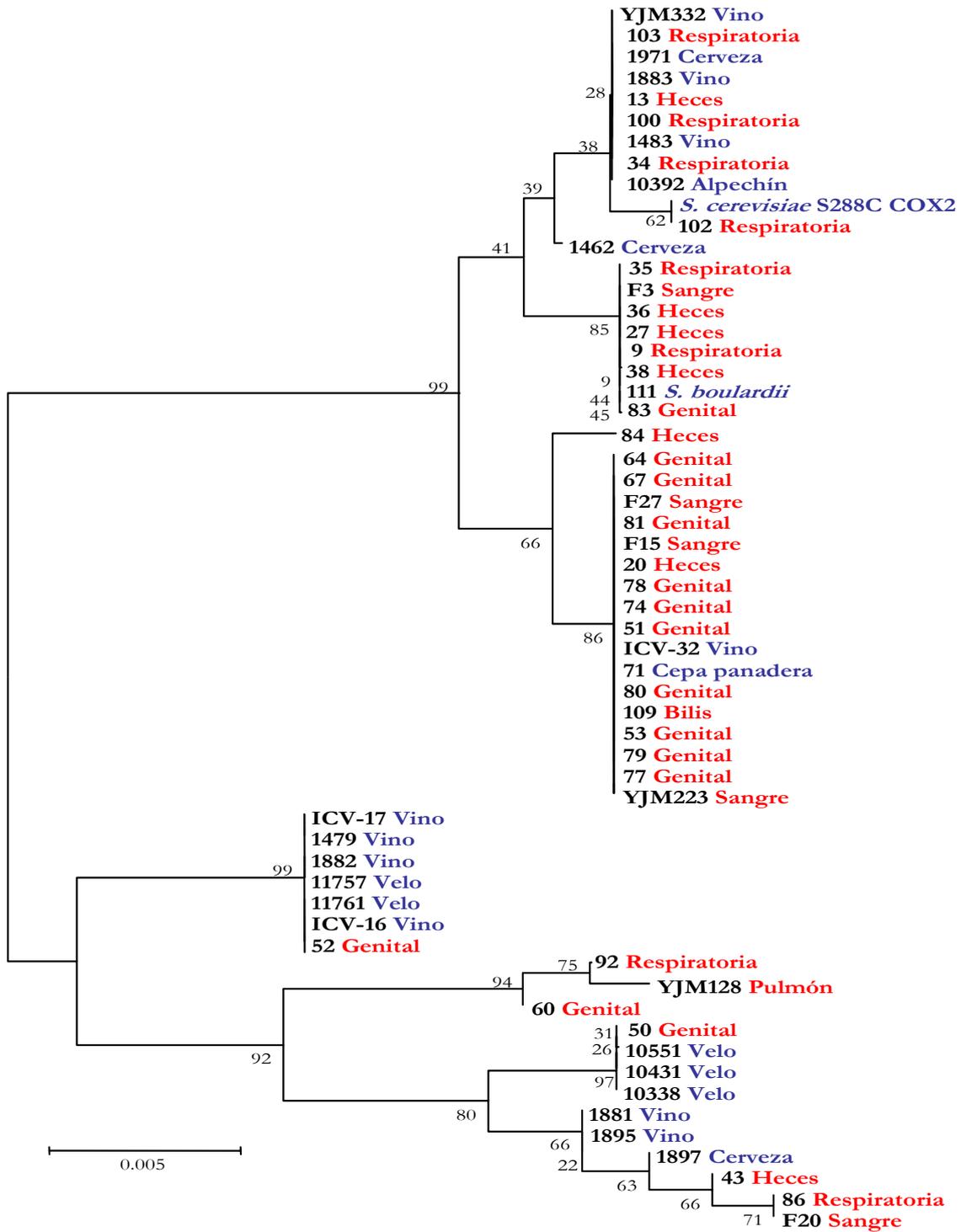


Figura 13. Árbol Neighbor-Joining. Árbol filogenético construido con el gen mitocondrial COX2 a partir de divergencias nucleotídicas y corregidas mediante el modelo Kimura de 2 parámetros. Los valores sobre las ramas corresponden a los valores “bootstrap” determinados a partir de 1000 pseudo-réplicas de la matriz de secuencias. Las cepas que se muestran en color azul pertenecen a cepas industriales y las que se encuentran marcadas en rojo, a aislados clínicos de *S. cerevisiae*.

4. La cepa probiótica de *S. boulardii* y las cepas de panadería como posibles orígenes de infección en humanos

Tanto la caracterización molecular como el análisis filogenético de *COX 2* descritos anteriormente, han mostrado que únicamente las cepas comerciales de panadería (Cinta roja y Plus vital) y *S. boulardii* parecen tener una estrecha relación genética con un grupo de aislados clínicos, que las restantes cepas industriales. Este dato hace pensar que estas cepas industriales podrían haber sido el origen de colonización de dichos aislados clínicos en los pacientes donde han sido recuperados. En la Figura 14 se muestran las dos únicas agrupaciones entre aislados clínicos y cepas industriales en base al análisis molecular y al filogenético.

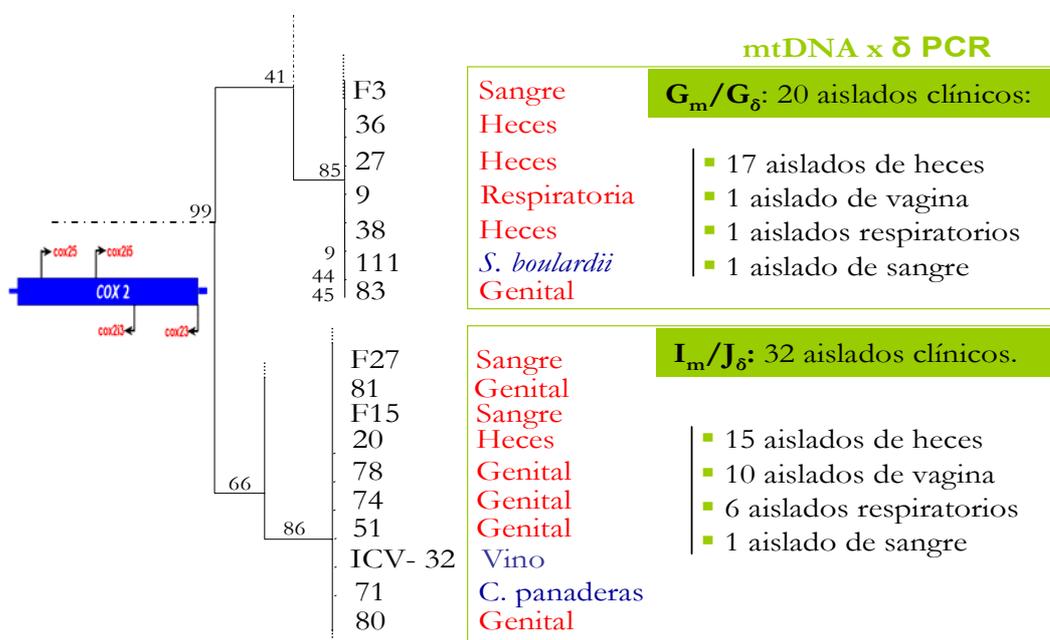


Figura 14. Dos posibles casos de colonización exógena. El análisis molecular y filogenético empleado reveló la agrupación de las cepas de panadería y la cepa de *S. boulardii* junto con un grupo de aislados clínicos de distinta procedencia.

El primer posible caso de colonización exógena viene dado por dos cepas comerciales de panadería (Cinta roja y Plus vital), las cuales comparten el mismo patrón compuesto I_m/J _{δ} que un grupo de 32 aislados clínicos, 15 aislados de heces, 10 aislados vaginales, 6 aislados del tracto respiratorio y 1 aislado de sangre, lo que indicaría la capacidad de estas cepas para crecer en diferentes ambientes. En este caso, la exposición exógena de estas cepas vendría dada a través de la ingestión de alimentos o bebidas. Además, el hecho de

que en este grupo también se encontrarse un aislado de sangre indicaría que las cepas de panadería podrían desarrollar una fungemia tras ser ingeridas.

El segundo caso de posible colonización exógena viene dado por la cepa bioterapéutica *S. boulardii*, ya que comparte el patrón compuesto G_m/G_8 con 20 aislados clínicos, entre ellos 17 son de heces, 1 de vagina, otro de faringe y el último de sangre. La exposición exógena vendría dada por la administración oral de esta cepa como probiótico, explicando su presencia de forma mayoritaria en heces. Por otro lado, llama la atención la adquisición de esta cepa en faringe y vagina que podría explicarse por inhalación o autoinoculación respectivamente tras la manipulación de los paquetes y/o cápsulas comerciales de esta cepa. Por último, la presencia en sangre de *S. boulardii* podría deberse a una contaminación venosa a través del uso de catéteres intravenosos.

Estos resultados estarían mostrando, por un lado, que la exposición exógena a ambas cepas industriales (de panadería y *S. boulardii*) podría constituir un posible origen de colonización en humanos por cepas pertenecientes a *S. cerevisiae*. Además, el hecho de encontrar entre el grupo de aislados clínicos, dos recuperados de sangre, sugeriría que estas levaduras podrían tener un papel importante en el proceso infeccioso que sufrieron los pacientes.

¿Podemos establecer que los aislados clínicos que comparten el mismo patrón molecular que las cepas panaderas y que la cepa de *S. boulardii* tienen en éstas su origen?

Para poder confirmar si, efectivamente, los aislados clínicos que se agrupan estrechamente en cada caso con las cepas panaderas y con *S. boulardii*, podrían tener un origen en panadería o un origen como agente terapéutico, se requería de un estudio exhaustivo de las características propias y distintivas de estas cepas de alimentos. Este estudio no pudo ser abordado para el grupo de aislados clínicos asociados a *S. boulardii*, ya que al ser una levadura recomendada para la prevención y tratamiento de diarreas, en concreto muy eficaz en el tratamiento de diarreas causadas por *Clostridium difficile* (Mc Farland y col., 1994), sus características como probiótico, fueron difíciles de analizar en nuestro laboratorio (tal y como se explica en el apartado de Discusión). Sin embargo, el estudio del posible origen de los aislados clínicos a partir de cepas panaderas con las que se agrupan pudo abordarse. Las cepas comerciales de panadería poseen una serie de propiedades fundamentales y únicas, no presentes en otras levaduras industriales, relacionadas tanto con su producción industrial

como con el proceso de panificación en el que van a ser empleadas, que pudieron ser estudiadas con mayor facilidad en el laboratorio.

4.1. Posible origen de panadería de los aislados clínicos que comparten el mismo patrón molecular que la cepa Cinta roja

En este apartado se han estudiado las características necesarias en el proceso de panificación: elevada actividad fermentativa en masas panarias y la actividad enzimática maltasa, necesarias para la obtención de un producto estable.

4.1.1. Selección de cepas

Las cepas comerciales de panadería, Cinta roja y Plus vital, incluidas en este trabajo están estrechamente relacionadas con 32 aislados clínicos con diferentes orígenes de aislamiento (Figura 13). Debido al elevado número de cepas que formaban dicho grupo, únicamente se seleccionaron 3 cepas con diferentes orígenes de aislamiento (el aislado de sangre F27; el aislado vaginal nº 75 y el aislado de heces nº 20), junto con las dos cepas vínicas T73 y ICV-30, utilizadas como controles negativos y la cepa comercial de panadería Cinta roja, que se utilizó como control positivo. Ya que los aislados clínicos han sufrido el paso por un hospedador, se creyó conveniente incorporar al estudio colonias recuperadas de riñón y cerebro extraídos de ratones BALB/c previamente inoculados con la cepa panadera Cinta roja. Estos ensayos realizados con ratones se describen en el apartado de patogenicidad y virulencia y constan básicamente de la inoculación intravenosa en la cola lateral de ratones, de una dosis de 2×10^7 UFC/mL de cada cepa a ensayo de *S. cerevisiae*, empleando tres cepas de ratones, entre ellas la cepa de ratones sanos BALB/c. Para realizar el seguimiento de la colonización de cada cepa de levadura, se sacrificaron dos ratones/cepa y se extrajeron el cerebro y riñones en diferentes momentos del ensayo. Es precisamente a partir de uno de estos ensayos, del cual se recuperaron colonias de los cerebros de ratones BALB/c previamente inoculados con la cepa panadera Cinta roja.

4.1.2. Propiedades de las cepas de panadería características del proceso de panificación

Para comprobar la capacidad fermentativa y la actividad maltasa de las cepas seleccionadas, cada una de ellas se creció en placas de melaza, sustrato comúnmente empleado en la producción de biomasa celular en la industria de las cepas de panadería, y tras 20 horas de incubación se obtuvo masa celular suficiente para proseguir con el estudio de la producción de CO₂ y la determinación de la actividad enzimática maltasa, tal y como se describe en el apartado correspondiente de los Materiales y Métodos.

a) Actividad fermentativa en Sistema modelo sintético LD

La determinación del gas desprendido durante el proceso de fermentación se realizó empleando un “fermentómetro” manufacturado (aparato Chittick), tal y como se describe en materiales y métodos. Dicho aparato permite cuantificar la cantidad de CO₂ producido durante la fermentación, como la medida de desplazamiento de una solución manométrica contenida en una bureta graduada.

Las fermentaciones se realizaron empleando una masa panaria salada, líquida, libre de harina (Sistema modelo LD). Este sistema mimetiza la composición principal de azúcares de las masas panarias saladas (Panadero y col., 2005) y se emplea habitualmente para probar la capacidad fermentativa de nuevas cepas de panadería desarrolladas en programas de producción. Contiene sorbitol para reducir la actividad de agua, glucosa y maltosa, principales azúcares de las masas panarias, y amonio como única fuente de nitrógeno, contiene además vitaminas y minerales.

En la Figura 15 se representan las curvas de fermentación para cada cepa a lo largo de los 180 minutos de duración del ensayo, observándose dos comportamientos fermentativos bien diferenciados al compararlos con las de la cepa panadera Cinta roja, que alcanza durante la fermentación niveles de CO₂ superiores a 250 mL. Por un lado, se observó como el aislado de Cinta roja recuperado del cerebro de ratón BALB/c (CR-r) presentó niveles de CO₂ intermedios entre la cepa panadera original y los aislados clínicos, los cuales muestran niveles de CO₂ entre los 150 y 200 mL. Por otro lado, las cepas vínicas T73 e YCV-30 empleadas como controles negativos, fueron capaces de fermentar de forma similar al resto de cepas mientras existió glucosa libre como fuente de carbono disponible en el medio LD, pero cuando dicha fuente de carbono se agotó y solo quedó la maltosa disponible, pararon sus

actividades fermentativas y a partir de ese momento mantuvieron niveles muy bajos y constantes hasta el final del ensayo, inferiores a 100 mL de CO₂. Estos datos indicarían que los aislados clínicos F27, N° 20 y 75 tendrían la capacidad de fermentar la masa panaria libre de harina del Sistema modelo, que no tienen las levaduras vínicas analizadas.

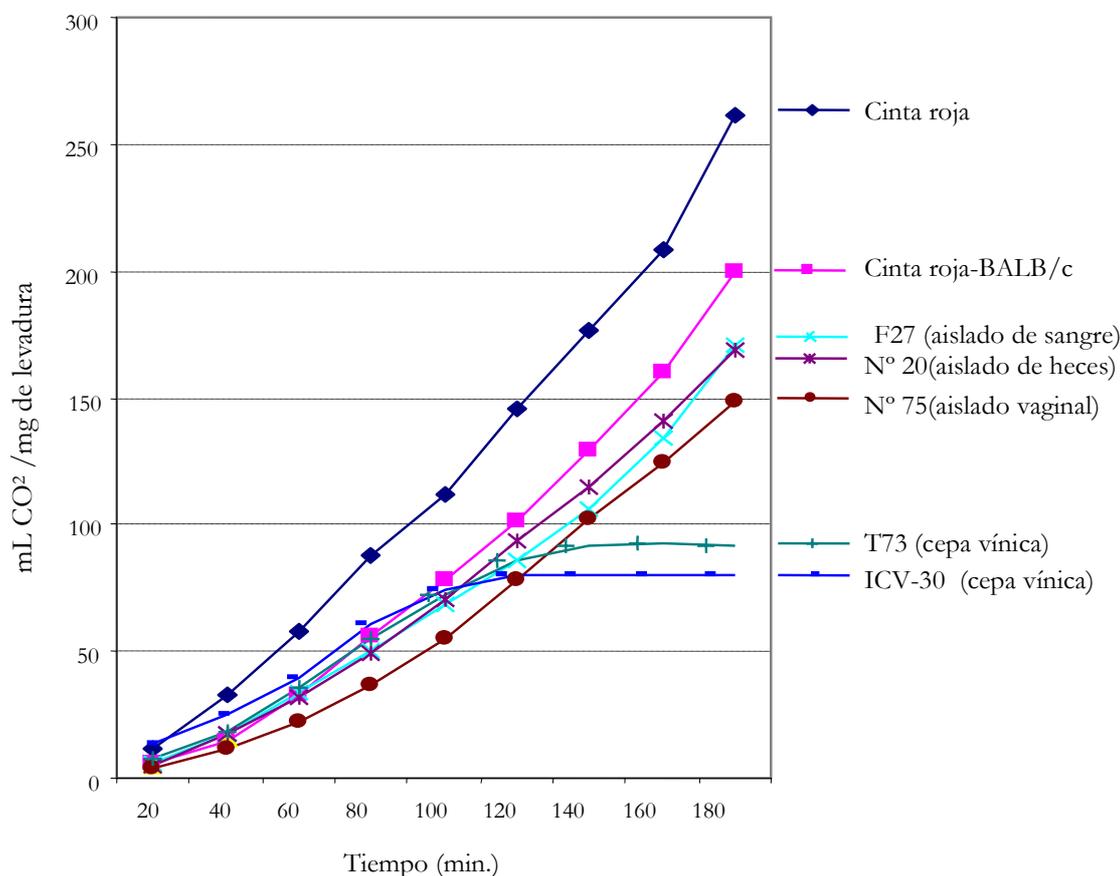


Figura 15. Curvas de producción de CO₂ de las cepas en estudio durante el proceso fermentativo en sistema modelo LD. La desviación estándar de cada punto y para cada cepa no se muestra en las curvas, pero siempre fueron menores al 5%. Cada punto representa la media de la medida de producción de gas a partir de tres experimentos independientes.

De estos tres comportamientos fermentativos es muy destacable la pérdida de capacidad fermentativa que experimentó el aislado de Cinta roja recuperado del cerebro de ratón BALB/c (CR-r), respecto a la original (CR), que podría estar indicando que el paso de esta cepa por el hospedador produce en ella una pérdida en su capacidad fermentativa original. Este mismo comportamiento se observó en los aislados clínicos con respecto a la cepa CR e incluso con respecto a CR-r. Estos aislados clínicos fueron capaces de llevar a

cabo una fermentación de masa panaria, pero con niveles inferiores a los de la cepa original, pero muy similares a los de CR-r. Estos resultados parecen indicar que el paso de esta cepa por un hospedador estaría produciendo cambios como la pérdida de capacidad fermentativa. Además se comprobó que este fenómeno se observaba con independencia de la cepa de ratón de la cual se recuperaban las colonias (BALB/c; DBA/2N e ICR/Swiss) y del órgano de aislamiento (cerebro o riñón).

b) Actividad enzimática maltasa

La tasa de producción de gas de las cepas de panadería depende de la formulación de la masa panaria, de parámetros concretos de la fermentación y específicamente de las características intrínsecas de las cepas de panadería. Uno de esos parámetros importantes que determina la actividad fermentativa de *S. cerevisiae* en masas panarias con bajo contenido en azúcar, son precisamente los niveles de maltasa. La determinación de la actividad enzimática maltasa se realizó empleando un método colorimétrico, tal y como se describe en Materiales y métodos. Un buen rendimiento en la elevación de las masas panarias ha sido correlacionado con altos niveles en la actividad maltasa y en la tasa fermentativa (Beudeker y col., 1990). En la Figura 16 se muestran los niveles de actividad maltasa observados para las diferentes cepas ensayadas.

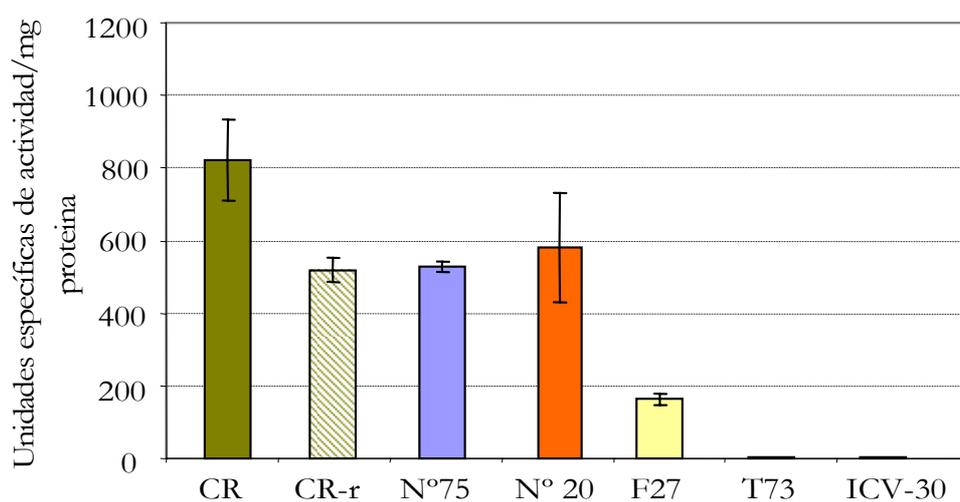


Figura 16. Niveles de actividad maltasa. Los valores se han expresado como las medias y desviaciones de tres experimentos independientes. Las cepas ensayadas son CR: (cepa comercial); CR-r (el aislado de Cinta roja recuperado del cerebro de ratón BALB/c); N° 75 (aislado genital); N° 20 (aislado de heces); F27 (aislado de sangre); T'73 e ICV-30 (cepas vínicas).

Los resultados muestran un comportamiento similar al observado en las fermentaciones, correlacionándose perfectamente ambos parámetros. La cepa de panadería comercial CR mostró los niveles más elevados, seguidos del conjunto de los aislados clínicos y el aislado recuperado de CR del cerebro de ratones BALB/c (CR-r), siendo el aislado de sangre F27 el que mostró el nivel más bajo, aunque significativo. Por último las cepas vínicas no mostraron ninguna actividad maltasa, corroborando lo que exponíamos anteriormente, estas cepas fermentaron el medio LD mientras existía glucosa libre y disponible en el mismo. Una vez agotada esta fuente de carbono, la fermentación se detuvo, ya que no son capaces de metabolizar la maltosa presente en el medio por no disponer de la enzima maltasa.

5. Discusión

S. cerevisiae, es una levadura considerada tradicionalmente de uso industrial y, aunque puede colonizar los tractos respiratorio, genitourinario y gastrointestinal de humanos, realmente no se sabe si es verdadera comensal en el hombre. La incidencia de los aislados clínicos de *S. cerevisiae* no es significativa comparada con la de otras cepas de levaduras del género *Candida*. De hecho en un trabajo realizado por Xu y col., (1999) en el que se estudió la colonización por diferentes levaduras en mujeres, observaron que sólo 2 de cada 80 aislados de levaduras eran *S. cerevisiae*. En los últimos años, la presencia de *S. cerevisiae* se ha incrementado significativamente en muestras clínicas. En el caso concreto de nuestro estudio, 96 aislados de *S. cerevisiae* han sido recuperados en el hospital Vall d'Hebrón de Barcelona en un periodo de unos 6-7 años (de Llanos y col., 2004).

El hecho de que la proporción de aislados clínicos de levaduras atribuidos a *S. cerevisiae* se haya incrementado, probablemente venga dado por el desarrollo de nuevos sistemas comerciales de identificación para aplicación clínica, que permiten diferenciar entre *S. cerevisiae* y *Candida sp*, las levaduras más comunes que causan fungemia. En nuestro caso, los dos hospitales que aportaron muestras para el estudio, usaron dos sistemas comerciales para la identificación de las cepas, el sistema AMS-Vitek Yeast-Card y el sistema API-32C. La fiabilidad de estos sistemas comerciales se evaluó comparando los resultados de sus identificaciones con los que nos proporcionó el análisis de restricción de la región ribosómica 5,8S-ITS. Este método molecular es muy útil para la identificación a nivel de especie (Esteve-Zarzoso y col., 1999) y ha sido aplicado con éxito para fines médicos en la diferenciación de especies de *Saccharomyces* genotípicamente diferentes (McCullough 1998a). Los resultados han

demostrado que los sistemas comerciales utilizados por los hospitales son capaces de discriminar las especies de *S. cerevisiae* de otras especies de levaduras clínicas, de hecho 100 de los 105 aislados clínicos atribuidos a esta especie estuvieron bien identificados (95,24% de fiabilidad).

Respecto a la caracterización a nivel de cepa, es necesario utilizar herramientas que den un alto nivel de discriminación. En el caso de *S. cerevisiae*, trabajos previos de nuestro grupo en caracterización de cepas vínicas (Querol, 1992 a,b y Querol 1994; Guillamón, 1996; Fernández-Espinar, 2001), nos han mostrado que el análisis de restricción del mtDNA y la amplificación por PCR de elementos δ podrían ser herramientas adecuadas, por ello aplicamos también estas técnicas a la caracterización de aislados clínicos de *S. cerevisiae*. El análisis de restricción del mtDNA identificó 21 cepas individualmente y el resto de cepas las separó en 7 grupos. Por otro lado, al aplicar la amplificación por PCR de secuencias δ , se identificaron 30 cepas individuales y 10 grupos que agruparon el resto de cepas. Ambas técnicas muestran un fácil manejo, pudiendo considerarse útiles para el análisis rutinario de levaduras de carácter clínico. Por una parte, la técnica basada en la amplificación por PCR de secuencias delta parece más conveniente utilizarla rutinariamente, ya que además de mostrar un mayor nivel de discriminación, es una técnica rápida y además muestra la ventaja de que en la reacción de PCR se puede utilizar tanto DNA purificado como de muestra de una colonia e incluso se podrían utilizar muestras de tejidos humanos o fluidos, tras realizar las adaptaciones apropiadas. Pero esta técnica tiene ciertas desventajas y es que genera patrones menos estables, que dependen de la cantidad de DNA de muestra. Sin embargo, el análisis del mtDNA es muy reproducible y su aplicación es recomendable especialmente cuando los resultados de diferentes laboratorios deben ser comparados.

Aunque estas técnicas permiten tipificar las levaduras a nivel de cepa y nos pueden dar una idea de lo similares que pueden ser unas cepas de otras, no nos proporcionan información de las relaciones filogenéticas entre aislados. Por ello se decidió realizar un análisis filogenético basado en secuencias del gen mitocondrial *COX2*. Estudios previos llevados a cabo por Belloch y colaboradores (2000) mostraron la gran utilidad de esta técnica en el análisis filogenético del género *Kluyveromyces*. El estudio filogenético llevado a cabo en este trabajo ha permitido comprobar que entre los aislados clínicos y las cepas industriales no se observan poblaciones genéticamente diferenciadas. Ambos tipos de cepas se agrupan juntas en dos grupos genéticamente diferenciados. Por otro lado ha sido interesante comprobar que mediante este estudio filogenético se obtuvieron los mismos resultados que las técnicas moleculares empleadas. De nuevo, las cepas panaderas (Cinta roja y Plus vital) y

el preparado probiótico de *S. boulardii* se agrupan junto a un grupo de aislados clínicos, confirmando así la gran proximidad que hay entre ellos y planteándose para estas cepas industriales dos posibles casos de colonización exógena.

Asociación entre los aislados clínicos y no clínicos

Ya que las exposiciones externas de *S. cerevisiae* ocurren en su mayoría a través de la ingestión de alimentos y bebidas, resulta interesante estudiar la asociación genética entre cepas de origen clínico y de origen alimentario. Las 6 cepas industriales escogidas para este propósito, se seleccionaron en base a su procedencia industrial y en base a datos de secuencia de levaduras aisladas de distintos alimentos, que se habían estudiado en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Fernández-Espinar y col., 2000 y 2003). Ya que otra forma de exposición exógena de esta especie de levadura ocurre a través del tratamiento terapéutico con *S. boulardii*, considerada actualmente como *S. cerevisiae* (McCullough y col., 1998b), se decidió incluir en este estudio una cepa de la misma, obtenida de un preparado comercial.

Con respecto al mecanismo de colonización, los agrupamientos obtenidos al combinar los resultados de ambas técnicas (40 patrones compuestos: 30 fueron cepas individuales y 10 grupos), mostraron que no hay un elevado grado de polimorfismo entre las cepas clínicas analizadas, de hecho solo un 27% de las cepas presentaron un patrón compuesto distintivo. Para estas cepas, una fuente de transmisión común o el contacto persona a persona, no parece explicar el origen de colonización y tampoco pudo establecerse la asociación entre cepa y lugar específico del cuerpo. En cuanto a las cepas no clínicas, solo las cepas de panadería y la cepa de *S. boulardii* se relacionaron genéticamente con cepas clínicas de este estudio. Las dos cepas de panadería (Cinta roja y Plus vital), compartieron el patrón compuesto I_m/J_8 con un grupo de 32 aislados clínicos, uno de los mayores grupos clínicos. Entre estas cepas se encontraron 15 aislados de heces, 10 aislados de vagina, 6 aislados del tracto respiratorio y un aislado de sangre, lo que indicaría la capacidad de estas cepas de crecer en diferentes ambientes. La presencia de levaduras de panadería en humanos ha sido descrita por varios autores (Hennequin y col., 2001; McCullough y col., 1998a; Posteraro y col., 1999; Wilson y col., 1988) y la fuente de colonización ha sido evaluada en algunos casos empleando métodos de tipificación del DNA, determinando que ésta puede ser gastrointestinal, por autoinoculación digital, o sexual (Posteraro y col., 1999). Cabe destacar que esta es la primera vez que una levadura relacionada con las de panadería se aísla de sangre (aislado F27), indicando que levaduras asociadas con alimentos son capaces de desarrollar

una infección si tiene lugar la entrada exógena de las mismas a través de alimentos y/o bebidas o bien por su manipulación industrial o en el hogar bajo la forma de preparados comerciales.

Otro origen exógeno se puede postular para el caso de los 20 aislados clínicos que comparten el patrón compuesto G_m/G_8 con la cepa bioterapéutica *S. boulardii*. Esta cepa es administrada para el tratamiento de casos severos de diarrea y generalmente se tolera bien y sin efectos secundario. Sin embargo, los estudios de colonización relacionados con esta cepa se han considerado de gran interés desde que en la literatura clínica ha sido descrita como responsable de numerosos casos de fungemia (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Hennequin y col 2000). Las cepas clínicas del grupo G_m/G_8 provienen principalmente de heces (89, 5%), pero también de faringe (Nº 7), vagina (Nº 8) y sangre (F3). Este resultado muestra que en este caso sí que existe asociación entre la cepa y el lugar de aislamiento (el tracto intestinal). La presencia de esta cepa en el tracto digestivo indicaría que *S. boulardii* ha sido administrada oralmente o ingerida voluntariamente por esos pacientes y ha permanecido en el intestino sin efectos negativo, ya que estudios previos muestran que no se encontró *S. boulardii* en pacientes no tratados (Hennequin y col., 2001). Sin embargo, la presencia de *S. boulardii* en faringe (nº 7) y vagina (nº 81) es menos frecuente. En el primer caso la adquisición de la cepa terapéutica podría darse por contaminación aérea al realizarse la apertura de los paquetes o cápsulas en las inmediaciones de las camas de los pacientes, como se muestra en otros casos (Hennequin y col., 2000) y la colonización del tracto respiratorio nos estaría indicando que *S. boulardii* podría diseminarse a través de la mucosa oral. Con respecto a la cepa de origen vaginal, ya que la paciente fue una trabajadora del hospital Vall d' Hebrón, la presencia de esta cepa en vagina podría venir dada por una autoinoculación a través de las manos contaminadas durante la manipulación de cápsulas (dato no disponible). Por último, con respecto a la presencia de *S. boulardii* en sangre (cepa F3), la explicación podría venir de un lado, por una posible administración de esta cepa terapéutica para tratar una diarrea asociada con la administración de antibióticos, ya que se trataba de una niña de 1 año, hospitalizada en la Unidad de Cuidados Intensivos de Pediatría del hospital La Fe. En este caso podría haber tenido lugar una translocación a través de la barrera intestinal, tal y como se ha descrito en otros casos (Lherm y col., 2002). Sin embargo, en su historial no había constancia de si dicha paciente había recibido tratamiento con *S. boulardii*. Otra explicación de esta fungemia podría venir por una contaminación venosa a través del uso de catéteres vasculares. Esta ruta de contaminación ha sido referida por varios autores (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Hennequin y col., 2000; Perapoch y col., 2000), de hecho

recientemente Herbrecht y Nivoix (2005) han revisado los efectos adversos de la administración del probiótico *S. boulardii* en pacientes con una salud frágil o con un catéter central venoso.

La colonización humana de las cepas de panadería y la cepa probiótica está relacionada probablemente por su gran nivel de manipulación por parte de los consumidores, en contraste con cepas de vino y cerveza, las cuales no aparecen relacionadas con muestras clínicas en este estudio.

Capacidad para causar infección

Tras analizar los resultados parece claro que existe cierta capacidad de colonización en ciertos subtipos genéticos, en particular se cumpliría para los casos de las cepas comerciales de panadería (Cinta roja y Plus vital) y *S. boulardii*, ya que sus patrones de DNA han sido identificados respectivamente entre un 32,3% y un 19,8% de los aislados clínicos en este estudio. Cabe por tanto preguntarse si existe una asociación entre la capacidad de colonizar humanos y la capacidad para causar una infección. Esta pregunta se puede contestar en parte a la vista de los resultados obtenidos para las cepas de panadería (Cinta roja y Plus vital) y la cepa de *S. boulardii*. Las cepas comerciales de panadería son idénticas a las cepas 75, 76, 77 y 79 aisladas de 3 pacientes con síntomas de infección vaginal. Trabajos previos en los que utilizaron otros métodos genotípicos como RFLPs del DNA total, usando la endonucleasa *Eco* RI (McCullough y col., 1998b) y microsatélites (Hennequin y col., 2001) encontraron que las cepas de panadería pueden ser inoculadas desde fuentes externas a la vagina, donde podrían causar una infección. Nuestros datos proporcionan evidencias de que estas cepas comercialmente disponibles, poseen propiedades asociadas con virulencia puesto que han sido capaces de causar infecciones entre pacientes, presumiblemente inmunocompetentes. A su vez la cepa de *S. boulardii* empleada fue indistinguible del aislado 81, procedente de la vagina de una paciente con vulvovaginitis. Entre las pacientes con infección sintomática en vagina, ninguna estaba embarazada o inmunocomprometida y 2 eran trabajadoras del Hospital Vall d' Hebrón. Estos datos apoyan la idea de que ciertos factores de predisposición, como el embarazo, podrían no ser importantes en la patogenicidad mientras que el contacto con una fuente exógena podría haber predispuesto a estas mujeres a una infección sintomática. El hecho de que sólo algunos individuos colonizados por estas levaduras manifiesten una infección podría depender de la concentración de levaduras existente en la fuente de contaminación exógena.

¿Realmente tienen un origen panadero los aislados clínicos próximos a las cepas panaderas?

Sin duda la combinación de las técnicas moleculares para la caracterización de levaduras a nivel de cepa y el estudio filogenético realizado en base al análisis de secuencias del gen mitocondrial *COX2*, nos ha permitido confirmar la estrecha relación entre ciertos aislados clínicos y dos cepas industriales, *S. boulardii* y las cepas panaderas. Estas cepas habrían podido colonizar y por tanto potencialmente causar una fungemia a través de las diferentes vías de entrada exógena, descritas anteriormente. Estos estudios han permitido establecer unas hipótesis sobre el origen de los aislados clínicos en cada caso, bien a partir de una cepa panadera o bien de una cepa probiótica, pero solo en el caso de las cepas panaderas ha sido posible comprobar que efectivamente algunos de los aislados clínicos pudieron tener un origen en cepas de panadería. Por lo que respecta a las características de *S. boulardii* como probiótico, aunque no están claras, radican principalmente en el efecto que tienen en el hospedador, como son su crecimiento rápido que favorece la disminución de la concentración de otros microbios al competir eficientemente por los nutrientes, o por el supuesto efecto trófico que producen sobre el intestino delgado del hospedador al liberar espermita y espermidina (Buts y col., 1994). Van der Aa Kühle y colaboradores (2005) estudiaron *in vitro* ciertas propiedades probióticas, como son la tolerancia a pH bajo y la sales biliares, la adhesión a células epiteliales del intestino y el efecto sobre la respuesta pro-inflamatoria en las células epiteliales del intestino expuestas a bacterias patógenas. Sin embargo, estos estudios eran muy difíciles de llevar a cabo en nuestro laboratorio, ya que la puesta a punto hubiera sido compleja y no era uno de los objetivos planteados en este trabajo.

Las cepas comerciales de panadería son cepas de *S. cerevisiae* domesticadas, que han sido seleccionadas y optimizadas para aplicaciones en panadería. Muchas de ellas son homotéticas con un alto grado de ploidía y baja habilidad de esporulación (Randez-Gil y col., 2003). Además, exhiben polimorfismo a nivel de cromosomas, así como reorganizaciones cromosómicas con múltiples translocaciones. Estas características especiales han sido resultado de una selección natural para adaptarse evolutivamente junto con sucesivas aplicaciones de programas de mejora. Finalmente la selección de estas cepas se realiza en base a la robustez, tasa de crecimiento o capacidad fermentativa. Teniendo en cuenta dichas características, las cepas seleccionadas se crecieron en placas de melaza, puesto que es el sustrato de crecimiento común en la industria panadera para la producción de biomasa

celular, procediendo posteriormente a la medida de la tasa de producción de CO₂, que causa el levantamiento de las masas panarias como resultado de la fermentación alcohólica de las levaduras, analizando también la actividad enzimática maltasa. Tras examinar dichos parámetros, observamos que efectivamente los tres aislados clínicos seleccionados cumplen los requisitos más importantes en panadería, presentan una alta tasa fermentativa, unidas a altos niveles de actividad maltasa. Pero quizás lo más llamativo de los resultados observados ha sido la disminución en la actividad fermentativa y en la actividad maltasa de los aislados clínicos respecto a la cepa original de panadería Cinta roja. Este hecho indicaría que los aislados clínicos han sufrido modificaciones tras pasar por el hospedador humano, entre ellas la pérdida de capacidad fermentativa y de actividad maltasa. Y sin duda estos cambios se han producido, ya que observamos comportamiento similar en los aislados recuperados de ratones BALB/c inoculados con Cinta roja, los cuales mostraron igualmente una disminución en su capacidad fermentativa y en la actividad maltasa. Por tanto el paso a través de un hospedador, sea el ratón para la cepa CR-r, como el humano para los aislados clínicos, ha producido ciertos cambios en dichas cepas, modificando ciertas características de panadería, quizás como consecuencia de una adaptación de estos aislados a un nuevo ambiente, el hospedador. Con todo ello podríamos confirmar que los aislados clínicos estudiados, N° 20, 74 y F27 tuvieron un origen en una cepa panadera, y por tanto su vía de entrada pudo ser efectivamente a través de la ingestión, autoinoculación o contaminación a través de las manos.

Capítulo II

Estudio comparativo de la patogenicidad
potencial de aislados clínicos y no
clínicos de *S. cerevisiae*

En el estudio anterior, 101 aislados clínicos se identificaron como la especie *S. cerevisiae*, empleando el análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS, lo cual confirmaba la fiabilidad de los sistemas comerciales AMS-Vitek Yeast-Card y API-32C empleados por los hospitales para la detección de levaduras. Por otro lado, el empleo del análisis de restricción del mtDNA y la amplificación por PCR de elementos δ , técnicas moleculares para la caracterización de levaduras a nivel de cepa, en combinación con el estudio filogenético realizado en base al análisis de secuencias del gen mitocondrial *COX 2*, nos ha permitido confirmar la estrecha relación que existe entre ciertos aislados clínicos y dos cepas industriales, *S. boulardii* y las cepas panaderas, planteándose para estas cepas industriales dos posibles casos de colonización exógena. Concretamente el origen de panadería pudo ser comprobado para algunos aislados clínicos, al cumplir las características propias de estas cepas industriales, alta actividad fermentativa y maltasa.

La estrecha asociación que estas cepas industriales tienen con grupos de aislados clínicos con diferentes orígenes de aislamientos, sangre, heces, vagina, así como aislados responsables de ciertas infecciones, plantea el objetivo que se desarrolla en este capítulo, determinar si existen diferencias en la virulencia de los aislados clínicos y las cepas industriales de *S. cerevisiae*, prestando una mayor atención al preparado probiótico y las cepas panaderas, por su relación molecular con aislados de sangre asociados con fungemia. Para ello, se ha abordado un estudio de rasgos fenotípicos que se conocen como rasgos de virulencia para otras especies de levaduras patógenas oportunistas, como *C. albicans* o *C. neoformans* y que pueden estar implicados en el mecanismo de infección de *S. cerevisiae*, y que fueron tratados con detalle en la Introducción. Con este estudio comparativo entre aislados clínicos y no clínicos se pretende conocer si existen rasgos fenotípicos asociados a la virulencia de esta levadura y en caso afirmativo si son diferentes en ambos tipos de aislados. El potencial patógeno de algunos aislados clínicos de *S. cerevisiae*, se ha estudiado empleando modelos murinos de infección sistémica y se han comparado con la de algunas cepas industriales. Con ello, se pretende confirmar si existe alguna relación entre los rasgos fenotípicos estudiados y la virulencia *in vivo* de las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas. Además, nos permitirá conocer la capacidad de estas cepas de invadir órganos y causar muerte. Por último, se ha empleado una técnica que se conoce actualmente como inmunoproteómica, se trata de la combinación de la electroforesis bidimensional y el análisis mediante Western blot. Para ello se emplea como anticuerpo primario, suero inmune de ratones infectados con las diferentes cepas de *S. cerevisiae* con el fin de determinar la existencia de marcadores de una infección causada por dicha levadura.

1. Estudio de rasgos de fenotípicos asociados con virulencia

Como se ha mencionado en la Introducción, los microorganismos patógenos poseen una variedad de factores de virulencia que les van a permitir eludir las defensas del hospedador y de esa manera incrementar su virulencia. Existen numerosos trabajos que han abordado la identificación de los rasgos de virulencia que están relacionados con el desarrollo de las infecciones causadas por bacterias o levaduras (Hogan y col., 1996). Estudios previos, aunque escasos, han puesto de manifiesto que existe una clara relación entre la capacidad de crecer a altas temperaturas, el crecimiento pseudofilamentoso y la actividad proteasa con la capacidad patogénica de los aislados clínicos de *S. cerevisiae* (Clemons y col., 1994). Concretamente la capacidad de crecer a 42° C y el crecimiento pseudofilamentoso están muy correlacionados con la capacidad de persistir y proliferar en sistemas *in vivo* (McCusker y col., 1994b). De manera que dichos rasgos fenotípicos se propusieron como posibles rasgos asociados a la virulencia de *S. cerevisiae*. Con el fin de profundizar más en la patogénesis de *S. cerevisiae*, en el presente trabajo se planteó realizar un estudio comparativo entre aislados industriales y clínicos en cuanto a ciertos rasgos de virulencia asociados a otros microorganismos patógenos. Este estudio será útil para comprender si existen diferencias entre los distintos aislados que puedan explicar la presencia de algunos de ellos en humanos.

1.1. Crecimiento a altas temperaturas

El estudio de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas se realizó mediante la siembra por goteo de 5 µL de diluciones específicas para cada temperatura, sobre placas de GPYA que se incubaron a las temperaturas de 28, 37, 39 y 42° C, tal y como se describe en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. La temperatura de 28° C se seleccionó como control positivo de crecimiento para este ensayo, puesto que se considera como la temperatura óptima de crecimiento para *S. cerevisiae*. Las temperaturas de 37° C y 39° C se seleccionaron por ser dos temperaturas que se observan habitualmente en pacientes febriles. Sin embargo, el crecimiento a 42° C se testó ya que en datos previos de McCusker y colaboradores (1994a y b), mostraron que es una característica no solo asociada al origen clínico de los aislados, sino que además está relacionada con los aislados virulentos de *S. cerevisiae*.

La capacidad de crecimiento a las diferentes temperaturas se evaluó para el total de los 101 aislados clínicos, las 17 cepas industriales (ver Tabla 8 de Materiales y Métodos) y las 3 cepas control con diferentes grados de virulencia (YJM128, alta; YJM 332, media y YJM223, baja virulencia) caracterizadas y descritas por McCusker y colaboradores (1994a). En la Figura 17 se muestran algunos ejemplos del crecimiento observado para algunas cepas industriales y aislados clínicos, sobre las placas de GPYA, a las diferentes concentraciones inoculadas correspondientes a 39 y 42° C. El crecimiento a 39° C de las cepas industriales y los aislados clínicos fue bastante homogéneo, es decir, en general todas las cepas crecieron bien hasta la última dilución inoculada. Sin embargo a 42° C se observaron diferencias en el crecimiento entre las cepas industriales y los aislados clínicos. Entre las cepas industriales el crecimiento máximo observado fue el mostrado por la cepa de *S. boulardii* y la cepa panadera Cinta roja, no excediendo de la dilución 10⁻¹. Mientras que entre los aislados clínicos se observaron diferentes tipos de crecimiento, tanto aislados capaces de crecer hasta la última dilución, como otros que apenas crecieron y lo hicieron en forma de colonias pequeñas y solo en las primeras diluciones. Para poder comparar entre cepas y sus capacidades de crecimiento a las diferentes temperaturas, los resultados se codificaron de forma que se consideró crecimiento positivo, a la capacidad de crecimiento al menos en la primera gota, que correspondía con el cultivo directo con una DO de 0,3-0,4. Tras analizar los resultados de crecimiento de las 118 cepas a las 4 temperaturas, se observó que la capacidad de crecimiento a 37 y 39° C no era una característica discriminadora, puesto que tanto la mayoría de los aislados industriales como los aislados clínicos crecieron bien a ambas temperaturas. Aunque existieron excepciones tanto entre las cepas industriales como entre los aislados clínicos, concretamente las cepas vínicas de referencia CECT 10.551, CECT 10.431, CECT 10.338 y CECT 1479, que fueron capaces de crecer a 37° C, pero no a 39° C y los casos de la cepa de cerveza CECT 1942 y el aislado de heces N° 11 que fueron incapaces de crecer a ambas temperaturas.

Puesto que las diferencias en la capacidad de crecimiento se observaron a las temperaturas más altas, únicamente se muestran resumidos los resultados observados para las temperaturas de 39° C y 42° C (Figura 18). Mientras que a 39° C muy pocas cepas fueron incapaces de crecer, tal y como se comentó anteriormente, a 42° C se encontraron diferencias significativas entre los aislados clínicos y las cepas industriales, de hecho tras aplicar un análisis estadístico empleando el test de χ^2 (STATGRAPHICS VER. 5.1), se determinó un *p* valor de 0,0001 ($P < 0,05$ se considera significativo). A dicha temperatura solo 4 cepas industriales (23%) fueron capaces de crecer: la cepa de panadería Cinta roja, la

cepa de *S. boulardii*, la cepa vínica ICV-32 Uvaferm PM y la cepa de control medio de virulencia YJM332, que proviene de vino. Sin embargo, entre los aislados clínicos el 79% fue capaz de crecer a 42° C y por tanto se puede concluir, que existe una relación entre la capacidad de crecer a altas temperaturas y el origen clínico de *S. cerevisiae*.

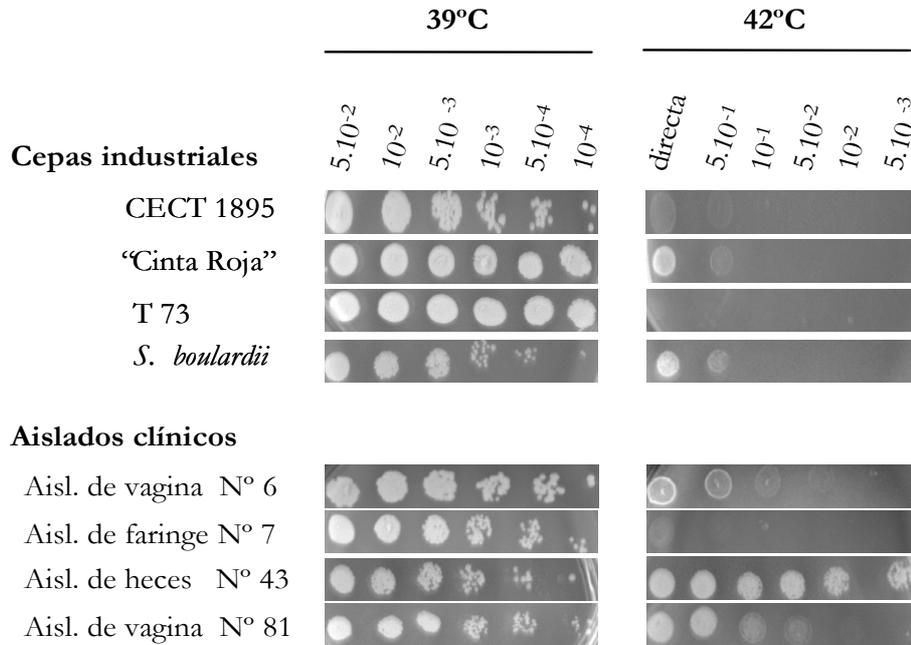


Figura 17. Ejemplos del crecimiento observado para las cepas industriales y aislados clínicos. El crecimiento se llevó a cabo sobre placas de GPYA, sembrando por goteo 5 µL de cada una de las concentraciones específicas, establecidas para cada temperatura. A partir del cultivo directo de una DO de 0,3-0,4 se realizaron todas las diluciones correspondientes para cada una de las cepas ensayadas.

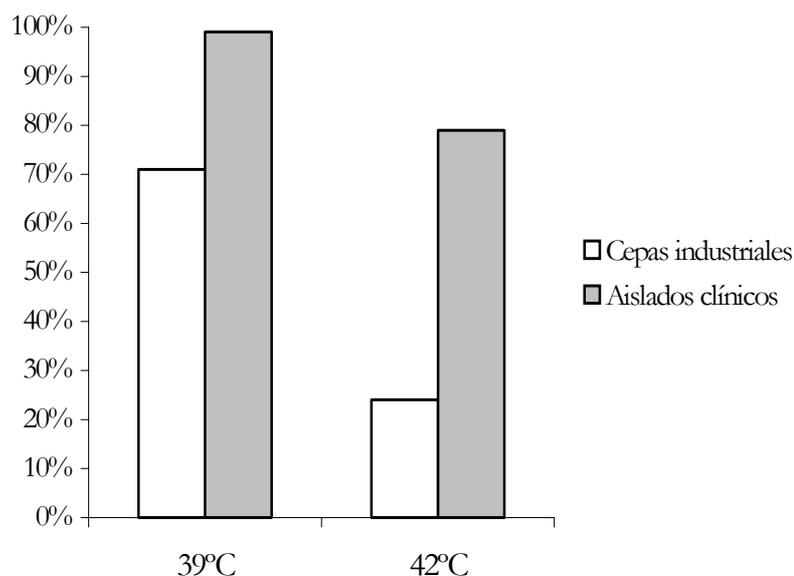


Figura 18. Porcentaje de crecimiento a 39 y 42° C de las cepas industriales y los aislados clínicos de *S. cerevisiae*. Se consideró crecimiento positivo cuando las levaduras eran capaces de crecer, al menos, en la primera gota que corresponde con el inóculo directo de crecimiento de una DO de 0,3-0,4.

1.2. Secreción extracelular de proteasas y fosfolipasas

La secreción extracelular de enzimas se considera una propiedad muy importante en la patogénesis de levaduras patógenas oportunistas como *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*, siendo la actividad proteasa (Naglik, 2003) y fosfolipasa (Ghannoum, 2000) las actividades enzimáticas más importantes. En el caso de *S. cerevisiae*, McCusker y colaboradores (1994a) estudiaron la producción de proteasas entre aislados clínicos y no clínicos de esta levadura y no establecieron relación alguna entre dicha actividad enzimática y el origen de aislamiento de los aislados. Sin embargo, no se ha encontrado información alguna sobre la secreción de fosfolipasas y su relación con aislados clínicos de *S. cerevisiae*, aunque se conoce que esta levadura posee dicha actividad enzimática (Witt y col., 1982; Witt y col., 1984 a y b; Lee y col., 1994; Kyung y col., 1994). Por lo cual se creyó interesante estudiar esta actividad enzimática, además de la actividad proteasa, tanto en aislados clínicos como industriales. Para ello se emplearon métodos cualitativos de crecimiento en placas, descritos específicamente para cada actividad enzimática, en las cuales se sembraron por goteo 5µL de un cultivo directo con una DO de 0,3-0,4 que se lavó y resuspendió en solución salina,

para eliminar cualquier resto del medio de cultivo YPD (ver apartado 4.2 de materiales y métodos).

La actividad proteasa se determinó empleando el medio de cultivo en placas de agar que contiene seroalbúmina fetal (BSA), descrito por Aoki y colaboradores (1994), que ha sido empleado en el estudio de esta actividad enzimática tanto en *C. albicans* (Kantarcioğlu y Yücel, 2002) como en *C. neoformans* (Vidotto y col., 2000). La digestión del BSA da lugar a un halo de precipitado blanco alrededor de las colonias como consecuencia de la actividad proteolítica.

La actividad fosfolipasa se determinó en placas de medio Yema de huevo (Price y col., 1982), se trata de un medio que contiene gran cantidad de fosfolípidos, predominantemente fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina. Un resultado positivo se determina tras la aparición de una zona de precipitación bien definida, blanca y densa alrededor de la colonia. Esta zona blanca se debe probablemente a la formación de un complejo de calcio con los ácidos grasos libres por la acción de la actividad fosfolipasa sobre los fosfolípidos presentes en la yema de huevo. No es un método específico de la actividad fosfolipasa en sí, puesto que la yema de huevo es un sustrato donde actuarán tanto fosfolipasas por contener fosfolípidos, como lipasas por los triglicéridos también existentes. No obstante, permite realizar exploraciones preliminares de dicha actividad.

Tras incubar a 37° C durante 4 días las placas del medio BSA y a 30° C durante 10 días las placas del medio yema de huevo, se procedió a la medida de ambas actividades, mediante el parámetro Pz. En la Figura 19 se muestra un ejemplo de actividad proteasa, y como se realizaron las mediciones del radio de la colonia respecto al radio del halo de precipitación, como resultado de la actividad enzimática correspondiente para cada cepa en los medios específicos. Los valores Pz obtenidos se trataron independientemente para cada actividad enzimática, y se codificaron como baja, moderada y alta actividad, teniendo en cuenta que valores de Pz cercanos a 1 indican actividad baja y cuanto más cercanos a 0, indican una actividad mayor. A continuación se muestran los intervalos de Pz para cada actividad y la codificación propuesta:

PROTEASA	Actividad	FOSFOLIPASA
Pz ≥ 0,56	Baja	Pz ≥ 0,65
[0,55 ≥ Pz ≥ 0,35]	Moderada	[0,64 ≥ Pz ≥ 0,5]
Pz ≤ 0,34	Alta	Pz < 0,5

Para codificar los valores de ambas actividades seguimos los rangos propuestos por otros autores para diferentes especies del género *Candida* (Kantarcioglu y Yücel, 2002) y *C. neoformans* (Vidotto y col., 2000). En estos trabajos los valores que obtenían para ambas actividades enzimáticas eran muy similares, permitiéndoles establecer rangos comunes. Sin embargo, en nuestro caso los resultados fueron muy distintos entre los Pz observados para la actividad proteasa, donde el valor mínimo fue de 0,26 y para la actividad fosfolipasa, donde el valor mínimo fue de 0,45. Por ese motivo decidimos codificar cada actividad por separado.

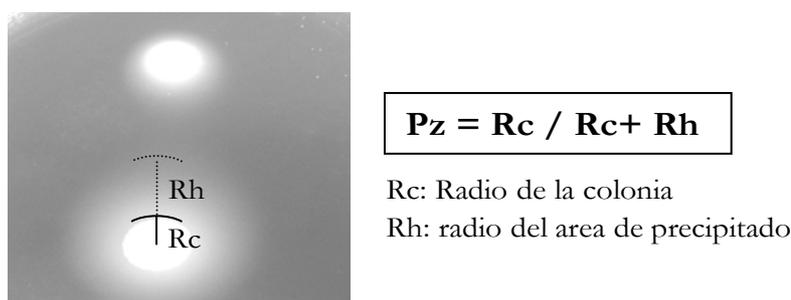


Figura 19. Cálculo del valor de Pz para ambas actividades enzimáticas. La medida se realizó teniendo en cuenta el radio de la colonia, respecto al radio del halo de turbidez que se genera alrededor de la colonia, como consecuencia de las actividades enzimáticas.

El análisis de los resultados de la actividad proteasa que se representa en la Figura 20, muestra que no existe relación entre la actividad proteasa y la naturaleza de los aislados, de hecho, muy pocos aislados industriales (CECT 10.431, CECT 1462, CECT 1942, Plus vital) junto con un solo aislado de sangre (F20) fueron incapaces de secretar proteasa al medio. Entre las cepas industriales, muchas exhibieron actividad proteasa, tanto alta (53%) como moderada (28%). En el caso de los aislados clínicos la actividad proteasa varió entre niveles moderados y altos (54% y 42% respectivamente). Tras realizar el estudio estadístico de dichos resultados, se observó que no existen diferencias significativas entre los aislados clínicos y las cepas industriales (P valor $> 0,05$), y por tanto, no puede establecer una relación entre origen clínico y actividad enzimática.

Sin embargo, cuando se analizaron los resultados para la actividad fosfolipasa (Figura 21), se observa cierta relación entre dicha actividad y el origen de los aislados, ya que las cepas clínicas mostraron una actividad fosfolipasa entre los niveles moderados y altos, únicamente el 15% de los aislados clínicos muestran niveles bajos. Por el contrario

las cepas industriales mostraron mayoritariamente actividad fosfolipasa baja y moderada. Y, aunque estadísticamente no se estableció una diferencia significativa, los resultados parecen indicar que existe una tendencia a producir mayor actividad por parte de los aislados clínicos, con lo cual la actividad fosfolipasa podría ser considerada como una característica asociada al origen clínico de los aislados de *S. cerevisiae*.

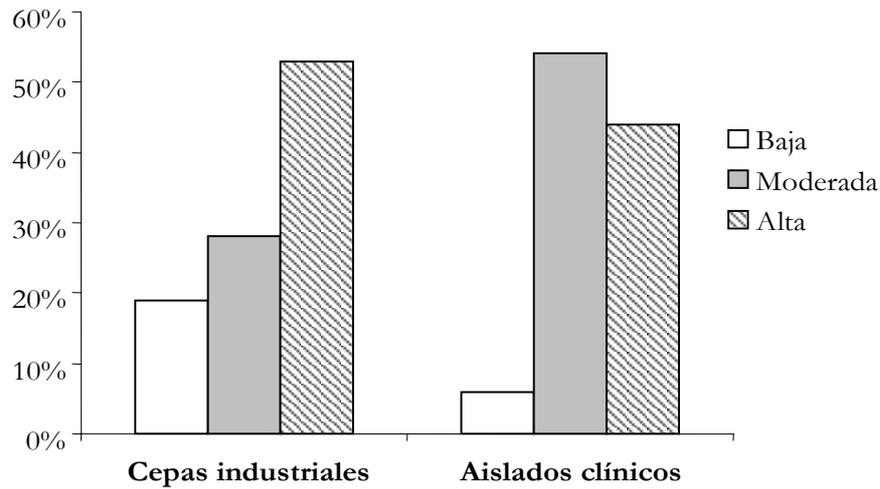


Figura 20. Porcentajes de actividad proteasa de los aislados clínicos y las cepas industriales. La actividad alta comprende valores de $P_z \leq$ de 0,34; la actividad moderada muestra valores de P_z entre 0,35 y 0,55; una actividad baja se definió con valores de $P_z \geq$ 0,56.

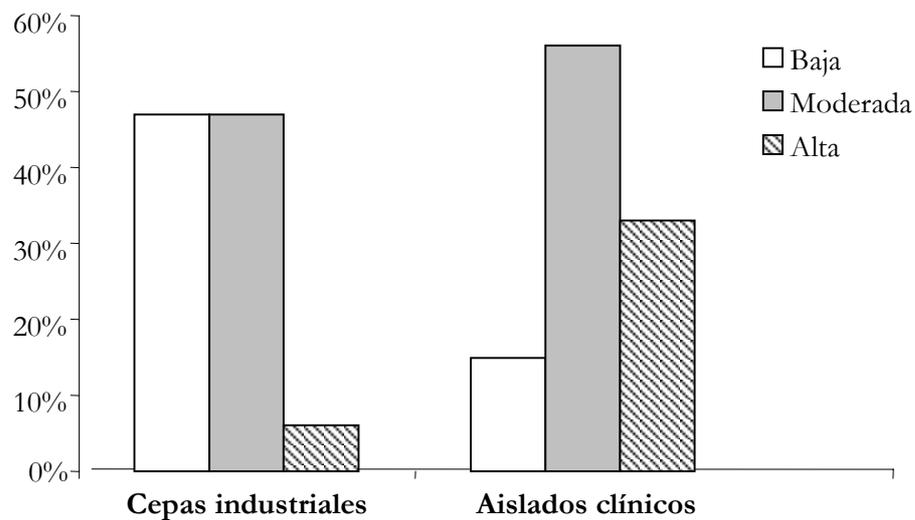


Figura 21. Porcentajes de actividad fosfolipasa de los aislados clínicos y las cepas industriales. La actividad alta comprende valores de $P_z <$ de 0,5; la actividad moderada muestra valores de P_z entre 0,5 y 0,64; una actividad baja se definió con valores de $P_z \geq$ 0,65.

1.3. Crecimiento pseudofilamentoso

Una de las principales características de la levadura patógena *C. albicans* es su dimorfismo, la capacidad de interconversión de la forma levaduriforme a una forma filamentosa (hifas y pseudohifas) bajo ciertas condiciones ambientales y que está asociado con su poder invasivo. Cambios en la temperatura, pH o la presencia de suero inducen el proceso de pseudofilamentación o filamentación verdadera (Navarro-García, 2001). De la misma manera que para *Candida*, en *S. cerevisiae* el cambio dimórfico de célula ovoide a pseudohifa ha sido descrito como una respuesta a una limitación nutricional (Gimeno y col., 1992), aunque también hay otros estreses que juegan un papel muy importante en este fenómeno, tal y como se describe en la Introducción. El posible papel de esta capacidad en la virulencia de *S. cerevisiae* también ha sido estudiado, de hecho Murphy y colaboradores (1999) encontraron que los aislados clínicos exhibían cierta capacidad de pseudofilamentar bajo ciertas condiciones, dando lugar a la penetración e invasión del medio sólido. Dicho comportamiento podría dar una idea del posible papel de pseudofilamentación *in vivo*.

En este trabajo se decidió estudiar el efecto que tiene el nitrógeno, una de las principales limitaciones nutricionales en el caso de *S. cerevisiae*, y que desencadena el crecimiento pseudofilamentoso. Para ello, las cepas fueron crecidas en medio SLAD, caracterizado por contener bajos niveles de nitrógeno (ver apartado 4.3. de Materiales y Métodos). Después de 4 días de incubación se observaron diferentes grados de pseudofilamentación que se definieron según la ausencia/presencia de crecimiento pseudohifal, así como la morfología y longitud de los filamentos desarrollados. En la Figura 22 se detallan las morfologías descritas para cada grado de pseudofilamentación observado.

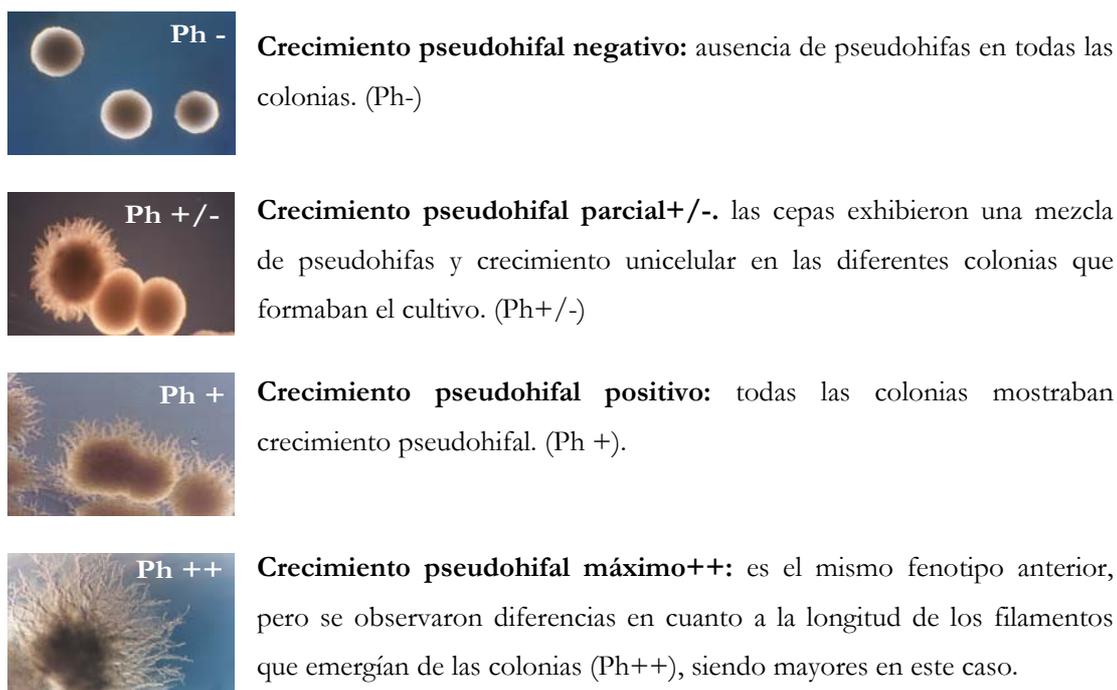


Figura 22. Grados de pseudofilamentación observados para *S. cerevisiae*. Tras 4 días de incubación en placas de medio SLAD se determinaron 4 grados de pseudofilamentación caracterizados por la presencia o no de pseudohifas, así como de la longitud de las mismas. Las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica Leica asociada al microscopio Leica HPS60, todas ellas a 40X aumentos.

Tras analizar el grado de pseudofilamentación mostrado por el total de las 118 cepas del presente estudio, se observaron diferencias claras en los fenotipos mostrados por los aislados clínicos y las cepas industriales. Tal y como puede observarse en la Figura 23, en la cual se muestran los porcentajes observados para cada fenotipo, la mayoría de las cepas industriales fueron incapaces de formar pseudohifas (53%) o exhibieron un crecimiento pseudohifal intermedio (12% Ph+/-; 12% Ph+), únicamente las dos cepas de panadería (Cinta roja y Plus vital), el control de virulencia YJM 332 (con origen vínico) y la cepa vínica comercial Fermivin Crio 7303 mostraron niveles altos de pseudofilamentación (Ph+). Sin embargo, entre los aislados clínicos, la gran mayoría fueron capaces de pseudofilamentar, el 42% y 34% de los aislados clínicos mostraron los fenotipos Ph + y Ph ++ respectivamente. De hecho, tras analizar estadísticamente los datos, se determinó que la capacidad de pseudofilamentar podría ser una característica diagnóstica en la patogenicidad de *S. cerevisiae* ($P=10^{-5}$).

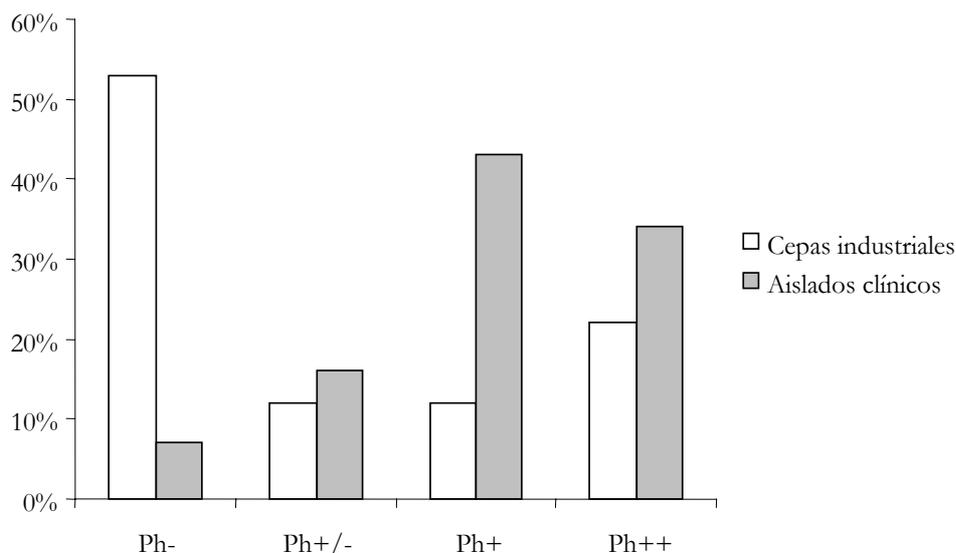


Figura 23. Porcentajes del crecimiento pseudohifal en el medio SLAD, entre las cepas industriales y los aislados clínicos. Ph-: indica la ausencia de pseudohifas; Ph+/-: la aparición de pseudohifas no ocurre en todas las colonias del cultivo; Ph+: crecimiento pseudohifal en todas las colonias con una morfología moderada en los tamaños de las hifas., Ph++: mismo fenotipo que en Ph+, pero se observó mayor longitud en las pseudohifas.

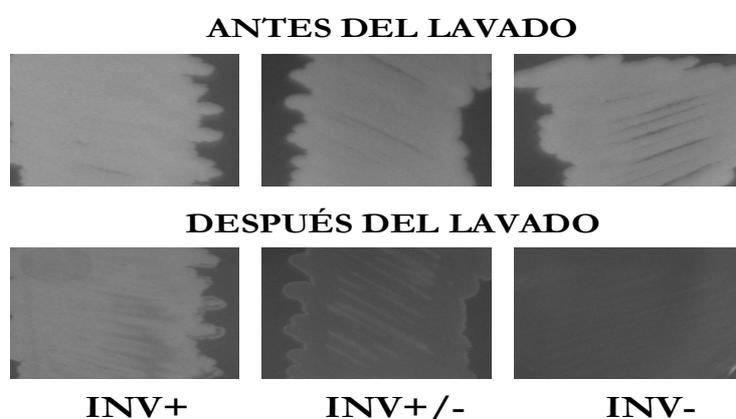
1.4. Crecimiento invasivo

Algunos aislados de *S. cerevisiae*, bajo el desarrollo pseudohifal son capaces de desarrollar invasión en agar, produciendo filamentos que son capaces de resistir un lavado vigoroso de la superficie del medio sólido de crecimiento, a dicha característica se la denomina crecimiento invasivo (Gancedo, 2001). En la Figura 24 A, se muestran los tres grados de crecimiento invasivo observados antes y después de lavar los cultivos crecidos sobre placas de GPYA, durante 5 días a 28° C. En la Figura 24 B se muestran los porcentajes observados para dichos grados de capacidad invasiva. Los 3 grados fueron descritos en base al crecimiento residual que permaneció tras lavar las placas. Por un lado se encontraron cepas cuyo crecimiento fue eliminado por completo, denominando a dicho fenotipo como **invasión negativa (inv-)**. Por otro lado, un gran número de cepas se mantuvieron ancladas al agar como una fina capa de levaduras, tras ser eliminada la parte superficial del cultivo en la placa, denominando dicho fenotipo como **invasión intermedia (inv +/-)**. Y por último, algunas cepas quedaron agarradas a la superficie del agar, sin

desaparecer de la placa tras ser lavadas, denominándose dicho fenotipo como **invasión positiva (inv+)**.

El análisis global de los resultados mostró que el crecimiento invasivo no parece ser un fenómeno muy extendido ni entre los aislados clínicos ni entre las cepas industriales, de hecho muy pocas cepas fueron capaces de invadir el agar de forma vigorosa, tal y como se muestra en la Figura 24 B. Además, el análisis estadístico mostró que las diferencias encontradas entre las cepas industriales y los aislados clínicos no son significativas (P de 0,286) y por tanto no se puede concluir que el crecimiento invasivo esté asociado con el origen clínico de *S. cerevisiae*.

A



B

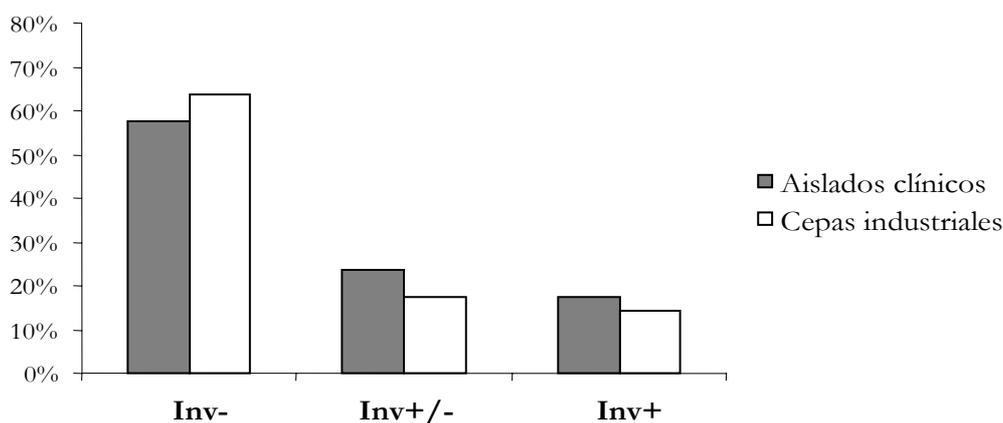


Figura 24. Crecimiento invasivo en los aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*. Se determinaron tres fenotipos de crecimiento invasivo sobre placas de GPYA incubadas 4 días a 28° C (A), definidos como: **Inv-**: el crecimiento es eliminado totalmente tras lavar la superficie; **Inv+/-**: tras lavar la superficie del agar permanece una fina capa de células ancladas al agar; **inv+**: no se observan diferencias en el crecimiento antes y después de lavar la superficie de las placas de agar. Se determinó el porcentaje de crecimiento invasivo para el total de los 118 aislados (B).

1.5. Comparación entre las cepas industriales y los aislados clínicos potencialmente virulentos.

Los resultados mostrados anteriormente se refieren a lo observado globalmente entre las cepas industriales y los aislados clínicos. Sin embargo, el grupo de los aislados clínicos puede desglosarse en dos subgrupos. Por un lado los aislados clínicos comensales, se trata de aquellos aislados que fueron recuperados de sitios que colonizan de forma habitual la microbiota, como son las heces o la vagina. Por otro lado, aquellos aislados recuperados de sitios estériles como la sangre o algún órgano estéril y/o que han sido responsables de infecciones, como vaginitis. A este segundo grupo de aislados se les denomina aislados clínicos potencialmente virulentos.

Los aislados clínicos comensales también deben ser considerados como potenciales cepas virulentas, ya que podrían permanecer en el hospedador inadvertidamente y en un momento dado, cuando las condiciones del hospedador lo permitieran, podrían causar una infección. Sin embargo, creímos conveniente prestar atención a los aislados clínicos potencialmente virulentos, ya que al haber sido aislados de sitios estériles e incluso haber causado alguna infección indica, al menos “a priori”, que podrían ser considerados más virulentos. Por esta razón se compararon los rasgos analizados anteriormente, concretamente para los aislados clínicos potencialmente virulentos y las cepas industriales, que en principio deberían considerarse como no virulentas (Tabla 13).

Dicha comparación evidenció que el crecimiento a 42° C y la formación de pseudohifas, son dos factores de virulencia que diferencian claramente ambos tipos de cepas. En términos generales, las cepas industriales fueron incapaces de crecer a 42° C, con la excepción de la cepa probiótica de *S. boulardii*, la cepa vínica comercial ICV-30 y las dos cepas comerciales de panadería (Cinta roja y Plus vital). En cuanto al crecimiento pseudohifal, las diferencias observadas fueron muy significativas ya que los aislados clínicos potencialmente virulentos fueron los que produjeron mayores niveles de crecimiento pseudohifal (Ph + o ++), mientras que las cepas industriales mostraron los niveles más bajos (Ph - o +/-). De nuevo las excepciones dentro de las cepas industriales fueron, la cepa terapéutica *S. boulardii*, las dos cepas comerciales de panadería y en este caso la cepa vínica comercial ICV-17. También se observaron algunas diferencias en la producción de actividad fosfolipasa, en general los aislados clínicos potencialmente virulentos produjeron mayores niveles de dicha enzima (+ o ++), mientras que las cepas de alimentos mostraron menor actividad. Es interesante destacar que entre las cepas industriales las excepciones

fueron de nuevo la cepa terapéutica de *S. boulardii* y las cepas comerciales de panadería., ya que como se detalló en el apartado del estudio de colonización, estas cepas industriales se confirmaron como dos posibles casos de colonización exógena, al compartir patrón molecular con dos grupos de aislados clínicos, además de mostrar una estrecha relación filogenética con los mismos. Concretamente *S. boulardii* se mostró estrechamente relacionado con un grupo de 32 aislados clínicos, entre los cuales se encuentran los aislados F3 (aislado de sangre) y n° 81 (aislado de vagina de una mujer que presentó vulvovaginitis). Y en el caso de las cepas de panadería, además de observar esa misma relación estrecha con un grupo de 20 aislados clínicos, entre los que destacan 4 aislados recuperadas de 3 pacientes con síntomas de infección vaginal (n° 75, 76, 77 y 79) y el aislado de sangre F27, también pudo confirmarse el origen en panadería para los aislados N° 20, 75 y F27, ya que mostraron las características propias de las cepas de panadería, capacidad fermentativa y actividad maltasa, descritas también en el capítulo anterior.

Estos datos sugieren, que estas cepas de alimentos podrían suponer un riesgo especialmente en pacientes con ciertos factores de predisposición (enfermedades debilitantes, terapias antibacterianas agresivas, SIDA...), ya que presentan rasgos de virulencia que les permitirían invadir los órganos estériles de estos enfermos, causando así una infección.

Por lo que respecta a los aislados clínicos comensales, los resultados observados para los rasgos de virulencia, extraídos del global de los aislados clínicos en general, fueron muy similares a lo que se ha observado en el caso de los aislados clínicos potencialmente virulentos. El 92% crecieron perfectamente a 42° C, produjeron niveles de fosfolipasa entre altos y moderados. Y un 66% mostró un crecimiento pseudohifal Ph+ y ++. Por tanto estos resultados ponen de manifiesto que los aislados comensales podrían emplear dichas cualidades para causar una infección. Por ello, no se puede descartar que ante una adecuada situación inmunológica puedan llegar a causar una infección.

Tabla 13. Comparación de los resultados obtenidos para los rasgos de virulencia analizados, entre las cepas de alimentos y los aislados clínicos potencialmente virulentos

Aislados	Crecimiento a			Actividad enzimática		Crecimiento pseudohifal	Crecimiento invasivo
	37°C	39°C	42°C	Proteasa	Fosfolipasa		
<i>S. boulardii</i>	++	++	+	++	+	+	-
Cepas de alimentos							
Cepas de referencia							
CECT 10.431	+	-	-	-	-	-	+/-
CECT 10.551	+	-	-	+	-	-	+
CECT 10.338	+	-	-	+	-	-	+/-
CECT 1479	+	-	-	+	+	-	-
CECT 1895	++	++	-	++	++	-	-
CECT 1462	++	++	-	-	++	+	+/-
CECT 1942	-	-	-	-	+	-	-
Cepas vínicas comerciales							
ICV-3	++	++	-	++	-	-	-
ICV-16	++	++	-	++	++	-	-
ICV-17	++	++	-	++	-	++	+/-
ICV-30	++	++	-	++	+	+/-	-
ICV-32	++	++	+	++	+	+/-	+/-
T73	++	++	-	++	++	-	-
Cepas comerciales de panadería							
Cinta roja	++	++	+	+	++	++	-
Plus vital	++	++	+	-	+	++	-
Cepas control de virulencia							
YJM128	+	++	++	++	-	++	+
YJM223	+	++	+	++	++	+/-	-
YJM332	++	++	++	++	+	++	-
Aislados clínicos potencialmente virulentos.							
F20	++	++	-	-	+	++	+
F15	++	++	-	++	+	++	-
F27	++	++	+	++	++	++	-
F3	++	++	-	++	++	++	+
33	++	++	++	+	++	++	+
101	++	++	++	+	+	++	-
102	++	++	-	+	+	++	+
103	++	++	-	+	++	+/-	-
105	++	++	+	+	++	-	+/-
106	++	++	-	++	+	+	-
107	++	++	-	++	+	-	-
81	++	++	++	++	++	+/-	-
75	++	++	-	++	++	++	-
76	++	++	+	+	+	+	+/-
77	++	++	+	++	+	++	-
79	++	++	+	-	+	++	-

2. Estudios de virulencia mediante sistema murino

El hecho de que los aislados clínicos considerados como potencialmente virulentos, por haber sido aislado de sitios estériles y/o haber causado alguna infección, muestren diferencialmente ciertos rasgos fenotípicos frente a las cepas industriales, hace que estos rasgos puedan considerarse como rasgos potenciales de virulencia para *S. cerevisiae* que posiblemente hayan facilitado la colonización de órganos estériles. De manera que el crecimiento a 42° C, el crecimiento pseudohifal y una alta actividad fosfolipasa podrían considerarse criterios a incluir en los programas de selección de levaduras que vayan a ser empleadas en la industria agroalimentaria (de Llanos y col., 2006a).

Con estos estudios se puede tener una idea de que cepas podrían ser potencialmente virulentas, pero la medida de la virulencia potencial de cualquier microorganismo es un punto difícil de definir, al igual que el concepto mismo de virulencia y por supuesto de virulencia fúngica, como se ha visto en la Introducción. Tradicionalmente se ha empleado el tiempo medio de supervivencia (TMS) de los animales inoculados con cierta dosis de un microorganismo, como una medida de la virulencia, pero este concepto tiene ciertas limitaciones. Uno de los puntos críticos de esta definición sería elegir adecuadamente el estado biológico del microorganismo potencialmente virulento, en forma de hifa o célula levaduriforme, la fase de crecimiento, presencia o ausencia de cápsula, ya que todas estas características influirán enormemente en los estados iniciales de la infección. Por otra parte la medida del TMS, solo nos permite establecer un valor semicuantitativo del grado de virulencia de un microorganismo y, además, no es comparable entre organismos diferentes ya que influyen otras características como el propio modelo animal empleado. Por ello existen alternativas para medir la virulencia, como es la cuantificación de la carga microbiana en órganos o tejidos específicos (Alonso-Monge y col., 2003). Esta medida tiene en cuenta la capacidad de colonizar de un microorganismo, dejando a un lado la letalidad o el daño producido en el hospedador, puesto que no siempre existe concordancia entre ambos conceptos (Casadevall y Pirofski, 2001). Y por último, no hay que olvidar que el modelo de infección empleado (el tipo de animal y el proceso de infección) afecta profundamente en la medida de la virulencia de un microorganismo. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que nunca se podrá mimetizar una infección natural ya que hay muchas variables (estado inmunitario, comensalismo, etc.) que se escapan en la planificación de un ensayo y que afectarán al desarrollo de la infección en el hospedador. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, creímos conveniente

emplear modelos murinos de infección sistémica, práctica habitual empleada en el estudio de *C. albicans* y utilizado también en los trabajos previos con *S. cerevisiae* (Byron y col., 1995; Clemons y col., 1994; Holzschu y col., 1979; Maejima y col., 1980; Okawa y Yamada, 2002; Wheeler y col., 2003). Además, teniendo en cuenta que el tipo de cepa de ratón empleada puede afectar en la virulencia de un microorganismos, se decidió utilizar tres cepas de ratones que se diferencian en su estado inmunológico. Dichos experimentos se muestran detalladamente a continuación.

2.1. Infección sistémica de *S. cerevisiae*

Tal y cómo se detalla en Materiales y Métodos, se han estudiado tres modelos de infección sistémica que se diferencian en el estado inmunitario que muestra cada cepa de ratón. En términos generales, la infección se realizó de la misma manera para cada modelo inyectando en la vena lateral del ratón una dosis de 2×10^7 células/mL de la cepa de *S. cerevisiae* en estudio. Tras realizar las infecciones, se monitorizó la muerte/supervivencia de los ratones inoculados (Figura 25) y se realizó un seguimiento de la colonización, midiendo el alojamiento o carga fúngica en cerebro y riñón a los 7, 15 y 30 días del inicio del ensayo. El alojamiento se expresó como el logaritmo en base 10 de la media del número de unidades formadoras de colonia por ratón.

La determinación de la dosis de *S. cerevisiae* a inyectar en el ratón se realizó en base a un estudio previo que realizaron Clemons y colaboradores (1994). En dicho estudio ensayaron tres dosis, 10^6 , 10^7 y 10^8 células/mL de la cepa YJM128 considerada como muy virulenta, que también ha sido incluida en la presente tesis (Tabla 5 de Materiales y Métodos). Tras realizar los ensayos de infección, determinaron que un inóculo mayor de 10^8 células/mL producía la muerte de todos los ratones ensayados a las 24 h tras la infección y por tanto no permitía establecer estudios de colonización a lo largo del ensayo. Por otro lado, con un inóculo de 10^6 células/mL se observó una supervivencia total de los animales recuperándose muy pocas colonias de los órganos extraídos como consecuencia de una colonización pobre. Finalmente, seleccionaron la dosis de 10^7 ya que permitía estudiar el curso de la infección de YJM128 y además se recuperaban un número elevado de colonias de los órganos extraídos.

En este mismo trabajo (Clemons y col., 1994), estudiaron la carga fúngica existente en cerebro, pulmones, bazo, riñones e hígado, tras la infección sistémica con cada cepa ensayada de *S. cerevisiae*. Los mayores alojamientos fueron observados siempre en el

RESULTADOS

cerebro, frente a los pulmones donde encontraron los menores niveles de colonización. Respecto a los otros tres órganos, la colonización que exhibieron tanto la cepa virulenta YJM 128, como una cepa de laboratorio, fueron muy similares e intermedios entre los dos órganos anteriores. Y puesto que en otras levaduras patógenas, como es el caso de *C. albicans*, el riñón es un órgano clave en la infección sistémica, existiendo incluso una relación lineal entre el alojamiento encontrado en este órgano y la supervivencia del hospedador (Hurtrel y col., 1980; Odds, 1988), creímos conveniente incluir el riñón como órgano a estudiar en la infección por las distintas cepas de *S. cerevisiae*, junto con el cerebro, órgano diana de esta levadura.



Figura 25. Esquema del procedimiento seguido para la realización del ensayo de infección en ratones BALB/c y DBA/2N.

1. Se utilizan hembras de peso comprendido entre 18 y 20 g de BALB/c (1a) y DBA/2N (1b).
2. Los ratones se inmovilizan y se exponen 2-3 min. bajo calor, para que se produzca la dilatación de la vena lateral.
3. Se inyecta en la vena lateral de cada ratón una dosis de 2×10^7 células /mL de una única cepa de las distintas cepas a ensayar.
4. Durante un periodo de 30 días se monitoriza la supervivencia (4a). A los 15 días se procede a la extracción de suero (4b).
5. A los 7 y 15 días postinfección se sacrifican 2 ratones/cepa, y a los 30 días los ratones supervivientes. De todos ellos se procedió a la extracción de cerebro (5a) y riñón (5b).
6. Los órganos se introducen en tubos con 5 ml de agua estéril.
7. Los órganos se homogenizan mediante trituración para liberar toda la carga fúngica de los mismos.
8. Se lleva a cabo una dilución seriada para el homogenizado de cerebro, y así facilitar el recuento de las levaduras. Se plaquean 100 μ L de las diluciones y los homogenizados directos en placas de GPYA con cloranfenicol, incubando las placas 2 días a 30° C.

2.1.1. Selección de las cepas de *S. cerevisiae*

Para abordar los ensayos *in vivo* se seleccionaron un total de 10 cepas de las 118 totales, basándonos en los rasgos de virulencia que proporcionaron claras diferencias entre los aislados clínicos y las cepas industriales. Estos rasgos fueron el crecimiento a 42° C, el crecimiento pseudohifal y una alta actividad fosfolipasa. Entre las 10 cepas se incluyeron representantes de las cepas de alimentos, las cepas clínicas comensales y las cepas clínicas potencialmente virulentas que mostraron o no dichas capacidades, junto con la cepa probiótica de *S. boulardii*. En la Tabla 14 se muestran las cepas seleccionadas y los resultados obtenidos para cada rasgo.

Aunque no se describe en el párrafo anterior, la cepa de control de virulencia YJM128 fue utilizada en unos ensayos previos de infección sistémica, pero no se observó mortalidad alguna e incluso los alojamientos fueron muy bajos. Como estos datos no se correspondían con los descritos por Clemons y colaboradores (1994), creímos conveniente no incluir esta cepa en el estudio. Posiblemente esta cepa haya perdido su virulencia, de hecho una situación similar fue descrita por estos mismos autores en dicho trabajo donde

ciertos subclones de algunos aislados mostraron una pérdida o disminución de su capacidad de virulencia con el paso del tiempo de conservación.

Se ha realizado un análisis estadístico de los alojamientos temporales dentro de cada modelo murino, así como entre ellos y para cada órgano. Para ello se empleó el programa estadístico STATGRAPHICS, en concreto se utilizó el análisis multifactorial de la Varianza (ANOVA).

Tabla 14. Cepas seleccionadas para realizar los ensayos in vivo, teniendo en cuenta en crecimiento pseudofilamentoso en medio SLAD y el crecimiento a 42° C.

Aislado	Origen de aislamiento	Crec. 42°C	Actividad enzimática		Crecimiento pseudohifal	Crec. invasivo
			Proteasa	Fosfolipasa		
<i>S. boulardii</i>	Probiótico	+	++	+	+	-
Cepas de alimentos						
CECT10431	Vino Sherry	-	-	-	-	+/-
ICV-17	Vino	-	++	-	++	+/-
T73	Vino	-	++	++	-	-
Cinta roja	Panadería	+	+	++	++	-
Cepas clínicas comensales						
Nº 20	Heces	++	+	+	++	+
Nº 60	Genital	+	++	+	++	+
Cepas clínicas potencialmente virulentas						
F27	Sangre	+	++	++	++	-
Nº 75	Genital	-	++	++	++	-
Nº 102	Tracto respiratorio	+	+	+	++	+

2.1.2. Modelo murino de infección sistémica en ratones inmunocompetentes BALB/c

La cepa de ratones cosanguíneos BALB/c se utiliza habitualmente en los estudios de infección sistémica de *Candida*. Se trata de una cepa de ratones que muestra cierta resistencia a la infección por dicha levadura (Héctor y col., 1982). En el caso de *S. cerevisiae*, esta cepa de ratón se ha empleado poco por lo que creímos interesante incluirla en nuestro estudio y determinar así su resistencia o sensibilidad a la infección, en el caso concreto de nuestras cepas.

Tras la inoculación intravenosa de 2×10^7 células/mL de cada cepa, los primeros resultados se observaron al tercer y cuarto día postinfección. Los ratones que habían sido inoculados con la cepa panadera Cinta roja, la cepa vínica ICV-17, el aislado clínico

comensal n° 60 y el aislado clínico potencialmente virulento n° 102, mostraron claros signos de infección, como son la pérdida de peso, el encrespamiento del pelo, que puede indicar un proceso febril y la falta de movilidad. Durante los 7 primeros días sucedieron las mortalidades totales del ensayo de 30 días de duración, para todas las cepas ensayadas. En la Tabla 15 se muestran las cepas que causaron alguna mortalidad, así como el número de ratones muertos y el día en que se produjo su muerte (Tabla 15). La cepa panadera “Cinta roja” causó una mortalidad del 30%, el aislado clínico comensal n° 60, el aislado potencialmente virulento n° 102 y la cepa probiótica de *S. boulardii* causaron una mortalidad del 20%. Y para el resto de cepas ensayadas se obtuvo el 100% de supervivencia. Una vez transcurridos los 7 primeros días, se observó una recuperación paulatina de los ratones, con excepción de los ratones inoculados con la cepa comensal genital n° 60, que mostraron poca movilidad y encrespamiento del pelo hasta los 15 días postinfección.

Tabla 15. Cepas de *S. cerevisiae* que causaron mortalidad en alguno de los tres modelos de infección sistémica empleados.

Cepas (origen de aislamiento)	N° ratones muertos (día de la muerte)		
	10 BALB/c [Sanos]	10 DBA/2N [C5-]	5 ICR/Swiss [Neutropénicos]
A. cl. comensal n° 60 (genital)	2 (4° día)	0	1 (3 ^{er} día); 2 (5° día); 1 (6° día)
A. cl. potencialmente virulento n° 102 (respiratorio)	2 (3 ^{er} día)	1 (4° día) 4 (6° día)	2 (4° día)
A. cl. potencialmente virulento F27 (sangre)	0	0	1 (4° día)
A. cl. potencialmente virulento n° 75 (genital)	0	1 (3 ^{er} día) 1 (6° día)	0
Cepa panadera “Cinta roja”	3 (3 ^{er} día)	0	2 (4° día)
Cepa <i>S. boulardii</i> (Ultralevura)	2 (4° día)	0	1 (4° día)

A. cl.: aislado clínico. Entre corchetes se especifica el estado inmunitario de cada cepa de ratón.

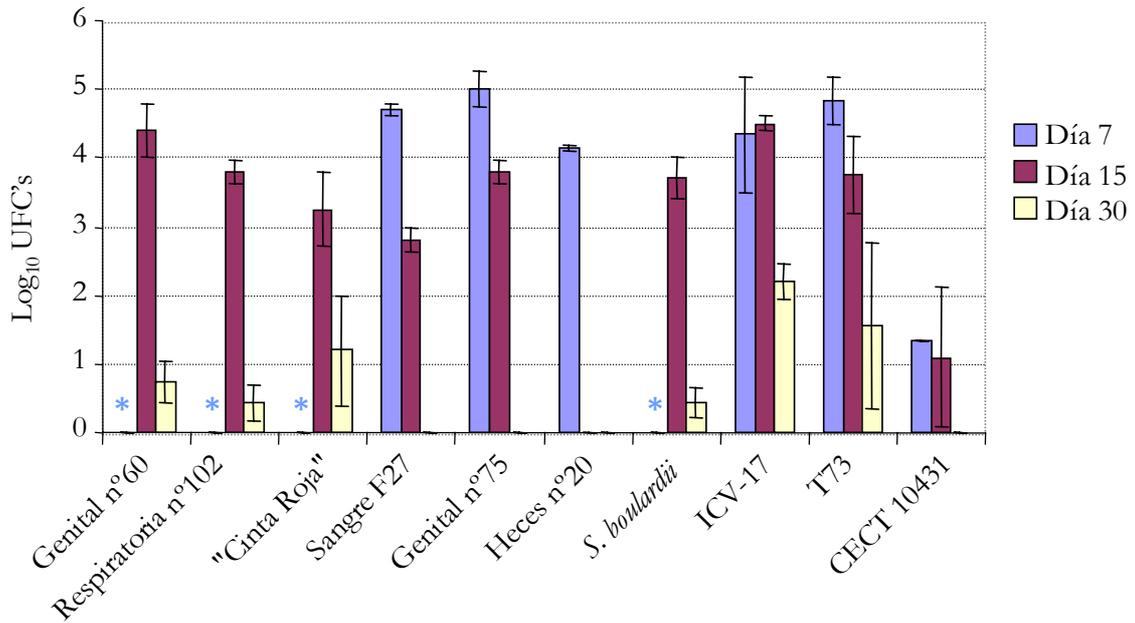
Además del estudio de la mortalidad/supervivencia durante los 30 días de duración del ensayo, se estudió la evolución de la colonización en cerebro y riñón de las 10 cepas. Para realizar dicho estudio, a los 7 y 15 días postinfección se sacrificaron 2 ratones de cada cepa ensayada y a los 30 días se sacrificaron los ratones supervivientes. En el caso de las cepas que causaron mortalidad antes de los 7 días, se decidió no sacrificar los 2 ratones

correspondientes para ese día. En la Figura 26 se muestran los alojamientos observados en cerebro y riñón respectivamente, representados como el Logaritmo en base 10, de la media del n° de unidades formadoras de colonia de cada cepa ensayada.

Si echamos un vistazo general a los alojamientos observados en ambos órganos destacan los elevados valores encontrados en cerebro frente a riñón, para la mayoría de las cepas ensayadas, tanto en los aislados clínicos como en las cepas industriales.

En cuanto a los alojamientos observados en cerebro (Figura 26 A), los mayores valores de carga fúngica se exhibieron a los 7 días postinfección y aunque no se disponen de los valores de alojamiento para las cepas causantes de mortalidad (los aislados clínicos n° 60 y n° 102, la cepa pandera “Cinta roja” y la cepa de *S. boulardii*), si comparamos entre los 3 aislados clínicos y las 3 cepas industriales restantes, es interesante destacar que las cepas industriales T73 e ICV-17 exhibieron valores muy elevados y similares a los mostrados por los aislados clínicos. Únicamente la cepa vínica de colección CECT 10.431 mostró el mínimo valor de alojamiento. A los 15 días postinfección los valores de alojamiento en cerebro disminuyeron ligeramente para todas las cepas, con excepción del aislado clínico n° 20, del cual no se hallaron microorganismos alojados, encontrándose para este caso un aclaramiento fúngico del 100%. Lo contrario se observó para la cepa vínica ICV-17 que mostró un ligero incremento en el valor del alojamiento, lo cual indicaría que esta cepa además de ser capaz de colonizar, estaría siendo capaz de proliferar en dicho órgano. Esta cepa junto a la cepa vínica T73, exhibieron niveles de carga fúngica comparables a los observados para las cepas responsables de mortalidad (Cinta roja, *S. boulardii*, y las cepas clínicas n° 102 y n° 60). De nuevo, la cepa de referencia CECT 10.431 mostró el menor valor de alojamiento. Transcurridos los 30 días de duración del ensayo, se observó una disminución general en los niveles de alojamientos. Es interesante destacar que las únicas cepas capaces de permanecer en cerebro por más tiempo fueron los aislados clínicos n° 60 y n° 102, la cepa pandera “Cinta roja” y la cepa de *S. boulardii* (las cepas que causaron mortalidad), junto con las cepas vínicas T73 e ICV-17, siendo los alojamientos exhibidos por estas cepas industriales incluso mayores que en el caso de los aislados clínicos.

A



B

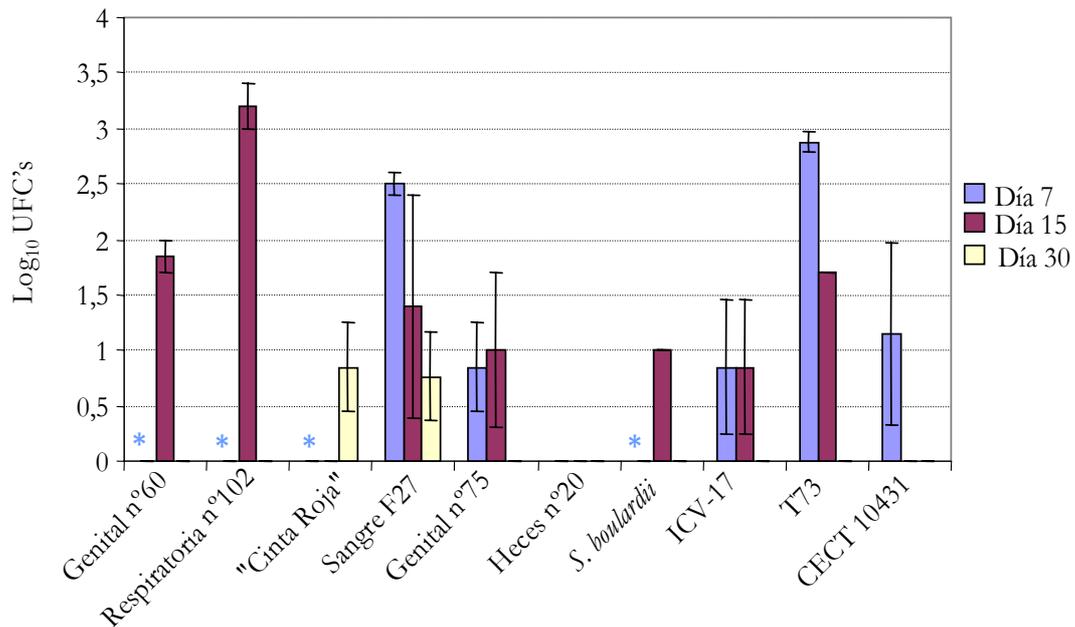


Figura 26. Alojamiento observado en cerebro (A) y riñones (B) de los ratones BALB/c para las diferentes cepas ensayadas de *S. cerevisiae*. Se han representado como el logaritmo en base 10 de las medias de las unidades formadoras de colonias observadas para los 7, 15 y 30 días postinfección. Los asteriscos indican que para dichas cepas no existe medida del alojamiento, ya que causaron mortalidad durante los 7 días postinfección y no se sacrificaron los ratones correspondientes.

Por lo que respecta al alojamiento observado en el riñón, los valores de carga fúngica fueron significativamente más bajos que en cerebro ($P < 0,005$) para todas las cepas ensayadas (Figura 26 B). A los 7 días postinfección, los valores de carga fúngica más elevados no superaron el valor de logaritmo de 3 y correspondieron a la cepa vínica T73 (Log de 2,8) seguida del aislado clínico de sangre F27 (Log de 2,5). Por debajo de un logaritmo de 1,5 se encontraron la cepa de referencia CECT 10.431, el aislado clínico n° 75 y la cepa vínica ICV-17. De todas las cepas, únicamente el aislado clínico n° 20 no fue recuperada, indicando el posible aclaramiento de esta levadura en dicho órganos o incluso pudiera ser que este aislado no hubiera colonizado dicho órgano tras la infección, ya que no mostró alojamiento alguno durante todo el ensayo. A los 15 días postinfección, también se observó una disminución en el valor de los alojamientos para todas las cepas ensayadas, incluso no se encontraron microorganismos en los ratones sacrificados para las cepas de alimentos “Cinta roja” y CECT 10.431. El aislado clínico F27 y la cepa vínica T73 disminuyeron 1,1 veces el logaritmo, la cepa vínica ICV-17 no experimentó ningún cambio, manteniendo el mismo valor de carga fúngica que había mostrado a los 7 días. Sin embargo, el aislado clínico n° 75 experimentó un leve incremento, lo que indicaría que esta cepa fue capaz de proliferar en el riñón. Por último, y aunque no tenemos los valores de alojamiento a los 7 días para los aislados clínicos n° 102 y n° 60 tras causar una mortalidad del 20% en ambos casos, éstos exhibieron los mayores alojamientos a los 15 días, con lo que podríamos pensar que los alojamientos a los 7 días para estos aislados seguramente serían también más elevados o por lo menos iguales a los observados en este momento del ensayo. Finalmente a los 30 días postinfección, los alojamientos eran prácticamente inapreciables para la mayoría de las cepas, de hecho únicamente presentaron alojamiento el aislado clínico de sangre F27 y curiosamente la cepa panadera “Cinta roja”, que a los 15 días parecía haber aclarado la infección. Este fenómeno indicaría que quizás los ratones sacrificados a los 15 días habrían conseguido aclarar a esta levadura, pero no era extensible a todos los ratones infectados. Es decir, que encontramos cierta variabilidad en la capacidad de cada ratón individualmente para vencer la infección de esta cepa o quizás de cualquier otra cepa.

Estos resultados indican que la cepa de ratones BALB/c es sensible para ciertas cepas de *S. cerevisiae*, causando la muerte durante la primera semana de infección. En general las cepas industriales fueron capaces de colonizar ambos órganos de forma similar a los aislados clínicos y de nuevo la cepa panadera y *S. boulardii* destacan entre las cepas no clínicas, ya que no solo fueron capaces de causar muerte, sino que además mostraron

elevados alojamientos. Sin embargo, dos cepas vínicas (T73 e ICV-17) sorprendieron por su capacidad colonizadora aunque no causaron mortalidad.

Los alojamientos sufrieron un aclaramiento progresivo de la infección en ambos órganos a lo largo de los 30 días de duración del ensayo, pero dicha disminución fue significativamente mayor en el caso de la colonización del riñón y entre los días 15 a 30, en comparación a lo observado en el cerebro ($P < 0,05$).

2.1.3. Modelo murino de infección en ratones DBA/2N, deficientes en el factor C5 del sistema del complemento

La cepa cosanguínea de ratón DBA/2N es deficiente en el factor C5 del Sistema del Complemento y dicha deficiencia parece incrementar la susceptibilidad a sufrir infecciones fúngicas por *Aspergillus fumigatus* (Héctor y col., 1990), *Candida albicans* (Héctor y col., 1982; Lyon y col., 1986; Ashman y col., 2003) y *Cryptococcus neoformans* (Rhodes y col., 1985), así como infecciones por bacterias gram-negativas. Sin embargo, la deficiencia en el factor C5 no parece influir en las infecciones causadas por otros microorganismos como *Histoplasma capsulatum* (Wu-Hsieh, 1989), *Paracoccidioides brasiliensis* (Burger y col., 1985; Calich y col., 1987) o *Coccidioides immitis* (Cox y col., 1988).

En el caso de las infecciones causadas por *S. cerevisiae*, Byron y colaboradores (1995) y Wheeler y colaboradores (2002) mostraron que el factor C5 es importante en la respuesta innata temprana del hospedador frente a la infección causada por algunos aislados capaces de causar mortalidad, pero también indicaron que no es un requerimiento absoluto para la resistencia innata contra todos los aislados de *S. cerevisiae*, de hecho dependería más de las estrategias propias de cada aislado de esta levadura para manifestar virulencia. Por ello, se decidió realizar un ensayo de infección en los ratones DBA/2N con las mismas cepas ensayadas en el modelo anterior y así determinar si efectivamente la deficiencia en el factor C5 del complemento altera la susceptibilidad a sufrir infección o si depende en mayor medida de la capacidad patogénica propia de cada aislado. Las infecciones se realizaron siguiendo la metodología descrita en el modelo anterior, tal y como se describe en la Figura 25.

Tras inocular con cada una de las cepas, los primeros signos de infección aparecieron a partir del 2º día, observándose pérdida de peso, encrespamiento del pelo y poca movilidad para la mayoría de los ratones inyectados con las cepas vínicas T73 e ICV-17 y los aislados clínicos nº 60, 102, 75 y 20. A los tres días ocurrió la muerte de 1 ratón

para las cepas clínicas n° 102 y 75 respectivamente y a los 6 días murieron 4 ratones más de la cepa n° 102 y 1 de la cepa n° 75 (ver Tabla 15). Los ratones supervivientes infectados con estas dos cepas clínicas mostraron signos de infección pasados los 15 días, aunque no sucedió mortalidad alguna tras la primera semana postinfección para ninguna cepa más. Si comparamos estos resultados con los observados en los ratones BALB/c, parece claro que los ratones DBA/2N muestran mayor susceptibilidad a sufrir infección en el caso concreto de los aislados clínicos n° 102 y n° 75. El aislado clínico n° 102 causó un 30% más de mortalidad que en el ensayo anterior y el aislado clínico n° 75, que en el modelo anterior no había causado mortalidad alguna, produjo la muerte del 20% de los ratones DBA/2N ensayados. Para el resto de cepas, los ratones DBA/2N se mostraron incluso más resistentes a sufrir una infección, ya que las cepas capaces de causar mortalidad en los ratones BALB/c (aislado clínico n° 60, la cepa de panadería Cinta roja y *S. boulardii*), fueron incapaces de causarla en los ratones DBA/2N. Este resultado no implica que estas cepas no hayan sido capaces de producir infección en estos ratones, puesto que los ratones mostraron signos de infección durante la primera semana postinfección y además se observaron niveles de alojamiento elevados para todas ellas. De todos modos lo que si se repitió en este modelo fue que las cepas que causaron mortalidad lo hicieron durante la primera semana de infección. Una vez transcurrido este periodo los ratones se fueron recuperando, siendo capaces de vencer la infección causada por estas cepas.

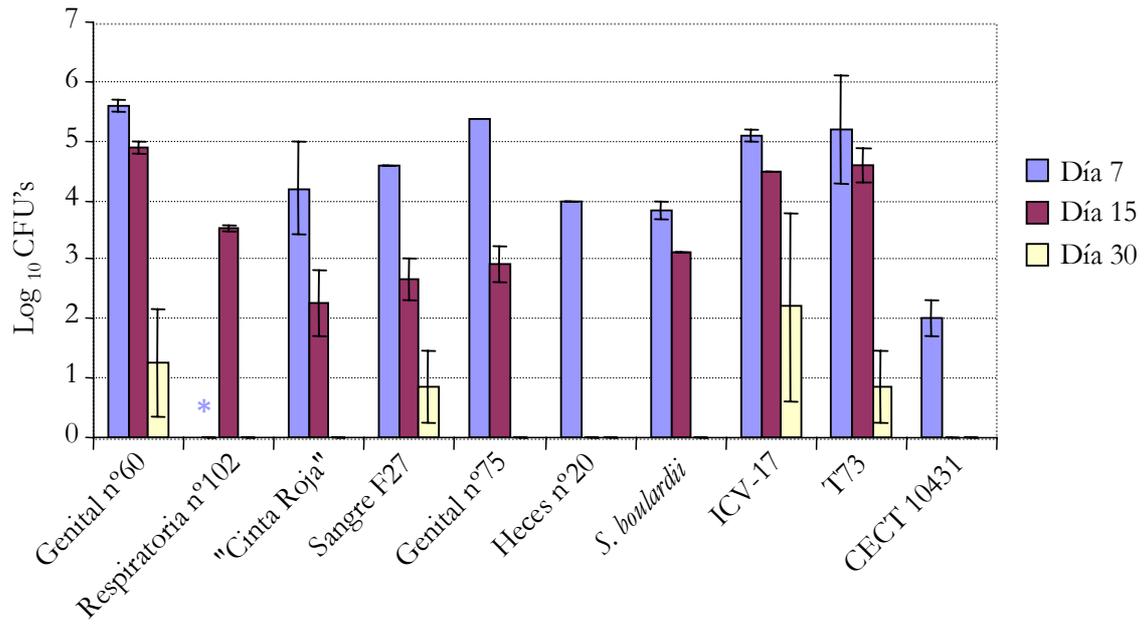
La evolución del alojamiento durante los 30 días de duración del ensayo se muestra en las Figura 27 A y B. Al igual que en el modelo anterior, no se sacrificaron los ratones correspondientes al día 7 en aquellas cepas que causaron mortalidad durante la primera semana postinfección, aunque para la cepa clínica n° 75 se sacrificó 1 ratón que se encontraba agonizando y era incapaz de levantarse para alimentarse, de manera que el valor del alojamiento a los 7 días es el proveniente únicamente de este ratón.

En líneas generales, se observaron resultados similares al ensayo anterior, tanto las cepas clínicas como no clínicas volvieron a exhibir alojamientos muy elevados en cerebro, aunque hay que destacar el considerable incremento observado en los valores de alojamiento en riñón, en comparación con los observados en los ratones BALB/c. Por lo que respecta a los alojamientos en cerebro (Figura 27 A), a los 7 días postinfección los alojamientos más elevados (por encima de un logaritmo de 5) se observaron para los aislados clínicos n° 60 y n° 75, junto con la cepa vínica ICV-17, seguidas de la cepa vínica T73, la cepa de panadería “Cinta roja” y el aislado clínico F27 (por encima de un logaritmo de 4). Con valores de carga fúngica menores, aunque por encima de un logaritmo de 3,5 se

encontraron la cepa de *S. boulardii* y el aislado clínico n° 20. De nuevo la cepa vínica de referencia CECT 10.431 mostró mayor dificultad para colonizar el cerebro. A los 15 días postinfección se observó un ligero descenso de 0,7 veces en los valores de carga fúngica para el aislado clínico n° 60, *S. boulardii* y las cepas vínicas T73 e ICV-17. En el caso de la cepa panadera “Cinta roja” y el aislado de sangre F27 el valor del alojamiento disminuyó en 1,95 veces, mientras que en el caso del aislado clínico n° 75 el valor de carga fúngica disminuyó casi a la mitad (2,4 veces menos). El aislado clínico n° 102 mostró valores intermedios de alojamientos, con un logaritmo de 3,5. Y por último, se observaron dos casos de posible aclaramiento fúngico del 100% para la cepa de referencia CECT 10.431 y el aislado clínico n° 20, ya que no se recuperaron microorganismos en ninguno de los ratones sacrificados. Al final del ensayo se observó un claro descenso en los alojamientos exhibidos por todas las cepas, únicamente se recuperaron células de las cepas vínicas T73 e ICV-17 y los aislados clínicos n° 60 y F27. Estas cepas mostraron mayor capacidad para colonizar y persistir en los ratones que el resto de cepas, incluso que las cepas capaces de causar muerte. De hecho, no se recuperó ninguna célula de los aislados clínicos n° 102 y n° 75, ni de la cepa de *S. boulardii*, indicando un aclaramiento fúngico del 100% en estos casos.

Los alojamientos temporales observados en el riñón se muestran en la Figura 27 B. Aunque los niveles de carga fúngica han sido mayores en este modelo comparándolo con el modelo anterior, de nuevo se observó la tendencia a un aclaramiento más rápido en este órgano que en cerebro. De hecho, a los 30 días ya no se encontró alojamiento alguno, con la excepción del aislado genital N° 60. A los 7 días se observaron los valores de carga fúngica más elevados, destacando las cepas vínicas T73 e ICV-17, junto con los aislados genitales N° 60 y 75, con valores de logaritmos cercanos y superiores a 4, bastante próximo a lo mostrado en el cerebro (Log de 5). “Cinta roja” y el aislado de sangre F27 mostraron valores cercanos a un logaritmo de 3 y la cepa de referencia CECT 10431 no fue recuperada durante todo el ensayo, por tanto o fue rápidamente clarificada antes de los 7 días o no fue capaz de colonizar este órgano. A los 15 días los alojamientos declinaron significativamente (P valor < 0,05), de hecho el número de células recuperadas para las cepas vínicas se redujo a la mitad e incluso en el caso de los aislados genitales N° 60 y 75 se redujeron tres veces, comparados con los observados en el día 7. Sin embargo, el aislado respiratorio N° 102, mostró el valor de alojamiento más elevado, ya que mostró un logaritmo de 3. Para el resto de cepas no se recuperaron células viables.

A



B

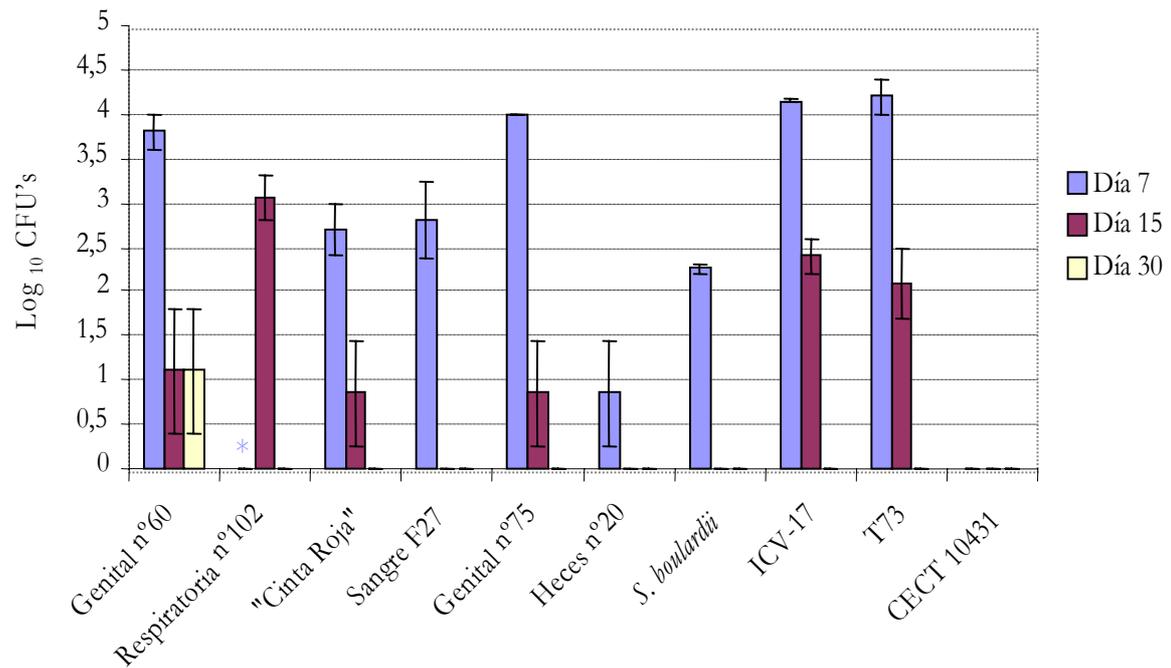


Figura 27. Alojamiento observado en cerebro (A) y riñones (B) de los ratones DBA/2N para las diferentes cepas ensayadas de *S. cerevisiae*. Se han representado como el Logaritmo en base 10 de las medias de las unidades formadoras de colonias observadas para los 7, 15 y 30 días postinfección. Los asteriscos indican que para dichas cepas no existe medida del alojamiento, ya que causaron mortalidad durante los 7 días postinfección y no se sacrificaron los ratones correspondientes.

Tras realizar el ensayo de infección sistémica en ratones deficientes en el factor C5, parece claro que la sensibilidad o resistencia de estos ratones a sufrir una infección por *S. cerevisiae*, depende más de las propiedades intrínsecas de cada cepa de levadura que de la deficiencia en el factor C5 de la cepa de ratones. Los alojamientos en ambos órganos fueron muy similares a los observados en ratones BALB/c para todas las cepas. Únicamente vieron incrementada su virulencia los aislados clínicos N° 75 y 102, para los cuales los ratones DBA/2N mostraron mayor susceptibilidad.

2.1.4. Modelo murino neutropénico de infección en ratones ICR/Swiss inmunosuprimidos con ciclofosfamida

Las infecciones descritas para *S. cerevisiae* están asociadas en su mayoría a pacientes que muestran ciertos factores de predisposición, como son la administración de terapias inmunosupresoras en la prevención de rechazo en los trasplantes de órganos o la inmunosupresión que sufren los enfermos de SIDA. Existen trabajos que emplean modelos murinos que mimetizan las condiciones de pacientes inmunodeprimidos y el efecto sobre estos ratones tras sufrir una infección con diferentes microorganismo como *C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Hansenula anomala* o *Aspergillus fumigatus* (Andes y Ogtrop, 2000; Anaissie y col., 1993; Fromtling y col., 1987; Cermeño-Vivas y col., 1999; Stephens-Romero y col., 2005, respectivamente). La inmunosupresión en estos modelos murinos se consigue por la administración de ciclofosfamida, un agente inmunosupresor que causa neutropenia y daña las defensas naturales del hospedador, incrementando la predisposición de éste a sufrir una infección fúngica (Bodey, 1966; Singh, 2001). En el caso de *S. cerevisiae*, en la bibliografía solo se ha encontrado un trabajo (Okawa y Yamada., 2002) en el cual, empleando modelos murinos neutropénicos de infección sistémica, se observó mortalidad para una cepa de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en este trabajo solo ensayaron cepas de procedencia industrial, por lo que se consideró interesante emplear dicho modelo para estudiar nuestros aislados clínicos y ampliar el número de cepas industriales.

La metodología seguida para inducir la neutropenia se describió en Materiales y Métodos en el apartado 7.2 y en la Figura 28 se detalla tanto el procedimiento de inmunosupresión como la infección posterior con *S. cerevisiae*. A diferencia de los modelos anteriores, en éste se trabaja únicamente con 5 ratones por cepa de levadura, debido a que estos ratones requieren inyecciones intraperitoneales sucesivas de ciclofosfamida para mantener la inmunodepresión. Como consecuencia, los ratones experimentan un nivel de

RESULTADOS

estrés adicional que los hace más agresivos y por tanto dificulta su manejo. Por el mismo motivo se acortó el tiempo de duración del ensayo hasta 10 días, siendo más que suficiente este periodo para observar el efecto de la inmunosupresión en la infección cursada por la levadura.

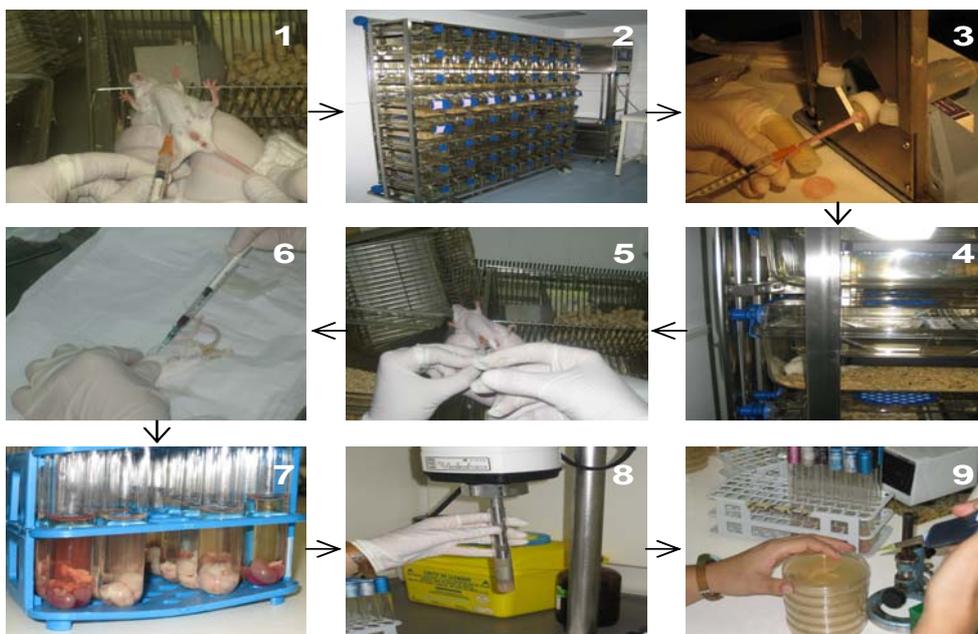


Figura 28. Esquema del procedimiento seguido para la realización del ensayo del modelo murino neutropénico.

1. El día previo a la infección se procede a la inmunosupresión por inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (200 mg/Kg de peso del ratón).
2. Los ratones se mantienen en condiciones de esterilidad, las jaulas presentan aireación independiente. La comida, agua y serrín administrados son estériles. A partir de este momento los animales se manipulan en cámara de flujo laminar
3. La infección se realiza en la vena caudal, inyectando 2×10^7 c/mL.
4. Durante un periodo de 10 días se monitoriza la supervivencia, revisando el estado de los ratones, que se mantienen en las jaulas estériles de aireación independiente.
5. A los 5 días postinfección se vuelve a inducir la neutropenia por inyección intraperitoneal de 150 mg/Kg de ratón. De esta manera se asegura la inmunodepresión durante los 10 días de duración del ensayo.
6. A los 10 días se extrae el suero por punción cardiaca a los ratones supervivientes.
7. Se extraen el cerebro y riñón de cada ratón sacrificado
8. Se homogenizan los órganos mediante trituración para liberar toda la carga fúngica de los mismos y se plaquearon las diluciones de ambos órganos en placas de GPYA con cloranfenicol (9). Las placas se incubaron a 30° C durante 2 días.

Tras realizar la infección con cada cepa de levadura, el día después a la 1ª inyección con ciclofosfamida, los ratones comenzaron a mostrar signos de infección, más o menos en el día 2 postinfección, principalmente en los ratones infectados con las cepas clínicas n° 60, 102 y la cepa vírica ICV-17. De nuevo, la mortalidad global del ensayo sucedió durante la primera semana postinfección (Tabla 15). En general la muerte vino dada por las cepas que ya habían causado mortalidad en alguno de los dos modelos anteriores, con la excepción de la cepa clínica de sangre F27. Es de destacar la cepa clínica comensal n° 60, ya que causó la muerte de 4 de los 5 ratones inoculados, este resultado podría indicar que el estado inmunitario del ratón estaría directamente relacionado con la susceptibilidad a cursar una infección por estas cepas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, el resto de cepas no vieron incrementada su tasa de mortalidad (la cepa de *S. boulardii* y el aislado de sangre F27 causaron un 20% y el aislado respiratorio N° 102 y Cinta roja un 40%), de manera que dicha explicación no podría hacerse extensible a todas las cepas.

De la misma manera que en los modelos anteriores, se estudió la capacidad de colonización de las cepas en cerebro y riñón en el último día de ensayo (10 días postinfección). En la Figura 29 se representan los alojamientos exhibidos en ambos órganos para cada cepa.

En términos general se observó un comportamiento similar al de los anteriores modelos y es que tanto las cepas clínicas como no clínicas fueron capaces de colonizar ambos órganos, siendo mayores en cerebro, aunque en este modelo la diferencia no fue significativamente alta respecto al alojamiento en riñón ($P > 0,05$), comparado con los modelos anteriores. De nuevo se observaron los niveles más bajos de carga fúngica para el aislado clínico comensal n° 20 y la cepa vínica CECT 10.341 y solo en cerebro, porque en riñón no se recuperaron células viables. Con respecto al resto de cepas ensayadas, de nuevo destacaron la cepa clínica n° 60 (valor que correspondió al único ratón superviviente) y las cepas vínicas ICV-17 y T73, los cuales exhibieron los niveles más elevados de carga fúngica en cerebro (alrededor o superiores a un valor de logaritmo de 5). Les siguieron la cepa clínica n° 102 y la cepa de panadería “Cinta roja”, con valores de alojamientos cercanos a un logaritmo de 5 y por último la cepa de *S. boulardii*, el aislado genital N° 75 y el aislado de sangre F27, con un valor de logaritmo de 4.

Los alojamientos observados en riñón fueron muy elevados en general, destacando el aislado genital N° 60 y el aislado de sangre F27 (muy similar a cerebro) y la cepa vínica ICV-17 con valores cercanos a un logaritmo de 4. A continuación destacaron el aislado respiratorio N° 102, “Cinta roja”, el aislado genital N° 75 y la cepa vínica T73 con valores iguales o superiores a un logaritmo de 3 y finalmente la cepa de *S. boulardii* que mostró el menor valor de carga fúngica (logaritmo de 2).

Estos resultados parecen indicar que la neutropenia no aumentó el número de cepas capaces de causar mortalidad, puesto que las cepas que mostraron cierta virulencia en los modelos anteriores, también la manifestaron en éste. Tampoco parece influir la neutropenia en un aumento significativo de la virulencia, en cuanto a la tasa de mortalidad, para las cepas capaces de causar muerte. Sin embargo, la neutropenia sí parece influir en la capacidad de colonización de las cepas en ambos órganos, aunque el aumento fue significativamente más elevado en riñón, que en cerebro, con respecto a los modelos anteriores. Aunque hubo excepciones, como fue el caso del aislado clínico N° 20 y la cepa de referencia CECT 10.431, los cuales no vieron aumentada su colonización, no mostrando colonización en riñón.

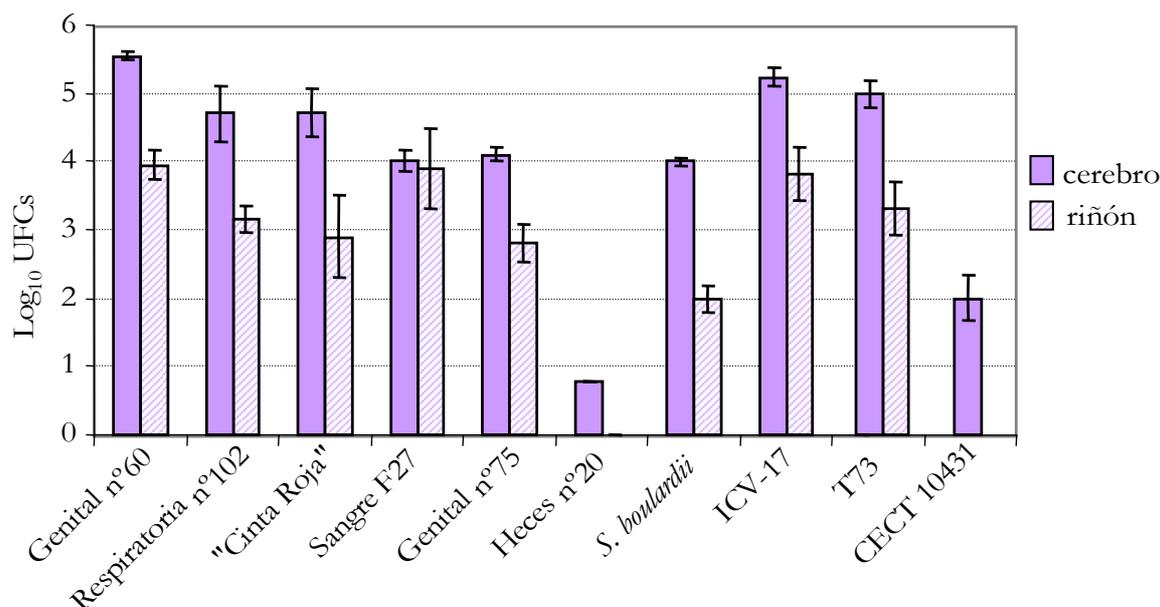


Figura 29. Alojamientos observados en cerebro y riñón de los ratones neutropénicos ICR/Swiss. Los alojamientos observados a los diez días de duración, se representan con barras en color para el cerebro y con barras rayadas para el riñón.

2.1.5. Determinación del grado de virulencia de las cepas ensayadas

Para determinar el grado de virulencia de las cepas de *S. cerevisiae* se han empleado diferentes criterios de acuerdo con diferentes parámetros. Clemons y colaboradores (1994) establecieron la capacidad de la levadura para proliferar y persistir en cerebro durante 14 días, como único parámetro para definir la virulencia de las cepas incluidas en su estudio, ya que en los ratones sanos CD-1 empleados no observaron mortalidad alguna, ni siquiera por la cepa considerada como virulenta YJM128. Por otro lado, Byron y colaboradores (1995), a partir de los ensayos de infección sistémica realizados en ratones DBA/2N, definieron 4 grados de virulencia, teniendo en cuenta tanto el grado de colonización, la persistencia en el hospedador, así como la mortalidad causada por los organismos. Teniendo en cuenta los parámetros considerados por cada autor para definir el grado de virulencia, se decidió establecer en el presente trabajo, grados de virulencia para las 10 cepas estudiadas, teniendo en cuenta tanto la capacidad de causar mortalidad, como el alojamiento observado en cerebro a los 15 días para los modelos de BALB/c y DBA/2N (pues se trata de un tiempo relativamente largo de persistencia para las levaduras en el hospedador) y 10 días para el modelo de neutropenia. En base a los resultados observados en los tres modelos de

infección sistémica, se seleccionó el cerebro como el órgano a tener en cuenta, por ser el órgano diana en el transcurso de una infección sistémica producida por *S. cerevisiae*. Considerando estos parámetros se definieron tres grados de virulencia que nos permitieron agrupar a las cepas en:

- **Cepas con virulencia alta:** aquellas cepas capaces de causar muerte y que exhibieron altos alojamientos en cerebro.

- **Cepas con virulencia intermedia:** las cepas que no causaron mortalidad, pero exhibieron igualmente altos niveles de alojamiento en cerebro, muy similares a los mostrados por las cepas de virulencia alta.

- **Cepas con baja virulencia o avirulentas:** cepas que exhibieron bajos o nulos alojamientos en cerebro, siendo incapaces de persistir mucho tiempo en el hospedador.

Siguiendo dicho criterio, las cepas fueron divididas en tres grados de virulencia para cada uno de los modelos murinos ensayado, tal y como se detalla en la Tabla 16.

Tabla 16. Grados de virulencia para cada cepa en cada uno de los modelos murinos, siguiendo el criterio de virulencia establecido.

MODELO MURINO	GRADOS DE VIRULENCIA		
	ALTO	INTERMEDIO	BAJO
BALB/c	Nº 60; 102; Cinta roja; <i>S. boulardii</i>	ICV-17; T73; Nº 75; F27	CECT10.431; Nº 20
DBA/2N	Nº 75 ; 102	Nº 60; ICV-17; T73; F27, <i>S. boulardii</i> ; ; Cinta roja;	CECT10.431; Nº 20
ICR/Swiss-neutropénicos	Nº 60; 102; Cinta roja; <i>S. boulardii</i> ; F27	ICV-17; T73; Nº 75	CECT10.431; Nº 20

Independientemente del modelo murino empleado, la cepa de referencia CECT 10.431 y el aislado clínico comensal Nº 20 (aislado de heces) pueden ser consideradas de baja virulencia, ya que para las tres cepas de ratón empleadas mostraron los menores valores de alojamientos y eran eliminadas rápidamente del ratón y la Nº 102 como alta virulencia (siempre). Por lo que respecta a los grados de virulencia alto e intermedio, las cepas se situaron en uno u otro grado dependiendo del modelo murino utilizado. Si comparamos los modelos BALB/c e ICR/Swiss neutropénicos, las cepas mostraban el mismo grado de virulencia, a excepción del aislado de sangre F27 que se situó en el grado mayor de virulencia en el modelo neutropénico, junto con las cepas que también habían causado mortalidad en los ratones BALB/c, (éstas incrementaron ligeramente sus tasas de mortalidad en los ratones neutropénicos, el aislado genital Nº 60 en un 60%, la cepa

panadera “Cinta roja” en un 10% y el aislado respiratorio N° 102 en un 30%). Sin embargo, estas cepas cambiaron su grado de virulencia alto por el intermedio cuando se ensayaron en los ratones DBA/2N ya que aunque mantuvieron muy elevado los alojamientos en cerebro no causaron mortalidad alguna. De manera que entre las cepas con alta virulencia se encontraron únicamente el aislado genital N° 75 y el aislado respiratorio N° 102, ya que fueron capaces de causar un 20% y 50% de mortalidad respectivamente.

La letalidad de un microorganismos no es el único parámetro a considerar para definir su patogenicidad, sino que la capacidad de colonizar y persistir es también una característica que debe ser tomada en cuenta, tal y como se detalló al inicio del apartado 2. Por este motivo se decidió analizar detalladamente la capacidad de colonización que mostraban las 10 cepas en estudio, abordando los niveles de alojamiento mostrados en el cerebro, a los 15 días postinfección para los modelos de BALB/c y DBA/2N y a los 10 días para el modelo de neutropenia, estos resultados se muestran en la Figura 30. De acuerdo con estos datos, se pudo establecer un rango de mayor a menor nivel de carga fúngica en el cerebro para cada modelo murino. Algunas cepas mostraron en los tres modelos murinos los niveles más altos de carga fúngica, como es el caso del aislado genital N° 60, la cepa vínica ICV-17, seguidos del aislado respiratorio N° 102 y la cepa vínica T3. Seguidos de la cepa de panadería “Cinta roja”, la cepa de *S. boulardii*, el aislado genital N° 75 y el de sangre F27, con capacidad intermedia para colonizar. Es interesante resaltar que se observó en general una tendencia a aumentar los alojamientos conforme mayor fue la deficiencia mostrada por el ratón. Aunque existieron excepciones, principalmente para los alojamientos observados en los ratones DBA/2N, de manera que la deficiencia en el factor C5 no parecía influir de la misma manera en la capacidad de colonizar en todas las cepas.

Por otro lado, aunque no pueda realizarse una comparación real entre estos dos modelos y el modelo neutropénico, por no coincidir los tiempos de estudio de los alojamientos, se puede intuir que la neutropenia influye en la capacidad infectiva de las cepas, en base a los alojamientos obtenidos.

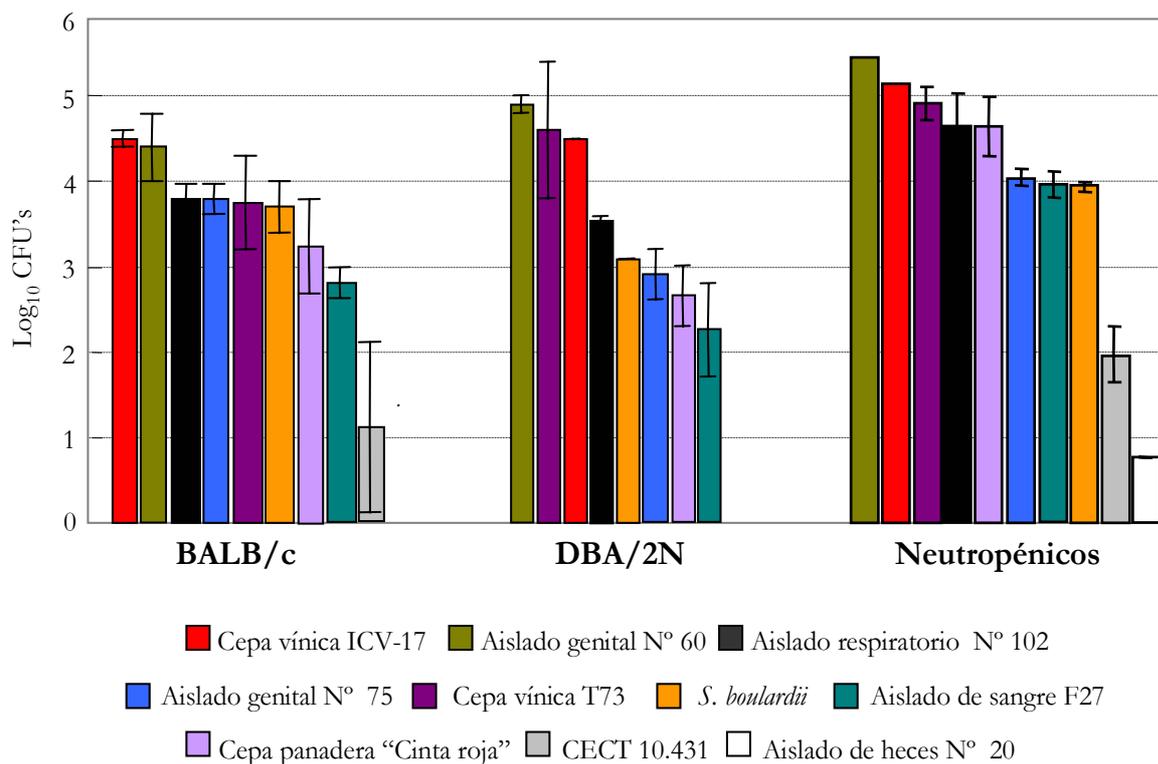


Figura 30. Comparación de los alojamientos observados en cerebro para las 10 cepas ensayadas en los tres modelos de ratones empleados. Los valores de carga fúngica observados a los 15 días postinfección para los ratones BALB/c y DBA/2N y 10 días para los ratones ICR/Swiss se muestran ordenados de mayor a menor.

El riñón no parece ser un órgano diana en el transcurso de la infección por *S. cerevisiae*, ya que no solo se observa alojamiento en menor grado que en el cerebro, sino que además las cepas muestran un aclaramiento mayor a lo largo del transcurso de la infección. En cualquier caso, se realizó igualmente un estudio comparativo del nivel de alojamiento observado en los riñones, para cada cepa y en cada modelo, a los 15 días para los ratones BALB/c y DBA/2N y 10 días para los ratones ICR/Swiss neutropénicos, ordenando de mayor a menor el nivel de carga fúngica de las cepas (Figura 31).

Los modelos BALB/c y DBA/2N nos proporcionaron resultados similares en cuanto a los niveles de alojamientos observados en riñón. Sin embargo, lo realmente llamativo fueron los alojamientos observado en los ratones neutropénicos. Todas las cepas industriales y aislados clínicos vieron aumentados sus alojamientos dos veces o más de lo mostrado en los otros dos modelos, posiblemente este hecho venga relacionado con el tipo de deficiencia inmunitaria que muestran dichos ratones, permitiendo una mayor

colonización, e incluso menor aclaramiento en comparación con los modelos anteriores. Es de destacar especialmente, el caso del aislado respiratorio N° 102, que mantuvo un nivel más o menos similar en los tres modelos murinos, próximo a un logaritmo de 3.

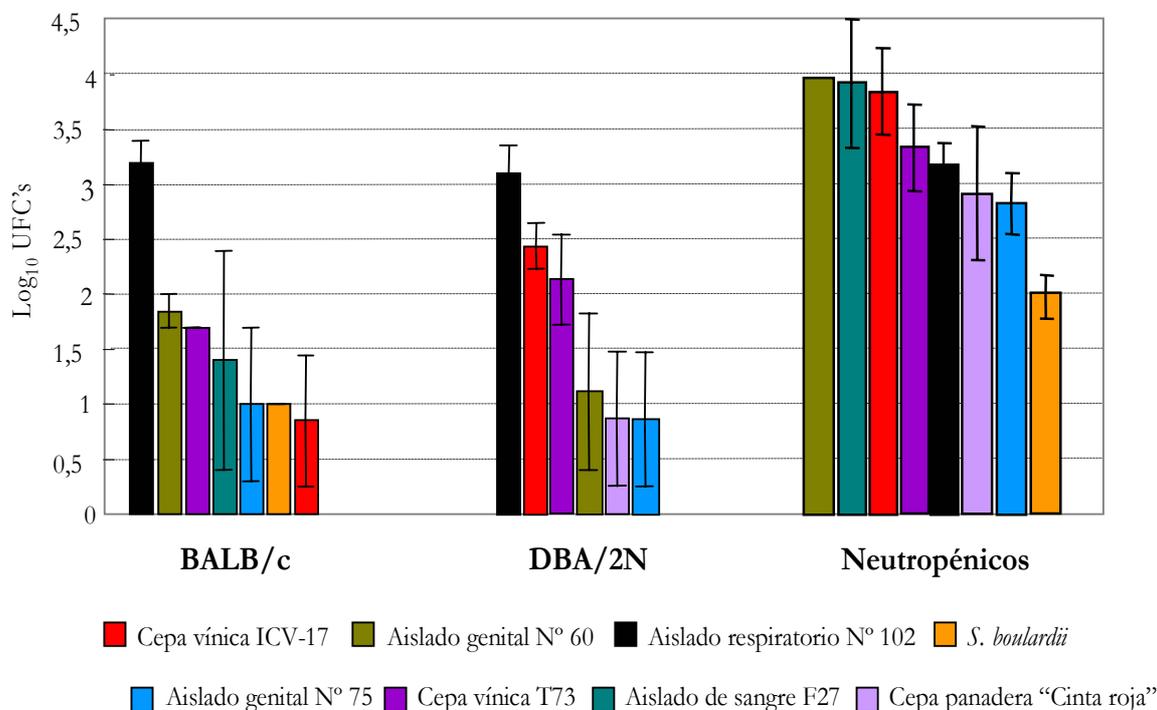


Figura 31. Comparación de los alojamientos observados en riñones para las 10 cepas ensayadas en los tres modelos de ratones empleados. Los valores de carga fúngica observados a los 15 días postinfección para los ratones BALB/c y DBA/2N y 10 días para los ratones ICR/Swiss se muestran ordenados de mayor a menor.

2.1.6. Estudio histológico

Ya que el cerebro es el órgano más colonizado tras la infección con *S. cerevisiae*, se planteó realizar un estudio histopatológico para poder determinar que morfología es capaz de adoptar *S. cerevisiae* en dicho órgano y si su alojamiento se puede asociar con algún tipo de lesión en el órgano colonizado. Para ello, se procedió a realizar un ensayo de infección sistémica en 4 ratones hembras BALB/c (ver Figura 25) con 3 de las cepas ensayadas anteriormente, que habían mostrado distinto grado de virulencia (la cepa clínica n° 60, la cepa vínica T73, la cepa panadera "Cinta roja"). Se sacrificaron 2 ratones BALB/c a los 7 días y otros dos a los 15 días, ya que eran los periodos en los cuales se observaban los

mayores alojamientos. Y se incluyeron también algunos cerebros de los ratones ICR/Swiss neutropénicos inoculados con las cepas Cinta roja, ICV-17 y la cepa clínica nº 102, del ensayo general descrito anteriormente. Los cerebros se extrajeron con mucho cuidado y se introdujeron en formamida diluida neutra. El proceso posterior de fijado de la muestra, cortes y tinción de Shift con ácido periódico se realizó en el Servicio de Patología de la Facultad de Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid.

En el caso concreto de la cepa clínica Nº 60 no hubo cortes histológicos a los 7 y 15 días, ya que los ratones inoculados empezaron a mostrar claros signos de infección a las 24 horas, sacrificándose incluso un ratón BALB/c que mostraba un aspecto moribundo. A los 3 días murieron 2 ratones más y se sacrificó el quinto ratón por mostrar claros síntomas de infección. Tampoco pudimos disponer de una muestra de cerebro de los ICR/Swiss para esta cepa, puesto que únicamente sobrevivió 1 ratón y se sacrificó para estudiar el alojamiento. En la Figura 32 se muestran algunos ejemplos de los cortes realizados.

En los cortes de cerebro del ratón BALB/c infectado con la cepa clínica Nº 60 y sacrificado a las 24 horas postinfección, aparecieron levaduras ovoides en el interior de los vasos del cerebro, en número escaso y no se apreció reacción inflamatoria alguna (Figura 32, sección A). Para el ratón infectado con la misma cepa y sacrificado a los 3 días, en los cortes se observaron múltiples focos de levaduras ovoides en cerebro y cerebelo sin que formasen focos inflamatorios, aunque en algunas zonas se observó una discreta reacción glial (Figura 32, sección B). Aunque en las muestras no se apreciaron levaduras en gran número, las lesiones que se observaron pudieron ser debidas consecuencia de la colonización de dicho órgano por células de levadura.

En el resto de los cortes realizados a cerebros de ratones BALB/c, para la cepa vírica T73 o la cepa de panadería “Cinta roja”, no se observaron levaduras, aunque sí se apreciaron ligeras reacciones inflamatorias en las muestras de 7 días postinfección de ambas. No encontramos explicación al hecho de que no se observasen levaduras en los cortes de estas cepas, ya que en esos momentos de la infección (7 y 15 días postinfección) se recuperó un alto número de levaduras en cerebro, tal y como se describió en los apartados anteriores. (Figura 26 A).

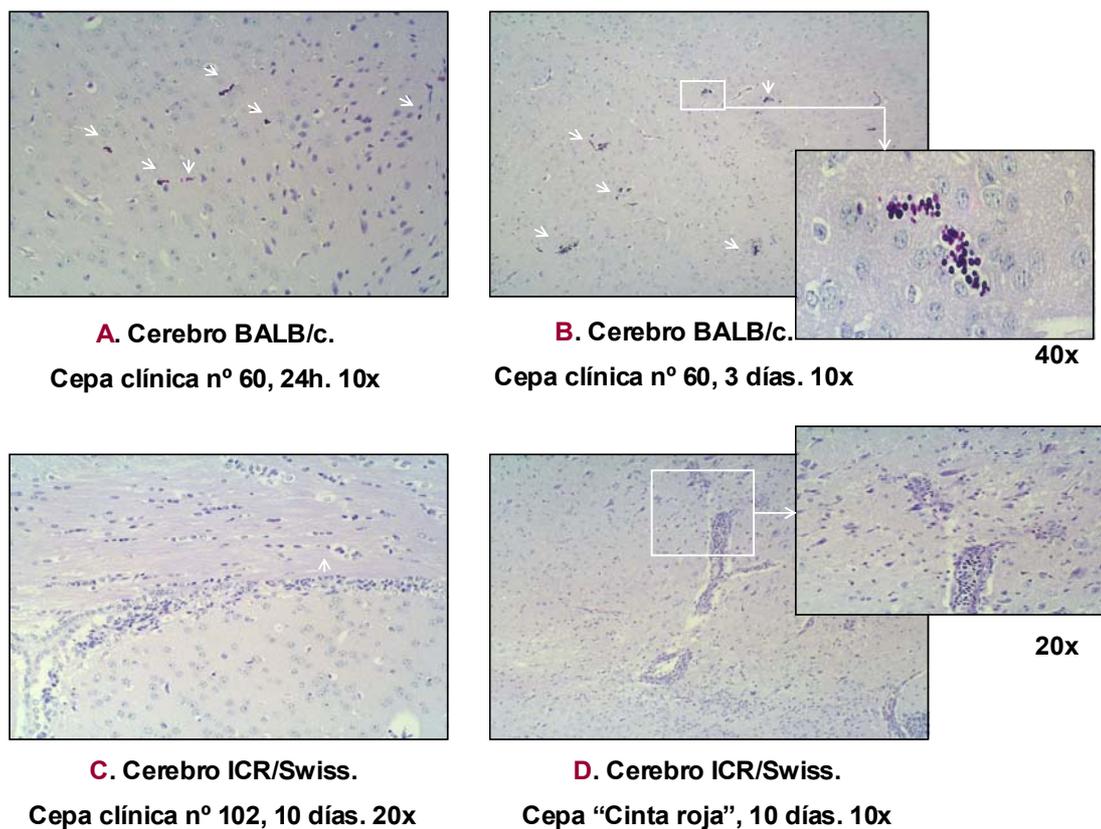


Figura 32. Análisis histológico del tejido cerebral de ratones infectados con cepas de *S. cerevisiae*. Los cortes fueron teñidos con ácido periódico de Shift (PAS). Las flechas indican núcleos de células de levaduras. **A** y **B**: cortes de cerebro de ratones BALB/c infectados con la cepa clínica nº 60, sacrificados a las 24 horas y 3 días respectivamente. La imagen asociada al corte B está aumentada 40 veces para poder discernir cómo las células de la cepa nº 60 se encuentra con una morfología ovoide en el tejido cerebral. **C** y **D**: cortes de tejido cerebral de ratones neutropénicos ICR/Swiss, infectados con la cepa clínica nº 102 y la cepa de panadería "Cinta roja" respectivamente. En la imagen aumentada en 20x del corte D, se aprecian los núcleos de levaduras y la reacción inflamatoria asociada.

En cuanto a los cortes realizados de los cerebros de ratones ICR/Swiss neutropénicos a los 10 días postinfección, se observaron escasas levaduras de la cepa de panadería "Cinta roja", aunque se apreció un proceso inflamatorio perivascular y una ligera reacción inflamatoria (Figura 32, sección C), lo que estaría indicando de nuevo que además de colonizar el cerebro, estas levaduras son capaces de causar lesiones en este órgano. Para la cepa clínica N° 102 también se encontraron levaduras en escaso número y se apreció una

ligera reacción inflamatoria glial en los plexos coroideos. (Figura 32, sección D). En los cortes de cerebro de los ratones neutropénicos infectados con la cepa vínica ICV-17 tampoco se apreciaron muchas levaduras, aunque sí se observó un proceso degenerativo de algunas neuronas que no sabemos como explicar.

Como se ha comentado, no se observó un número elevado de levaduras en los cortes, en contra de lo que cabría esperar de la gran colonización observada para cualquiera de las cepas. En cuanto a la morfología adoptada por *S. cerevisiae* en el cerebro, se observó que siempre se encuentra como célula ovoide y no en forma pseudohifal, lo cual quizás le permita pasar con más facilidad la barrera hematoencefálica. Tampoco se observó un gran daño tisular, pero si se observaron ligeras reacciones inflamatorias que podrían ser fruto de la colonización por parte de estas cepas, que como puede observarse son tanto cepas industriales (Cinta roja o ICV-17) como aislados clínicos (Nº 60 y 102), y que además mostraron siempre alta capacidad para colonizar e incluso para causar mortalidad.

2.1.7. Aplicación de técnicas moleculares para la comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de los ratones infectados.

Como complemento al estudio realizado en la presente sección, creímos conveniente comprobar si las colonias de *S. cerevisiae* recuperadas de cerebro y riñón se correspondían con la cepa inoculada en cada caso, descartando contaminaciones accidentales por otras levaduras u otras cepas de *S. cerevisiae*. Para ello se aplicó la técnica del análisis de restricción del DNA mitocondrial, utilizada para estudiar el origen de colonización de los aislados clínicos, en la primera parte del presente trabajo. Como consecuencia contábamos con los perfiles de restricción de cada una de las cepas utilizadas en los ensayos *in vivo*. Además, se aplicó la técnica del cariotipado mediante electroforesis de campo pulsante, por ser una técnica muy eficaz para la diferenciación a nivel de cepa al obtenerse patrones cromosómicos específicos de cepas que pueden variar en el número, tamaño e intensidad de las bandas. Esta técnica también había sido utilizada previamente en nuestro laboratorio para caracterizar cepas de referencia y comerciales de *S. cerevisiae* (Guillamón y col., 1996; Fernández-Espinar y col., 2001). Además, esta técnica revela el polimorfismo que muestra cada cepa como resultado de la adición, eliminación o translocación de largos fragmentos de DNA en cromosomas homólogos que suceden durante la evolución del genoma de levaduras (Keogh y col., 1998), así como consecuencia de una respuesta adaptativa ante ciertos cambios ambientales, como ciertas condiciones de

estrés. (Martínez y col., 1995; Codón y col., 1997 y 1998). Considerando que el paso de la levadura por un hospedador podría ser una condición de estrés y puesto que en el apartado del estudio del origen de colonización, observamos que los aislados con origen en panadería habían sufrido cambios relacionados con el proceso fermentativo, se creyó conveniente aplicar esta técnica, que permitiría por un lado confirmar la caracterización a nivel de cepa que la técnica de restricción del mtDNA ofrece y además se determinaría si se han podido producir cambios cromosómicos que pudieran explicar el fenómeno de pérdida de capacidad fermentativa o adaptación al hospedador.

Antes de aplicar ambas técnicas, las colonias que se fueron recuperando de ambos órganos y de cada cepa de ratón, se observaron al microscopio para confirmar por su morfología que se trataban de *S. cerevisiae*. Posteriormente se procedió a la selección aleatoria de diferentes colonias a las que se aplicaron ambas técnicas moleculares. En la Figura 33 se muestran únicamente dos ejemplos, el aislado genital N° 60 y la cepa de *S. boulardii*. Ambas técnicas revelaron que las colonias recuperadas pertenecían a la cepa inoculada en los ratones, ya que mostraron los mismos perfiles que las originales. Este resultado fue extensible al 100% de las colonias analizadas. En la Figura 34 se muestran algunos ejemplos de cariotipos de distintas cepas y las distintas colonias recuperadas en diferentes tiempos y órganos. En ningún caso se observaron cambios cromosómicos entre la cepa inoculada y la recuperada, como resultado de reorganizaciones ocurridas durante la infección del ratón.

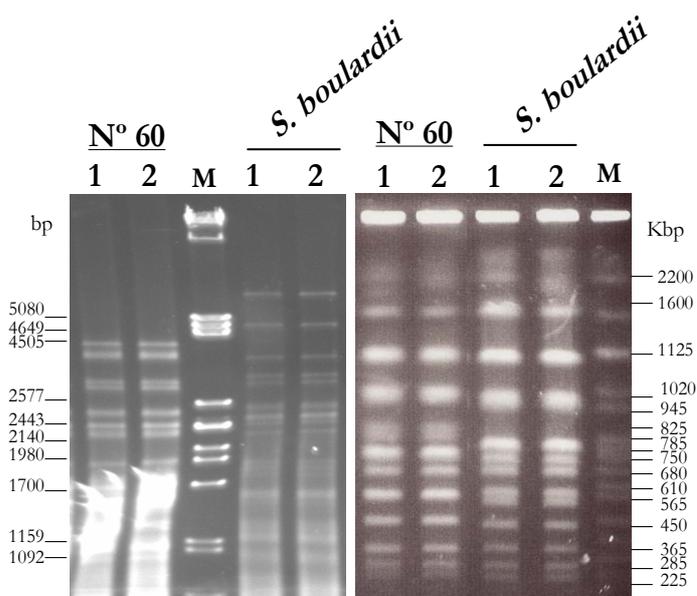


Figura 33. Comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de ratón. Ejemplos de los perfiles obtenidos de ambas técnicas moleculares para el aislado original (1) y la colonia recuperada de cerebro de la cepa de ratón BALB/c a los 15 días postinfección (2). El marcador empleado en el análisis de restricción molecular fue λ DNA digerido con la endonucleasa *Pst*I y para los cariotipos se empleó como marcador la cepa de referencia YNN295 (BioRad) (carreras M).

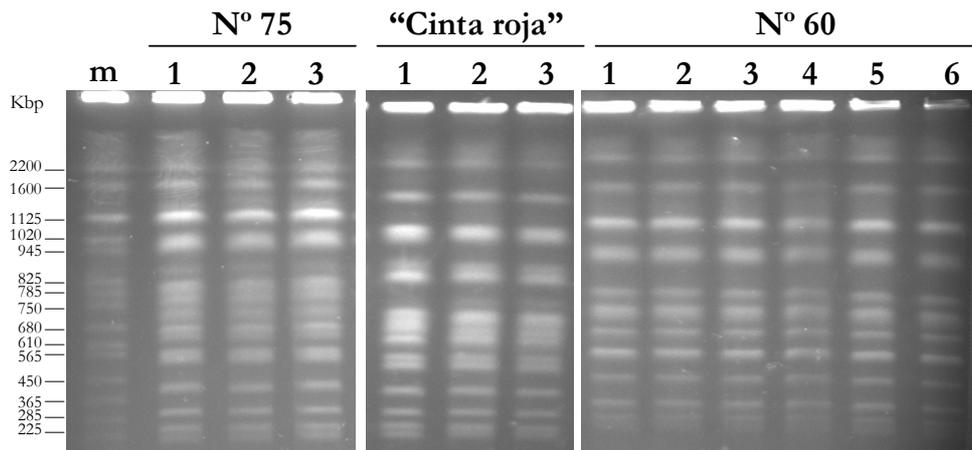


Figura 34. Ejemplos de cariotipos de la cepa original y las colonias recuperadas de ratón. En cada una de las cepas, la carrera señalada como n° 1 corresponde a la cepa original. En el aislado N° 75, las colonias n° 2 y 3 provienen del cerebro y riñón de ratones BALB/c a los 7 días postinfección respectivamente. En el caso de la cepa de panadería “Cinta roja”, las colonias n° 2 y 3 se recuperaron del cerebro de distintos ratones DBA/2N, a los 7 y 15 días postinfección respectivamente. Para el aislado N° 60, la colonia n° 2 se recuperó del cerebro de un ratón BALB/c a los 30 días; las n° 3 y 4 del cerebro y riñón de un ratón DBA/2N a los 7 días postinfección; las colonias n° 4, 5 y 6 se recuperaron del ratón neutropénico superviviente y corresponden a dos colonias diferentes del cerebro y una del riñón respectivamente. Se empleó como marcador para cariotipos, la cepa de referencia YNN295 (BioRad) (carreras M).

De forma esporádica y solo en el caso de la cepa panadera ICV-17 y los aislados clínicos virulentos N° 60 y 102, se observaron algunas colonias recuperadas de cerebro y riñón con una morfología rugosa, irregular, muy diferente a la morfología típica de *S. cerevisiae* (Figura 35). De manera que para confirmar la identidad de estas colonias también se les aplicó ambas técnicas moleculares mostrándose que pertenecían a la especie *S. cerevisiae* (datos no mostrados). A estos cambios morfológicos de las colonias se les conoce como el fenómeno “switching”. Clemons y colaboradores (1997) estudiaron dicho fenómeno para *S. cerevisiae* y observaron que los aislados clínicos mostraban una tasa de cambio mayor que los aislados no clínicos, pero no pudieron asociarlo con virulencia. Aunque este fenómeno ha sido observado a lo largo de este trabajo de forma espontánea, su estudio como parte de un posible rasgo de virulencia no fue incluido en la presente tesis.

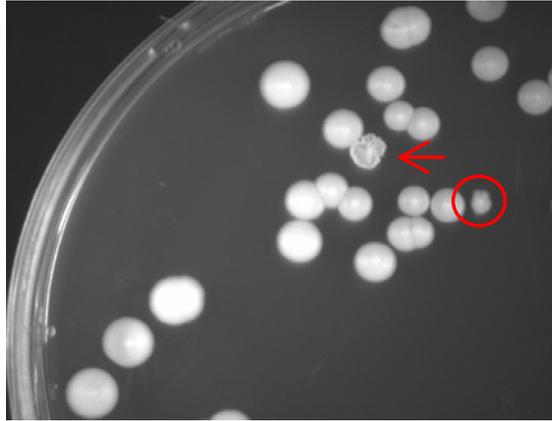


Figura 35. Colonias con aspecto diferentes, fueron recuperadas del cerebro de un ratón BALB/c inoculado previamente con la cepa vírica ICV-17. En la placa se observó un crecimiento mayoritario y representativo de *S. cerevisiae*, colonias redondas, bien definidas con un aspecto cremoso y blanquecino. En color rojo se señala con una flecha una colonia completamente diferente y con un círculo del mismo color otra colonia que está empezando a parecerse a la señalada con la flecha. Estas colonias muestran un aspecto rugoso en los bordes.

3. Estudio de la respuesta serológica tras la infección sistémica con *S. cerevisiae*

La defensa del organismo frente a distintos microorganismos patógenos está basada en cierta medida en su capacidad para producir anticuerpos dirigidos contra antígenos (proteínas u otros componentes) de dichos microorganismos.

La identificación y caracterización de antígenos como posibles marcadores de infecciones de microorganismos patógenos, ha sido ampliamente estudiada con el fin de desarrollar eficientes estrategias de diagnóstico. En este contexto, la proteómica se ha constituido como una herramienta muy útil para el estudio de la respuesta del hospedador ante infecciones microbianas (Marshall y Williams, 2002). De esta manera y gracias a la técnica de electroforesis bidimensional (2D-PAGE) combinada con técnicas de Western-blotting, se pueden llegar a identificar las proteínas inmunogénicas presentes en extractos proteicos complejos ya sean bacterianos (Lemons y col., 1988; Jungblut y col., 1999; Haas y col., 2002) o fúngicos (Pitarch y col., 1999; Pardo y col., 2000; Pitarch y col., 2001; Fernández-Arenas y col., 2004 a,b) para posteriormente utilizar dichas proteínas inmunogénicas en el diseño de nuevos marcadores diagnósticos o como antígenos candidatos para el desarrollo de vacunas. En este campo cabe destacar los numerosos estudios realizados para el hongo patógeno oportunista *C. albicans* en el cual se han llegado a determinar patrones de anticuerpos protectores (Fernández-Arenas y col., 2004 a,b), así como también perfiles de anticuerpos marcadores de la evolución de las candidiasis sistémicas en humanos (Pitarch y col., 2001). Sin embargo, no existen trabajos previos en la bibliografía donde se aborden esta clase de estudios con *S. cerevisiae*, de manera que se decidió seguir la metodología descrita por Pitarch y colaboradores (1999 y 2001) para la detección de proteínas inmunogénicas en *S. cerevisiae* y de esta manera estudiar la existencia de marcadores de una infección causada por dicha levadura. En primer lugar se realizó una electroforesis bidimensional mediante la cual se separaron las proteínas de un extracto proteico obtenido de un lisado citoplasmático de la cepa silvestre BY4741. La electroforesis bidimensional permite separar las proteínas según su diferencia de punto isoeléctrico y masa molecular. A continuación, dichas proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en la que se llevó a cabo un “western-blotting” con los sueros de los ratones BALB/c, DBA/2N e ICR/Swiss neutropénicos obtenidos a los 15 y 10 días postinfección (ver apartados 7.1 y 8 de Materiales y Métodos). Posteriormente, el patrón de manchas correspondiente a la unión de Antígeno-Anticuerpo se comparó con el gel de referencia revelado con plata amoniacal, en el que aparecen representadas todas las proteínas

presentes en el extracto citoplasmático de *S. cerevisiae* utilizado. Una vez asignada la correspondencia entre una mancha determinada y su correspondiente proteína en el gel de referencia, se llevó a cabo la escisión de la misma del gel de referencia para su posterior identificación. La identificación final de las posibles manchas se llevó a cabo mediante análisis por espectrofotometría de masas en un analizador de tipo MALDI-TOF.

Para este estudio, se seleccionaron los aislados clínicos de *S. cerevisiae* N° 60 y 102 ya que son los aislados de mayor virulencia, la cepa vínica ICV-17, por ser una levadura capaz de colonizar al mismo nivel que los aislados clínicos anteriores y provocar signos de infección (aunque no mortalidad) y por último la cepa vínica de referencia CECT 10.431, como ejemplo de cepa poco virulenta, con niveles de colonización siempre muy bajos y sin provocar en ningún caso signos de infección ni mortalidad.

Lo primero que llamó la atención fue la presencia de anticuerpos frente a proteínas de las 4 cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en los sueros obtenidos de los tres tipos de ratones. Paradójicamente, la mayor respuesta inmunológica se observó en el suero de los ratones inmunodeprimidos (neutropénicos mediante su tratamiento con ciclofosfamida) que además fueron los que mayor susceptibilidad mostraron para la mayoría de cepas de *S. cerevisiae* ensayadas. Así pues se llevó a cabo la identificación de las proteínas inmunogénicas detectadas con el suero de los ratones neutropénicos inoculados con las cepas anteriormente descritas, a los 10 días de la infección causada por cada cepa (Figura 36 y Tabla 17).

Entre dichas proteínas inmunogénicas se encuentran proteínas de estrés térmico de la familia Hsp70 (Ssc1/Ssb2), piruvato descarboxilasa (Pdc1), enolasa 1 (Eno1 y 2), enolasa 2 (Eno2), fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), alcohol deshidrogenasa (Adh1), gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (Tdh 2 y 3), fosfoglicetato quinasa (Pfk1), ácido acetohidroxi isomeroeductasa 5 (Ilv5), Fosfoglucosa isomerasa 1 (Pgi1), Aldehído deshidrogenasa (Ald6), Subunidad β de la proteína de unión a guanina (Asc1), S-adenosil metionina sintetasa 1 (Sam1), Triosa fosfato isomerasa (Tpi1), Cistationina gamma liasa 3 (Cys 3) y Cistationina beta sintasa 4 (Cys4). No se observó reactividad frente a todas estas proteínas con todos los sueros ensayados, variando así mismo la intensidad de la reacción Antígeno-Anticuerpo según el suero utilizado; en la Tabla 17 se muestra la presencia de cada una de estas proteínas respecto al suero obtenido de las cepas ensayadas, y el grado de intensidad en la reactividad (reactividad nula (-); modera y alta (+)). El suero obtenido frente a la cepa vínica de referencia CECT 10.431 mostró la menor reactividad Antígeno-Anticuerpo, detectándose un menor número de manchas en el western blot, lo que parece

estar correlacionado con la menor o nula virulencia de dicha cepa. Sin embargo, el suero obtenido tras la infección con el resto de cepas mostró reactividad frente a las 7 proteínas inmunoreactivas identificadas, con mayor o menor intensidad en la reactividad. Es de destacar la respuesta observada frente a la cepa vónica ICV-17, ya que en comparación con los aislados clínicos virulentos N° 60 y 102, mostró incluso mayor intensidad en la reactividad y mayor número de manchas inmunoreactivas. De nuevo hay que resaltar una correlación entre mayor capacidad virulenta y mayor producción de anticuerpos.

Tabla 17. Listado de las proteínas antigénicas identificadas, según el suero obtenido de las diferentes cepas ensayadas.

Proteínas antigénicas	Masa (kDa)	pI	Reactividad frente a los sueros obtenidos de:			
			CECT10.431	N°60	N° 102	ICV-17
Familia Hsp70 (Ssc1)	70.5	5,48	+	+/-	+	+
Familia Hsp70 (Ssb2)	66.5	5,37	+	+/-	+	+
Piruvato descarboxilasa (Pdc1)	61.5	5,80	-	+	+/-	+
Enolasa 1 (Eno1)	46.6	6,17	-	+	+	+
Enolasa 2 (Eno2)	46.8	5,67	-	+	+	+
Fructosa bifosfato aldolasa 1 (Fba1)	39.7	5,51	-	+	-	+
Enolasa 2 (Eno2)	46.8	5,67	+	+/-	+	+
Alcohol deshidrogenasa 1 (Adh1)	37	6,26	+	+	+	+
Gliceraldehido 3P-deshidrogenasa 2 (Tdh2)	35.8	6,49	-	+	+	+
Gliceraldehido 3P-deshidrogenasa 3 (Tdh3)	35.7	6,49	-	+	+	+
Fosfoglicerato quinasa 1 (Pgk1)	44.6	7,10	-	-	-	+
Ácido acetohydroxido isomeroreductasa 5 (Ilv5)	44.5	9,06	-	+	+	+
Fosfoglucosa isomerasa 1 (Pgi1)	61	6	-	+	+	+
Aldehido deshidrogenasa (Ald6)	54.6	5,31	+/-	+/-	-	+/-
Subunidad β de la proteína de unión a guanina (Asc1)	34.7	5,8	-	-	-	+/-
S-adenosil metionina sintetasa 1 (Sam1)	42	5,04	+	+	+	+
Triosa fosfato isomerasa (Tpi1)	26.7	5,75	-	+/-	+/-	+
Cistationina gamma liasa 3 (Cys 3)	42	6,05	-	-	+	+
Cistationina beta sintasa 4 (Cys4)	56	6,25	-	-	+/-	+

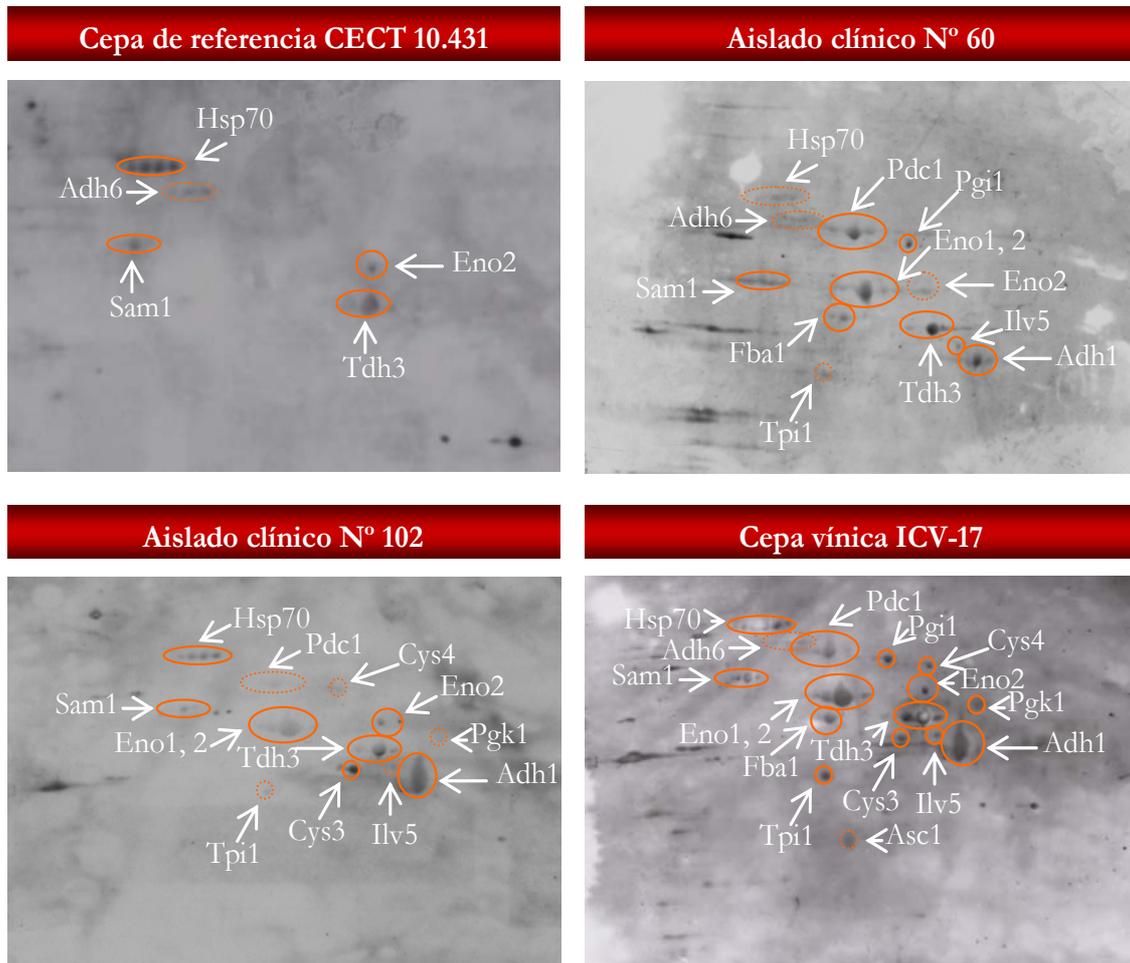
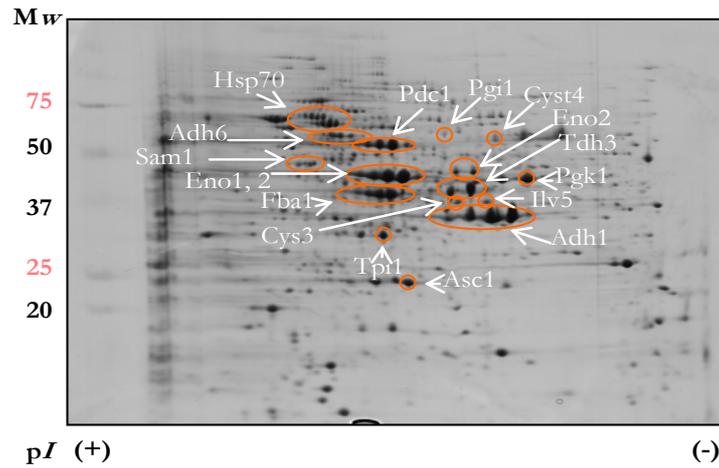


Figura 36. Análisis mediante Western-blot de las proteínas inmunoreactivas frente a sueros de ratones ICR/Swiss neutropénicos. En la parte superior de la figura se muestra el gel 2-DE teñido mediante tinción de plata y que sirve de referencia para la identificación de las manchas observadas en cada membrana. La intensidad de la reactividad de las manchas se marca con círculos en líneas continuas o discontinuas, dependiendo de su mayor o menor reactividad respectivamente.

4. Discusión

Aunque ya se ha comentado a lo largo de este trabajo, los progresos médicos en sectores como el transplante de órganos, la implantación de prótesis, el uso de terapias inmunosupresoras y el desarrollo de nuevos fármacos no solo tiene connotaciones positivas, sino que desafortunadamente tiene “efectos secundarios”, como son el incremento de las infecciones causadas tanto por patógenos habituales como por nuevos microorganismo hasta ahora considerados saprofitos e inoocuos para el organismo. Esta incidencia viene dada por el aumento de la esperanza de vida de los enfermos, que como resultado deja tras de sí un mayor número de pacientes comprometidos inmunológicamente y que por lo tanto, son más susceptibles a sufrir cualquier clase de infección. Este fenómeno por otro lado, ha hecho que se replanteen los conceptos de virulencia, patogénesis y rasgos de virulencia, así como que se definan nuevas interacciones entre hospedador y patógeno tales como, patógeno primario, oportunista, comensal, emergente y nosocomial (Casadevall y Pirofski, 1999). Sin duda *S. cerevisiae* constituye un claro ejemplo de este fenómeno, ya que ha pasado de ser considerada como una levadura segura para el hombre, a ser considerada una levadura patógena **oportunista** (los pacientes inmunodeprimidos son los principales hospedadores diana), **emergente** (puesto que sus infecciones tienen una reciente aparición, concretamente desde la última década) y **nosocomial** (principalmente en el caso de *S. cerevisiae* var. *boulardii* ya que es administrada en los hospitales para el tratamiento de diarreas) (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005). Ya que su reciente aparición en el ámbito hospitalario no ha permitido que existan suficientes estudios acerca de su virulencia y mecanismos de infección, se decidió abordar un estudio comparativo entre aislados clínicos y cepas industriales, desde diferentes puntos de vista que permitieran ampliar el conocimiento sobre la virulencia de *S. cerevisiae*.

¿Existen rasgos fenotípicos asociados con el origen clínico de *S. cerevisiae*?

La primera aproximación que puede realizarse para profundizar en el estudio del mecanismo de infección de cualquier microorganismo es estudiar aquellos rasgos de virulencia que permitan la colonización y persistencia en el hospedador una vez producido el proceso de infección. Y una característica común entre los organismos patógenos es su capacidad para crecer a temperaturas próximas a la del cuerpo humano. El promedio de temperatura máxima de crecimiento para *S. cerevisiae* fue ensayado por McCusker y

colaboradores (1994a) y observaron que claramente la capacidad de crecer a 42° C no era un rasgo común para esta levadura y que principalmente los aislados clínicos eran los que mostraban dicha capacidad. Dado que *S. cerevisiae* es utilizada ampliamente en la industria agroalimentaria, es de gran interés saber cuales son las diferencias existentes entre las cepas industriales y los aislados clínicos responsables de una infección. Esto ha sido demostrado principalmente para los aislados clínicos, ya que fundamentalmente las cepas virulentas que mostraron tener mayor capacidad para proliferar y persistir en ratones inmunocompetentes CD-1, fueron capaces de crecer a 42° C (McCusker y col., 1994b). En el presente trabajo también se ha observado que los aislados clínicos de este estudio pueden crecer dentro del rango de 37-39° C, mientras que la mayoría de los aislados clínicos potencialmente virulentos (aislados recuperados de sitios estériles y/o responsables de alguna infección) crecieron bien a 42° C. Sin embargo, las cepas industriales de *S. cerevisiae* fueron capaces de crecer alrededor de 37-39° C pero no crecieron a 42° C. Esta misma relación entre virulencia y termotolerancia ha sido observada en otros hongos como *Sporothrix schenckii* e *Histoplasma capsulatum* (Hogan y col., 1996) y la levadura *C. neoformans* (Known-Chung y col., 1982) e incluso la capacidad o no de crecimiento a 42° C permite la diferenciación de dos especies genéticamente muy cercanas, la especie virulenta *C. albicans* y la especie avirulenta *C. stellatoidea*, siendo esta última incapaz de crecer a 42° C (Sarachek y col., 1981).

Aunque la capacidad de crecer a la temperatura del cuerpo humano parece estar asociada con virulencia, no es el único factor determinante en la virulencia de un microorganismo, en concreto entre los patógenos fúngicos tanto de plantas como de animales, la capacidad de experimentar una transición dimórfica también es un importante factor de virulencia (Madhani y Fink, 1998). En *S. cerevisiae* la diferenciación de célula ovoide a forma filamentosa está mediada principalmente por limitaciones nutricionales (Gimeno y col., 1992). McCusker y colaboradores (1994a) estudiaron la capacidad de pseudofilamentación en medios que contenían caseína como única fuente de carbono y observaron que dicho dimorfismo era mayoritario entre los aislados clínicos respecto a los no clínicos y además podría constituir un rasgo asociado con la virulencia de esta levadura. En el presente trabajo se realizó un estudio similar, pero se empleó el medio SLAD, limitante en la fuente de nitrógeno y que permitió observar que también los aislados clínicos potencialmente virulentos fueron capaces de desarrollar un crecimiento pseudohifal, con pocas excepciones (aislados n° 105 y 107), frente a las cepas industriales que no mostraron crecimiento pseudohifal bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Aunque este fenómeno en la levadura *S. cerevisiae* se correlaciona con el estado nutricional

del ambiente (condiciones similares que posiblemente pueda encontrar en humanos), hemos observado que las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de infecciones sistémicas produjeron mayores niveles de crecimiento pseudohifal que las cepas industriales e incluso que el resto de aislados clínicos. Quizás esta relación juegue un papel importante en la invasión de tejidos y órganos por parte de estos aislados clínicos, aunque el estudio histológico realizado en los cortes de tejido cerebral mostró que para todas las cepas de *S. cerevisiae* y en los diferentes tipos de ratones, la morfología celular era ovoide y en ningún caso se observaron pseudohifas. Estas observaciones son coincidentes con los estudios realizados por Clemons y colaboradores (1994) quienes observaron la misma morfología ovoide para el aislado virulento YJM128 en diferentes tejidos de ratones CD-1. Sin embargo, no se puede excluir que en algún momento durante el transcurso de la infección, las células de *S. cerevisiae* sufran el cambio a la forma pseudohifal, quizás para invadir nuevos tejidos, en busca de mejores condiciones nutricionales. De todos modos, el tipo de morfología que va a intervenir en una infección varía considerablemente para cada infección fúngica. Por ejemplo *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp o *Zygomycota* infectan el hospedador en forma de esporas que posteriormente germinan en forma de hifas en ciertos tejidos como los pulmones o *C. neoformans* que lo hace cubierto con su cápsula. El caso más llamativo y estudiado sería el de *C. albicans*, una levadura patógena oportunista que se encuentra tanto en forma de levadura como de pseudohifas o incluso hifas verdaderas en los tejidos infectados (Gow y col., 2002). Sin embargo, existen otras especies dentro de este mismo género como es el caso de *Candida glabrata*, que muestra una limitada capacidad para formar pseudohifas (Csank y Haynes, 2000) y no hay que olvidar que es la segunda causa más importante de diseminación de las infecciones por *Candida* (Sanglard y Odds, 2002). Además, al igual que ocurre en el caso de *S. cerevisiae*, también *C. glabrata* se muestra únicamente como células en crecimiento vegetativo en los tejidos animales (Fidel y col., 1999). En un trabajo reciente llevado a cabo por Kingsbury y colaboradores (2006) se estudió el papel que tiene el transporte, regulación y metabolismo del nitrógeno y carbono en la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae* y se determinó que las fuentes de nitrógeno no son limitantes *in vivo*. Puesto que la capacidad de pseudofilamentar de esta levadura *in vitro* requiere condiciones de limitación de nutrientes, estos autores proponen que éste pueda ser el motivo por el cual *S. cerevisiae* no forma pseudohifas cuando crece en el interior de un hospedador, al igual que ha sido descrito para *C. glabrata* (Fidel y col., 1999). Y dejan abierta la posibilidad de que quizás en la transición dimórfica participen otros genes importantes en la patogénesis. En cualquier caso, la capacidad de desarrollar la hifa verdadera no debe

ser esencial para la patogénesis, de hecho existe un trabajo que confirma que *C. albicans*, *C. grabrata* y *S. cerevisiae* son levaduras capaces de atravesar la pared del intestino de ratones pequeños, en forma de célula levaduriforme (Pope y Cole, 1982).

Sea cual sea la razón por la cual *S. cerevisiae* se muestra como célula ovoide *in vivo*, esta característica podría ser una ventaja a la hora de vencer la barrera hematoencefálica y poder colonizar el cerebro, una vez allí se mantendría con la misma morfología porque seguramente encuentre las condiciones idóneas. No puede descartarse que *S. cerevisiae* pueda desarrollar pseudohifas durante el transcurso de una infección, si en algún momento no encuentra las condiciones óptimas, de manera que pueda aprovechar el dimorfismo como una ventaja para invadir o colonizar nuevos tejidos, siendo realmente una característica que utiliza en situaciones normales de no infección. Es decir, sin ser el dimorfismo una característica desarrollada para su propia virulencia, pueda aportarle ventajas en procesos necesarios para que suceda una infección, como es la invasión de nuevos tejidos en busca de nuevos aportes nutricionales. De hecho la pseudofilamentación de las colonias diploides de *S. cerevisiae* y los filamentos de las haploides penetran a través del agar generando huecos, de la misma manera que lo hacen las hifas verdaderas y pseudohifas de *C. albicans*. Este comportamiento de penetración mecánica dentro de una superficie sólida deja entrever que este mismo fenómeno puede darse en los tejidos, las hifas y pseudohifas generarían presión conforme fuesen expandiéndose, dando lugar a la penetración a través de ellos (Gow y col., 2002). En cualquier caso el estudio de la transición dimórfica en la patogénesis de otras muchas levaduras y hongos es un tema de continuo estudio y mucho más para *S. cerevisiae*, cuya inclusión en el ámbito hospitalario es demasiado reciente y quedan muchas cuestiones por seguir analizando.

Aunque el dimorfismo pueda ser un componente muy importante en la invasión de los tejidos del hospedador, los microorganismos poseen enzimas hidrolíticas inducibles y constitutivas que van a facilitar este proceso, destruyendo o alterando los componentes de las membranas de las células del hospedador, dejando a las membranas no funcionales y/o con disrupciones físicas (Ghannoum, 2000). Estos constituyentes de las membranas son fundamentalmente proteínas y lípidos, y por tanto son el blanco de ataque de las enzimas que secretan las levaduras patógenas como *C. albicans*, consideradas muy importantes en la patogénesis de esta levadura y posiblemente secretadas en la parte apical de las hifas que esta levadura desarrolla durante su infección. Estas enzimas se clasifican en 2 tipos, proteasas, que hidrolizan péptidos (Naglik y col., 2003) y fosfolipasas, las cuales hidrolizan fosfolípidos (Ghannoum, 2000). En el caso de *S. cerevisiae*, la capacidad de producir

proteasas no parece estar asociada con su virulencia. Clemons y colaboradores (1994) observaron que tanto las cepas de alimentos como los aislados clínicos fueron capaces de licuar gelatina. Nuestros resultados confirman también que la actividad proteasa va a ser una cualidad ampliamente distribuida para esta levadura y que no presenta una correlación con los aislados clínicos. Aunque el hecho de que estos aislados muestren dicha actividad indica que podría ser empleada durante el curso de las infecciones que estos aislados puedan producir en un momento dado.

Por otro lado la actividad fosfolipasa no es una actividad enzimática ampliamente distribuida entre las levaduras oportunistas, únicamente ha sido detectada en *C. albicans* (Odds, 1988; Lane y col., 1991), *C. neoformans* (Vidotto y col., 1997), *S. cerevisiae* (Kyung y col., 1994), *Malassezia furfur* (Riciputo y col., 1996) y *Rhodotorula rubra* (Mayser y col., 1996). La relación entre la secreción de fosfolipasa y la virulencia ha sido demostrada en las levaduras patógenas oportunistas *C. albicans* (Ghannoum, 2000) y *C. neoformans* (Chen y col., 1997). Sin embargo, para otras especies del género *Candida* no-*albicans* esta relación no parece tan clara e incluso hay cierta controversia según autores, en torno a la capacidad de producir actividad fosfolipasa para especies como *C. glabrata* o *C. tropicalis* (Ghannoum, 2000). Por otra parte, aunque se conoce que *S. cerevisiae* cuenta con diferentes actividades fosfolipasas (actividades Lisofosfolipasa, fosfolipasa B o incluso una actividad aciltransferasa) (Lee y col., 1994; Witt y col., 1984 a;b) no se encontró información previa en la bibliografía sobre la relación de la actividad fosfolipasa y la virulencia o el origen clínico de *S. cerevisiae*. Teniendo en cuenta los resultados observados, se puede concluir que aunque estadísticamente no encontramos diferencias significativas entre dicha actividad y el tipo de aislado, sí observamos una clara tendencia de los aislados clínicos a producir fosfolipasa, frente a las cepas industriales, observando que los aislados clínicos potencialmente virulentos (aislados recuperados de sitios estériles y/o responsables de alguna infección) produjeron aún mayores niveles de fosfolipasa que las cepas industriales. Por tanto, la actividad fosfolipasa, aunque no se ha estudiado *in vivo* en infecciones causadas por *S. cerevisiae*, creemos que quizás pueda participar en patogenicidad de esta levadura.

De acuerdo con nuestros datos podemos concluir que los aislados clínicos, concretamente los aislados recuperados de sitios estériles y/o responsables de una infección sistémica, mostraron una mayor capacidad de secretar fosfolipasa que las cepas industriales, de crecer a 42° C y de pseudofilamentar. En el caso de las cepas industriales, hemos observado excepciones, la cepa vínica ICV-32, una cepa comercial de *S. cerevisiae* var *boulardii* y las dos cepas comerciales de panadería. La cepa ICV-32 y la cepa de *S. cerevisiae*

var *boulardii* crecieron a 42° C, pero en el crecimiento pseudohifal y la actividad fosfolipasa mostraron valores moderados. En el apartado del estudio de colonización, donde se mostró la caracterización molecular del total de 118 cepas de *S. cerevisiae* de este estudio (RFLPs del mtDNA y amplificaciones de las secuencias δ) (de Llanos y col., 2004), observamos que la cepa de *S. cerevisiae* var *boulardii* mostraba el mismo patrón compuesto que 19 aislados clínicos, incluyendo aislados de heces, vagina, faringe y también un aislado de sangre (F3) (de Llanos y col., 2006b). Esta agrupación no sorprende puesto que *S. cerevisiae* var *boulardii* se ha relacionado con muchos casos de fungemia (Bassetti y col., 1998; Cassone y col., 2003; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Fredunucci y col., 1998; Perapoch y col., 2000). Las otras excepciones son las cepas comerciales de panadería, las cuales crecieron bien a 42° C, mostraron niveles elevados de actividad fosfolipasa y desarrollaron pseudohifas bajo limitación de nitrógeno, muy similar a lo observado para los aislados clínicos potencialmente virulentos. De nuevo haciendo referencia al estudio de colonización, también observamos que las cepas de panadería compartieron el mismo patrón compuesto con aislados clínicos de heces, vagina, tracto respiratorio y sangre, lo que nos indicó la capacidad de estas cepas a crecer en ambientes diferentes (de Llanos y col., 2004). La presencia de levaduras de panadería en humanos ya había sido descrita en la bibliografía y además la fuente de colonización había sido determinada como vía gastrointestinal o sexual, usando métodos de tipificación del DNA (Wilson y col., 1988). Además, en este trabajo observamos que las cepas de panadería mostraron el mismo patrón compuesto que un aislado de sangre (F27) (de Llanos y col., 2006b), siendo esta la primera vez en la que se asocia una cepa de alimentos con una infección.

El estudio de posibles factores de virulencia para *S. cerevisiae* llevado a cabo en este trabajo constituye una aproximación sobre la condición de posible patógeno oportunista de baja virulencia, tal y como ha sido definido por Murphy y Kavanagh (1999). Existen otros muchos factores que no han sido incluidos en este estudio, como es el fenómeno “switching”, o variación fenotípica. Dicho fenómeno fue descrito para *S. cerevisiae*, en un trabajo realizado por Clemons y colaboradores (1997), en el cual mostraron que los aislados clínicos de esta levadura tenían tendencia a mostrar múltiples fenotipos coloniales, los cuales eran reversibles, mientras que los aislados no clínicos mostraban fenotipos coloniales únicos. De todos modos, en dicho trabajo no se demostró una relación directa entre el “switching” y la virulencia para esta levadura. Aunque no se ha estudiado este fenómeno como rasgo de virulencia propiamente dicho en este trabajo, el fenómeno de cambio colonial fue observado en algunas de las cepas ensayadas *in vivo*, al recuperarlas de los

órganos que invadían. Pero también ha podido ser observada en numerosas ocasiones cuando las cepas se cultivaban en los medios habituales de crecimiento. Realmente este fenómeno en *S. cerevisiae* ocurre sin necesidad de previa mutagénesis (Clemons y col., 1997). En nuestros estudios además, se confirmó la identidad de las colonias diferentes, mediante las técnicas moleculares descritas en el apartado de resultados, eliminando cualquier sospecha de una posible contaminación.

Por último, es importante volver a mencionar el trabajo reciente llevado a cabo por Kingsbury y colaboradores (2006), ya que han puesto de manifiesto que existen ciertas rutas implicadas en la captación, metabolismo y biosíntesis de compuestos de carbono y nitrógeno, que son muy importantes para la supervivencia de los aislados clínicos de *S. cerevisiae* en un hospedador murino (se detalla en profundidad en la Introducción del presente trabajo). Concretamente han observado que entre las fuentes de nitrógeno que el aislado puede encontrar en el hospedador no existe ninguna esencial, sin embargo la glucosa parece ser una fuente de carbono primordial para la supervivencia *in vivo*. De la misma manera, la capacidad de detectar y responder ante concentraciones limitantes de glucosa, también parecen ser más necesarias que las de nitrógeno, en la supervivencia de los aislados clínicos *in vivo*. Además, este trabajo ha identificado dianas potenciales para drogas antifúngicas, como medida de tratamiento a las infecciones que causa la levadura que tradicionalmente se consideró segura para el hombre.

¿Existen cepas potencialmente virulentas entre los aislados clínicos y las cepas industriales de *S. cerevisiae*?

La patogénesis fúngica viene determinada por dos variables interconectadas y que tienen igual importancia, por un lado el estado inmunitario del hospedador y por otro lado las propiedades intrínsecas que posean los microorganismos. Como hemos visto, *S. cerevisiae* cuenta con ciertas cualidades que seguramente se verán implicadas en el desarrollo de las infecciones causadas por esta levadura, pero la interacción que cada microorganismo establezca con el hospedador va a estar muy condicionada por el estado inmunitario del mismo. Por este motivo se creyó conveniente emplear tres modelos murinos distintos de infección sistémica, con la intención de abarcar diferentes condiciones inmunológicas de los hospedadores y estudiar así la respuesta de estos modelos, a la infección de ciertas cepas de *S. cerevisiae*. Los tres modelos fueron, ratones sanos BALB/c, ratones DBA/2N deficientes en el factor C5 del complemento y ratones ICR/Swiss que simulan un estado de

neutropenia tras la inyección intraperitoneal del inmunosupresor ciclofosfamida. Siguiendo con el objetivo principal de este trabajo, el estudio comparativo entre cepas industriales y aislados clínicos, se nos plantearon tres preguntas en relación a los ensayos de infección sistémica en los tres modelos murinos: ¿existen diferencias en la virulencia y patogénesis entre ambos tipos de aislados de la levadura?; ¿existen diferencias en la infección según el modelo murino seleccionado? y por último, ¿existen diferencias en la colonización de los órganos estudiados para cada cepa?

Para responder a la primera de las cuestiones fue de gran ayuda establecer un criterio de virulencia que considerase tanto la letalidad como la colonización del cerebro durante 15 días de infección para los modelos BALB/c y DBA/2N y de 10 días para los ratones neutropénicos. Con dicho criterio se establecieron tres grados de virulencia (alto intermedio y bajo) en los cuales se encontraron tanto aislados clínicos como no clínicos. En el grado de baja virulencia, siempre se encontró la cepa vónica de referencia CECT 10.431 y el aislado clínico N° 20, ambos mostraron cierta dificultad en la colonización tanto de cerebro como de riñón, aunque principalmente en riñón, y además nunca causaron mortalidad. Los grados de virulencia alta e intermedia agruparon al resto de aislados clínicos y no clínicos, que se caracterizaron por mostrar altos niveles en los alojamientos en cerebro en los tres modelos, como es el caso de los aislados clínicos N° 60, 75 y F27, la cepa industrial de panadería y la cepa terapéutica de *S. boulardii*. Estos datos muestran que no existe una clara diferenciación entre las cepas industriales y los aislados clínicos, ni incluso entre los aislados clínicos potencialmente virulentos ni los considerados comensales, en cuanto a su capacidad para colonizar. Así, cabe destacar la cepa de panadería y el aislado de *S. boulardii* que, según los datos moleculares y los rasgos de virulencia descritos anteriormente, mostraban características asociadas a cepas virulentas al causar muerte tanto en ratones sanos como inmunodeprimidos. Además, es de destacar que estas cepas industriales, junto con la cepa industrial ICV-17 y los aislados virulentos N° 60 y 102, fueron las únicas que tras ser inoculadas en los ratones provocaron en éstos la manifestación de signos típicos de enfermedad (pérdida de peso, poca movilidad o encrespamiento del pelo). Estos mismos signos de infección han sido descritos en el curso de las infecciones causadas por otras levaduras patógenas oportunistas como *C. albicans* (MacCallum y Odds, 2005) o *Hansenula anomala* (Cermeño-Vivas y col., 1999), de manera que para *S. cerevisiae* dichas manifestaciones estarían indicando que estos ratones estarían sufriendo una infección por la cepa en cuestión y que podrían finalizar con la muerte.

Clemons y colaboradores (1994) observaron una graduación continua en la virulencia de aislados clínicos y no clínicos, resultados similares se han observado en el presente trabajo, en base a la combinación de los resultados de los alojamientos mostrados en el cerebro principalmente, aunque también de los riñones, y la mortalidad producida por cada cepa, independientemente del modelo murino ensayado. Así pues se estableció la siguiente clasificación de mayor a menor virulencia para el total de las 10 cepas analizadas en este trabajo: [Aislado clínico respiratorio y potencialmente virulento N° 102; aislado clínico comensal de origen genital N° 60; cepa industrial de panadería “Cinta roja”; aislado probiótico *S. boulardii*; aislado de sangre potencialmente virulento F27; cepa vínica ICV-17; cepa vínica T73; cepa de referencia CECT 10.431; aislado clínico comensal con origen de heces N° 20].

En relación a la segunda pregunta, acerca de si existen o no diferencias en el grado de susceptibilidad para cada cepa en relación a cada modelo murino ensayado, se observó que efectivamente estas diferencias se daban en el caso de los ratones neutropénicos tratados con ciclofosfamida, ya que mostraron claramente una mayor susceptibilidad, seguidos de los ratones sanos BALB/c y en último caso los ratones DBA/2N, deficientes en el factor C5 del sistema del complemento. El hecho de que los ratones neutropénicos sean más susceptibles para *S. cerevisiae* no sorprende, teniendo en cuenta que es una levadura que mayoritariamente causa infecciones en pacientes con diversas deficiencias en su estado inmunitario. De hecho, el único trabajo encontrado en la literatura (Okawa y Yamada, 2002) en el que se emplearon ratones tratados con ciclofosfamida que fueron inoculados con ciertas cepas de *S. cerevisiae*, se observó que algunas de las cepas eran capaces de causar la muerte, mientras que en los ratones sanos no ocurría, detectándose también un incremento en los alojamientos en diversos órganos. En cualquier caso, y con respecto a los datos que se muestran en el presente trabajo, las diferencias observadas con los ratones sanos BALB/c y para todas las cepas, no parecen ser tan grandes como cabría esperarse “a priori”. De hecho, las cepas que se han definido como de baja virulencia (aislado de heces N° 20 y la cepa de referencia CECT 10.431), no aumentaron la susceptibilidad en los ratones neutropénicos con respecto a los sanos. Sin embargo, el tratamiento con ciclofosfamida sí aumentó la virulencia de aquellas cepas que causaron cierta mortalidad en BALB/c, concretamente el aislado clínico N° 60 incrementó la tasa de mortalidad en un 40%. Bistoni y colaboradores (1984) observaron igualmente que la inmunodepresión provocada por la ciclofosfamida no modificaba significativamente la susceptibilidad de estos ratones para las especies de *Candida* que habían mostrado baja o

nula patogenicidad en ratones sanos. Sin embargo, la susceptibilidad se veía aumentada solo en el caso de las especies del género que sí habían sido patógenas en los ratones no tratados.

El efecto de la neutropenia se tradujo principalmente en un incremento de los alojamientos para ambos órganos, aunque la diferencia fue muy significativa para los alojamientos que se dieron en los riñones. Fulurija y colaboradores (1996), observaron un fenómeno similar en infecciones por *C. albicans* en ratones neutropénicos, donde destacaban los alojamientos elevados en riñón frente a otros órganos, entre ellos el cerebro. La explicación radica en que la deficiencia en neutrófilos parece aumentar la susceptibilidad de los órganos a ser colonizados y especialmente en el caso de los riñones, donde los neutrófilos y las células fagocíticas juegan un papel esencial en el control de la proliferación fúngica. Además, el incremento del alojamiento en cerebro es menor en este tipo de ratones porque el aclaramiento de células de *Candida* en este órgano está mediado por mecanismos independientes a la intervención de los neutrófilos. Este mismo comportamiento de aumento en la tasa de mortalidad y alojamiento en los riñones, ha sido observado tras la infección de ratones neutropénicos con otras levaduras consideradas de baja virulencia como *Candida krusei* (Anaissie y col., 1993), *C. glabrata* (Brieland y col., 2001) o *H. anomala* (Cermeño-Vivas y col., 1999), lo cual nos permite concluir que el tratamiento con ciclofosfamida modularía la susceptibilidad a la infección sistémica por *S. cerevisiae*, permitiendo una mayor colonización de órganos diana que pueden acabar en el aumento de la tasa de mortalidad, pero solo en el caso de las cepas que muestran una virulencia alta o intermedia.

Cuando se comparan los modelos de ratones sanos BALB/c y deficientes en el factor C5 DBA/2N observamos que para la mayoría de las cepas, con excepción de los aislados clínicos N° 75 y 102, los ratones sanos parecían ser más susceptibles que los ratones deficientes en C5. Además, si comparamos con trabajos previos llevados a cabo por Clemons y colaboradores (1994), Byron y colaboradores (1995), McCullough y colaboradores (1998b) y Wheeler colaboradores (2002), esta es la primera vez que se observa mortalidad para ratones sanos, tanto en la misma estirpe de ratones utilizada en nuestro estudio como en otras estirpes como CD-1. Es más, en estos trabajos tras infectar ratones DBA/2N y ratones sanos, fuesen BALB/c o CD-1, observaban un aumento de la virulencia de las cepas en los ratones DBA/2N que atribuían a la deficiencia que estos ratones sufren en el sistema del complemento. En el trabajo realizado por Byron y colaboradores (1995) describieron algo similar para algunas cepas, las cuales cambiaban su

grado de virulencia según el modelo de ratón empleado. Estos datos indican por tanto que el factor C5 del complemento no parece ser un requerimiento absoluto en la resistencia innata contra todas las cepas de *S. cerevisiae* y por tanto parecen intervenir factores intrínsecos a cada cepa de levadura que afectarían a su virulencia. Mientras algunas cepas son eliminadas vía complemento en ratones sanos y son capaces de colonizar mejor en ausencia del factor C5, como sería el caso de los aislados clínicos N° 75 y 102, otras cepas serán capaces de evadir los mecanismos relacionados con el sistema del complemento y puede que no les afecte una deficiencia en dicho sistema (como sería el caso del aislado clínico N° 60 y las cepas industriales “Cinta roja” y *S. boulardii*). De todos modos, no todos los microorganismos se ven afectados de la misma manera ante la deficiencia del factor C5 del complemento, de hecho se sabe que la deficiencia de C5 afecta a la supervivencia y desarrollo de las infecciones causadas por *C. albicans* (Ashman y col., 2003, Lyon y col., 1986) o *C. neoformans* (Rhodes, 1985). Sin embargo, existen otros microorganismo para los cuales la falta del factor C5 no parece afectar en su capacidad para provocar la infección, es el caso de *Histoplasma capsulatum* (Burger y col., 1985), *Paracoccidioides brasiliensis* (Calich y col., 1987) o *Coccidioides immitis* (Wu-Hsieh y col., 1989). En cualquier caso, estudios recientes ponen de manifiesto que la medida de la susceptibilidad de las diferentes cepas de ratones (Ej., presencia o ausencia del factor C5 del complemento) debe realizarse no solo por el aumento de la mortalidad, sino también por el aumento de carga fúngica que pueda darse en lugares específicos y, por extensión, por el mayor daño tisular que causan (Ashman y col., 2003). En el caso de *C. albicans*, en ausencia del factor C5, se observa sensibilidad en las infecciones sistémicas y no en las infecciones gastrointestinales o vaginales. Además, la ausencia de C5 en los ratones DBA/2N infectados con *C. albicans* se traduce en un aumento significativo de carga fúngica solo en los riñones, mientras que en el cerebro se aprecia un leve aumento de la colonización. Puesto que los neutrófilos son cruciales en la defensa de los riñones tras la inoculación intravenosa de las levaduras y se necesita de la quimiotaxis que media el factor C5, entre otros, para que suceda el reclutamiento de estas células inflamatorias en el riñón, la muerte sobrevendría por un fallo en el control de la proliferación de las levaduras en este órgano diana. Quizás esta explicación solo pueda ser válida en el caso de levaduras que muestren como órgano diana el riñón y por ese motivo, la susceptibilidad de este tipo de ratones esté más limitada en el caso de *S. cerevisiae*, ya que esta levadura no coloniza rápidamente el riñón, sino que tras la inoculación intravenosa, *S. cerevisiae* tiene preferencia por el cerebro, como se deduce de los datos de alojamientos.

Aunque los resultados muestran que existen diferencias tanto en la supervivencia como en la colonización que sufre cada tipo de ratón dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae*, existen también rasgos comunes en la infección sistémica de esta levadura con independencia de la cepa de ratón empleada. En concreto hemos observado que aquellas cepas que son capaces de causar muerte lo harán siempre durante la primera semana de infección, desarrollando signos de infección a partir del segundo o tercer día de la inoculación, y que algunos, como la pérdida de peso o el encrespamiento del pelo debido a la fiebre que sufren los ratones, podrían considerarse marcadores del tiempo de supervivencia de los ratones, como se ha intentado establecer para *C. albicans* (MacCallum y Odds, 2005), aunque parecen ser parámetros difíciles de correlacionar. Además, *S. cerevisiae* es capaz de colonizar tanto el cerebro como los riñones, aunque en general se ve favorecida la colonización del cerebro. En el riñón las levaduras son eliminadas eficazmente durante las dos primeras semanas por la actuación de los neutrófilos, mientras que en el cerebro la colonización es mucho mayor y como lo es también su persistencia a lo largo del tiempo. Para *S. cerevisiae* podría establecerse el cerebro como el órgano diana de su infección, donde una elevada acumulación de levaduras durante la primera semana postinfección podría correlacionarse con la muerte, al igual que ocurre en ratones que sufren una infección con *C. albicans*. En este último caso la mortalidad está directamente relacionada con la carga fúngica en los riñones, el órgano diana de la infección de esta levadura (Hurtrel y col., 1980; Odds, 1988; Ashman y col., 1996).

Los resultados observados en este apartado indican que *S. cerevisiae* es capaz de colonizar ratones sanos e inmunodeficientes, que la colonización se da principalmente en el cerebro, persistiendo durante un periodo bastante largo de tiempo, y produciendo una infección que llegó en algunos casos a producir la muerte. Pero para cerciorarnos que efectivamente las cepas que se inoculaban en los ratones eran las que cursaban posteriormente la infección, se aplicaron las técnicas del análisis de restricción del DNA mitocondrial y el análisis electroforético de cariotipos, que permiten caracterizar las levaduras a nivel de cepa. Ambas técnicas nos permitieron comprobar que en ningún caso había sucedido una contaminación y que por tanto, la infección fue causada por la cepa inoculada.

Por otra parte y mediante el análisis de cariotipos, se comprobó que no habían acontecido reordenaciones cromosómicas, como en un principio se había pensado en los casos de “Cinta roja” y los aislados clínicos con origen en panadería F27 y nº 75, y que podrían haber explicado los cambios en la actividad fermentativa de estas cepas. Las

reordenaciones cromosómicas son fenómenos descritos en los genomas de las levaduras vínicas durante el crecimiento vegetativo, por recombinación de cromosomas homólogos y por la recombinación entre repeticiones o secuencias parálogas, que pueden suceder como resultado de mecanismos de adaptación a condiciones de estrés (Puig y col., 2000). Estas reordenaciones cromosómicas pueden revelarse mediante la técnica del cariotipado. Existen trabajos que han determinado cómo las levaduras vínicas de flor no mantienen cariotipos estables y definidos (Martínez y col., 1995), pero ha sido entre las levaduras de panadería donde se ha observado mayor variabilidad cromosómica (Codón y col., 1998), como resultado de la gran frecuencia de movimiento de los elementos Ty en el DNA, o recombinación entre elementos Ty en posiciones heterólogas, así como de las regiones subteloméricas Y'. Puesto que estos cambios en muchos casos no serían visibles a nivel de cariotipo, no se puede descartar en el presente trabajo cambios que hayan tenido lugar a nivel cromosomal en las levaduras con origen de panadería y que explicaría las diferencias observadas en estas antes y después de pasar por el hospedador. Las reorganizaciones cromosómicas como respuesta adaptativa descritas para *S. cerevisiae* (Brown y col., 1998; Dunham y col., 2002) también han sido descritas en las levaduras oportunistas *C. albicans* y *C. glabrata*. Cambios en el número de copias de cromosomas, han sido descritos como fuente de variabilidad genética permitiendo evolucionar y adquiriendo nuevas propiedades como la capacidad de usar sorbosa o crecer en presencia de drogas antifúngicas como el fluconazol (Suzuki y col., 1989). E incluso, cambios en el número de copias de cromosomas para *C. albicans* han sido observados en condiciones de crecimiento en el hospedador (Chen y col., 2004; Forche y col., 2005), que podrían asociarse con alteraciones fenotípicas y genotípicas. Por tanto, aunque este tipo de información no se conoce para *S. cerevisiae*, parece probable que estos fenómenos puedan darse también para esta levadura a su paso por un hospedador, donde encontrará condiciones de estrés, como la restricción nutricional, pudiendo favorecer a que sucedan cambios a nivel cromosomal, de la misma manera que han sido descritos *in vitro* y que le permitirían adaptarse a las condiciones del hospedador.

¿Existe una asociación entre los rasgos fenotípicos asociados con el origen clínico de *S. cerevisiae* y la virulencia *in vivo*?

Haciendo un repaso de los rasgos de virulencia asociados al origen clínico de *S. cerevisiae* y comparándolo con los resultados que hemos observado tras realizar los

ensayos *in vivo*, parece difícil establecer una relación directa. Si tenemos en cuenta la cepa vínica de referencia CECT 10.431, una cepa clasificada como no virulenta, al analizar el fenotipo que mostró para los rasgos de virulencia (Tabla 13), se encontraría una explicación satisfactoria, puesto que no mostró ninguno de los tres rasgos relacionados con el origen clínico (crecimiento a 42° C, crecimiento pseudofilamentoso y alta actividad fosfolipasa). Sin embargo, este perfil de rasgos de virulencia es completamente opuesto en el caso del aislado N° 20, considerado también como no virulento, pues mostró idénticos rasgos de virulencia que los aislados definidos como virulentos (N° 60 y 102). En el caso de las cepas vínicas T73 e ICV-17, aunque no mostraron mortalidad, éstas se caracterizaron por los altos alojamientos exhibidos en ambos órganos, pero el fenotipo de rasgos de virulencia no explica lo observado, ya que si bien ambas no fueron capaces de crecer a 42° C, la cepa T73 no mostró crecimiento pseudohifal e ICV-17 no mostró actividad fosfolipasa. Es decir, lo que estos resultados parecen indicar es que no existe un factor único implicado en la patogénesis de *S. cerevisiae* y que incluso mostrando todas las características supuestamente necesarias, existen cepas que no pueden ser capaces de desarrollar una infección. El estudio de rasgos de virulencia en el campo de las levaduras y hongos oportunistas es complicado, debido principalmente a las limitaciones que existen cuando se estudian patógenos que requieren de cierta susceptibilidad del hospedador para expresar su virulencia, como es el caso de *S. cerevisiae*. El estado inmunitario del hospedador puede modificar la expresión de los factores de virulencia y finalmente la capacidad de estos patógenos para desarrollar la infección (Casadevall y Pirofski, 2001). Por tanto, puede ser aún más difícil establecer rasgos de virulencia que sirvan para discriminar entre cepas patógenas y no patógenas.

En cualquier caso este trabajo deja abierta muchas hipótesis acerca de los mecanismos disponibles por *S. cerevisiae* para establecer una infección ya que seguramente esta levadura cuenta con propiedades propias que aún desconocemos y que intervengan efectivamente en este proceso.

***S. cerevisiae* es capaz de inducir una respuesta inmunológica en un modelo murino de infección sistémica.**

La combinación de la electroforesis bidimensional y el análisis mediante Western blot empleando suero inmune murino, generado frente a diferentes microorganismos como anticuerpo primario, se conoce actualmente como inmunoproteómica y es una importante herramienta en la identificación de una gran variedad de antígenos, ya sean antígenos

bacterianos (Jungblut y col., 2001) o fúngicos (Pitarch y col., 2004). La detección de anticuerpos frente a estos antígenos en el suero de pacientes a diferentes tiempos ha permitido monitorizar la evolución y el pronóstico de las enfermedades causadas por estos microorganismos, como se ha descrito recientemente en un estudio con pacientes que atravesaban una candidiasis sistémica y en el que se llegó a relacionar la presencia de anticuerpos frente a unas determinadas proteínas como señal de pronóstico favorable, frente a patrones de anticuerpos más relacionados con un desenlace menos favorable (Pitarch y col., 2006). Además, algunos de esos antígenos están siendo estudiados como posibles antígenos inmunoreactivos capaces de inducir una respuesta protectora eficaz (Fernández-Arenas y col., 2004 a, b). En nuestro caso, y dado que algunas de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en los ensayos de virulencia habían producido infección, e incluso en algunos casos hasta una significativa tasa de mortalidad, quisimos comprobar si la presencia de estas cepas en el ratón podía llegar a desencadenar una respuesta inmunológica frente a esta levadura, en principio asumida por todo el mundo como inocua.

En los distintos “western blot” realizados con los sueros murinos obtenidos tras la inoculación de las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas, la mayor inmunoreactividad detectada se produjo con los sueros procedentes de los ratones inmunodeprimidos mediante ciclofosfamida. Dichos sueros mostraron reactividad frente a las enzimas glicolíticas Fba, Tdh, Eno, Tpi, Pgi, Pgl1; las enzimas metabólicas Pdc, Ald, Adh (relacionadas con el metabolismo fermentativo), Ilv, Sam, Cys (con el metabolismo de aminoácidos); la proteína Asc, envuelta en la traducción y por último las Hsp, de respuesta a choque térmico. Es importante destacar que estas proteínas de *S. cerevisiae* son homólogas a proteínas de *C. albicans* descritas como inmunogénicas tanto en modelos murinos (Fernández-Arenas y col., 2004 a, b) como en pacientes humanos (Pitarch y col., 1999 y 2004). La inmunorreactividad observada en los sueros de los ratones neutropénicos varió en función de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada para la infección de los mismos. En general podemos decir que la mayor o menor inmunorreactividad observada, se relaciona directamente con la capacidad virulenta de las cepas, determinada por su tasa de alojamiento en cerebro y riñón y la tasa de mortalidad producida en los ratones infectados. De esta forma, el suero obtenido tras la inoculación de la cepa vínica CECT 10.431, con los menores niveles de alojamiento y mortalidad registrados, fue el menos inmunorreactivo, detectándose únicamente 3 de las 7 proteínas identificadas. De acuerdo a este mismo razonamiento, la mayor reactividad se obtuvo con los sueros obtenidos tras la infección con las cepas ICV-17, N° 60 y 102 que mostraron los niveles máximos de alojamiento y mortalidad. Salvando las diferencias en la

inmunoreactividad de los distintos sueros, hay que destacar que en la mayoría de los casos se observó alta reactividad frente a las enzimas glicolíticas y metabólicas mencionadas anteriormente. Las proteínas homólogas a éstas en *C. albicans*, han sido ampliamente descritas y estudiadas por diferentes autores por su relevancia e implicación en la respuesta inmunológica desencadenada frente a este patógeno oportunista. La detección mayoritaria de estas proteínas muy abundantes en el citoplasma celular (concretamente las proteínas Eno, Pgc, Tpi, Pdc, Adh y Tdh) durante las infecciones causadas por *C. albicans* parece estar relacionada por una parte, con su liberación como resultado del daño o lisis que sufrirán las células de *C. albicans* por las defensas del hospedador, durante el curso de la infección. Así como por su localización secundaria superficial en la interfase hongo-hospedador, al haberse descrito también como integrantes de la pared celular de *C. albicans*, por lo que estarían expuestas a las defensas del hospedador, sin necesidad de un daño celular (Martínez y col., 1998; Pardo y col., 1999; Pitarch y col., 1999; Pitarch y col., 2001; Pitarch y col., 2006; Fernández-Arenas y col., 2004 a, b; López y col., 2006). Aunque no se conoce con exactitud la función que desempeñan en la pared celular, parece que muestran funciones relacionadas con procesos específicos de la superficie, como la unión a componentes del hospedador, como la fibronectina y laminina (Gozalbo y col., 1998). Por ejemplo, se sabe que la Enolasa interviene en cambios de la pared celular que suceden en presencia de drogas como el fluconazol en el medio (Angiolella y col., 2002), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa está implicada en la adhesión de las células del hongo a la fibronectina y laminina (Gozalbo y col., 1998) o la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa que actúa como antígeno (Nombela y Chaffin, 2006). El caso de las proteínas de respuesta a estrés, Hsp, que además de las múltiples funciones que tienen en el interior celular, en la respuesta a diferentes estreses, principalmente el térmico, y como proteínas acompañantes, también se ha descrito su localización en pared celular. Además se ha aceptado como antígeno inmunodominante en amplio rango de infecciones (Martínez y col., 1998), así como su asociación con la protección inmunitaria (Pockley, 2003).

Por lo que respecta al resto de proteínas detectadas en el presente trabajo, solo la ácido acetohydroxido isomeroeductasa (Ilv), y la subunidad β de la proteína de unión a guanina (Asc) han sido detectadas como proteínas inmunoreactivas en *C. albicans*, proponiéndose junto con las anteriores, como excelentes candidatas para futuras vacunas fúngicas (Fernández-Arenas y col., 2004b; Pitarch y col., 2004). Sin embargo, en el caso de las proteínas, S-adenosil metionina sintasa, aldehído deshidrogenasa, cistationina gamma

liasa y cistationina beta sintasa, no se han encontrado trabajos que las identifiquen como proteínas inmunoreactivas para el caso de *C. albicans*.

En el caso de *S. cerevisiae*, también se ha descrito la presencia de todas estas proteínas en la pared celular (Nombela y Chaffin, 2006), como es el caso de algunos miembros de la familia Hsp70 (López-Ribot y Chaffin, 1996), así como de la enzima glicolítica gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (Pardo y col., 1999; Delgado y col., 2003 a, b). También se ha descrito en *S. cerevisiae* que protoplastos en regeneración son capaces de secretar la Enolasa (Eno2), fructosa bifosfato aldolasa (Fba1) y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Tdh2 y 3), así como algunos miembros de la familia de las Hsp70 (Ssa1 y 2, así como Ssb1 y 2) al medio de cultivo, lo que sugiere la presencia de los mismos en la pared celular (Pardo y col., 1999; 2000). De manera que no es de extrañar por tanto, que estas proteínas puedan jugar un papel antigénico relevante durante el transcurso de una infección por parte de *S. cerevisiae*, al encontrarse accesibles para las células del sistema inmunitario.

Conviene aclarar que la localización de estas proteínas en la pared celular de las levaduras ha sido tema de gran controversia durante los últimos años, ya que dichas proteínas carecen de péptido señal (secuencia aminoacídica N Terminal) que les dirija al retículo endoplásmico para su entrada en la ruta de secreción clásica hacia el exterior de la célula (membrana citoplásmica y pared celular). Sin embargo, gracias a trabajos recientes se ha podido demostrar que las levaduras pueden disponer para ciertas proteínas que no poseen el péptido señal (como es el caso de las proteínas nombradas anteriormente) de una ruta alternativa de transporte no convencional, que las posicionaría en la superficie celular (López y col., 2006). Además, esta ruta alternativa de secreción de proteínas no consideradas propiamente de pared celular, está siendo estudiada como un posible factor más de virulencia, debido a que algunas de estas proteínas, como es el caso de la proteína Enolasa, se les atribuye un cierto papel virulento por su capacidad de unión al plasminógeno, contribuyendo por tanto a la invasión de los tejidos por *C. albicans* (Pitarch y col., 2004). De la misma manera, se ha descrito que anticuerpos frente a esta proteína parecen conferir protección (Pitarch y col., 2006).

De esta manera podemos concluir que los resultados obtenidos mediante la inmunoproteómica (combinación de la proteómica y western blot), han permitido poner de manifiesto que *S. cerevisiae* es capaz de inducir una respuesta inmune, similar a la descrita para el hongo patógeno oportunista *C. albicans*, dejando en entredicho la aparente inocuidad de esta levadura, considerada comúnmente como segura. Así mismo, mediante estas

técnicas, y tomando como modelo trabajos realizados con *C. albicans*, sería posible llegar a determinar marcadores de una posible “*Saccharomycosis*,” así como, qué antígenos son los idóneos para el desarrollo de una posible vacuna o medicamentos efectivos frente a estas infecciones, en el caso de llegar a producirse la proliferación de cepas de *S. cerevisiae* virulentas.

Capítulo III

Estudio del grado de activación de las rutas
de transducción de señales mediadas por
las MAP quinasas Slt2 y Kss1

Como se ha observado, los aislados clínicos de *S. cerevisiae* cuentan con una serie de rasgos fenotípicos que se asocian significativamente con el origen clínico y que, por tanto, pueden estar directamente relacionados con la virulencia. En este sentido, ha sido más difícil determinar si participan o no en la virulencia *in vivo*, empleando para ello modelos murinos de infección sistémica. En cualquier caso sería conveniente añadir a los criterios de selección de cepas industriales que van a ser comercializadas, pruebas relacionadas con el crecimiento a 42° C, alta producción de fosfolipasas y el crecimiento pseudohifal, ya que se plantean como los rasgos de virulencia que mejor diferencian a las cepas industriales de los aislados clínicos, principalmente aquellos que fueron aislados de sitios estériles y/o habían causado una infección. Los ensayos *in vivo*, empleando tres modelos murinos con diferente estado inmunológico, han evidenciado que existen ciertos aislados clínicos virulentos, capaces de colonizar e invadir principalmente el cerebro, llegando incluso a causar la muerte tanto de ratones sanos como neutropénicos, durante la primera semana de infección.

Teniendo en cuenta que uno de los fenómenos que diferenciaron fundamentalmente a los aislados clínicos de los no clínicos fue el crecimiento pseudofilamentoso, se planteó analizar una de las ruta de señalización que regula el proceso del crecimiento pseudohifal e invasión ante una limitación nutricional, la ruta de transducción de señales mediada por la MAP quinasa Kss1 (MAPK). Sin embargo, las rutas de transducción de señales no son simples secuencias lineales de proteínas que se activan de forma sucesiva, sino que conforman redes complejas de comunicación celular. De hecho, existe cierta interconexión entre la ruta involucrada con el crecimiento pseudohifal, mediada por Kss1, la ruta de integridad celular, mediada por Slt2 y la ruta relacionada con el apareamiento y la respuesta a feromonas por Fus3. Estas rutas comparten elementos comunes y responden ante otros estímulos diferentes no específicos. La ruta del apareamiento o respuesta a feromonas comparte muchos elementos comunes con la ruta de pseudofilamentación (Figura 37), entre ellos el módulo de las MAP quinasa, Ste20, Ste11, Ste7 y Ste12. Además, se ha observado que Kss1 se fosforila rápidamente tras la estimulación de las células con feromonas, e incluso esta fosforilación es necesaria para la inducción de los genes que se expresan en estas condiciones (Sabbagh, 2001). Además Kss1 debe participar en la ruta de feromonas, ya que la pérdida de Fus3 no vuelve estéril a la célula, como sí sucede con el doble mutante *fus2 kss1* (Elion y col., 1991). Por otro lado, la ruta de integridad celular, mediada por Slt2, responde a muy diferentes estímulos externos, como por ejemplo alta temperatura, baja osmolaridad externa, ayuno de

nitrógeno, la presencia de feromonas o de agentes que interfieren con la biosíntesis de componentes de la pared celular y estrés oxidativo (de Nobel y col., 2000; Martín y col., 2005; Vilella y col., 2005). Se ha observado también que algunos defectos en la integridad de la pared celular provocan además de activación de la ruta de Slt2, un aumento en la transcripción de genes de respuesta a feromonas, a través de la ruta SVG, y que para ello son necesarios los componentes de la ruta de apareamiento y pseudofilamentación Ste11, Ste7 y Ste12 (Cullen y col., 2000). Por último, también se ha descrito que la activación constitutiva de la GTPasa Cdc42, que interviene en las rutas de apareamiento y pseudofilamentación, provoca una activación de la MAPK Slt2 que depende de la presencia de Ste7, Fus3 y Kss1, pero no de la GTPasa de la ruta de integridad Rho1 (Rodríguez-Pachón y col., 2002).

Debido a la compleja interacción que existe entre estas tres rutas y puesto que existen anticuerpos específicos frente a estas MAPKs activadas (Martín y col., 2000), se planteó abordar el estudio del nivel de activación de dichas proteínas, para conocer así la posible implicación de estas rutas en el desarrollo de la patogenicidad de los aislados virulentos de *S. cerevisiae*, comparando con cepas industriales, que mostraron a su vez diferente comportamiento *in vitro*, en el estudio de los rasgos de virulencia, e *in vivo* en sistemas modelos de infección sistémica.

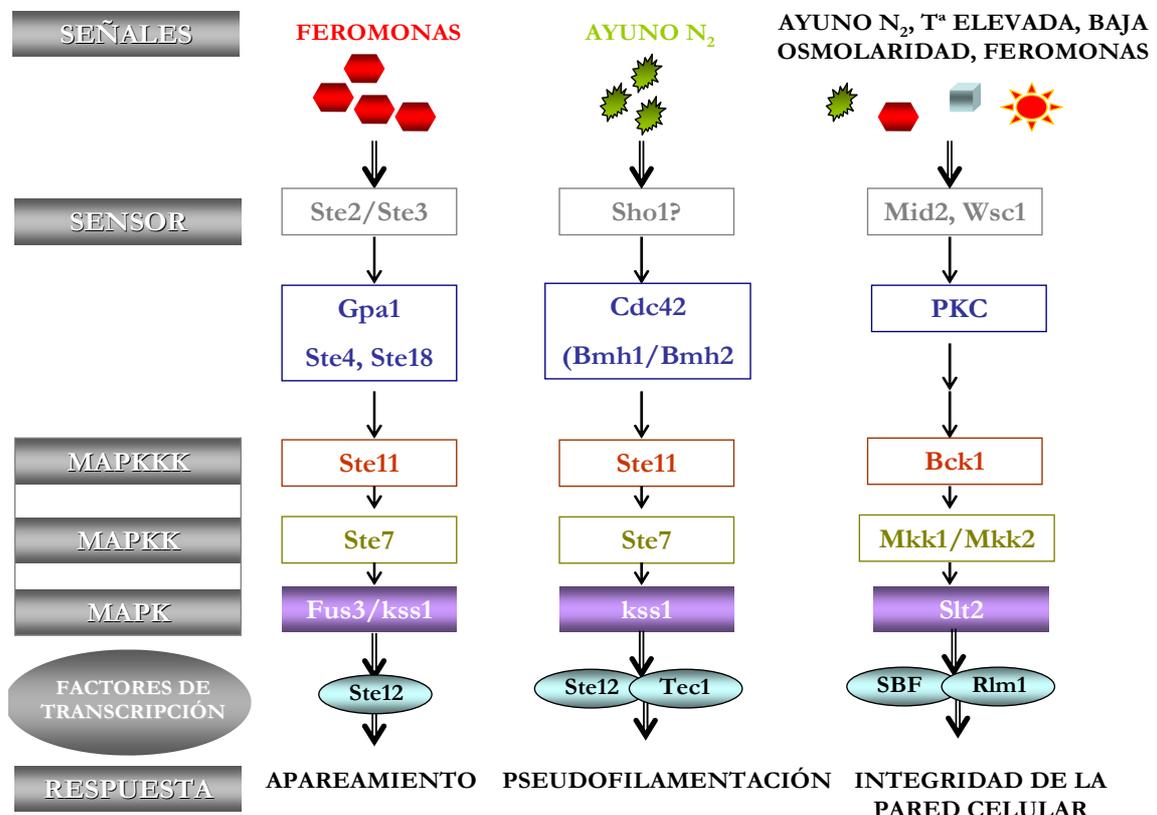


Figura 37. Esquemas de las rutas de apareamiento, crecimiento pseudohifal e integridad de la pared celular de *S. cerevisiae*.

1. Estudio del grado de activación por fosforilación de las MAPK Kss1, Slt2 y Fus3 en condiciones de no activación

Con el objetivo de estudiar las rutas de integridad celular mediada por Slt2, de pseudofilamentación por Kss1 y de apareamiento por Fus3, en condiciones de cultivo que no las activasen, las cepas se incubaron a una temperatura de 24° C en el medio de cultivo YPD, para estudiar así si existe nivel basal en estas MAP quininas (Martín y col., 2000), siguiendo la metodología descrita en el apartado 9 de materiales y métodos. Tras realizar el “Western blotting”, las membranas fueron incubadas en primer lugar con el anticuerpo anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), que detecta la fosforilación dual de Slt2, de Kss1 y de Fus3. A continuación y tras realizar las deshibridaciones necesarias de las membranas, se emplearon anticuerpos que nos permiten determinar la cantidad total de proteína en cada carrera, por un lado se empleó el anticuerpo anti-GST-Slt2 (Martín y col., 1993), que nos permite cuantificar la cantidad total de Slt2 y el anticuerpo anti-actina.

La realización de este tipo de ensayos con aislados clínicos planteó cierta dificultad, ya que al ser cepas aisladas de un ambiente hospitalario sus fondos genéticos no se conocían y por tanto no se disponía de cepas isogénicas con las que comparar los resultados obtenidos en este tipo de ensayos. De manera que para solventar esta dificultad, se decidió que los resultados obtenidos para cada cepa se compararían consigo misma, tras realizar diversas repeticiones, y con respecto a una cepa de referencia de laboratorio BY4741. Para que estas comparaciones tuviesen lugar, se cuantificó la cantidad de proteína total para cada cepa, empleándose además controles de carga (mediante el empleo de los anticuerpos descritos anteriormente).

En primer lugar se realizó un ensayo preliminar para el cual se seleccionaron los aislados clínicos N° 102, F3 y F27 (aislados de sangre), incluyéndose también como controles la cepa BY4741 y los mutantes *kss1*Δ (el cual muestra activación de Slt2), *fus3*Δ (que muestra activación de Slt2 y Kss1), *slt2*Δ y el mutante *itc1*Δ que muestra activadas las 3 MAPK's en estudio. Estos mutantes y la cepa BY4741 se crecieron en las 2 últimas horas de cultivo con Rojo congo, con el fin de obtener un patrón de bandas correspondiente a cada MAPK, con las que poder comparar los resultados que se obtuviesen de los aislados clínicos.

En la Figura 38 se muestran los resultados obtenidos, dos de los cuales son interesantes de destacar. Por un lado el aislado de sangre F3 exhibió una banda que coincidía con las bandas para Kss1 que mostraron los mutantes *itc1*Δ, *slt2*Δ y *fus3*Δ. De

manera que este aislado, tenía activada a nivel basal la MAPK que media en el crecimiento pseudohifal. El segundo resultado fue para el aislado clínico N° 102, que parecía mostrar una banda adicional por encima de la banda normal de Slt2. Este resultado hacía pensar que quizás este aislado tuviese otra proteína fosforilada muy parecida a Slt2, o simplemente fuese un artefacto producido durante el revelado. Por lo que respecta a Fus3, no se observó en estas condiciones ninguna banda al nivel correspondiente, ni en el caso de los aislados clínicos ni para el mutante *itc1a* Δ , en el que normalmente se reconoce.

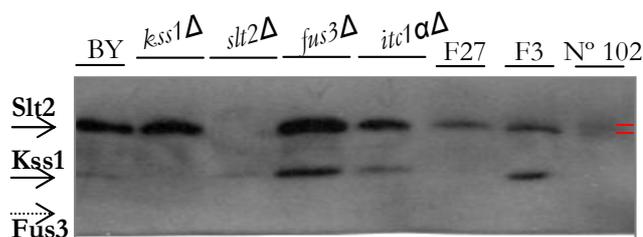


Figura 38. Estudio preliminar de las MAPK's Slt2, Kss1 y Fus3 en algunos aislados clínicos para conocer su nivel basal de activación. El análisis mediante Western blotting se realizó mediante extractos proteicos procedentes de la cepa silvestre BY 4741; los mutantes *kss1* Δ , *slt2* Δ , *fus3* Δ y *itc1a* Δ ; los aislados clínicos de sangre F27 y F3; el aislado respiratorio N° 102. Todas las cepas se cultivaron en medio líquido rico (YPD) a 24° C (condiciones de no activación), menos los mutantes a los que se les añadió rojo congo a una concentración final de 10 μ g/mL y se incubaron con este compuesto a 24°C durante dos horas. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-P-p44/42. Las dos bandas que se detectan a nivel de Slt2 para el aislado N° 102 se marcan con dos líneas rojas.

Estos resultados preliminares dieron una idea de la heterogeneidad que se podría encontrar entre los aislados clínicos en estudio y dieron paso al análisis de las tres MAPK's para un total de 40 cepas (entre aislados clínicos y no clínicos), con diferentes fenotipos para los rasgos de virulencia ensayados en el apartado anterior, en el que también se incluyeron las cepas ensayadas *in vivo*. Del total de cepas analizadas, se encontró un grupo de 9 que mostraron diferencias llamativas en la activación basal de Slt2 y Kss1, y cuyos resultados se muestran en la Figura 39.

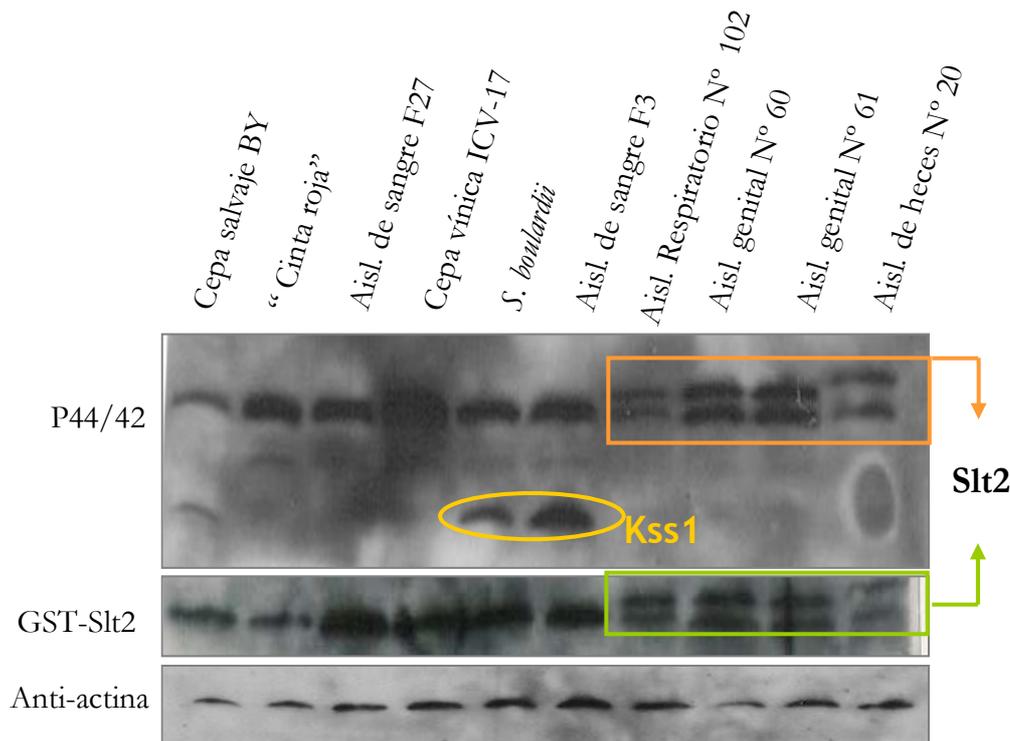


Figura 39. Detección de diferencias a nivel de activación basal para las MAPK's Slt2 y Kss1 Análisis mediante Western blotting de extractos proteicos procedentes de las cepa silvestre BY 4741; la cepa "Cinta roja" ("C.r"); el aislado de sangre F27, la cepa vínica ICV-17, la cepa de *S. boulardii* (*S.b*), el aislado de sangre F3; el aislado respiratorio N° 102, los aislados genitales N° 60 y 61; el aislado de heces N° 70. Todas las cepas se cultivaron en medio líquido rico (YPD) a 24° C (condiciones de no activación). La membrana se incubó con los anticuerpos anti-P-p44/42 (panel superior), anti-Slt2 (panel intermedio) y anti-actina (panel inferior), estos 2 últimos como control de carga de proteína de cada carril. Los carriles con recuadro naranja indican una doble banda detectada como Slt2 fosforilada y con recuadro verde confirman que las dos bandas corresponden a Slt2. En rojo se marcan las bandas correspondientes a Kss1.

Tal y como se comentó anteriormente, el análisis de los resultados se realizó en base a la mayor o menor activación mostrada por cada cepa con respecto a la cepa control BY 4741, así como al propio control interno del total de proteína cargado en cada carril. Además se realizaron tres repeticiones del mismo ensayo y siempre se obtuvo un perfil de fosforilación para Slt2 y Kss1 muy similar al mostrado en la Figura 39, para las 9 cepas en los diversos ensayos realizados.

De los resultados obtenidos es interesante destacar que entre estas 9 cepas, se encontraban las cepas que fueron ensayadas *in vivo*, como son los aislados clínicos N° 60,

102, F27 y las cepas industriales “Cinta roja”, *S. boulardii* e ICV-17. Pero también lo fueron los casos del aislado clínico F3, ya que comparte patrón molecular con *S. boulardii* y el aislado clínico N° 61, ya que además de mostrar el mismo perfil molecular que el aislado clínico N° 60, ambos fueron aislados del mismo paciente. Por lo que respecta al aislado de heces N° 70, se trata de un aislado clínico considerado dentro del grupo de los comensales. En la Tabla 18 se muestran los resultados que obtuvimos para los rasgos de virulencia de estas 9 cepas. El aislado N° 61, que podría considerarse la misma cepa que la N° 60, mostró un perfil fenotípico similar, excepto para la actividad fosfolipasa. Por lo que respecta al aislado N° 70, presentó un perfil positivo para todos los rasgos estudiados y, por último, el aislado F3, considerada también muy próxima a la cepa de *S. boulardii*, mostró un perfil similar a ésta, diferenciándose en la falta de crecimiento a 42° C y el crecimiento invasivo positivo. De manera que aunque algunos aislados eran filogenéticamente muy próximos, mostraban un fenotipo distinto, dificultando la posibilidad de establecer genotipos característicos de virulencia.

Tabla 18. Rasgos fenotipos asociados con virulencia en *S. cerevisiae*.

Aislado	Origen de aislamiento	Crec. 42°C	Actividad enzimática		Crecimiento pseudohifal	Crec. invasivo
			Proteasa	Fosfolipasa		
Cepas industriales						
ICV-17	Vino	-	++	-	++	+/-
Cinta roja	Panadería	+	+	++	++	-
<i>S. boulardii</i>	Probiótico	+	++	+	+	-
Cepas clínicas comensales						
N° 70	Heces	+	+	++	+	+
N° 60	Genital	+	++	+	++	+
N° 61	Heces	+	+	-	++	+
Cepas clínicas potencialmente virulentas						
F27	Sangre	+	++	++	++	-
F3	Sangre	-	++	++	++	+
N° 102	Tracto respiratorio	+	+	+	++	+

A continuación se detallan los resultados mostrados en la Figura 39, atendiendo a las MAPK activadas y el grado de activación en cada caso:

1.1. Activación de Slt2 superior a la mostrada por la cepa silvestre BY4741

Teniendo en cuenta las cepas que únicamente mostraron una sola banda para Slt2 y comparando los niveles de fosforilación observados para esta proteína, todas tenían una

activación muy superior a lo observado para la cepa BY4741. Los resultados muestran una mayor activación para los aislados clínicos, frente a la cepa silvestre, destacando la cepa panadera y la cepa ICV-17. Bien es cierto que al comparar los carriles correspondientes con el anticuerpo anti-Slt2 se aprecian algunas variaciones en el nivel de carga entre cepas. Estas diferencias provienen de la propia activación que esta proteína ejerce sobre su propia transcripción, por ello las variaciones en el nivel de carga son mucho mayores que cuando se comparan con el control de la actina, el cual permitió realizar una correcta comparación de la activación de esta proteína entre los aislados. Como se comentó anteriormente se realizaron dos ensayos más, que confirmaron que efectivamente bajo condiciones de no activación, estas cepas mostraban siempre niveles de fosforilación muy elevados con respecto a una cepa silvestre, para la MAPK que media la ruta de integridad celular. Estos resultados sugieren que estas cepas podrían tener alterada esta ruta en algún punto, o bien podrían tener alguna alteración de la pared celular que pueda traducirse en esta activación basal en condiciones de no activación.

1.2. Activación de Kss1 en *S. boulardii* y el aislado clínico de sangre F3

La activación basal de Kss1 sin necesidad de activar la ruta implicada en el crecimiento pseudohifal, fue observado únicamente en el caso de la cepa de *S. boulardii* y el aislado de sangre F3. Es interesante resaltar que estas cepas manifiestan en condiciones normales de crecimiento, una morfología más elongada que el resto, que podría explicarse como resultado de una activación constitutiva de Kss1. En la Figura 40 se observa como el aislado clínico F3 y la cepa de *S. boulardii* muestran una morfología celular elongada muy diferente a la morfología de células ovoides típica para *S. cerevisiae* (cepa silvestre BY). Además, tienden a formar pequeñas cadenas de células que no se separan al gemar de la célula madre, dando lugar a un crecimiento pseudohifal en medios normales de cultivos de levaduras, como es el GPYA, sin necesidad de emplear medios específicos para inducirlo, como es el medio SLAD (limitante en nitrógeno). Posiblemente estos fenómenos observados principalmente para estas cepas, estén directamente relacionados con la activación basal que se observa para Kss1.

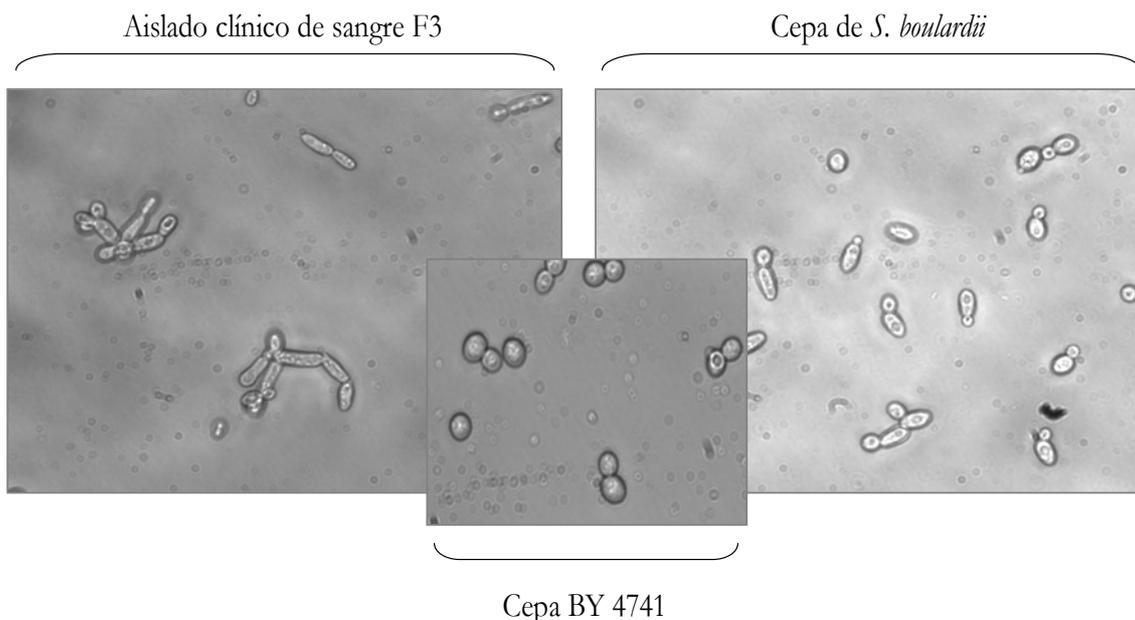


Figura 40. Morfología celular elongada mostrada por el aislado clínico F3 y la cepa de *S. boulardii*, en condiciones normales de cultivo. Son imágenes capturadas por una cámara fotográfica Leica asociada al microscopio Leica HPS60, todas ellas a 40X aumentos, a partir de cultivos crecidos en placas de GPYA durante 48h. Las imágenes se han ampliado para apreciar con mayor definición la morfología que exhibían.

1.3. Doble banda observada para Slt2

Al emplear el anticuerpo anti-fosfo-p44/42, que detecta la fosforilación dual de Slt2, la fosforilación de Kss1 y de Fus3, se reveló la existencia de una banda adicional situada por encima de la banda normal de Slt2, tal y como se observa en la Figura 39. Ésta, podría ser otra forma fosforilada para Slt2 o bien una proteína diferente que estaría siendo identificada por este mismo anticuerpo. Para confirmar una de estas posibilidades, se empleó el anticuerpo específico para Slt2, anti-GST-Slt2, observándose de nuevo esta banda adicional, lo que confirmaba que estos aislados (Nº 60, 61, 70 y 102) mostraban dos formas de la proteína Slt2. El nivel de fosforilación de ambas bandas era el mismo para cada aislado y al comparar entre los distintos aislados (Figura 39), en general se observó un nivel de fosforilación similar, aunque el aislado Nº 70 parecía exhibir siempre menor activación que el resto. Aunque estos aislados mostraron la doble banda para Slt2, se observó que existía una diferencia en el tamaño, los aislados Nº 60 y 61 mostraron unas bandas con semejante movilidad electroforética, el aislado Nº 102 mostró unas bandas con

ligeras diferencias de movilidad y el aislado N° 70 con mayor diferencia de movilidad que los otros dos aislados.

A la vista de los resultados, se plantearon diferentes hipótesis sobre la existencia de esta doble banda para estos aislados clínicos, por un lado podría ser el producto de modificaciones postraduccionales de la proteína Slt2, que dieran lugar a dos proteínas con diferente tamaño o bien estas cepas podrían mostrar alelos SLT2 diferentes para este gen que dieran lugar a dos proteínas, al menos diferentes en tamaño.

Por otro lado, se planteó si esta banda adicional tendría una función similar a la proteína normal Slt2, o quizás no tuviera ninguna función. Quizás, la existencia de esta doble banda se traduciría en algún efecto fenotípico, que incluso pudiera influir en la virulencia de estos aislados. Puesto que los aislados N° 60 y 102 mostraban la doble banda para Slt2 y dado que fueron los aislados que mayor virulencia exhibieron *in vivo*, se planteó la hipótesis de que quizás los aislados N° 61 (que compartió patrón molecular M_m/S_8 con el N° 60 y fueron aislados del mismo paciente) y el N° 70, que también mostraban la doble banda, podrían mostrar un comportamiento similar de virulencia. Para comprobarlo se realizaron ensayos en ratones sanos BALB/c, bajo las mismas condiciones descritas en el capítulo anterior. Sin embargo, los resultados indicaron justo lo contrario, ya que no solo no se observó mortalidad alguna, sino que los alojamientos fueron muy bajos, comparables a los exhibidos por las cepas no virulentas (datos no mostrados en este trabajo). Por tanto, esta banda no parecía estar directamente relacionada con la virulencia que mostraron los aislados N° 60 y 102. De todos modos, es posible que las diferencias de tamaño observadas en las dobles bandas pudieran influir en la función de esta proteína, lo cual explicaría en parte las diferencias observadas en virulencia, o bien las dobles bandas no tengan una relación directa con la virulencia mostrada por los aislados N° 60 y 102.

2. Estudio de la sensibilidad o resistencia ante agentes que alteran la pared celular

Independientemente de la causa que de lugar a esta banda adicional para Slt2 en estos aislados, puede que la función de esta nueva proteína sea igual a la proteína Slt2 o quizás no muestre ningún tipo de función. Para determinar si la presencia de esta banda adicional se traduce en algún efecto fenotípico, se estudió la sensibilidad de estas cepas a dos compuestos que se emplean habitualmente en los ensayos en los que se buscan defectos en pared celular. Se emplearon rojo Congo y Blanco de calcoflúor, compuestos que alteran fundamentalmente el ensamblaje de las cadenas de quitina (Roncero y Durán,

1985), interfiriendo en la organización de la pared celular de forma que si ésta se encuentra debilitada, las células son sensibles a concentraciones de este agente que no suelen afectar a células silvestres. A las placas de GPYA se les añadió 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rojo Congo y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Blanco de calcoflúor. Las cepas se sembraron en las placas de control de GPYA (medio rico sin ningún aditivo) y en placas de GPYA con los distintos compuestos, mediante gotas con diluciones de una suspensión celular de una DO entre 0,3-0,4. Las placas se incubaron a 24° C durante 48 horas y se observó el crecimiento obtenido. En la Figura 41 se muestran los resultados de sensibilidad a los dos compuestos empleados, junto al control positivo de crecimiento en YPD.

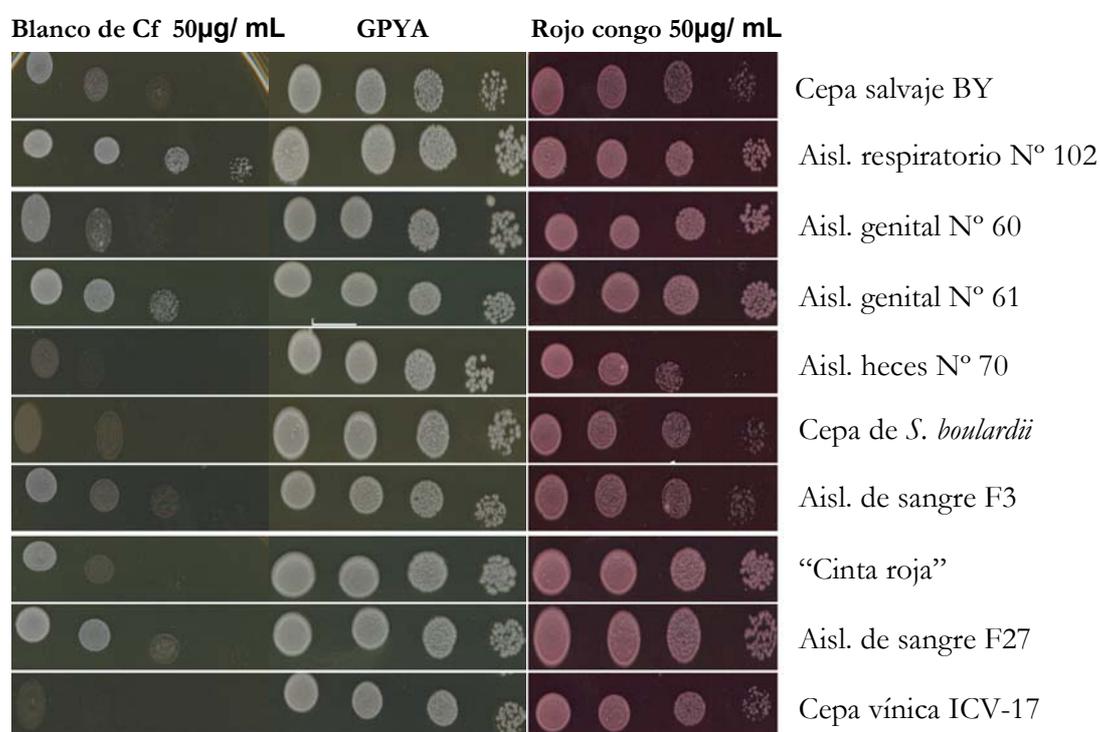


Figura 41. Análisis de la sensibilidad a rojo Congo y blanco de Calcoflúor. Las cepas se sembraron en placas de GPYA y GPYA + rojo Congo (RC, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y GPYA+ Blanco de calcoflúor (CF, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mediante gotas de diluciones seriadas a partir de una suspensión celular de una DO de 0,3-0,4. Las placas se incubaron posteriormente a 24° C durante 48 horas. Los aislados que mostraron la doble banda para Slr2 están marcados en negrita en la figura.

En los ensayos realizados con rojo Congo, en general todas las cepas mostraron resistencia a este compuesto, únicamente se observaron ciertas diferencias de crecimiento en el aislado clínico N° 70, la cepa de *S. boulardii* y el aislado clínico F3, aunque fueron muy

similares a las mostradas por la cepa silvestre BY. En cambio, las diferencias en crecimiento se observaron con el blanco de calcoflúor, donde únicamente el aislado respiratorio N° 102 mostró resistencia a dicho compuesto, por encima del crecimiento exhibido por la cepa BY. El aislado genital N° 61, junto con los aislados de sangre F3 y F27, mostraron un perfil de resistencia similar al de la cepa silvestre y por último los aislados N° 60 y 70, la cepa de *S. boulardii*, la cepa vínica ICV-17 y la cepa de panadería “Cinta roja”, exhibieron cierta sensibilidad a dicho compuesto.

Entre los aislados con doble banda de Slt2, se observaron tres fenómenos. Por un lado el aislado respiratorio N° 102, que manifestó resistencia a ambos compuestos, el N° 70 que mostró cierta sensibilidad a ambos compuestos y por último los aislados N° 60 y 61 que manifestaron resistencia a rojo congo y una sensibilidad intermedia al blanco de calcoflúor. La presencia de la doble banda, no parece estar confiriendo un fenotipo similar de resistencia o sensibilidad frente a estos compuestos, para todas las cepas. No obstante, estos resultados podrían explicar las morfologías observadas concretamente para los aislados N° 60 y 102, cuando crecen en un medio normal de cultivo (YPD). El aislado N° 60 crece formando cadenas de células que no se separan, hasta formar pequeños grupos de células. Mientras que, el aislado N° 102 forma grupos mayores de células (Figura 42). Sin embargo, estas morfologías no se han observado para los aislados N° 61 y 70, que también mostraron dicha banda adicional. Estos datos sugería que los aislados N° 60 y 102 podrían tener alterada su pared celular, en estructura y/o composición, pudiéndose observar cambios asociados en el contenido de quitina, que se revelarían mediante la Tinción de calcoflúor. Sin embargo, las tinciones llevadas a cabo en ensayos preliminares (datos no mostrados en este trabajo) no mostraron diferencias apreciables en la cantidad de quitina de la pared celular de los aislados N° 60 y 102, respecto del resto, que pudiesen explicar los resultados observados tanto en la resistencia/sensibilidad a calcoflúor, como las morfologías mostradas en la Figura 42.

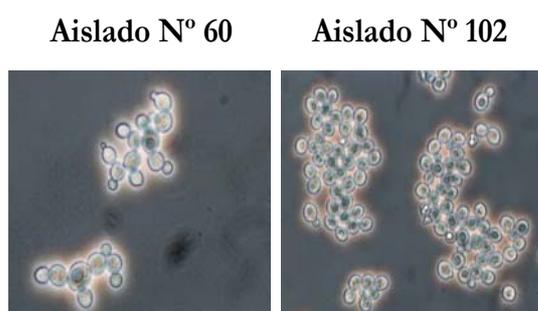


Figura 42. Morfología celular de los aislados clínicos N° 60 y 102. Las cadenas y agrupaciones celulares observadas para ambos aislados se apreciaron en cultivos crecidos en medio YPD. Son imágenes capturadas por una cámara fotográfica Leica asociada al microscopio Leica HPS60

Por ello se decidió retomar las hipótesis iniciales sobre el posible origen de esta doble banda, bien por modificación postraducciona de la proteína Slt2, que podrían dar lugar a dos formas de la proteína, diferentes al menos en tamaño, o bien que estas cepas tuviesen alelos diferentes para este gen, que dieran lugar a dos proteínas también diferentes en tamaño.

3. Caracterización molecular del gen *SLT2*

El estudio del origen de la doble banda de Slt2 para los 4 aislados clínicos, se abordó desde un punto de vista molecular. De manera que si la doble banda era resultado de dos alelos diferentes para este mismo gen y si éstos a su vez mostraban diferente tamaño como proteína, quizás podrían ser detectados al amplificar el gen por PCR. Para ello se emplearon los cebadores externos slt2 3' y slt2 5', para amplificar el gen *SLT2* a partir de DNA total. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 43.

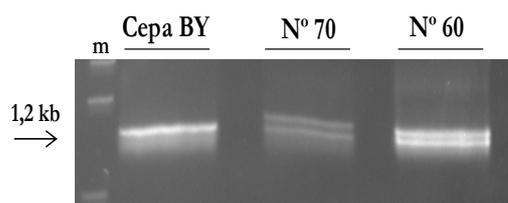


Figura 43. Amplificación por PCR del gen *SLT2*.

Tras realizar una extracción total de DNA de cada cepa, se realizaron las amplificaciones por PCR del gen *SLT2*, empleando los cebadores externos slt2 3' y 5'. El patrón de tamaños (m) es el "100bp DNA ladder" de Gibco-BRL.

La amplificación del gen reveló que efectivamente los aislados clínicos N° 60, 70 y 102 (aunque no se muestra en este gel) tenían dos fragmentos para el gen *SLT2*, con un tamaño muy similar y difícilmente distinguible. Sin embargo, para la cepa silvestre solo se observó una única banda para este gen. Estos datos genéticos concordaron perfectamente con lo observado para las dos bandas de Slt2, puesto que el aislado N° 70 que mostraba una diferencia de tamaño mayor entre proteínas, también lo mostró en los fragmentos obtenidos para el gen. Y lo mismo ocurrió para el aislado N° 60, que mostró menor diferencia de tamaño en las dos proteínas Slt2 y también para los dos fragmentos obtenidos por PCR.

Por tanto, estos resultados evidenciaban que la hipótesis de la existencia de alelos diferentes para el gen *SLT2* en estos aislados era posible. De manera que a continuación se planteó intentar separar ambos fragmentos de PCR, que corresponderían con los alelos

diferentes y proseguir con la secuenciación de cada banda para conocer el origen de las diferencias observadas en el tamaño.

Paralelamente se realizó un análisis de la secuencia del gen *SLT2* entre las especies del género *Saccharomyces*, que constituyen el complejo *sensu stricto* y observamos que hacia la zona 5' del gen existía una región que mostraba un número variable de repeticiones CAA CAG (región de microsatélites), que variaba según la especie. Al traducir la secuencia nucleotídica a la correspondiente secuencia de aminoácidos, se observó que dichas repeticiones se traducían en un número variable de glutaminas (Q). En la Figura 44 se muestran los alineamientos para las especies que constituyen el complejo *sensu stricto*, específicamente de la región de microsatélites, donde se concentran las diferencias observadas entre dichas especies, según el número de repeticiones CAA CAG que tiene cada una y que abarca una zona de unos 500 pb hacia la zona final del gen. En la Figura 45 se muestra la región de la secuencia aminoacídica, correspondiente a la región de los microsatélites, donde se observan las diferencias en el número de glutaminas para las diferentes especies.

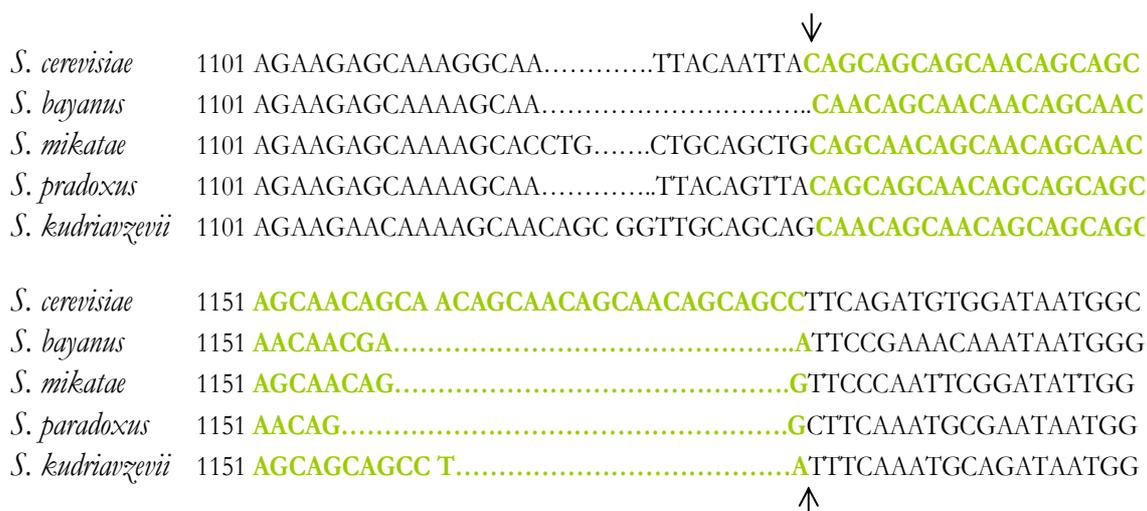


Figura 44. Alineamiento de las secuencias nucleotídica de la proteína SlT2 para las cepas que conforman el complejo *sensu stricto*. Las zonas marcadas en color verde y las flechas delimitan la región que concentra las repeticiones CAA CAG y que constituyen las diferencias significativas entre dichas especies para este gen.

<i>S. cerevisiae</i>	351	VIQEVQDFRFLFVRQPLLEE	QRQ...LQLQQQQQQQQQQQQQQQQQ	PSDVDNG
<i>S. bayanus</i>	351	VIQEVQDFRQFVRQPLLEE	QKQ.....QQQQQQQR.....	IPETNNG
<i>S. mikatae</i>	351	VIQEVQDFRQFVRQPLLEE	QKHLQLQQQQQQQQQ.....	VPNSDIG
<i>S. paradoxus</i>	351	...IQEVQDFRFLFVRQPLLEE	QKQ...LQLQQQQQQQQ.....	ASNANNG
<i>S. kudriavzevii</i>	351	VIQEVQDFRRF...RQPLLEE	QKQRLQQQQQQQQQQQP.....	ISNADNG

Figura 45. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína Slt2 para las cepas que conforman el complejo *sensu stricto*. Las zonas marcadas en color verde delimitan la región variable de glutaminas (Q) y que constituyen las diferencias significativas entre dichas especies para este gen.

Estos alineamientos muestran que la especie *S. cerevisiae* es la que concentra mayor número de repeticiones CAA CAG y por tanto mayor número de glutaminas. Con lo cual, se planteó que posiblemente las diferencias en el tamaño de los dos fragmentos de PCR del gen *SLT2* observados para los aislados clínicos, podrían deberse al número de repeticiones que cada alelo contuviese. Puesto que la escisión de los dos fragmentos generados al amplificar por PCR el gen *SLT2* a partir del gel de agarosa, dio muchos problemas, se decidió variar la metodología, de manera que se diseñaron dos cebadores internos, slt2 3'i y slt2 5'i (ver Tabla 9 de materiales y métodos), en zonas conservadas que flanqueasen la región de microsatélites, para amplificar dicha región y confirmar si la diferencia en el tamaño de los alelos, se debía a un mayor o menor número de repeticiones. En la Figura 46 se muestra un esquema del gen *SLT2*, así como los cebadores empleados para obtener los diferentes fragmentos de amplificación por PCR.

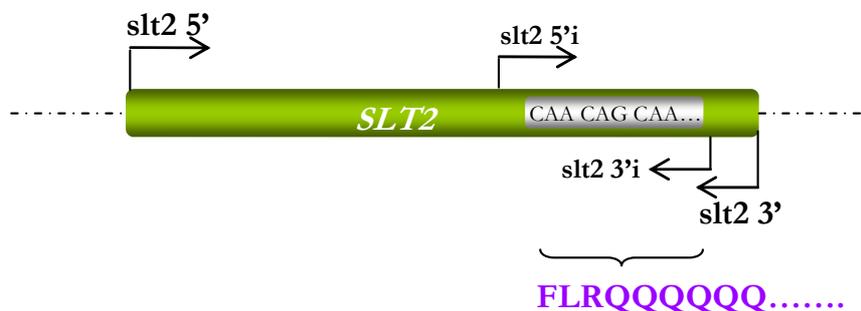


Figura 46. Esquema del gen *SLT2* y de los cebadores empleados para amplificar diferentes regiones según su combinación. La zona de repeticiones se sitúa en los últimos 500 pb del gen que se traduce en un número variable de glutaminas (Q).

3.1. Amplificación de la zona de repeticiones (microsatélites) mediante PCR

En primer lugar se realizó la amplificación de la región de repeticiones, mediante la combinación de los cebadores slt2 5'i x slt2 3', observándose un fragmento de unos 450 pb, tal y como cabía esperar en la cepa BY4741. En la Figura 47 se muestran los resultados obtenidos tras realizar las amplificaciones por PCR de dicha región para cada cepa. Tal y como se puede observar en dicha figura se obtuvieron entre los aislados clínicos, tamaños de amplificado muy distintos. Por un lado se obtuvo el tamaño esperado de unas 450 pb, como ocurre en la cepa BY4741, para la cepa de *S. boulardii* y la cepa vínica ICV-17, marcado en la Figura 47 con el nº 4. Sin embargo, los resultados observados para el resto de cepas fueron muy llamativos, ya que se obtuvieron más fragmentos de amplificación para la misma región. La cepa de panadería “Cinta roja” y el aislado F27 (con un origen de panadería y el mismo perfil molecular que esta cepa panadera), exhibieron dos fragmentos de PCR para dicha región, los fragmentos nº 3 (exclusivo de estas cepas) y nº4 (muy similar al esperado), de unos 430 pb y 480 pb respectivamente; aunque parece que las bandas obtenidas para el aislado F27 están más juntas entre sí que las mostradas para “Cinta roja” y es que probablemente se debe a que presentan un tamaño ligeramente diferente. Por último se observó que los aislados que mostraron dos bandas tanto para la proteínas Slt2 como para el gen, exhibían tres fragmentos de amplificado para esta región, las bandas nº 1 y 2 no observadas en las otras cepas analizadas y la nº 4 con un tamaño similar al esperado. Los aislados N° 60 y 102 mostraron tamaños similares para los fragmentos nº 1 y 2, de unas 510 pb y 480 pb respectivamente. Sin embargo, el tamaño del fragmento nº 4 fue inferior al esperado y ligeramente diferente en cada caso; de unas 430 pb para el aislado N° 60 y unas 440 pb para el aislado N° 102. En el caso del aislado N° 70 los tamaños de cada fragmento fueron mayores a los anteriores, el fragmento nº 1 de unas 550 pb, el nº 2 de unas 510 pb (muy similar al fragmento nº 1 de los aislados anteriores) y el nº 4 de unas 440 pb.

Estos datos sugieren que el aislado clínico F27 y a la cepa de panadería “Cinta roja” poseen dos alelos diferentes, posiblemente debido a una diferencia en la región de las repeticiones. Sin embargo, en el caso de los aislados de doble banda para Slt2, no solo había diferencias de tamaño que se explicarían por las diferencias en el nº de repeticiones CAA CAG, sino que además estos aislados debían contar con más de dos alelos para el gen *SLT2*, que variarían en el número de repeticiones.

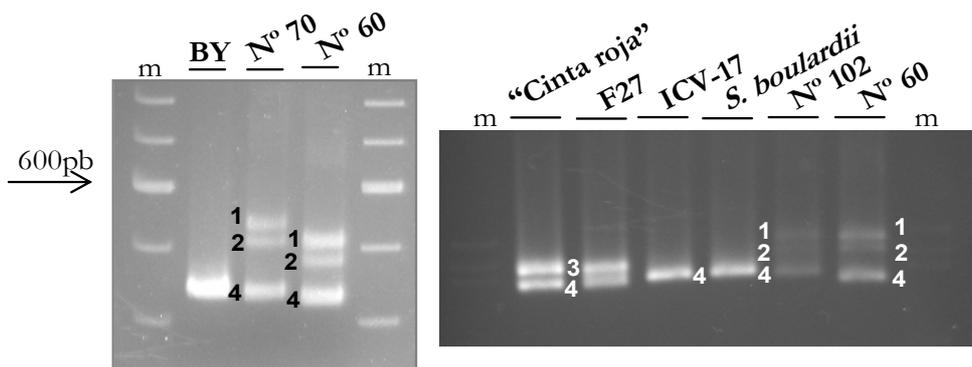


Figura 47. Amplificación por PCR de la región de repeticiones. Para amplificar dicha región se empleó la combinación de cebadores *slt2* 5'i x *slt2* 3'. Los fragmentos se han numerado del 1 al 4 para poder identificar el que mostró cada una de las cepas ensayadas. Los marcadores empleados (carreras m) fueron, el patrón de peso molecular de “100bp DNA ladder” de Gibco-BRL en el gel de la izquierda, y en el de la derecha, λ DNA digerido con la endonucleasa *Pst* I.

4. Secuenciación de las bandas amplificadas para la región de las repeticiones

4.1. Aislados con doble banda para la proteína Slt2: N° 60, 70 y 102

Para conocer el posible origen de las dos proteínas Slt2, se realizó la amplificación por PCR del gen completo utilizando los cebadores *slt2* 5' y *slt2* 3' (ver Figura 46) y se observaron dos copias diferentes en tamaño para dicho gen en estos aislados. Dicho resultado explicaría en parte la existencia de la doble banda para Slt2. A continuación, se intentó separar ambas bandas a partir de los geles de electroforesis con el fin de secuenciarlas, pero la proximidad de tamaño hizo difícil este proceso y se procedió a la amplificación por PCR de la región de microsatélites, empleando los cebadores *slt2* 5'i y *slt2* 3', que diferencian las especies del complejo *sensu stricto*, tal y como se observa en la Figura 43. Los resultados demostraron nuevamente, la existencia de más copias para este gen en los aislados N° 60, 70 y 102, prueba de ello fueron las tres bandas de amplificación obtenidas para esta región. Por este motivo, se decidió purificar las bandas de amplificado de la región de repeticiones n° 1, 2 y 4 de los geles de agarosa (Figura 47), para poder secuenciarlas posteriormente por separado (ver apartado 5.3.1 de materiales y métodos). La purificación fue posible para las bandas n° 2 y 4, sin embargo fue imposible separar la banda n° 1 del gel de agarosa. A continuación, se purificaron y se realizó la secuenciación

de cada una de estas bandas. El análisis de las secuencias obtenidas, se realizó empleando la versión 3.1 del programa MEGA. Se corrigieron las incertidumbres, por comparación de las dos hebras y se obtuvo la secuencia aminoacídica correspondiente, para estudiar el número de glutaminas que diferencian a las bandas n° 2 y 4 obtenidas de la amplificación por PCR de la región de microsatélites. En la Figura 48 se muestran el número de glutaminas para los fragmentos n° 2 y 4, comparándolo con el único fragmento n° 4 obtenido para la cepa silvestre BY y la cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* S288c (obtenida de la base de datos BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)).

Como se ha comentado anteriormente, la banda n° 1 de estos tres aislados no pudo secuenciarse, ya que hubo problemas en la purificación a partir del gel de agarosa. Sin embargo, se hizo una estima del número de glutaminas que podría haber para las bandas n° 1 de los aislados N° 60 y 102, en base al tamaño en pares de bases observado en los geles de agarosa correspondientes (Figura 46), ya que era muy similar al tamaño observado para la banda n° 2 del aislado N° 70. Con lo cual, se estimó que las bandas n° 1 de los aislados N° 60 y 102, al menos contarían con el mismo número de glutaminas que la banda n° 2 del aislado N° 70. Sin embargo, no fue posible estimar el número de glutaminas de la banda n° 1 del aislado N° 70, ya que al mostrar un tamaño de amplificado muy superior al resto, no pudo ser comparado en tamaño con otra banda de repeticiones conocidas, aunque sin duda dicha banda mostraría el mayor número de glutaminas en su secuencia. El número de glutaminas para cada banda de cada uno de los aislados se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Número de glutaminas observado para las bandas de amplificación de la región de microsatélites.

Cepa/aislado	N° de banda	N° de glutaminas (Q)
Cepa By	Banda n° 4	16
Aislado genital N° 60	Banda n° 1	≥34
	Banda n° 2	24
	Banda n° 4	12
Aislado respiratorio N° 102	Banda n° 1	≥34
	Banda n° 2	22
	Banda n° 4	14
Aislado de heces N° 70	Banda n° 1	>34
	Banda n° 2	34
	Banda n° 4	12



Figura 48. Representación del número de glutaminas presentes en cada una de las bandas secuenciadas. Cada banda se muestra señalada con el n° 1, 2 y 4 y acompaña a la cepa a la cual pertenece. Las glutaminas marcadas en gris para las bandas n° 1 de los aislados N° 60 y 102 se han calculado por comparación del tamaño en pares de bases que estas bandas mostraron en los geles de agarosa.

A la vista de estos resultados podemos concluir que los aislados clínicos N° 60, 70 y 102 tienen al menos tres copias para dicho gen. Estas copias se diferencian en el número de repeticiones CAA CAG, que se traducen en un número variable de glutaminas. Las bandas n° 4 de estos aislados mostraron un tamaño similar a la correspondiente banda n° 4 de la cepa silvestre BY (en torno a los 450 pb), de hecho mostraron un número de glutaminas muy similares.

Para comprobar si la diferencia de tamaño observado en la doble proteína Sl2 era debido exclusivamente a las diferencias observadas en esta región de repeticiones o también existían diferencias en la región anterior a estas repeticiones, región muy conservada entre las especies del complejo *sensu stricto*, se procedió a la amplificación de dicha región. Para ello se realizó la amplificación por PCR mediante la combinación del cebador externo slt2 5' y el cebador interno slt2 3'i (ver Figura 46), que amplificarían una región de unas 1050 pb aproximadamente, según la secuencia de la cepa S288c disponible en bases de datos.

Se amplificó dicha región para el aislado N° 60 y la cepa silvestre BY, obteniéndose una única banda para las dos cepas, de unos 1080 pb, tal y como se muestra en la Figura 49.

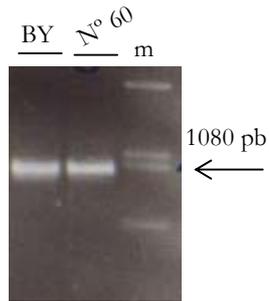


Figura 49. Amplificación por PCR de la región anterior a la zona de repeticiones. Se amplificó esta región para la cepa salvaje BY y el aislado clínico N° 60, mediante la combinación de los cebadores slt2 5' x slt2 3'i. El marcador utilizado fue λ DNA digerido con la endonucleasa *Pst* I (carrera m).

A continuación se procedió a la purificación, secuenciación y análisis de dichas bandas mediante la versión 3.1 del programa informático MEGA. Los resultados obtenidos fueron muy interesantes, ya que la secuencia de dicho fragmento de amplificado para el aislado N° 60, revelaba que efectivamente existían varias copias solapadas prácticamente idénticas, con la excepción de ciertos nucleótidos que en la secuencia aparecían como indeterminaciones, pero que cuando se estudiaron con detenimiento los cromatogramas de cada hebra, se observó que en dichas indeterminaciones existían dos picos con dos bases diferentes, que el programa traducía como un error. Al analizar en profundidad dicha secuencia se determinaron un total de 7 indeterminaciones a las cuales se les asignó una letra, de acuerdo con el Código IUPAC de incertidumbres nucleotídicas. Teniendo en cuenta las dos bases posibles que aparecieron en cada una de las posiciones, se estudió cual sería el aminoácido que codificaría cada una de las posibles combinaciones. Para ello las secuencias se tradujeron a la secuencia aminoacídica mediante el programa MEGA 3.1 y se observó que los cambios eran sinónimos, es decir, que se obtenía el mismo aminoácido fuese cual fuese la base que tuviese en cada posición. Es decir, que independientemente del nucleótido que se seleccionase, la secuencia aminoacídica no se veía afectada y por tanto se obtendría la misma proteína Sl2. Estos resultados se muestran en la Figura 50.

Por tanto, si las 7 posiciones son sinónimas, las proteínas que se obtengan de los diferentes alelos que muestra el aislado N° 60 para el gen *SLT2*, serán idénticas en secuencia entre ellas y a la cepa de laboratorio, aunque diferentes en el tamaño, debido a las variaciones que muestran en la región de los microsatélites. Este resultado confirma con mayor firmeza, que las dos bandas observadas corresponden a dos formas de la MAPK Sl2.

Puesto que los resultados indicaban que este aislado tenía más de dos copias, al menos para este gen, se planteó estudiar la dotación genética de este aislado. Como primera aproximación se hizo esporular el aislado, en un medio adecuado (medio acetato descrito

en la Tabla 7 de materiales y métodos) y se obtuvieron ascas con diferente número de esporas en su interior, 2, 3 y 4 esporas. La presencia de diferente número de ascosporas en las ascas para una cepa, ha sido ampliamente observado entre las cepas industriales de *S. cerevisiae*, relacionándose con fenómenos de aneuploidía, lo cual indica que son cepas que muestran un incremento de su dosis génica (Barrio y col., 2006). Por tanto, podría considerarse que el aislado N° 60 fuera aneuploide, de manera que para conocer exactamente la dotación cromosómica de este aislado se utilizó la técnica de Citometría de Flujo (realizado en el Centro de citometría de flujo y microscopía confocal de la Universidad Complutense de Madrid). Sin embargo, los resultados obtenidos al emplear esta técnica no permitieron conocerse con exactitud la dotación génica de esta cepa, debido a que este aislado crece formando pequeñas cadenas de 6 a 8 células en condiciones normales de crecimiento y desde las primeras generaciones, de manera que cuando el haz de láser focalizado incidía sobre las células que se encontraban en suspensión, no cuantificaba el contenido de DNA de una célula única, sino de cadenas formadas con un número diferente de células. En la Figura 51 se muestra el resultado de citometría de flujo obtenidos para esta cepa.

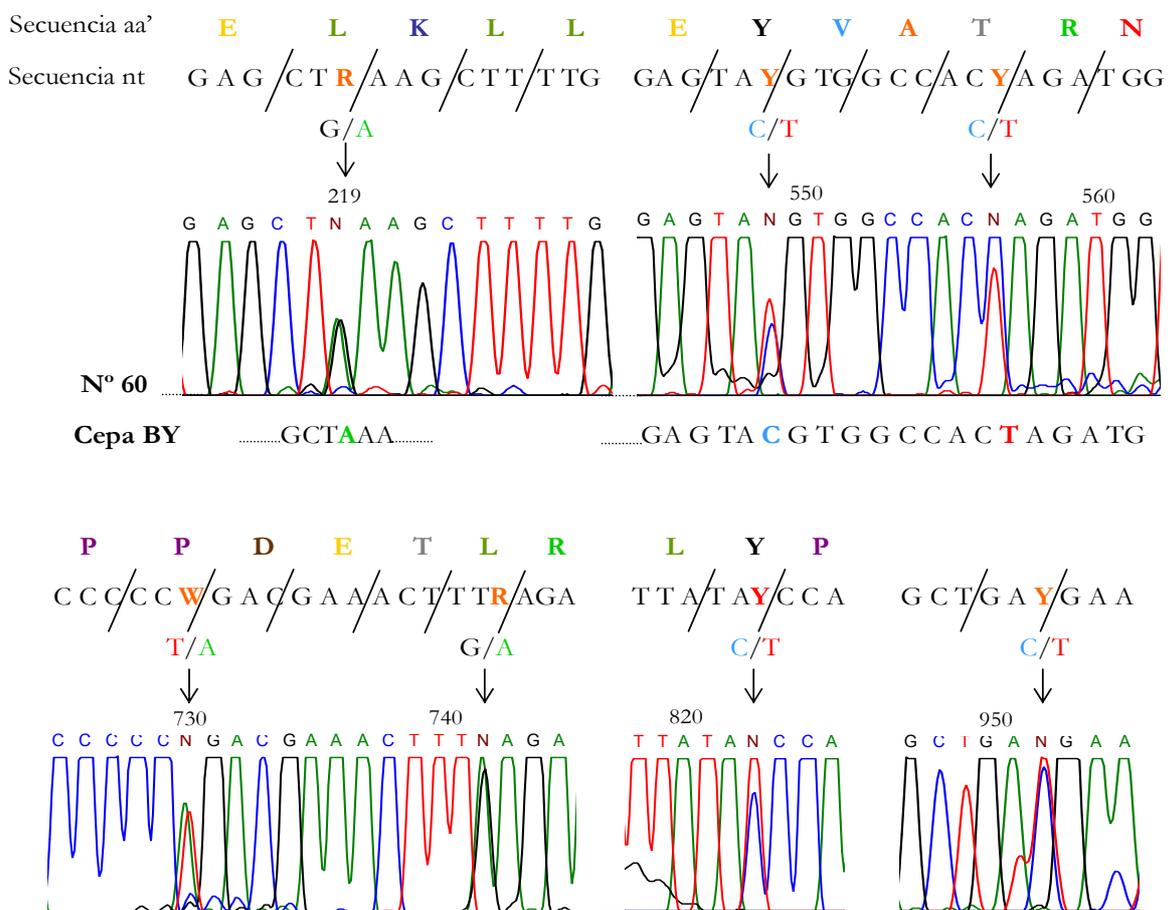


Figura 50. Secuencia anterior a la región de repeticiones. Esta región fue amplificada empleando la combinación de cebadores slt2 5' x slt2 3' para la cepa BY y el aislado clínico N° 60. Los nucleótidos señalados con una N en el cromatograma reflejan el error ante la existencia de dos picos que muestran igual intensidad. En la parte superior del cromatograma aparece la secuencia nucleotídica (nt) y por encima la secuencia aminoacídica (aa') correspondiente. En la parte inferior de la secuencia del aislado N° 60 aparece la correspondiente para la cepa silvestre BY. Los cambios de nucleótidos se designan bajo unas letras determinadas, según la codificación establecida por el Código IUPAC de incertidumbres nucleotídicas: **W** (A/T); **R** (G/A); **Y** (C/T); **S** (G/C); **M** (A/C) y **K** (T/G). Los cambios concretos se señalan con las letras correspondientes en amarillo y con una flecha los nucleótidos posibles para cada caso.

Aunque el análisis por citometría de flujo no permitió conocer la dotación genética de este aislado, sugería que no debía ser un diploide perfecto. Por tanto, se puede concluir que el aislado N° 60 es aneuploide, lo que implica que mostrará un incremento en el número de copias de algunos genes, entre los que se encontraría el gen de la MAKP Slt2.

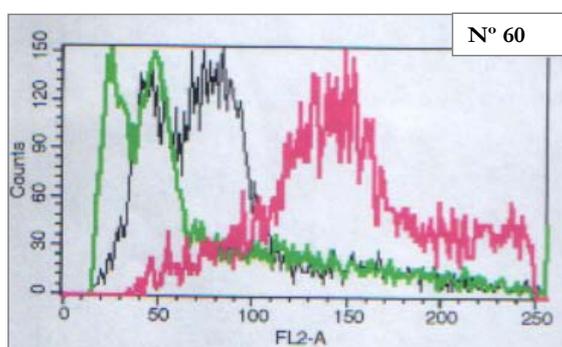


Figura 51. Citometría de flujo del aislado clínico N° 60. En el histograma de la parte izquierda de la figura se representa en color verde una cepa control haploide, en negro una cepa control haploide y en color rosa se muestra el aislado N° 60.

4.2. “Cinta roja” y el grupo de aislados clínicos con origen de panadería

Al igual que se ha realizado con los aislados clínicos, que mostraron 2 formas para la proteína Slt2, con las cepas de panadería Cinta roja y el aislado clínico F27 se amplificó con los cebadores slt2 5i' y slt2 3', la región de microsatélites situada en el extremos 3' del gen, con la finalidad de determinar si el gen *SLT2* de estas cepas muestra variación en el número de repeticiones.

Los resultados obtenidos tras amplificar dicha región, revelaron dos fragmentos de amplificado con un tamaño similar, tanto para la cepa “Cinta roja” como para el aislado clínico F27 (Figura 47). Tal y como se ha descrito en el Capítulo 1, el estudio del origen de colonización mostró que estas cepas no solo compartían patrón molecular, sino que además el aislado F27, junto con 2 aislados más del mismo grupo, resultaron ser aislados con origen panadero, ya que cumplieron las características típicas de las cepas panaderas, una alta actividad fermentativa y actividad maltasa. Teniendo en cuenta que la cepa panadera y F27 mostraban dos bandas de amplificado para la región de repeticiones, se decidió amplificar dicha región en los otros dos aislados con origen panadero, el aislado genital N° 75 y el aislado de heces N° 20 y comprobar si estos aislados compartían también la misma característica. Y como puede observarse en la Figura 52, estos aislados mostraron también dos bandas n° 3 y 4 para la región de microsatélites, de 430 pb y 480 pb respectivamente, iguales en tamaño que las amplificadas para “Cinta roja” y F27, datos que confirman que todas las cepas que presentaban el mismo patrón molecular que la cepa panadera, deben tener el mismo origen.

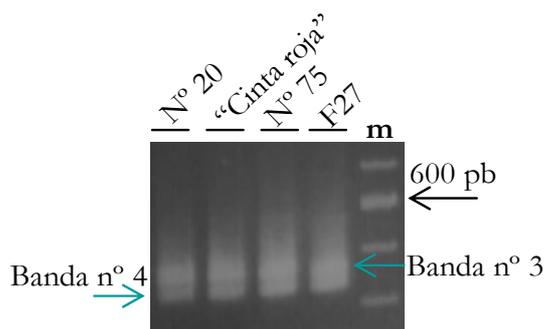


Figura 52. Amplificación por PCR de la región de repeticiones. Se amplificaron las bandas n° 3 y 4 para la cepa de panadería “Cinta roja” y los aislados clínicos n° 20, 75 y F27, los cuales tienen un origen en panadería. El patrón de peso molecular (m) es el de “100bp DNA ladder” de Gibco-BRL.

Siguiendo el esquema de trabajo, detallado en el apartado 4, se procedió a la amplificación del gen completo *SLT2*, observándose una única banda de amplificado, con el tamaño de 1,2 kb esperado para este gen. A continuación, se purificaron y secuenciaron dichos productos de amplificado del gen completo para este grupo de cepas. Las secuencias fueron también analizadas empleando la versión 3.1 del programa informático MEGA, observándose que, aunque en el gel de agarosa únicamente se observaba una sola banda de amplificado para el gen completo, las secuencias mostraban que en ese producto de amplificado había más de dos copias. Tal y como ocurrió con el aislado clínico N° 60, en la Figura 53 se muestra solo una parte de la secuencia total del gen que comprende el inicio de

la región de repeticiones y un parte de la región anterior a ésta, leídos en dirección 3' a 5' del gen.

El análisis de las secuencias mostró que los aislados clínicos y la cepa “Cinta roja” tenían fragmentos de distinta naturaleza en la única banda amplificada del gen *SLT2*. El solapamiento de picos observados en los cromatogramas de la zona anterior a las repeticiones, indicaba que existían al menos tres alelos para este gen en el caso de “Cinta roja” y los aislados clínicos N° 20 y 75, mientras que en el cromatograma del aislado clínico de sangre F27 únicamente se observaron dos picos en las regiones solapadas, lo cual indicaba que al menos tendría dos alelos diferentes en tamaño, debido a diferencias en el número de repeticiones, aunque no se puede descartar que tengan más de dos alelos, algunos iguales en el tamaño de las repeticiones. Con todo ello, el estudio se centró en el análisis de la secuencia para el gen completo de la cepa “Cinta roja” y el aislado de sangre F27. En la Figura 54 se muestran por separado las copias que aparecían solapadas en la secuencia completa del gen *SLT2*.

Al analizar las secuencias completas solapadas de la cepa “Cinta roja”, se observaron tres secuencias diferentes en el número de repeticiones de la región de microsatélites. Una secuencia larga de 18 repeticiones; una intermedia de 16 y una corta de 14 repeticiones (Figura 54). Por lo que respecta al aislado F27, se diferenciaron 2 secuencias que mostraban 4 repeticiones de diferencia entre sí, la banda superior con 18 repeticiones y la inferior con 14 repeticiones. Por tanto, estos resultados muestran que efectivamente estas cepas cuentan con al menos 2 alelos diferentes, para este gen. En el caso de la cepa de panadería se han observado al menos tres alelos, aunque de nuevo no se puede descartar que más alelos idénticos a alguna de los otros 3 y lo mismo puede decirse para el aislado clínico F27, el hecho de observar 2 copias diferentes, no descarta la posibilidad de que exista una tercera o cuarta, que sean iguales a las 2 copias observadas.

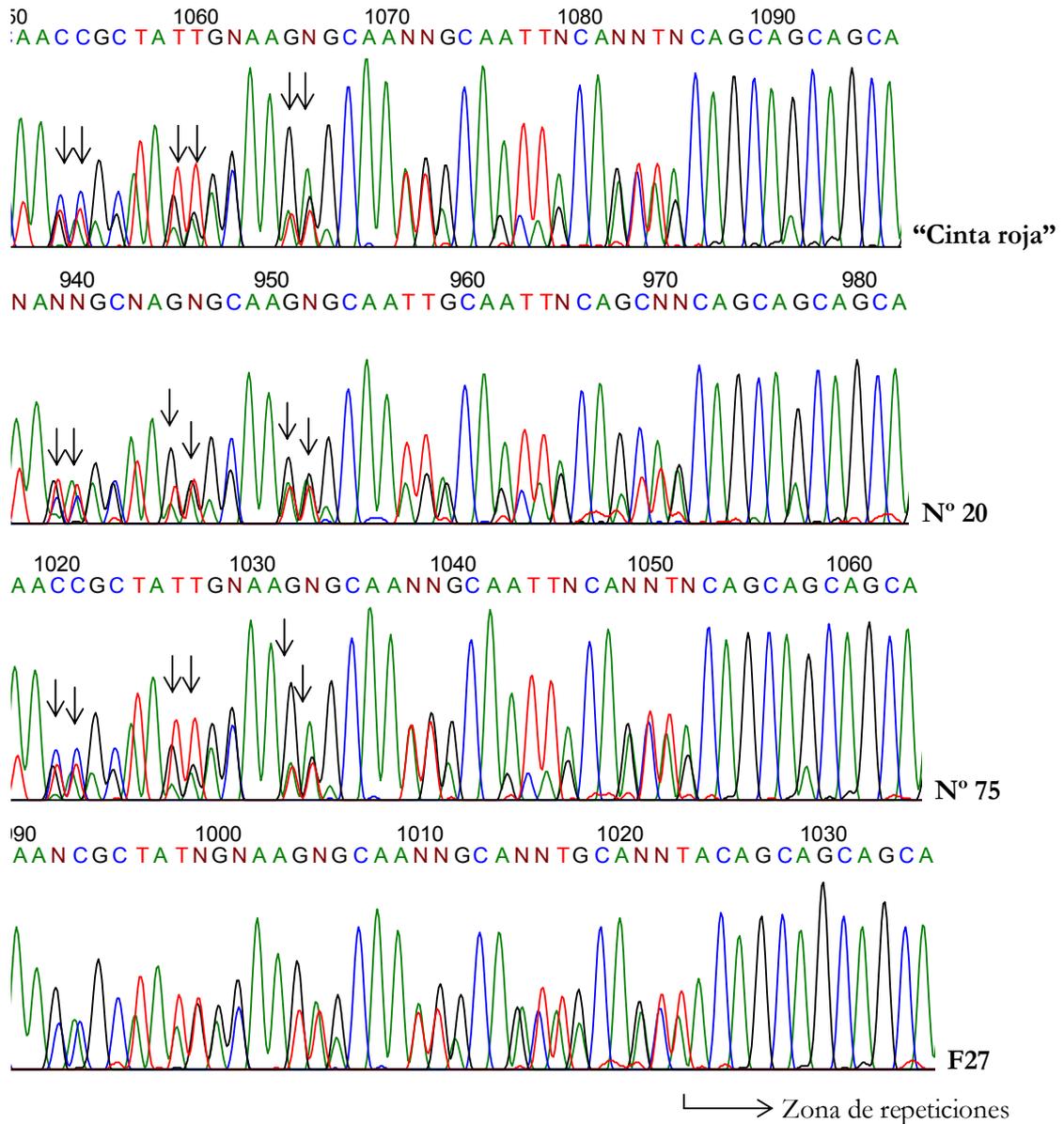


Figura 53. Secuencia del fragmento amplificado para el gen *SLT2*. En la figura solo se muestra parte de dicha secuencia que comprende una región anterior a la zona de repeticiones y el inicio de dichas repeticiones indicado con una flecha en la parte inferior de la figura. En los puntos donde existen solapamiento de tres picos se señalan con una flecha en vertical. Las secuencias que se leyeron en dirección 3' a 5'.

Estos resultados concuerdan con el carácter poliploide que está descrito para las cepas de panadería (Codón y col., 1998), de hecho se sabe que la cepa de panadería “Cinta roja” es aneuploide, cercana a la triploidía. En el caso del aislado de sangre F27, se esperaría

que también tuviese una dotación cromosómica mayor a $2n$. Los datos de esporulación, confirmaron que se trataba de una cepa aneuploide, puesto que se observaron 2, 3 y 4 ascosporas por ascas, y tal y como se mencionó anteriormente este fenómeno está descrito para las cepas industriales de *S. cerevisiae*, a su dotación cromosómica aneuploide. El análisis del contenido en DNA estudiado mediante citometría de flujo, permitió confirmar que no se trataba de una cepa diploide perfecta (Figura 55). De todos modos, los datos sugieren que quizás este aislado clínico (F27), podría tener una ploidía menor a la observada para “Cinta roja”. El valor de 2,33 significa que presenta polisomía para algunos de sus cromosomas.

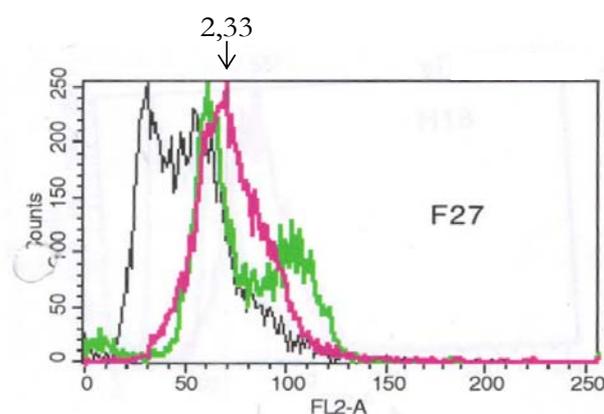
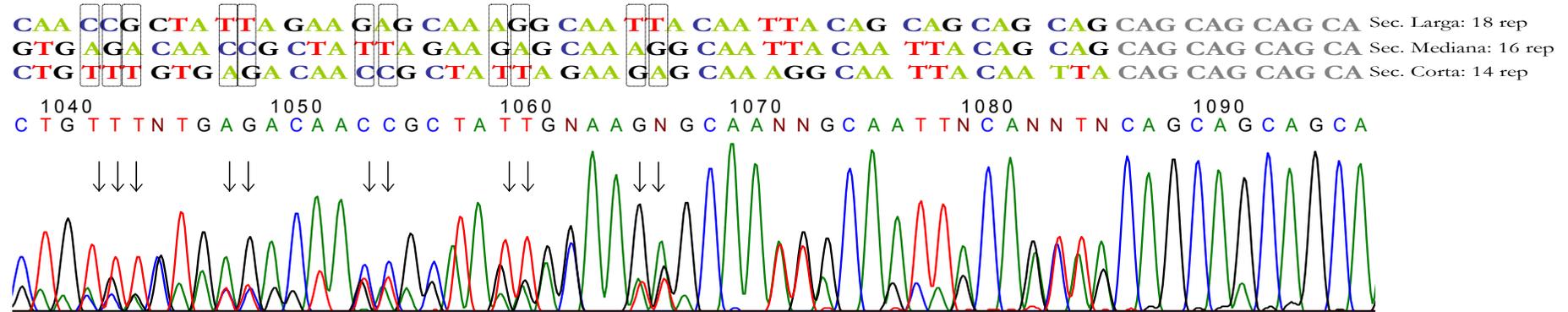


Figura 55. Citometría de flujo del aislado clínico F27. En el histograma de la parte izquierda de la figura se representa en color verde una cepa control haploide, en negro una cepa control diploide y en color rosa se muestra el aislado F27.

Al igual que el caso de los aislados clínicos con doble banda para *Slt2*, la cepa “Cinta roja” y el aislado clínico F27 son cepas aneuploides, que tendrán alterada su dotación cromosómica, de hecho los resultados muestran que efectivamente contiene más copias para el gen de la MAPK *Slt2*. Este fenómeno era de esperar en el caso de la cepa panadera comercial, puesto que se sabe que está cercana a la triploidía, pero en el caso del aislado de sangre, aunque también se observa que no es diploide perfecto, los datos sugieren que tendrá una ploidía inferior a “Cinta roja”. De manera que se plantea la hipótesis de si el paso por un hospedado habría causado, en esta cepa en concreto, un cambio en su dotación, que quizás explicaría la pérdida de actividad fermentativa observada para F27 y el resto de aislados clínicos con origen panadero.

En cualquier caso, los resultados han mostrado que todos estos aislados clínicos (Nº 60, 61, 70 y 102; Nº 20, 75 y F27), junto con la cepa de panadería, contienen un mayor número de copias, del gen *SLT2*, aunque no se ha podido determinar cual sería el efecto de tener más de dos copias diferentes en tamaño, para la MAPK *Slt2*.

A: Cepa de panadería “Cinta roja”



B: Aislados de sangre F27 con origen de panadería

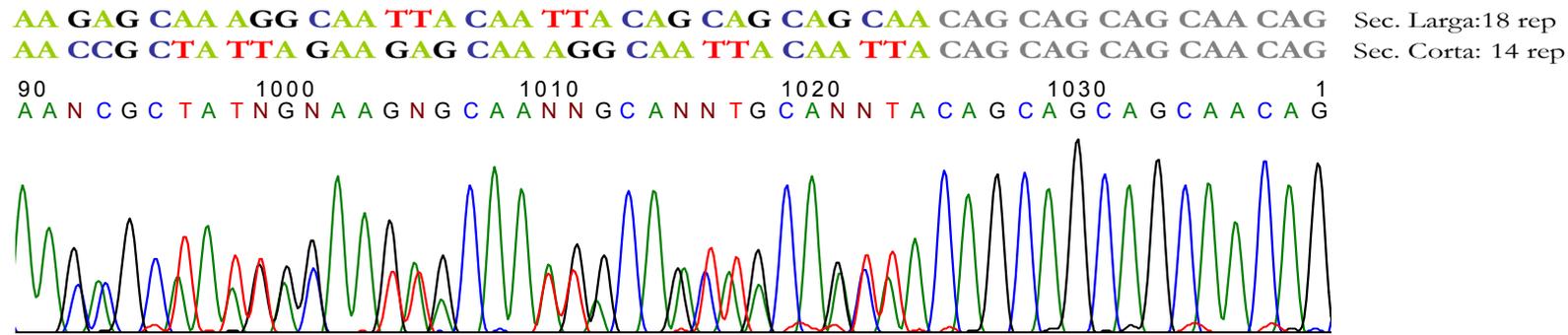


Figura 54. Secuencias observadas para el fragmento amplificado del gen *SLT2*. En la figura solo se muestra parte de dicha secuencia que comprende un fragmento de la región anterior a la zona de repeticiones y el inicio de ésta, para la cepa panadera (A) y el aislado clínico F27 (B). La zona marcada en color gris comprendería la región de repeticiones idénticas para las tres secuencias. En el caso de la cepa de panadería, los picos donde existen tres secuencias solapadas se enmarcan con una flecha, así como los tres nucleótidos correspondientes que se encuadran en un recuadro punteado.

5. Discusión

Las rutas de señalización celular juegan un papel importantísimo en la adaptación de los organismos ante estímulos que reciben del medio que los rodea. Las células eucariotas poseen diferentes cascadas de transducción de señal que median la comunicación entre las señales del ambiente y la maquinaria celular que finalmente controlan el crecimiento y la diferenciación celular. Entre las rutas de transducción de señales están la ruta dependiente del AMP cíclico y las mediadas por las MAPK. Ambas rutas responden a estímulos extracelulares como hormonas, diferentes estreses como el nutricional, regulando diversos procesos fisiológicos, para adaptarse a los estímulos detectados.

Por lo que respecta a *S. cerevisiae*, además de poseer las dos rutas anteriormente citadas, también dispone de otras rutas de transducción de señales nutricionales, como son la cascada TOR (Target of rapamycin) u otras rutas de señalización de glucosa (Gagiano y col., 2002). Puesto que recientemente se ha descrito que las rutas mediadas por MAP quinasas están involucradas en la patogénesis de diferentes levaduras y hongos patógenos como es el caso de *C. albicans* (Alonso-Monge, y col., 1999), *Botrytis cinerea* (Zheng y col., 2000), *C. neoformans* (Kruppa, y Calderone, 2006) o *Fusarium oxysporum* (Di Pietro y col., 2000), el trabajo se centró en el estudio de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPK's

El estudio de las MAPKs Kss1, Slt2 y Fus3 en condiciones de no activación para las rutas que median estas proteínas, reveló la existencia de un grupo de 9 cepas que mostraban diferentes grados de activación para Slt2 y Kss1. En ningún caso se observó activación basal de la MAPK Fus3. Por lo que respecta a Kss1, se observaron dos cepas que en condiciones normales mostraban sobre activada esta proteína, el aislado de sangre F3 y la cepa de *S. boulardii*. Este fenómeno podría explicar la morfología celular elongada que ambas exhiben, y además, podría ser una prueba más del gran parecido que muestran estas dos cepas, pues como se observó anteriormente, comparten patrón molecular y aparecen filogenéticamente relacionadas según las secuencias del gen *COX 2*.

Aunque no se ha abordado el porqué tienen estas dos cepas activada Kss1 de forma basal, quizás tenga que ver con los efectos beneficiosos que hacen de *S. boulardii* ser probiótico en el tratamiento de diarreas, como es disponer de buenas propiedades adhesivas (van der Aa Hühle y col., 2005). En *S. cerevisiae* el fenómeno de adhesión célula a

célula se aprovecha en procesos industriales para la separación de biomasa de los productos fermentados, pero además, la adhesión es un fenómeno de respuesta a cambios del ambiente, como limitación de nitrógeno y/o carbono, cambios en el pH o altos niveles de etanol. Además de poder tener un aspecto beneficioso para la salud o industrial, este mecanismo es crucial en la patogénesis fúngica, ya que los patógenos necesitan adherirse a tejidos del hospedador para establecer un foco de infección (Verstreppen y Klis, 2006). Y entre las rutas que median el fenómeno de adhesión está la ruta del crecimiento pseudohifal, mediada por la MAPK Kss1, que regula la expresión del gen *FLO11*. Éste gen media la adhesión célula-superficie bajo ciertos factores de estrés y/o una limitación nutricional, además de estar implicado en procesos de infección de plantas (Prusty y col., 2004). Por ello, nos planteamos como hipótesis que, al menos para estas dos cepas, pueda existir una relación entre la activación basal de Kss1 y la activación constitutiva de *FLO11*, dando lugar a células más elongadas y, quizás, con mayor capacidad para adherirse a superficies, pudiendo facilitarles la colonización, invasión e infección en un hospedador.

Un distinto grado de activación de Slt2 en condiciones basales, fue observado entre las cepas estudiadas. Por un lado se observó una activación mayor que en la cepa BY4741, en el caso de la cepa de panadería “Cinta roja”, la cepa vínica ICV-17 y el aislado F27. La MAPK Slt2 media la ruta de integridad celular, que se encarga de mantener una pared celular estable y dinámica a lo largo de toda la vida de la célula, adaptándose a los cambios, y modificándose según los requerimientos fisiológicos. El hecho de observar una activación basal de Slt2 para estas cepas podría haberse traducido en algún tipo de alteración a nivel de la pared celular. Por este motivo, se realizaron los ensayos de sensibilidad/resistencia al blanco de calcoflúor y el Rojo congo, sustancias que son incapaces de atravesar la membrana plasmática y se unen preferentemente a la quitina presente en la pared celular de la levadura, interfiriendo en el ensamblaje correcto de los componentes de la misma (Roncero y Durán, 1985). En general las 9 cepas mostraron resistencia frente al Rojo congo y las únicas diferencias en el crecimiento se vieron para el Blanco de calcoflúor, siendo significativas respecto a la cepa BY4741, en el caso del aislado N° 102 (que mostró resistencia) y los aislados N° 60 y 70, junto con *S. boulardii* y la cepa ICV-17 que mostraron sensibilidad. Las diferencias observadas en el comportamiento frente al calcoflúor, para los aislados N° 60 y 102, junto con el crecimiento en cadenas y la formación de agrupaciones que estos aislados exhibían, podría relacionar la presencia de las dos bandas para Slt2, con algún tipo de alteración en sus paredes celulares. Sin embargo, no se observaron cambios en la composición de quitina que pudieran explicar estos resultados. No obstante no

podemos descartar que la pared celular de estos aislados muestre alguna alteración, como resultado de la doble banda de Slt2.

La presencia de esta banda adicional para la proteína Slt2 planteó, en principio, ciertas dudas sobre su identidad, puesto que no se había encontrado ningún trabajo con un caso similar en la bibliografía para *S. cerevisiae*. Sin embargo, la confirmación de que se trataba de Slt2, mediante el uso del anticuerpo específico para esta MAPK, hizo que se valoraran distintas hipótesis a cerca de su origen y de la contribución que pudiera tener. Puesto que esta doble banda de la proteína Slt2 se apreció precisamente en dos aislados considerados virulentos (tal y como se detalló en el estudio de patogenicidad y virulencia), abría la posibilidad de que pudiera ser una característica relacionada con su virulencia, pero los ensayos *in vivo* realizados para los aislados N° 61 y 70, confirmaron que la doble banda posiblemente no está directamente relacionada con la virulencia, puesto que estos dos aislados mostraban baja colonización y no causaron mortalidad alguna. Concretamente el aislado N° 61 compartía patrón molecular y origen de aislamiento con el N° 60, lo cual confirmaba firmemente que no debía existir una relación directa entre virulencia y las dos bandas de Slt2. Por tanto, no se ha podido establecer una relación entre la presencia de la doble banda de Slt2 en estos aislados con alguna característica fenotípica diferencial que pudiera relacionarse con la virulencia de los aislados N° 60 y 102. Quizás la activación basal de Slt2 y la presencia de dos proteínas Slt2, genere algún cambio en la pared celular de estos aislados que les confiera alguna ventaja al permitirles persistir mejor en el hospedador, como la evasión de las defensas, o una mayor resistencia a condiciones hostiles.

Por otro lado, se plantearon cual podía ser el origen de esta banda adicional de proteína Slt2. Podría ser producto de modificaciones postraduccionales, que dieran lugar a dos proteínas con diferente tamaño, o bien que estas cepas pudieran mostrar alelos diferentes de este gen, que dieran lugar también a proteínas diferentes en tamaño. Las estrategias seguidas se encaminaron a abordar el análisis molecular del gen *SLT2*. Mediante la amplificación del gen *SLT2* se confirmó la veracidad de la segunda de las hipótesis, los aislados con dos proteínas, también mostraban dos fragmentos de amplificado para este gen. Por tanto, los aislados clínicos N° 60, 61, 70 y 102 tenían dos alelos para el gen *SLT2*, diferentes en tamaño, que daban lugar a las dos proteínas observadas. Sin embargo, se ha podido confirmar que, tanto estos aislados como para la cepa pandera “Cinta roja” y los 3 aislados que comparten con ella el patrón molecular y origen en panadería (N° 20, 75 y F27), no son diploides perfectos y muestran más de dos alelos para el gen *SLT2*. El análisis de la secuencia del gen *SLT2* para el complejo *sensu stricto*, reveló que este gen contiene una

región de repeticiones de codones CAA CAG de glutamina, que comprende unas 500 pares de bases, y se localiza cerca de la región 3'. Efectivamente, el estudio de la región de repeticiones o microsatélites en las diferentes cepas, determinó que los alelos eran diferentes porque mostraban un número de repeticiones distintas, de hecho se confirmó para el aislado N° 60, que en la región anterior a las repeticiones, las 7 bases diferentes eran sinónimas, es decir que codificarían el mismo aminoácido y por tanto la proteína sería la misma en secuencia, pero diferente en tamaño. Este resultado constituye un dato más de que la banda adicional es la proteína Slt2. Sin embargo, no solo se observó una diferencia en el tamaño de los alelos, como consecuencia de la variabilidad en el número de repeticiones, sino que además se pudo confirmar que estos aislados contenían más de dos copias de este gen.

Por tanto, el estudio inicial que planteaba analizar el grado de activación a nivel basal de las MAPKs Slt2, Kss1 y Fus3, ha revelado, por un lado, que los aislados clínicos muestran una ploidía superior a $2n$, al igual que ocurre con cepas industriales, lo que podría conferirles ventajas para desarrollarse en un nuevo ambiente, como es un hospedador. Sin embargo, a su vez las copias del gen *SLT2* revelaron diferencias en su tamaño, como consecuencia de la variación en el número de repeticiones de los trinucleótidos CAA/CAG presentes en una región de microsatélites, situada hacia la región 3' del gen, que a su vez se traduce en un número variable de glutaminas en la proteína Slt2.

Las repeticiones de glutaminas, son frecuentes entre los organismos eucariotas.

La presencia de un número variable de repeticiones de glutaminas en la MAPK Slt2, que ha podido dar lugar a una segunda proteína diferente en ciertos aislados, no parece ser un fenómeno aislado, es más, *S. cerevisiae* se caracteriza por ser un organismo eucariota que contiene gran número de microsatélites distribuidos en sus 16 cromosomas (Field and Wills 1998), localizándose tanto en los genes como en las regiones intergénicas. Son regiones inestables que generan polimorfismo en los alelos, hecho que ha permitido que se empleen como marcadores moleculares en la diferenciación de cepas de la misma especie (Hennequin y col., 2001). Pero, concretamente las repeticiones de los trinucleótidos que dan lugar a repeticiones variables de glutaminas constituyen un tema de estudio actual, ya que están involucradas en ciertos desordenes neurológicos severos que suceden en humanos. Entre estas enfermedades neurodegenerativas se encuentran la enfermedad de

Huntington, la distrofia muscular y la ataxia de Friedreich (Ashley y Warren, 1995). Los mecanismos responsables de estas largas expansiones no se conocen con exactitud, pero lo más llamativo es que para muchas de estas enfermedades, las repeticiones anormales hacen que las proteínas resultantes contengan porciones repetitivas inusualmente largas del aminoácido glutamina (Gln) (Reddy y Housma, 1997). Además, recientes estudios ponen de manifiesto que, en los trastornos neurodegenerativos, parece ser un tema recurrente el tener copias adicionales de una proteína normal, no sólo de una proteína mutada, pudiendo causar una patología (Tsuda y col., 2005).

Por lo que respecta a otros organismos, estas repeticiones de glutaminas parecen jugar un papel importante, como es el caso de *Drosophila melanogaster*, la mayoría de las proteínas que las contienen, están implicadas en el desarrollo del sistema nervioso central (Karlín y Burge, 1996). O el caso de *S. cerevisiae*, donde las repeticiones de glutaminas son muy frecuentes entre las repeticiones de trinucleótidos, que aparecen distribuidas a lo largo de los cromosomas, siendo muy frecuentes en los factores de transcripción y proteínas quinasas (Albá y col., 1999). Existen evidencias de que cambios en la longitud de las repeticiones de Gln, pueden afectar a la función de la proteína, como es el caso particular del receptor andrógeno (Kazemi-Esfarjani y col., 1995), o que éstas u otras repeticiones aminoacídicas pueden participar entre interacciones proteína-proteína (Pinto y Lobe, 1996), e incluso hay evidencias de que cambios de pauta en las regiones codificantes son deletéreas (Lanz y col., 1995). Todos estos casos han hecho pensar que los cambios en la longitud de las repeticiones pueden producir la selección de fenotipos en algún nivel, al generar alguna función positiva, como ocurre en plantas, donde una inserción de un tramo de Gln homopoliméricas en el interior de un factor de transcripción, proporciona un mayor nivel de expresión de los genes diana (Schwechheimer y col., 1998). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha demostrado si las repeticiones aminoacídicas pueden jugar un papel adaptativo en las funciones de las proteínas.

Se ha planteado que el hecho de que las repeticiones de Gln ocurran principalmente en componentes que forman parte de los sistemas de señalización celular, da pie a especular que cambios en la longitud de las repeticiones en estos sistemas, podría alterar su funcionamiento y por tanto contribuir a su diversificación evolutiva, pudiéndose dar con relativa rapidez, puesto que la tasa de mutaciones que suceden en los microsátélites es muy elevada (Hancock, 1999). Además, parece ser que entre los eucariotas, la incorporación de repeticiones en su DNA constituye un mecanismo molecular para adaptarse a cambios en el medio que los rodea, como son la presencia de condiciones de

estrés. Por ello en el caso de *S. cerevisiae*, la incorporación de estas repeticiones en proteínas de regulación (factores de transcripción y proteína quinasa), podría ser una manera rápida de contribuir a la evolución de nuevos fenotipos adaptativos (Young y col., 2000). Los mecanismos que dan lugar a la evolución de los microsatélites en los genes, incluyen el deslizamiento transitorio de la cadena naciente fuera de fase con respecto a la cadena molde, al producirse errores durante la replicación del DNA como consecuencia del bloqueo de la horquilla de replicación de la región repetitiva (Tachida y Iizuka, 1992); o bien debido a procesos de recombinación y conversión génica entre las hebras de DNA con diferencias en el número de repeticiones (Li y col., 2002).

Por tanto, nuestros resultados proporcionan un caso más de este fenómeno que ocurre de forma habitual en *S. cerevisiae*. Lo que no podemos concluir es, si estas diferencias en las repeticiones de glutaminas para la MAPK Slt2 observadas en estos aislados, se hubieran podido fijar durante del paso por el hospedador de estos aislados, puesto que este nuevo hábitat podría constituir un mecanismo de presión selectiva sobre variantes en el número de repeticiones.

La ploidía podría tener un efecto en la virulencia de *S. cerevisiae*.

Los aislados N° 60, 61, 70 y 102 mostraron la doble banda para la proteína Slt2. Por otra parte comprobamos mediante la amplificación por PCR de la región de repeticiones la presencia de 3 fragmentos diferentes en tamaño, lo cual indicaba que estos aislados al menos tendrían tres copias para este gen. Además, se confirmó que dicha banda correspondía en secuencia a la proteína Slt2. Lo mismo ocurrió para el grupo de la cepa “Cinta roja” y los aislados que comparten con ella patrón molecular y origen panadero (N° 20, 75 y F27), puesto que la secuenciación del único fragmento amplificado para el gen *SLT2*, reveló la existencia de más de tres copias para este gen, que a su vez se diferenciaban precisamente en el número de repeticiones CAA CAG que contenían. Por tanto, estos estudios, junto con los datos de esporulación (no mostraron una esporulación perfecta de tétradas, sino que daban ascas con 2 y 3 esporas), confirmó que estos aislados clínicos no poseían una dotación génica diploide, sino que se trataba de aislados aneuploides. Tal y como se comentó anteriormente, una esporulación de este tipo se relaciona con cepas industriales de *S. cerevisiae* que muestran también aneuploidías, y que han tenido lugar como resultado de mecanismos de evolución, que les confiere ciertas ventajas para sobrevivir y desarrollar los procesos industriales (Eladio y col., 2006). De la misma manera, es posible

que el hecho de contener mayor número de copias para ciertos genes, *SLT2* en este caso concreto, les confiera también ciertas ventajas para poder persistir, colonizar o invadir un hospedador. En estudios anteriores (Clemons y col., 1997), destacaban el carácter heterocigótico de los aislados clínicos para muchos loci, además de observar que entre los aislados clínicos virulentos, no solo había diploides, sino que muchos de los aislados clínicos eran tetraploides o próximos a la tetraploidía, e incluso podrían tratarse de alotetraploides o híbridos entre las especies *S. paradoxus* y *S. cerevisiae*.

Por tanto, parece claro que entre los aislados clínicos la aneuploidía puede ser un rasgo genético común. Sin embargo, se plantea la duda de si estos aislados contaban con esta propiedad antes de pasar por un hospedador, o han sufrido algún cambio genético como consecuencia del nuevo ambiente en el que se encuentran. No sería descabellado pensar que podría haber sucedido el segundo caso, si tenemos en cuenta que fenómenos similares se han descrito para cepas industriales de *S. cerevisiae*, los cuales sufren reordenaciones cromosómicas, como consecuencia de mecanismos evolutivos de adaptación, a condiciones que suponen cierto estrés a la levadura (Codón y col., 1998; Puig y col., 2000). Además de los casos similares que han sido descritos para *C. albicans*, ya que tras el paso de una infección sistémica, se han observado tanto reordenaciones cromosómicas, que dan lugar a aneuploidías, trisomías de cromosomas completos, como es el caso del cromosoma 1 (Chen y col., 2004; Magee y Magee, 1997), hasta la obtención de tetraploides tras el proceso de apareamiento, después de una infección sistémica (Magee y Magee, 2000). Por tanto podríamos plantearnos la posibilidad que hubiese sucedido un fenómeno similar en los aislados clínicos de *S. cerevisiae*, tras haber pasado por un hospedador.

Es difícil abordar esta hipótesis, desde luego sabemos que fenómenos similares ocurren entre las cepas comerciales de *S. cerevisiae*, tal y como se comentó en la discusión del apartado sobre virulencia y patogenicidad. Quizás estos mismos fenómenos sucedan cuando una levadura pasa por un hospedador, puesto que encontrará condiciones desfavorables (resistencia a las defensas del hospedador, crecimiento bajo condiciones limitantes, adaptación a un nuevo nicho), que requerirán la expresión de patrones determinados de genes y quizás dicha expresión dependa de la ploidía de la cepa. De hecho, Galitski, y colaboradores (1999) pusieron de manifiesto que la ploidía tenía un efecto sobre la regulación de ciertos genes en *S. cerevisiae*, como era el caso concreto de la represión del gen *FLO11*, que está relacionado el crecimiento invasivo y pseudohifal. Explicaban la regulación de la expresión de determinados genes por la ploidía, en términos de dosis

génica o debido al contenido total de DNA. A raíz de estos datos se nos plantea que quizás la ploidía juegue un papel importante en la virulencia de *S. cerevisiae*. ¿Serían los aislados originales diploides?, ¿Siendo originariamente diploides, habrán sufrido un cambio genético, que haya dado lugar a las aneuploidías que hemos observado? ¿La condición de aneuploide podría afectar a la virulencia de estos aislados?

Para responder a algunas de las preguntas que se nos plantea, debemos tener en cuenta trabajos como el llevado a cabo por Ibrahim y colaboradores (2005), en el cual muestran como las cepas tetraploides de *C. albicans*, generadas durante el apareamiento que tiene lugar en una infección sistémica, son menos virulentos que las cepas diploides y el hecho de no observar tetraploides entre los aislados clínicos de *C. albicans*, plantea la posibilidad de que éstos puedan sufrir cambios de ploidía durante la infección, bien porque intrínsecamente sean menos capaces de sobrevivir a las defensas del hospedador o por competencia con los diploides parentales, aunque también se postula que puedan volver rápidamente al estado diploide, vía meiosis o por una pérdida al azar de cromosomas (Bennett y Jonson, 2003).

Quizás los aislados clínicos de *S. cerevisiae* fuesen diploides y las cepas aneuploides que se recuperaron de los pacientes, son consecuencia de cambios genéticos, viendo alterada su capacidad virulenta inicial, o quizás, para el caso de *S. cerevisiae*, una levadura patógena oportunista de baja virulencia, la patogenicidad esté regida por un aumento de la ploidía y al igual que ocurre para las cepas industriales, ser aneuploides les confiera ventajas que les permitan persistir, colonizar e incluso causar una infección en el hospedador. Hecho que en parte se confirma, con la cepa de panadería “Cinta roja” que se considera cercana a la triploidía, y que fue capaz de colonizar y causar muerte. Por tanto podemos concluir que la ploidía puede que afecte en la virulencia de *S. cerevisiae*, pero no sabemos en qué medida, ya que la mayoría de las cepas consideradas virulentas muestran aneuploidías. Después de conocer que las repeticiones de glutaminas suceden preferentemente en proteínas de señalización, no son de extrañar los resultados observados, estas cepas podrían haber sufrido mutaciones que alterasen el número de repeticiones de glutaminas presentes en el gen. La existencia de la doble MAPK Slt2 para ciertos aislados clínicos, podría venir como consecuencia de la incorporación en el gen de repeticiones de glutaminas, dando lugar así a una nueva proteína, o simplemente venga por la combinación de los dos procesos, es decir, la presencia de más copias para este gen y la incorporación, en alguna de estas copias, del número de glutaminas necesarias para dar lugar a una nueva proteína Slt2. Si esta proteína adicional Slt2 tiene alguna contribución en estos aislados, es algo que

desconocemos. Pero quizás hayan tenido lugar como resultado del paso de estos aislados por un hospedador, ofreciéndoles alguna ventaja para la supervivencia de este nuevo hábitat.

Conclusiones

1. El análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS ha permitido identificar 100 de los 105 aislados clínicos aportados por los hospitales Vall d'Hebrón de Barcelona y La Fe de Valencia, como pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*. Estos datos confirman la presencia y la incidencia que esta especie está adquiriendo en el ámbito hospitalario.
2. Se ha determinado que el análisis de restricción del mtDNA y la amplificación por PCR de secuencias δ , son herramientas útiles para la caracterización de aislados clínicos de *S. cerevisiae*. Por tanto, ambas técnicas son apropiadas para determinar orígenes de colonización, puntos de infección, monitorizar aislados en los casos de recaídas y resistencia a antibióticos, proponiéndose como posibles herramientas con aplicación clínica.
3. La combinación de estas técnicas moleculares junto con el estudio filogenético de secuencias del gen *COX2*, ha permitido establecer dos posibles casos de colonización exógena, por parte de las cepas de panadería y la cepa probiótica *S. boulardii*. Estas cepas industriales mostraron una gran proximidad filogenética con grupos de aislados clínicos de diferentes orígenes y han sido las únicas cepas, asociadas con alimentos, que han mostrado habilidad para colonizar y causar una infección.
4. Se ha demostrado que los aislados clínicos que se agruparon con las cepas comerciales panaderas, tienen su origen en panadería, puesto que estos aislados mostraron alta actividad fermentativa y actividad maltasa, características necesarias para que tenga lugar el levantamiento de la masa panaria y no presentes en otras levaduras industriales. El paso por un hospedador, el hombre o el ratón, produjo una disminución de dichas actividades, en de los aislados clínicos, respecto a la cepa original Cinta roja, quizás como respuesta a al nuevo ambiente, el hospedador.
5. La capacidad de crecimiento a 42° C, crecimiento pseudohifal y niveles altos en la actividad fosfolipasa, son rasgos de virulencia que han marcado la diferencia entre los aislados clínicos potencialmente virulentos y las cepas industriales. Las únicas excepciones son las cepas industriales de panadería y el preparado probiótico de *S. boulardii*, que no deberían descartarse como potenciales cepas virulentas en individuos inmunocomprometidos. Por tanto se propone, que en la selección de cepas industriales

se deberían descartar las cepas que muestren estas características fisiológicas, como medida preventiva.

6. Los ensayos murinos de infección sistémica han confirmado que algunos aislados clínicos, la cepa de panadería Cinta roja y el probiótico *S. boulardii*, son capaces de causar mortalidad durante la primera semana de infección, provocando signos característicos del desarrollo de una infección fúngica, como la disminución del peso y de la movilidad, y el encrespamiento del pelo.
7. El órgano diana de infección para *S. cerevisiae* es el cerebro. Tanto los aislados clínicos como no clínicos mostraron mayor habilidad para colonizar y persistir en dicho órgano que en los riñones, órgano diana de otras levaduras patógenas como *C. albicans*.
8. Aunque las cepas virulentas fueron capaces de causar mortalidad tanto en ratones sanos BALB/c como en los ratones inmunodeprimidos, la neutropenia incrementó la susceptibilidad de estos ratones a sufrir una infección por parte de las cepas virulentas de *S. cerevisiae*. Mostrando que los ratones inmunodeprimidos tienen mayor riesgo de sufrir infecciones por *S. cerevisiae*.
9. La inmunoproteómica ha demostrado que *S. cerevisiae* es capaz de inducir una respuesta inmune en los ratones inmunodeprimidos. Su mayor o menor inmunorreactividad, se relaciona directamente con la capacidad virulenta de las cepas.
10. El estudio de las MAP quinasas Kss1, Slt2 y Fus3 en condiciones de no activación, mostró diferentes grados de activación de Slt2 y Kss1, pero no de Fus3. Se ha observado una activación basal de Kss1, en el aislado clínico F3 y la cepa probiótica *S. boulardii*, que podría explicar la morfología elongada que muestran en condiciones normales. Por otra parte, la cepa de panadería “Cinta roja”, la cepa vínica ICV-17 y el aislado F27, mostraron una mayor activación de Slt2, mientras que los aislados N° 60, 61 y 70 exhibieron dos proteínas Slt2.
11. Los aislados con dos proteínas Slt2, también mostraron dos fragmentos diferentes de amplificado por PCR para su gen. El análisis de la secuencia del gen *SLT2* reveló que estos aislados contenían más de dos alelos que se diferenciaban en el tamaño, como

consecuencia de la variación en un gran número de repeticiones de los trinucleótidos CAA/que codifican glutaminas. La cepa panadera y los aislados clínicos con origen en panadería, también presentan más de dos alelos Slt2 con pequeñas variaciones en la región de microsatélites, no detectables a nivel de proteínas.

Listado de Figuras y Tablas

Figura 1. Morfologías de crecimiento observadas para la levadura <i>S. cerevisiae</i>	2
Figura 2. MAPKs descritas en <i>S. cerevisiae</i> estímulos que las activan y respuestas que generan	23
Figura 3. Esquema de la ruta de pseudofilamentación o invasividad en <i>S. cerevisiae</i>	24
Figura 4. Esquema de la ruta del AMPc en <i>S. cerevisiae</i>	25
Figura 5. Esquema de la organización de los genes ribosomales	35
Figura 6. Cálculo del parámetro Pz, según el crecimiento de las colonias y el halo de opacidad	45
Figura 7. Esquema del proceso de obtención de biomasa y funcionamiento del “fermentómetro”	54
Figura 8. Esquema del procedimiento seguido en los ensayos de infección sistémica por <i>S. cerevisiae</i> en los modelos murinos con las cepas de ratones BALB/c y DBA/2N	58
Figura 9. Esquema del procedimiento seguido en el ensayo de inmunosupresión con ciclofosfamida de los ratones ICR/Swiss	59
Figura 10. Esquema de la técnica de Western-Blotting para la detección de las proteínas inmunogénicas.	62
Figura 11. Análisis de restricción del DNA mitocondrial	68
Figura 12. Amplificación de elementos delta	69
Figura 13. Árbol Neighbor-Joining	74
Figura 14. Dos posibles casos de colonización exógena	75
Figura 15. Curvas de producción de CO ₂ de las cepas en estudio durante el proceso fermentativo en sistema modelo LD	79
Figura 16. Niveles de actividad maltasa	80
Figura 17. Ejemplos del crecimiento observado para las cepas industriales y aislados clínicos	92

Figura 18. Porcentaje de crecimiento a 39 y 42° C de las cepas industriales y los aislados clínicos de <i>S. cerevisiae</i>	93
Figura 19. Cálculo del valor de Pz para ambas actividades enzimáticas	95
Figura 20. Porcentajes de actividad proteasa de los aislados clínicos y las cepas industriales	96
Figura 21. Porcentajes de actividad fosfolipasa de los aislados clínicos y las cepas industriales.	96
Figura 22. Grados de pseudofilamentación observados para <i>S. cerevisiae</i>	99
Figura 23. Porcentajes del crecimiento pseudohifal en el medio SLAD, entre las cepas industriales y los aislados clínicos	100
Figura 24. Crecimiento invasivo en los aislados clínicos y no clínicos de <i>S. cerevisiae</i>	100
Figura 25. Esquema del procedimiento seguido para la realización del ensayo de infección en ratones BALB/c y DBA/2N	105
Figura 26. Alojamiento observado en cerebro (A) y riñones (B) de los ratones BALB/c para las diferentes cepas ensayadas de <i>S. cerevisiae</i>	111
Figura 27. Alojamiento observado en cerebro (A) y riñones (B) de los ratones DBA/2N para las diferentes cepas ensayadas de <i>S. cerevisiae</i>	116
Figura 28. Esquema del procedimiento seguido para la realización del ensayo del modelo murino neutropénico	118
Figura 29. Alojamiento observado en cerebro los ratones neutropénicos ICR/Swiss	121
Figura 30. Comparación de los alojamientos observados en cerebro para las 10 cepas ensayadas en los tres modelos de ratones empleados	124
Figura 31. Comparación de los alojamientos observados en riñones para las 10 cepas ensayadas en los tres modelos de ratones empleados	123
Figura 32. Análisis histológico del tejido cerebral de ratones infectados con cepas de <i>S. cerevisiae</i>	127
Figura 33. Comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de ratón	129

Figura 34. Ejemplos de cariotipos de la cepa original y las colonias recuperadas de ratón	130
Figura 35. Colonias con aspecto diferentes, fueron recuperadas del cerebro de un ratón BALB/c inoculado previamente con la cepa vínica ICV-17	131
Figura 36. Análisis mediante Western-blot de las proteínas inmunoreactivas frente a sueros de ratones ICR/Swiss neutropénicos	135
Figura 37. Esquemas de las rutas de apareamiento, crecimiento pseudohifal e integridad de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	156
Figura 38. Estudio preliminar de las MAPK's Slt2, Kss1 y Fus3 en algunos aislados clínicos para conocer su nivel basal de activación	158
Figura 39. Detección de diferencias a nivel de activación basal para las MAPK's Slt2 y Kss1	159
Figura 40. Morfologías celulares elongadas mostradas por el aislado clínico F3 y la cepa de <i>S. boulardii</i> , en condiciones normales de cultivo	162
Figura 41. Análisis de la sensibilidad a rojo Congo y blanco de Calcoflúor	164
Figura 42. Morfología celular de los aislados clínicos N° 60 y 102	165
Figura 43. Amplificación por PCR del gen <i>SLT2</i>	166
Figura 44. Alineamiento de las secuencias nucleotídica de la proteína Slt2 para las cepas que conforman el complejo <i>sensu stricto</i>	167
Figura 45. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína Slt2 para las cepas que conforman el complejo <i>sensu stricto</i>	168
Figura 46. Esquema del gen <i>SLT2</i> y de los cebadores empleados para amplificar diferentes regiones según su combinación	169
Figura 47. Amplificación por PCR de la región de repeticiones	170
Figura 48. Representación del número de glutaminas presentes en cada una de las bandas secuenciadas	172
Figura 49. Amplificación por PCR de la región anterior a la zona de repeticiones	173
Figura 50. Secuencia anterior a la región de repeticiones	174

Figura 51. Citometría de flujo del aislado clínico N° 60	175
Figura 52. Amplificación por PCR de la región de repeticiones	176
Figura 53. Secuencia del fragmento amplificado para el gen <i>SLT2</i>	178
Figura 54. Secuencias observadas para el fragmento amplificado del gen <i>SLT2</i>	180
Figura 55. Citometría de flujo del aislado clínico F27	181
Tabla 1. Especies de levaduras no- <i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i> , que causan infecciones oportunistas en humanos	7
Tabla 2. Factores que contribuyen a las infecciones humanas causadas por patógenos oportunistas. Y las consecuencias que se derivan de ellos	8
Tabla 3. Factores de virulencia entre los patógenos oportunistas más importantes	11
Tabla 4. Síndromes causados por <i>S. cerevisiae</i>	16
Tabla 5. Aislados clínicos de <i>S. cerevisiae</i>	40
Tabla 6. Aislados no clínicos de <i>S. cerevisiae</i>	41
Tabla 7. Medios de cultivo	42
Tabla 8. Diluciones sembradas en las placas de GPYA para cada temperatura	44
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	47
Tabla 10. Anticuerpos utilizados	64
Tabla 11. Tamaño de los productos de amplificado y perfiles de restricción de la región 5'8S-ITS para los aislados clínicos no <i>S. cerevisiae</i>	67
Tabla 12. Patrones tipo obtenidos al aplicar la técnica de análisis de restricción del mtDNA y la amplificación por PCR de secuencias δ , así como patrones compuestos resultado de la combinación de las mismas	71
Tabla 13. Comparación de los resultados obtenidos para los rasgos de virulencia analizados, entre las cepas de alimentos y los aislados clínicos potencialmente virulentos	103

Tabla 14. Cepas seleccionadas para realizar los ensayos <i>in vivo</i> , teniendo en cuenta en crecimiento pseudofilamentoso en medio SLAD y el crecimiento a 42° C	108
Tabla 15. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> que causaron mortalidad en alguno de los tres modelos de infección sistémica empleados	109
Tabla 16. Grados de virulencia para cada cepa en cada uno de los modelos murinos, siguiendo el criterio de virulencia establecido	122
Tabla 17. Listado de las proteínas antigénicas identificadas, según el suero obtenido de las diferentes cepas ensayadas	134
Tabla 18. Rasgos fenotipos asociados con virulencia en <i>S. cerevisiae</i>	160
Tabla 19. Número de glutaminas observado para las bandas de amplificación de la región de microsátélites	171

ANEXO I

Casos clínicos relacionados con *S. cerevisiae* y *S. boulardii*

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencias	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del Catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibiótica previa	Neutropenia			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> diseminadas									
Stein y col., 1970	54 años, M	Sangre, orina	Prótesis valvular	Si	Si	No	Anfotericina B	Si	Favorable
Rubinstein y col., 1975	38 años, H	Sangre	Prótesis valvular	NE	Si	No	Anfotericina B	NE, RC	Favorable
Jensen y Smith, 1976	68 años, H	Medula espinal	Ingest. Lev. cerveza	NE	No	Si	Ninguno	NE	Favorable
Eschete y West, 1980	59 años, H	Sangre	Quemaduras severas	Si	Si	No	Anfotericina B 5-FC	Si	Favorable
Cimolai y col., 1987	61 años, H	Sangre	Fallo renal, hemodialis	Si	Si	No	MCZ, 5-FC	Si	Muerte
Sethi y Mandell, 1988	37 años, M	Sangre	SIDA, diálisis peritoneal	NE	Si	NE	Anfotericina B	SE	Favorable
Anaïssie y col., 1989	26 años, H	Sangre	AML	Si	NE	No	NS	Si	Favorable
Anaïssie y col., 1989	81 años, M	Sangre	AML	NE	NE	Si	Anfotericina B	NE	Favorable
Manzella y col., 1989	25 años, M	Sangre	Trauma, cirugía	No	Si	No	Anfotericina B	Si	Favorable
Tawfik y col., 1989	39 años, H	Pulmón	SIDA	Si	No	No	Ninguno	No	Muerte
Nielsen y col., 1990	6 semanas, NE	Sangre	Cirugía abdominal	Si	Si	No	Ninguno	Si	Favorable
Nielsen y col., 1990	71 años, H	Sangre	Anemia	NE	Si	Si	Anfotericina B 5-FC	NE	Muerte
Aucott y col., 1990	62 años, M	Sangre	Neoplasia pancreática	NE	Si	NE	Anfotericina B	NE	Muerte
Aucott y col., 1990	65 años, M	Sangre	Pancitopenia	NE	Si	Si	Ninguno	NE	Muerte
Bonnay y col., 1991	71 años, M	Sangre	Cancer epidérmico Quimioterapia	NE	Si	No	Anfotericina B 5-FC	NE	Muerte
Oriol y col., 1994	70 años, H	Sangre	AER	NE	Si	Si	Ninguno	NE	Muerte
Tiballi y col., 1995	8 semanas, M	Sangre	Fallo respiratorio	Si	Si	NE	Ninguno	NE	Favorable
Cairoli y col., 1995	48 años, H	Sangre	TM	Si	NE	No	FLU	Si	Favorable
Muehrcke y col., 1995	NE, NE	Endocarditis	Vácula prostética	NE	Si	NE	Anfotericina B	NE	Favorable
Fung y col., 1996	32 años, M	Sangre	Shock séptico	NE	NE	NE	NE	NE	Favorable
Fung y col., 1996	16 años, H	Sangre	Apoplejía	NE	NE	NE	NE	NE	Favorable
Debelian y col., 1997	NE, NE	Sangre	Alcoholismo crónico	NE	Si	NE	NE	NE	Favorable
Eholie y col., 1997	NE, NE	Sangre	SIDA	NE	NE	NE	NE	NE	Muerte
Yoshida y col., 1997	34 años, H	Sangre	Recaída de leucemia	Si	Si	Si	Anfotericina B 5-FC	NE	Favorable
Sparrelid y col., 1998	NE, NE	Sangre	TM	Si	NE	NE	NE	NE	NE
Fiore y col., 1998	10 años, H	Sangre	Fibrosis cística	Si	Si	NE	Anfotericina B	Si	Muerte
Fiore y col., 1998	10 semanas, NE	Sangre	Nacimiento prematuro Enfermedad crónica resp.	NE	Si	No	Anfotericina B	Si	Favorable
Fiore y col., 1998	7 años, F	Sangre	Linfopenia de células T	Si	No	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Pavese y col., 1999	85 años, H	Sangre	Trauma	NE	NE	No	Anfotericina B	NE	Favorable
Heath y col., 2000	59 años, M	Sangre	Diabetes, alcoholismo	NE	Si	No	FLU Anfotericina B	NE	Muerte

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencias	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del Catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia			
Ramirez y col., 2000	2 años, M	Endocarditis	NE	NE	NE	No	Ninguno	NE	Muerte
Cesaro y col., 2000	8 meses, H	Sangre	AML, quimioterapia	Si	Si	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Ipson y Blanco, 2001	2 semanas, M	Sangre	Nacimiento premat.	NE	Si	No	Anfotericina B	NE	Favorable
Morrison y col., 1993	30 años, M	Sangre	BMT	NE	NE	NE	Anfotericina B	NE	Favorable
Ubeda y col., 2001	57 años, M	Sangre	Válvula prostética	No	Si	No	KET	No, RV	Muerte
Smith y col., 2002	56 años, H	Sangre	Fítula aórtica	NE	Si	No	Anfotericina B	NE	Muerte
Ruiz-Esquide y col., 2002	9 días, H	Endocarditis	Nacimiento premat.	Si	Si	No	Anfotericina B 5-FC	NE	Favorable
de Llanos y col., 2006b	66 años, H	Sangre	SM; quimioterapia	Si	NE	Si	Fungizona	NE	Favorable
de Llanos y col., 2006b	12 años, H	Sangre	Trauma cerebral	Si	Si	NE	FLU, albacet	NE	Favorable
de Llanos y col., 2006b	77 años, M	Sangre	Neumonía	Si	Si	Si	NE	NE	Muerte
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> localizada									
Feld y col., 1982	73 años, M	Fluido sinovial	Artritis reumatoide	NE	No	No	Ninguno	Favorable	NE
Dougherty y Simmons, 1982	66 años, H	Absceso gástrico	Obstrucción biliar	NE	Si	No	KET	NE	NE
Eng y col., 1984	75 años, H	Fístula periurental	Diabetes	NE	No	No	NE	NE	Favorable
Eng y col., 1984	52 años, H	Fluido pleural	EPOC, ingestión de levaduras	NE	No	NE	NE	NE	Muerte
Eng y col., 1984	70 años, H	Absceso renal	Diabetes	NE	No	NE	KET	NE	NE
Rippon, 1988	NE, NE	Pulmón	Enfermedad de Hodgkin	NE	NE	NE	NE	NE	Muerte
Doyle y col., 1990	17 años, H	Masa prihilar	SIDA	NE	NE	NE	Anfotericina B	Muerte	Muerte
Aucott y col., 1990	68 años, H	Pulmón	AML, quimioterapia	NE	No	Si	Anfotericina B KET	NE	NE
Chertow y col., 1991	60 años, M	Fluido pleural	Cirrosis	NE	No	No	Anfotericina B	NE	Muerte
Snyder, 1992	33 años, H	Peritoneo	DPC	Si	No	NE	FLU	Si	Favorable
Morrison y col., 1993	36 años, H	Pulmón	Leucemia	Si	NE	NE	NE	NE	Favorable
Tiballi y col., 1995	70 años, H	Absceso abdominal	Cirugía abdominal	NE	Si	NE	FLU	NE	Favorable
Senneville y col., 1996	67 años, H	Uréter (bolas mitóticas)	Cirugía de uréter por carcinoma	NE	Si	NE	Anfotericina B ITR/5-FC	NE	Favorable
Hovi y col., 1996	4 años, H	Osteomielitis	ALL, quimioterapia	NE	Si	Si	Anfotericina B	NE	Muerte
Kirsch y col., 1996	71 años, M	Absceso endoftálmico	Trauma, queratitis	NE	NE	No	Anfotericina B FLU		Favorable
Konecny y col., 1999	59 años, H	Esofaguitis	SIDA	NE	No	No	FLU		Favorable
Ren y col., 2004	40 años, H	Pulmón	Exposición a levadura	No	No	No	Cirugía		Favorable

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>									
Referencias	Edad y sexo	Condición subyacente	Factores de predisposición			Terapia con <i>S. boulardii</i>	Tratamiento	Retirada Catéter IV	Resultado
			Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Inmunodeficiencia				
Zunic y col., 1991	33 años, H	Colitis, cirugía abdominal	Si	Si	NE	Si	Anfotericina B FLU	NE	Favorable
Viggiano y col., 1995	14 años, H	Quemados	Si	Si	NE	Si	Anfotericina B 5-FC	Si	Favorable
Pletincx y col., 1995	1 años, M	Gastroenteritis, malnutrición	Si	Si	Si	Si	FLU	NE	Favorable
Bassetti y col., 1998	51 años, M	Poliarteritis nodosa. TIS	Si	Si	NE	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Fredenucci y col., 1998	49 años, H	Neumonía	Si	Si	NE	Si	FLU	NE	Favorable
Niault y col., 1999	78 años, M	Enfermedad intestinal. EPOC	Si	Si	NE	Si	FLU	Si	Favorable
Cesaro y col., 2000	8 meses, H	Leucemia mieloide aguda	Si	NE	Si	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Hennequin y col., 2000	30 meses, H	Cirugía gaso gástrica	Si	Si	NE	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Hennequin y col., 2000	36 años, H	SIDA. Quimioterapia	Si	Si	Si	Si	FLU	Si	Favorable
Hennequin y col., 2000	47 años, H	Neoplasia esofágica	Si	Si	NE	Si	FLU	Si	Favorable
Hennequin y col., 2000	78 años, M	SIRA; hemorragia digestiva	Si	Si	NE	Si	Ninguno	No	Favorable
Hennequin y col., 2000	31 años, M	SIDA	Si	NE	Si	Si	Anfotericina B	NE	Favorable
Hennequin y col., 2000	36 años, M	SIDA	Si	NE	Si	Si	Anfotericina B	NE	Favorable
Hennequin y col., 2000	20 meses, H	Atresia intestinal	Si	NE	No	Si	NE	NE	NE
Perapoch y col., 2000	3 meses, H	Cirugía de una cardiopatía congénita	Si	Si	NE	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Perapoch y col., 2000	1 mes, M	Cirugía de atresia intestinal	Si	Si	NE	No	Anfotericina B	Si	Favorable
Rijnders y col., 2000	74 años, H	Cirugía cerebral	Si	NE	No	Si	FLU	NE	Muerte
Lherm y col., 2002	50 años, H	Infarto	Si	NE	No	Si	Ninguno	NE	Muerte
Lherm y col., 2002	51 años, M	Cirugía aórtica	Si	NE	Si	Si	FLU	NE	Muerte
Lherm y col., 2002	50 años, H	SIRA; úlcera gástrica	Si	NE	No	No	FLU	Si	Favorable
Lherm y col., 2002	82 años, M	Fallo respiratorio agudo	Si	NE	NE	Si	Ninguno	NE	Favorable
Lherm y col., 2002	75 años, H	Fallo respiratorio agudo	Si	NE	NE	Si	Ninguno	NE	Favorable
Lherm y col., 2002	77 años, H	Peritonitis	Si	NE	Si	Si	Anfotericina B	NE	Muerte
Lherm y col., 2002	71 años, M	Hemorrágica cerebral vascular	Si	NE	Si	Si	Ninguno	NE	Favorable
Cassone y col., 2003	34 años, H	Trauma cerebral y torácico	Si	Si	No	No	FLU	No	Favorable
Cassone y col., 2003	48 años, H	Aneurisma	Si	Si	No	No	FLU	Si	Favorable
Cassone y col., 2003	75 años, M	Enfermedad miocárdica	Si	Si	No	No	FLU	Si	Favorable
Lestín y col., 2003	48 años, H	Diabetes	NE	Si	No	Si	Ninguno	NE	Muerte
Lungarotti y col., 2003	3 semanas, H	Nacimiento prematuro	Si	NE	No	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Riquelme y col., 2003	42 años, M	Transplante riñón-pancreas	NE	Si	NE	Si	FLU	NE	Favorable

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>									
Referencias	Edad y sexo	Condición subyacente	Factores de predisposición			Terapia con <i>S. boulardii</i>	Tratamiento	Retirada Catéter IV	Resultado
			Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Inmunodeficiencia				
Riquelme y col., 2003	41 años, H	SIDA	NE	Si	NE	Si	Anfotericina B	NE	Favorable
Cherifi y col., 2004	89 años, M	Enfermedad intestinal	No	Si	No	Si	FLU	No	Muerte
Henry y col., 2004	65 años, H	Cáncer de cabeza y cuello	Si	Si	Si	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Burkhardt y col., 2005	19 años, H	Tetraparesis espástica	NE	No	No	Si	FLU y VRZ	NE	Favorable
Muñoz y Bouza, 2005	76 años, M	Diabetes; cirugía de corazón	Si	Si	No	Si	FLU	NE	Muerte
Muñoz y Bouza, 2005	72 años, M	Cirugía de corazón	Si	Si	No	Si	Ninguno	NE	Muerte
Muñoz y Bouza, 2005	74 años, M	Artritis reumatoide	No	Si	NE	Si	FLU	NE	Muerte
de Llanos y col., 2006b	1 año, M	Trauma craneoencefálico; contusión pulmonar	Si	Si	NE	NE	Cefutaxima	NE	Favorable

M: Mujer; Hombre: hombre; ALL: Aguda Leucemia Linfoide; AML: Aguda Mieloide leucemia; TM: Transplante médula; DPC: Diálisis peritoneal crónica; LCM: leucemia crónica mieloide; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; AER: Anemia Eritroblástica refractoria; SM: Síndrome Mielodisplástico; TIS: Terapia Inmuno supresora; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; SIRA: Síndrome de Insuficiencia Respiratoria Aguda FLU: fluconazole; ITR: itraconazol; KET: Ketoconazol; MCZ: Miconazole; NE: No específico; RV: re-emplazamiento; 5-FC: 5-flucitosina

Bibliografía

A

- Agatensi, L., Farnchi, F., Mondello, F., Bevilacqua, RL., Ceddia, T., De Bernardis, F. y Cassone, A. (1991). Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynecology clinic. *J. Clin. Pathol.* 44: 826-30
- Albá, MM., Santibáñez-Koref, MF. y Hancock, JM. (1999). Amino acid reiterations in yeast are overrepresented in particular classes of proteins and show evidence of a slippage-like mutational process. *J.Mol.Evol.* 49: 789-797.
- Almanza, L., Debien, B., Fontaine, B. y Brinquin, L. (1998). Four hours for a record, of a reserve fuminationg cellulitis: can *Saccharomyces cerevisiae* be the causal agent. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 17: 130-2
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Díez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sánchez, M. y Nombela, C. (1999). Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181: 3058-3068
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Roman, E., Eximan, B., Nombela, C. y Pla, J. (2003). Strategies for the identification of virulence determinants in human pathogenic fungi. *Curr Genet.* 42: 301-12.
- Anaissie, E., Hachem, R., K-Tin-U, C., Stephens, LC. y Bodey, GP. (1993). Experimental Hematogenous Candidiasis caused by *Candida Krusei* and *Candida albicans*: species differences in pathogenicity. *Infection and Immunity.* 61: 1268-1271.
- Annaissie, E., Bodey, GP., Kantarjian, H. y col., (1989). New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev. Infect. Dis.* 11: 369-78
- Andes, D., y van Ogtrop, M. (2000). In vivo characterization of the pharmacodynamics of flucytosine in a neutropenic murine disseminated Candidiasis model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 44: 038-942.
- Angionella, L., Micocci, MM., D'Alessio, S., Girolamo, A., Maras, B. y Cassone, A. (2002). Identification of major glucan-associated cell wall proteins *Candida albicans* and their role in fluconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1688-1694.
- Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, K., Kato, J., Ninomiya, K. y Vidotto, V. (1994). Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 128: 143-150.
- Ashman, RB., Fulurija, A., y Papadimitriou, JM. (1996). Strain-dependent differences in host response to *Candida albicans* infection in mice are related to organ susceptibility and infectious load. *Infection and Immunity.* 5: 1866-1869.
- Ashman, RB., Papadimitriou, JM., Fulurija, A., Drysdale, KE., Farah, CS., Naidoo, O. y Gotjamanos, T. (2003). Role of complement C5 and T lymphocytes in pathogenesis of disseminated and mucosal candidiasis in susceptible DBA/2N mice. *Microbial pathogenesis.* 34: 103-113.
- Ashley, CT. y Warren, ST. (1995). Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Nat. Genet.* 13: 390-391.
- Aucott, JN., Fayen, J., Grossnicklas, H., Morrissey, A., Lederman, MA. y Salata, RA. (1990). Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*:

BIBLIOGRAFÍA

- report of three cases and review. *Rev. Inf. Dis.* 12: 406-411.
- B**
- Baleiras Couto, MM., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, JH. y van der Vossen, JM. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 41-46
- Barchiesi, F., Arzeni, D., Compagnucci, P., Di Francesco, LF., Giacometti, A. y Scalise, G. (1998). In vitro activity of five antifungal agents against clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Med Mycol.* 36:437-40.
- Barnes, RM., Allan, S., Taylor-Robinson, CH., Finn, R. y Johnson, PM. (1990). Serum antibodies reactive with *Saccharomyces cerevisiae* in inflammatory bowel disease: Is IgA antibody a marker for Crohn's disease? *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92: 9-15
- Barnett, JA., Payme, RW. y Yarrow, D. (1990). *Yeast: Characteritics and Identification*, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, London
- Barnett, JA., Payme, RW. y Yarrow, D. (2000). *Yeast: Characteritics and Identification*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, London
- Bart-Delabesse, E., Humbert, JF., Delabese, E. y Bretagne, S. (1998). Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2413-2418.
- Barta, Z., Csipo, I., Szabo, GG. y Szegedi, G. (2003). Seroreactivity against *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 9: 2308-2312.
- Bassetti, S., Frei, R. y Zimmerli, W. (1998). Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. *Am. J. Med.* 105: 71-72.
- Belchi-Hernández, J., Mora-González, A. y Iniesta-Pérez, J. (1996). Baker's asthma caused by *Saccharomyces cerevisiae* in dry powder form. *J. Alergy Clin. Immunol.* 97: 131-134.
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., García, MD. y Querol, A. (1997). Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *System. Appl. Microbiol.* 20: 397-408.
- Belloch, C., Querol, A., García, M.D. y Barrio, E. (2000). Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int. J. Syst Bacteriol.* 50: 405-416.
- Bennett, R. y Johnson, AD. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *The EMBO Journal.* 10: 2505-2515.
- Bernstein, CN., Orr, K., Blanchard, JF., Sargent, M. y Workman, D. (2001). Development of an assay for antibodies to *Saccharomyces cerevisiae*: easy, cheap and specific for Cronh's disease. *Can. J. Gastroenterol.* 15: 499-504.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, MJ., Pagan, MJ., García, MJ., Gras, ML., Martínez-Monzo, J. y Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *J. Food Engineer.* 56: 273-277.

- Beudeker, RF., van Dam, HW., van der Plaat, LB., y Vellenga, K. (1999). Developments in Baker's yeast production. En: *Yeast Biotechnology and biocatalysis*, (ed) Verachtert, H. y De Mot, R.. Marcel Dekker, New York, pp. 103-146.
- Bistoni, F., Vecchiarelli, A., Cenci, E., Sbaraglia, G., Perito, S. y Cassone, A. (1984). A comparison of experimental pathogenicity of *Candida* species in cyclophosphamide-immunodepressed mice. *Sabouraudia*. 5: 409-418.
- Bodey, GP. (1966). Fungal infections complicating acute leukaemia. *J. Chronic. Dis.* 19: 667-687
- Bonnay S, Darchis JP, Veyssier P. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* septicaemia in a cancer patient. *Me´decine et Maladies infectieuses* .21:32-4
- Borkovich, KA., Farrelly, FW., Finkelstein, DB., Taulien, J. y Lindquist, S. (1989). Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell. Biol.* 9: 3919-3930.
- Bouakline, A., Lacroix, C., Roux, N., Gangneux, JP. y Derouin, F. (2000). Fungal contamination of food in hematology units. *J Clin Microbiol.* 38: 4272-4273.
- Bouza, E. y Muñoz, P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*: el fin de la inocencia. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17: 227-231.
- Bowman, BH., Tylor, JW. y White, TJ. (1992). Molecular Evolution of the fungi: human pathogens. *Mol.Biol. Evol.* 9: 893-904
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braun, DK. y Kaufmann, CA. (1999). *Rhodotorula* fungemia: a life-threatening complication of indwelling central venous catheters. *Mycoses* 35: 305-308.
- Brieland, J., Essig, D., Jackson, C., Frank, D., Loebenberg, D., Menzel, F., Arnold, B., DiDominico, B. y Hare, R. (2001). Comparison of pathogenesis and host immune responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in systemically infected immunocompetent mice. *Infect. and Immun.* 69: 5046-5055.
- Brown, CJ., Todd, KM. y Rosenzweig, RF. (1998). Multiple duplication of yeast hexose response to selection in a glucose-limited environment. *Mol. Biol. Evol.* 15: 931-942.
- Burger, E., Singer-Vermes, LM. y Calich, VLG. (1985). The role of C5 experimental murine paracoccidioidomycosis. *J. Infect. Dis.* 152: 425-426.
- Burkhardt, O., Kohnlein, T., Pletz, M. y Welte, T. (2005). *Saccharomyces boulardii* induced sepsis: successful therapy with voriconazole after treatment failure with fluconazole. *Scand J Infect Dis.* 37:69-72
- Buts, JP., de Keyser, N. y De Raedemaeker, L. (1994). *Saccharomyces boulardii* enhances rat intertinal enzyme expression by endoluminal release of poliamones. *Pediatr. Res.* 4: 522-7.
- Byron, JK., Clemons, KV., McCusker, JH., Davis, RW. y Stevens, DA. (1995). Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. *Infection and Immunity.* 63: 478-485.

C

- Cairolí, R., Marengo, P., Perego, R. y de Cataldo, F. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia with granulomas in the bone marrow in a patient undergoing BMT. Bone Marrow Transplant. 15: 785-786.
- Calich, VLG., Burger, E., Kashino, SS., Fazioli, R.A. y Singer-Vermees, LM. (1987). Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. Infect. Immun. 55: 1919-1923
- Cameron, JR., Loh, EY. y Davis, RW. (1979). Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. Cell. 16: 739-751
- Candelli, M., Papa, A., Nista, EC., y col. (2003). Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae*: are they useful in clinical practice? Hepatogastroenterology. 50: 718-20
- Carle, GF. y Olson, MV. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. Proc.Natl. Acad. Sci. 82: 3756-3760.
- Carrillo-Muñoz, AJ., Giusiano, G., Ezkurra, PA. y Quindós, G. (2006). Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. Review. Rev Esp Quimioterap. 2: 130-139
- Casadevall, A. y Pirofski, L. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infection and Immunity. 8: 3703-3713
- Casadevall, A. y Pirofski, L. (2001). Host-Pathogen interactions: the attributes of virulence. The Journal of infectious diseases. 184: 337-44.
- Casadevall, A. y Pirofski, L. (2002). What is a pathogen?. Ann Med. 34: 2-4
- Cassaregola, S., Nguyen, HV., Leplinge, A., Brignon, P., Gnedre, F. y Guillardin, C. (1998). A family of laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry rearrangements involving chromosomes I and III. Yeast. 14: 551-561
- Cassone, M., Serra, P., Mondello, F., Giolamo, A., Scafetti, S., Pistella, E. y Venditti, M. (2003). Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighbouring those treated with a probiotic preparation of the organism. J. Clin. Microbiol. 41: 5340-5343.
- Cermeño-Vivas, J.R., Torres-Rodríguez, J.M., Corominas, J.M. y Madrenys, N. (1999). Pathogenicity of *Hansenula anomala* a model of immunocompromised mice. Mycopathologia. 144: 67-71.
- Cesaro, S., Chinello, P., Rossi, L. y Zanesco, L. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. Support Care Cancer. 8:504-5.
- Chen, S., Muller, M., Zhou, Z., Wricht, L. y Sorell, T. (1997). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? J. Infect. Dis. 414-420.
- Chen, X., Magee, BB., Dawson, D., Madgee, PT. y Kumamoto, CA. (2004). Chromosome 1 trisomy comprises the virulence of *Candida albicans*. Molecular Microbiology. 2: 551-565.
- Cherifi, S., Robberecht, J. y Miendje, Y. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient with *Clostridium difficile* colitis. Acta Clin Belg. 59: 223-224.
- Chertow, G.M., Mercantonio, ER. y Wells, RG. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* emphysema in a patient with esophago pleural fistula

- complicating variceal scleropathy. *Chest* 99: 1518-1519.
- Cimolai, N., Gill, MJ. y Church, D. (1987). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: case report and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 113-117.
- Clemons, KV., McCusker, JH., Davis, RW. y Stevens, DA. (1994). Comparative pathogenesis of clinical and non-clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Infectious Diseases* 169: 859-67.
- Clemons, KV., Park, P., McCusker, JH., McCullough, MJ., Davis, RW. y Steven, DA. (1997). Application of DNA typing methods and genetic analysis to epidemiology and taxonomy of *Saccharomyces* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1822-1828.
- Codón, AC., Benítez, T. y Korhola, M. (1997). Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast. *Curr. Genet.* 32: 247-259.
- Codón, AC., Benítez, T. y Korhola, M. (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 154-163
- Cole, GT., Halawa, AA. y Anaissie, EJ. (1996). The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis from the laboratory to the bedside. *Clin. Inf. Dis.* 22: S73-88.
- Cox, RA., Kennel, W., Boncyk, L. y Murphy, JW. (1988). Induction and expression of cell mediated immune responses in inbred mice infected with *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 56: 13-17.
- Csank, C., y Haynes, K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters.* 189: 115-120.
- Cullen, PJ., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, BJ., Jigami, Y., y Sprague, GF. (2000). Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent activation of a *STE12* signaling pathway in yeast. *Genetics* 155: 1005-1018.
- Czaja, AJ., Ahums, Z., Donaldson, PT. y Norman, GL. (2004). Frequency and significance of antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in autoimmune hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 49: 611-618.
- Czerucka, D. y Rampal, P. (2002). Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infect.* 4: 733-739.
- D**
- Darroch, CJ., Barnes, RM. y Dawson, J. (1999). Circulating antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers'/brewers' yeast) in gastrointestinal disease. *J. Clin. Pathol.* 52: 47-53.
- Dawson, K.A. (2002). Not just bread and beer: new applications for yeast and yeast products in human health and nutrition. En: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industry*, (ed) Lyons, TP. y Jaques, FA. Nottingham University Press, UK., pp 225-232
- de Grot, PWJ., Ruiz, C., Vázquez de Aldana, CR., Dueñas, E., Cid, VJ., Del Rey, F., Rodríguez-Peña, JM., Andel, A., Cubín, J., Arroyo, J., Garcñia, JC., Molina, M., García, LJ., Nombela, C. y Klis, FM. (2001). A genomic approach for the identification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp. Funct. Genom.* 2: 124-142.

BIBLIOGRAFÍA

- de Llanos, R., Fernandez-Espinar, MT. y Querol, A. (2006a). A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie van Leeuwenhoek*. 90: 221-231.
- de Llanos, R., Querol, A., Pemán, J., Gobernado, M. y Fernández-Espinar, MT. (2006b). Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *Int. J. Food. Microbiol.* 110: 286-290.
- de Llanos, R., Querol, A., Planes, AM. y Fernandez-Espinar, MT. (2004). Molecular characterisation of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *System Appl. Microbiol.* 27: 427-435.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martín, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. y Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* 146: 2121-2132.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. y Wiemken, A. (1994). The role of trehalose síntesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* 219: 179-186.
- Debelian, GJ., Olsen, I. y Tronstad, L. (1997). Observation of *Saccharomyces cerevisiae* in blood of patient undergoing root canal treatment. *Int Endod J.* 30:313-7.
- Del Poeta, M. (2004). Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. Minireview. *Eukaryotic Cell.* 5: 1067-1075.
- Delgado, ML., Gil, ML. y Gozalbo, D. (2003a). Starvation and temperature upshift cause an increase in the enzymatically active cell wall-associated glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase protein in yeast. *FEMS Yeast Research.* 4: 297-303.
- Delgado, ML., O'Connor, JE., Azorín, I., Renal-Piqueras, J., Gil, ML. y Gozalbo, D. (2003b). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology.* 147: 411-417
- Dequin, S., Salmon, J-M., Nguyen, HV. y Blondin, B. (2003). Wine yeast. En: *Yeast in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*, (ed) Boekhout, T. y Robert, V. Hamburg: Behr's Verlag GmbH y Co. pp. 389-412.
- Di Prieto, A., García-Maceira, FI., Meglecz, E. y Roncero, MIG. (2000). A mitogen-activated protein kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is dispensable for vegetative growth but essential for pathogenicity. Abstract of the 5th European Conference on Fungal Genetics, Arcachon, France, March 25-29, p: 227
- Diekema, DJ., Messer, SA., Brueggemann, AB., Coffman, SL., Doern, GV., Herwaldt, LA. y Pfaller, MA. (2002). Epidemiology of Candidemia: 3-Year Results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa

- Organisms Study. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1291-1302
- Diekema, DJ., Petroelje, B., Messer, SA., Hollis, R.J. y Pfaller, MA. (2005). Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J. Clin. Microbiol.* 43: 476-478.
- Dlauchy, D., Tornai-Lechoczki, J. y Gábor, P. (1999). Restriction enzyme análisis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Syst Appl. Microbiol.* 22: 445-453.
- Dougherty, S.H. y Simmons, R.L. (1982). Postoperative peritonitis caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Surg.* 117: 248-249.
- Doyle, MG., Pickering, LK., O'Brien, N. y Hoots, K. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 850-851.
- Dunham, MJ., Badrame, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, PO., Rozenzweig, RF. y Botstein, D. (2002). Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 16144-16149
- E**
- Eholie, SP., N'Gbocho, L., Bissagnene, E. y col. (1997). Profound mycoses in AIDS in Abidjan (Cote d'Ivoire). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 90: 07-11
- Eigel, A. y Feldman, H. (1982). Ty1 and delta elements occur adjacent to several tRNA genes in yeast. *EMBO J.* 1: 1245-1250
- Eladio, B., González, SS., Arias, A., Belloch, C. y Querol, A. (2006). Molecular mechanisms involved in the adaptative evolution of industrial yeast. En: *Yeast in Food and Beverages*, (ed) Querol, A. y Fleet, GH. *The yeast Handbook*, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg. pp: 153-174
- Eleuterio, EC., Araujo, PS. y Panek, AD. (1993). Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology.* 30: 591-596.
- Elion, EA., Brill, JA. y Fink, GR. (1991). FUS3 represses CLN1 and CLN2 and in concert with KSS1 promotes signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 21: 9392-6
- Enache-Angoulvant, A. y Hennequin, C. (2005). Invasive *Saccharomyces* infection: A comprehensive review. *Clin. Infect. Dis.* 41: 1559-1568.
- Eng, RHK., Drehmel, R., Smith, SM. y Goldstein, EJC. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* infections in man. *J. Med. Vet. Mycol.* 22: 403-407.
- Eschete, ML. y West, BC. (1980). *Saccharomyces cerevisiae* septicaemia. *Arch. Intern. Med.* 140: 1539-1540.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337:
- Esteve-Zarzoso, B., Zorman, T., Belloch, C. y Querol, A. (2003). Molecular characterization of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Syst. Appl. Microbio.* 26: 404-411

F

BIBLIOGRAFÍA

- Feld, R., Fornasier, VL., Bombardier, C. y Hastings, DE. (1982). Septic arthritis due to *Saccharomyces species* in a patient with chronic rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 9:637–40.
- Fernández-Arenas, E., Molero, G., Nombela, R., Díez-Orejas, R., y Gil, C. (2004a). Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics.* 4: 1204-1215.
- Fernández-Arenas, E., Molero, G., Nombela, R., Díez-Orejas, R., y Gil, C. (2004b). Low virulent strains of *Candida albicans*: unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics.* 4: 3007-3020.
- Fernández-Espinar, MT., Barrio, E. y Querol, A. (2003). Genetic variability among species of the *Saccharomyces sensu stricto*. *Yeast.* 20: 1213-1226
- Fernández-Espinar, MT., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. y Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of “Ffor” yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 87-97
- Fernández-Espinar, MT, López, V., Bartra, E. y Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 1-10
- Fidel, PJ., Vazquez, J y Sobel, J. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, patogénesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 00: 80-96.
- Field, D., y Wills, C. (1998). Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 1647–1652.
- Fiore, NF., Conway, JH., West, KW. y Kleiman, MB. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* 17:1177–9.
- Fleet, GH. (2003). Yeasts in fruit and fruit products. En: *Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*, (ed) Boekhout, T. y Robert, V. Behr's Verlag, Hamburg. pp 267-287,
- Fleet, GH y Roostita, B. (2006). The public health and probiotic significance of yeast in foods and beverages. En: *Yeast in Food and Beverages*, (eds) Querol, A y Fleet, GH. *The Yeast Handbook* Springer, Germany. pp 381-397
- Fleet, GH. (2006). The commercial and Community Significance of yeast in Food and Beverage Production. En: *Yeast in Food and Beverages*, (eds) Querol, A y Fleet, GH. *The Yeast Handbook* Springer, Germany. pp 1-12
- Forche, A., May, G. y Magee, PT. (2005). Demonstrations of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in *Candida albicans* strains during infections. *Eukaryotic cell.* 1: 156-165.
- Fredenucci, I., Chomarat, M., Boucaud, C. y Flandrois, J.P. (1998). *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient receiving Ultra-levure therapy. *Clin Infect Dis.* 1:222-223.
- Fröhlich-Wyder, MT. (2003). Yeasts in dairy products. En: *Yeasts in Food. Beneficial and*

- Detrimental Aspects, (ed) Boekhout, T. y Robert, V. Behr's Verlag, Hamburg. pp 209-237
- Fromtling, R.B., Abruzzo, G.K. y Giltinan, D.M. (1987). *Candida tropicalis* infection in normal, diabetic, and neutropenic mice. *Journal of Clinical Microbiology*. 25: 1416-429.
- Fulurija, A., Ahsman, R.B. y Papadimitriou, J.M. (1996). Neutrophils depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. *Microbiology*. 142: 3487-3496.
- Fung, K.S., Scheel, O., Lyon, D.J., Cheng, A.F., Bendeck, J. (1996). Self-inflicted bacteraemia and fungaemia in Vietnamese migrants *Scand J. Infect. Dis.* 28: 83-5.
- G**
- Gagiano, M., Bauer, F.F. y Pretorius, I. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast Research*. 2: 433-470.
- Galitski, T., Saldaña, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S. y Fink, G.R. (1999). Ploidy regulation of gene expresión. *Science*. 28: 107-125.
- Gancedo, J.M. (2001). Control of pseudofyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 107-123.
- García-Martos, P., Hernández-Molina, J.M., Galan, F., Ruiz-Henestrosa, J.R., García-Agudo, R., Palomo, M.J. y Mira, J. (1999). Isolation of *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) in humans. *Mycopathologia*. 144: 73-75.
- Gelperin, D., Weigle J., Nelson, K., Roseboomt, P., Irie, K., matsumoto, K. y Lemmon, S. (1995). 14-3-3 proteins: Potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology*. 92: 11539-11543
- Ghannoum, M. (2000). Potential Role of phospholipases in virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1: 122-143.
- Greuter, W., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Chaloner, W.C., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Jorgenson, P.M., Nicholson, D.H., Silva, P.C., Trehane, P. y McNeil, J. (1994). International code of botanical nomenclature (Tokyo Code). Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany
- Giaffer, M.H., Clark, A. y Holdsworth, C.D. (1992). Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *Gut*. 33: 1071-1075
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. y Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*. 68: 1077-90.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldman, H. y col. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274: 563-567.
- Goldstein, A.L. y McCusker, J.H. (2001). Development of *Saccharomyces cerevisiae* as a model pathogen: A system for the genetic identification of gene products required for survival in the mammalian host environment. *Genetics*. 159: 499-513.

BIBLIOGRAFÍA

- Gow, NAR., Brown, AJP. y Odds, FC. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 366-371.
- Gozalbo, D. (1998). The cell wall-associated glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun.* 66: 2052-2059.
- Greer, A. y Gemoets, H. (1943). The coexistence of pathogenic fungi in certain chronic pulmonary diseases: with especial reference to pulmonary tuberculosis. *Dis Chest*. 9:212-24.
- Guillamón, JM., Barrio, E., Huerta, T. y Querol, A. (1994). Rapid characterization of four the species of *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Bacteriol.* 44: 708-714
- Guillamón, J.M., Barrio, E. y Querol, A. (1996). Characterisation of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 122-132
- Guillamón, JM., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A. (1998). Rapad identification of wine yeast species base don RFLP análisis on the ribosomal internal transcribed spacer ITS region. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392.
- Guillamón, JM., Sánchez, I. y Huerta, I. (1997). Rapad characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiol Lett.* 147: 267-272.
- Guslandi, M., Giollo, P. y Testoni, PA. (2003). A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 15: 697-698.
- ### H
- Haas, G., Karaali, G., Ebermayer, K., y col. (2002). Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics*. 2: 313-324.
- Halvarson, J., Standaert-Vitse, A., Järneot, B., Jouault, T., Bodin, A., Duhamel, JF., Colombel, A., Tysk, C. y Poulain, D. (2005). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in twins with inflammatory bowel disease. *Gut*. 54: 1237-1243.
- Hancock, JM. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism. En: *Microsatellites: Evolution and applications*, (eds) Goldstein, DB. y Schlötterer, C. Oxford University Press, Oxford. pp 1-9.
- Hanzen, KC. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 462-478.
- Haron, E., Anaisse, E., Dumphy, F., McCredie, K. y Fainstein, V. (1988). *Hansenula anomala* fungemia. *Rev Inf Dis*. 10: 1182-1186.
- Heath, CH., Jaksic, A., McKerracher, D. y Clarke, GM. (2000). Disseminated *Saccharomyces cerevisiae* infection following polymicrobial hepatobiliary sepsis [letter]. *Aust N Z J Med.* 30:521-2.
- Héctor, RF., Dómer, J. y Carrow, EW. (1982). Immune responses to *Candida albicans* in genetically distinct mice. *Infection and immunity*. 3: 1020-1028.
- Héctor, RF., Yee, E. y Collins, MS. (1990). Use of DBA/2N mice in models of Systemic

- candidiasis and pulmonary and systemic aspergillosis. *Infections and Immunity*. 5: 1476-1478.
- Hennequin, C., Kauffmann-Lacroix, C., Jobert, A., Viard, J.P., Ricour, C., Jacquemin, J.L. y Berche, P. (2000). Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 16-20.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C. y Dujon, B. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39: 551-559.
- Henry, S., D'Hondt, L., Andre, M., Holemans, X. y Canon, J.L. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a head and neck cancer patient: a case report and review of the literature. *Acta Clin Belg*; 59:220-2.
- Herbrecht, R. y Nivoix, Y. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: adverse effect of *Saccharomyces boulardii* probiotic administration. *Clin. Infect. Dis.* 40:1635-1637.
- Hodgetts, S., Matthews, R., Morrissey, G., Mitsutake, K., Piper, P. y Burnie, J. (1996). Over-expression of *Saccharomyces cerevisiae* hsp90 enhances the virulence of this yeast in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 16: 229-234
- Hogan, L.H., Klein, B.S., y Levitz, S.M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*. 4: 469-488.
- Holzschu, DL., Chandler, FW., Ajello, L. y Ahern, DG. (1979). Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.* 17: 71-78.
- Hottiger, T., Schmutz, P. y Wiemken, A. (1987). Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169: 5518-5522
- Hovi, L., Saarinen, UM., Donner, U. y Lindqvist, C. (1996). Opportunistic osteomyelitis in the jaws of children on immunosuppressive chemotherapy. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 18: 90-4
- Huffman, J.L., Molina, FI. y Jong, SC. (1992). Authentication of ATCC strains in the *Saccharomyces cerevisiae* complex by PCR fingerprinting. *Exp. Mycol.* 16: 316-319.
- Hurtrel, B., Lagrange, PH., y Michel, JC. (1980). Systemic candidiasis in mice. Correlation between kidney infection and mortality rate. *Ann.Immunol.* 1: 93-104.
- I**
- Ibeas, JI., Lozano, I., Perdigonés, F., Jiménez, J. (1997). Dynamics of flor yeast population during the biological aging of Sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 75-79.
- Ibrahim, AS., Magee, BB., Sheppard, DC., Yang, M., Kauffman, S., Becker, J., Edwards, JE. y Magee, PT. (2005). Effects of ploidy and mating type on virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 11: 7366-7374.
- Ipson, MA. y Blanco, CL. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* sepsis in a 35-weekold premature infant: a case report. *J Perinatol.* 21:459-60.
- J**
- James, SA., Cai, J., Roberts, IN. y Collins, MD. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces*

BIBLIOGRAFÍA

- kunashirensis* sp. Nov. and *Saccharomyces martiniae* sp.nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 453-460
- Jensen, DP. y Smith, DL. (1976). Fever of unknown origin secondary to brewer's yeast ingestion. Arch. Intern. Med. 136: 332-333.
- Jungblut, PR. (2001). Proteome analysis of bacterial pathogens. Microbes and Infections. 3: 831-840.
- Jungblut, PR., Grabher, G., y Stöffler, G. (1999). Comprehensive detection of immunorelevant *Borrelia garinii* antigens by two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis. 20: 3611-3622.
- ### K
- Kantarcioglu, AS. y Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 45: 160-165.
- Karlin, S. y Burge, C. (1996). Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 1560-1565.
- Kazemi-Esfarjani, P., Trifiro, AM. y Pinsky, L. (1995). Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n-expanded neuropathies. Hum. Mol. Genet. 4: 523-527.
- Keogh, RS., Seoighe, C. y Wolfe, KH. (1998). Evolution of gene order and chromosomal number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. Yeast. 14: 443-457
- Kingsbury, JM., Goldstein, AL. y Mccusker, JH. (2006). Role of nitrogen and carbon transport, regulation, and metabolism genes for *Saccharomyces cerevisiae* survival in vivo. Eukaryotic Cell. 5: 816-824
- Kirchelle, A., Fruhwien, N., and Toburen, D. (1996). Treatment of persistent diarrhea with *S. boulardii* in returning travellers. Results of a prospective study. Fortschr. Med. 114: 136-140.
- Kirsch, LS., Brownstein, S., Deschenes, J., Sorgini, C. y Jackson, WB. (1999). *Saccharomyces* eratitis and endophthalmitis. Can J Ophthalmol. 34:229-32.
- Klein, AS., Tortura, GT., Malowitz, R. y Greene, WH. (1988). *Hansenula anomala*: a new fungal pathogen. Arch Intern Med. 148: 1210-1213.
- Known-Chung, KJ., Polachek, I., y Popking, TJ. (1982). Melanin lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. J. Bacteriol. 150: 1414-1421.
- Kojic, EM. y Daroviche, RO. (2004). *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev. 17, 255-267.
- Konecny, P., Drummond, FM., Tish, KM. y Taosall, JW. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* oesophagitis in a HIV-infected patient. Int. J. STD. AIDS. 10: 821-2.
- Kontoyiannis, DP. y May, GS. (2000). delta-aminolaevulinic acid modulates the resistance to fluconazole in a *bem1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. J Antimicrob Chemother. 6:1044-6
- Krause, I., Monselise, Y., Milo, G. y Weinberger, A. (2003). Anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies. A novel serologic marker for Behcet's disease. Adv. Exp. Med. Biol. 528: 201-204

- Krcmery, V. y Barnes, AJ. (2002). Non-albicans *Candida* spp causing fungaemia: pathogeneity and antifungal-resistance. *J. Hosp. Infect.* 50: 243-260.
- Kruppa, M. y Calderone, R. (2006). Two-components signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res.* 2: 149-59
- Kurtzman, C.P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vandervaltosyza* and *Zygotoruspora*. *FEMS Yeast Research.* 4: 233-245.
- Kurtzman, CP. y Robnett, CJ. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwehoek.* 73: 331-371
- Kurtzman, CP. y Robnett, CJ. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces complex*” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3: 417-432
- Kwon-Chung, KJ., Bennett, JE. (1992). *Saccharomyces* Meyen Ex Reess. En: *Medical mycology*, (ed) Kwon-Chung, JJ. y Bennett, E. Philadelphia, Lea and Febiger. pp. 772-773
- Kyung, SL., Patton, J., Fido, M. y col., (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1, gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *J. Biol. Chem.* 269: 1975-1980.
- L**
- Lai, E., Birren, BW., Clark, SM. y Hood, L. (1989). Differentiation of brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA. *J. Inst. Brew.* 91: 169-173
- Lambrechts, MG., Bauer, FF., Marmur, J. y Pretorius, IS. (1996). Muc1 a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 8419-8424
- Lane, T. y García, JR.. (1991). Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses* 34: 217-220.
- Lanz, RB., Wielands, S., Hung, M. y Rusconi, S. (1995). A transcriptional repressor obtained by alternative translation of a trinucleotide repeat. *Nucleic. Acids. Res.* 23: 138-145.
- Lee, B. N. y E. A. Elion. (1999). The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 96:12679-12684.
- Lee, SY. y Knudsen, FB. (1985). Differentiation of brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA. *J. Inst. Brew.* 91: 169-173.
- Lee, KS., Patton, JL., Fido, M., Hines, LK., Kohlwein, SD., Paltauf, F., Henry, SA. y Levin, DE. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *J. Biol. Chem.* 269: 19725-19730
- Lengeler, KB., Davidson, RC., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W-C, Wang, P., Waugh, M. y Heitman, J. (2000). Signal Transduction Cascades Regulating Fungal. Development and Virulence. *Microbiology and Molecular biology reviews.* 4: 746–785

BIBLIOGRAFÍA

- Lemos, JA., Giambiagi-Demarval, M. y Castro, AC. (1988). Expression of heat-shock proteins in *Streptococcus pyogenes* and their immunoreactivity with sera from patients with streptococcal diseases. *J Med Microbiol.* 8:711-5.
- Lestin, F., Pertschy, A. y Rimek, D. (2003). Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple comorbidities. *Dtsch Med Wochenschr.* 128:2531-3.
- Lherm, T., Monet, C., Nougier, B., Soulier, M., Larbi, D., Le Gall, C., Caen, D. y Malbrunot, C. (2002). Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Int. Care Med.* 28: 797-801.
- Li, WH. (1997). *Molecular evolution.* Sinauer, Sunderland
- Li, YC., Korol, AB., Fahima, T., Beiles, A. y Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11: 2453-2465.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W. y Borner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic. Microbiol.* 33: 413-426
- Lillie, SH. y Pringle, JR. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* 143: 1348-1349.
- Lindberg, E., Magnusson, KE., Tysk, C. y Jarnerot, G. (1992). Antibody (IgG, IgA and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut.* 33: 909-913.
- Liu, H., Styles, CA. y Fink, GR.. (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science.* 262: 1741-1744.
- López-Ribol, JL. y Chaffin, WL. (1996). Members of the Hsp 70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology.* 15: 4724-4726.
- López-Villar, E., Monteoliva L., Larse, MR., Sachon, E., Shabaz, M., Pardo, M., Pla, J., Gil, C., Roepstorff, P. y Nombela, C. (2006). Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolasa in the cell surface. *Proteomics.* 1: S107-18.
- Lorenzo, MC., Cuttler, NS. y Heitman, J. (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Bio. Cell.* 11: 183-199
- Lott, TJ., Kuykendall, RJ, y Reiss, E. (1993). Nucleotide sequences analysis of the 5,8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast.* 9: 1199-1206
- Lunel, FV., Licciardello, L., Stefani, S., Verbrugh, HA., Melchers, WJ., Meis, JF., Scherer, S. y van Belkum, A. (1998). Lack of consistent short sequence repeat polymorphisms in genetically homologous colonizing and invasive *Candida albicans* strains. *J. Bacteriol.* 180: 37771-3778.
- Lungarotti, MS., Mezzetti, D. y Radicioni, M. (2003). Methaemoglobinaemia with concurrent blood isolation of *Saccharomyces* and *Candida*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 88:F446.

- Lutwick, LI., Phaff, HJ. y Stevens, DA. (1980). *Kluyveromyces fragilis* as an opportunistic fungal pathogen in man. *Sabouraudia*. 18: 69-73.
- Lyon, F., Héctor, RF. y Dómer, JE. (1986). Innate and acquired immune responses against *Candida albicans* in congenic B10.D2 mice with deficiency of the C5 complement component. *J. Med. Vet. Mycol.* 24: 359-367
- M**
- MacCallum, DM. y Odds, FC. (2005). Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. *Mycoses*. 48: 141-161.
- Madhani, HD. y Fink, GR. (1998). The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol.* 8: 348-353.
- Maejima, K., Shimoda, K., Morita, C., Fujiwara, T., and Kitamura, T. (1980). Colonization and pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae*, MC16, in mice and cynomolgus monkeys after oral and intravenous administration. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 33: 271-276.
- Magee, BB. y Magee, PT. (1997). WO-2, a stable aneuploid derivative of *Candida albicans* strains WO-1, can switch from white to opaque and form hyphae. *Microbiology*. 143: 289-295.
- Magee, BB. y Magee, PT. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL a and MTL α strains. *Science*. 289: 310-313.
- Main, J., McKenzie, H., Yerman, GR., y col. (1988). Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ*. 297: 1105-6
- Malgoire, JY., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, JM. y Mallié, M. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 43: 1133-1137.
- Manzella, JP., Shaffer, S., Agarwa, LN. y Kellogg, JA. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a multiply traumatized patient. *J. Trauma*. 29: 129-130.
- Marshall, T. y Williams, KM. (2002). Proteomics and its impact upon biomedical science. *Br. J. Biomed. Sci.* 59: 47-64
- Marteau, P. y Boutron-Ruault, MC. (2002). Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *Brit J Nutr* 87 (Supplement 2): S153-S157.
- Martín, H., Arroyo, J., Sanchez, M., Molina, M. y Nombela, C. (1993). Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol. Gen. Genet.* 241: 177-184.
- Martín, H., Flandes, M., Nombela, C. y Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *MicroReview. Molecular Microbiology*. 58: 6-16
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, JM., Ruiz, C., Nombela, C. y Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 1511-1519.
- Martínez, JP., Gil, ML., López-Ribot, JL. y Chaffin, WL. (1998). Serological response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 121-141.

BIBLIOGRAFÍA

- Martínez, P., Codón, A. C., Pérez, L. y Benítez, T. (1995). Physiological and molecular characterization of flor yeasts: Polymorphism of flor yeast populations. *Yeast*. 11:1399-1411
- Matthews, RC., Burnie, P., Howat, D., Rowland, T. y Walton, F. (1991). Autoantibody to heat shock protein 90 can mediate protection against systemic candidiasis. *Immunology*. 74: 20-24.
- Mayser, P., Laabs, S., Heuer, KU. y Gründer, K. (1996). Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. *Mycopathologia*. 135: 149-155.
- McCullough, MJ., Clemons, KV., Farina, C., McCusker, JH. y Stevens, DA. (1998a). Epidemiological investigation of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates by a genotypic method. *J Clin Microbiol*. 36: 557-562.
- McCullough, MJ., Clemons, KV., McCusker, JH. y Stevens, DA. (1998c). Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. *J. Clin. Microbiol*. 36: 1035-1038
- McCullough, MJ., Clemons, KV., McCusker, JH. y Stevens, DA. (1998b). Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom inval). *J Clin Microbiol*. 36: 2613-2617.
- McCusker, JH., Clemons, KV., Stevens, DA. y Davis, R.W. (1994a). Genetic characterization pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics* 136: 1261-1269.
- McCusker, JH., Clemons, KV., Stevens, DA. y Davis, R.W. (1994b). *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42°C and form pseudohyphae. *Infection and Immunity*. 62: 5447-5455.
- McFarland, LV. (1996). *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin Infect Dis* 22: 200-201.
- McFarland, LV. y Bernasconi, P. (1993). *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microb Ecol Health Dis*. 6: 157-171.
- McFarland, LV., Surawicz, CM., Greenberg, RN., Fekety, R., Elmer, GW., Moyer, KA., Melcher, KE., Bowen, KE., Cox, JL. y Noorani, Z. (1994). A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 271: 1913-1918.
- McKenzie, H., Main, J., Pennington, CR. y Parratt, D. (1990). Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut*. 31: 536-538.
- Mitterdorfer, G., Mayer, HK., Kneifel, W. y Viernstein, H. (2002). Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *J Appl Microbiol*. 93: 521-530.
- Miyake, T., Sammoto, H. y Bun-ichiro, O. (2003). Acivicin induce Filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosi. Biotechnol. Biochem*. 10: 2283-2285
- Mombelli, B. y Gismondo, MR. (2000). The use of probiotics in medical practice. *Int J Antimicrob Agents*. 16: 531-536.

- Morrison, VA., Haake, RJ. y Weisdorf, DJ. (1993). The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 72: 78-89.
- Mösch, HU., Roberts, RL. y Fink, GR. (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 5352-5356
- Muehrcke, DD., Lytle, BW. Y Cosgrove, DM. (1995). 3rd Surgical and long-term antifungal therapy for fungal prosthetic valve endocarditis. *Ann. Thorac. Surg.* 60: 538-43
- Muller, J., Remus, N., and Harms, K.H. (1995). Mycoserological study of the treatment of paediatric cystic fibrosis patients with *Saccharomyces boulardii* (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926). *Mycoses* 38: 119-123
- Muñoz, P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, JM., Pérez, MJ., Sánchez-Somolinos, M., Rincón, C., Hortal, J. y Peláez, T. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 40:1625-1633
- Murphy, A. y Kavanagh, K (1999) Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen, Implications for biotechnology. *Enz Microbial Technol.* 25: 551-557.
- Murphy, N., Damjanovic, V., Hart, C., Buchanan, CR., Whitaker, R. y Cooke, RWI. (1986). Infection and colonisation of neonates by *Hansenula anomala*. *The Lancet*. 291-293.
- Mydlík, M., Tkacova, E., Scovenyiova, K., Mizla, P. y Derzsiova, K. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* peritonitis complicating CAPD. *Perit. Dial. Int.* 16: 188
- N**
- Naglik, JR., Challacombe, SJ. y Hube, B. (2003). *Candida albicans* Secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 400-428.
- Navarro-Garcia, F., Sánchez, M., Nombela, C. y Pla, J. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2:245-68.
- Ness, F., Lavallée, F., Dubordieu, D., Aigle, M. y Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62: 89-94
- Niault, M., Thomas, F., Prost, J., Ansari, FH. y Kalfon, P. (1999). Fungemia due to *Saccharomyces species* in a patient treated with enteral *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis.* 28:930.
- Nielsen, H., Stenderup, J. y Bruun, B. (1990). Fungemia with Saccharomycetaceae. Report of four cases and review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 22: 581-584
- Nombela, C. y Chaffin, WL. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *TRENDS in Microbiology.* 1: 15-21.
- Nyirjesy, P., Vazquez, JA., Ulfberg, DD., Sobel, JD., Bolkov, DA. y Buckley, HR. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: transmission from yeast used in baking. *Obstetr Gynecol.* 86: 326-329.
- O**
- Odds, FC. (1988). Candidosis of the gastrointestinal tract. En *Candida and Candidosis*. Baillière Tindall (ed). London, United Kingdom. pp. 156-163.

BIBLIOGRAFÍA

- Okada, H. y Halvorso, H.O. (1964). Uptake of alpha-thioethylglucopyranoside by *Saccharomyces cerevisiae*. 1. The genetic control of facilitated diffusion and active transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 82: 538-542.
- Okawa, Y. y Yamada, Y. (2002). Lethality of yeast with Low Pathogenicity in Mice Immunocompromised by Cyclophosphamide Treatment. *Biol. Pharm. Bull.* 7: 940-942.
- Olver, WJ., James, SA., Lennard, A. y col. (2002). Nosocomial transmission of *Saccharomyces cerevisiae* in bone marrow transplnat patients. *J. Hosp. Infect.* 52: 268-72
- Oriol, A., Ribera, J. M., Arnal, J., Milla, F., Batlle, M., Feliu. E. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* septicemia in a patient with myelodysplastic syndrome. *Am. J. Hematol.* 43, 325-326
- O'Rourke, S. M. y Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the *HOG* and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 12: 2874-2886.
- Ouwehand, AC., Kirjavainen, PV., Shortt, C. y Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal.* 9: 43.52.
- P**
- Panadero, J., Randez-Gil, P., y Prieto, J.A. Validation of a flour-free Model System for throughput studies of Baker's yeast. *Appl. And Envirom. Microb.* 71: 1142-1147.
- Papadogeorgakis, H., Frangoulis, E., Papaefstathiou, E. y Katsambas, A. (1999). *Rhodotorula rubra* fungaemia in an immunocompromised patient. *J Eur Acad Derm Ven.* 12: 169-170.
- Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sánchez, M., Gil, C. y Nombela, C. (1999). Two-dimensional análisis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenetating protoplast: a novel approach to study the cell wall. *Yeast.* 15: 459-472.
- Pardo, M., Ward, M., Pitarch. A., Sánchez, M., Nombela, C., Blackstock, W. y Gil, C. (2000). Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis.* 21: 2651-2659.
- Parrou, JL., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B. y Francois, J. (1999). Dynamic responses of reserves carbohydrate metabolism Ander carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15: 191-203.
- Parrou, JL., Teste, MA. y Francois, J. (1997). Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidences for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology.* 143: 1891-1900.
- Pavese, P-. Brion, JP., Lebeau, B., Grillot, R. y Ambroise-Thomas, P. (1999). Epidemiology of fungemia in a university hospital; therapeutic incidente. *Pathol. Biol.* 47: 579-83
- Perapoch, J., Planes, A. M., Querol, A., López, V., Martínez-Bendayán, I., Tormo, R., Fernández, F., Peguero, G. y Salcedo, S. (2000). Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with Ultra-

- levura. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19, 468-470
- Periti, P. y Tonelli, F. (2001). Preclinical and clinical pharmacology of biotherapeutic agents: *Saccharomyces boulardii*. Journal of Chemotherapy. 13: 473-493
- Petrocheilou-Paschou, V., Prifti, H., Kostis, E., Papadimitriou, C., Dimopoulos, MA. y Stamatelopoulos, S. (2000). *Rhodotorula* septicemia: case report and mini review. Clin Microbiol Infect. 7: 100-102.
- Pfaller, MA., Messer, S. y Jones, RN. (1997). Activity of a new triazole, Sch 56592, compared with those of four other antifungal agents tested against clinical isolates of *Candida* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother. 41:233-5.
- Piarroux, R., Millon, L., Bardouet, K., Vagner, O. y Koenig, H. (1999). Are live *Saccharomyces* yeasts harmful to patients. The Lancet. 353: 1851-1852.
- Pinto, M. y Lobe, CG. (1996). Products of the *grg* (Groucho-related gene) family can dimerize through the amino-terminal Q domain. J. Biol. Chem. 271: 33026-33031
- Pitarch, A., Abián, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C. y Gil, C. (2004). Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. Proteomics. 4: 3084-3106
- Pitarch, A., Díez-orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sánchez, M., Gil, C. y Nombela, C. (2001). Análisis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infections in a murine model. Proteomics. 1: 550-559.
- Pitarch, A., Jimenez, A., Nombela, C. y Gil, C. (2006). Serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. Moll Cell Proteomics. 1: 79-96.
- Pitarch, A., Pardo, M., Jiménez, A., Pla, J., Gil, C., Sánchez, M. y Nombela, C. (1999). Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. Electrophoresis. 20: 1001-1010.
- Pletincx, M., Legein, J. y Vandenplas, Y. (1995). Fungemia with *Saccharomyces boulardii* in a 1-year-old girl with protracted diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 21:113-5.
- Pockley, AG. (2003). Heat shock proteins as regulators of the immune response. Lancet. 362: 469-476.
- Pontón, J., Rüchel, R., Clemons, KV., Coleman, DC., Grillot, R., Guarro, J., Aldebert, D., Ambroise-Thomas, P., Cano, J., Carrillo-Muñoz, A.J., Gené, J., Pínel, C., Stevens, DA. y Sullivan, DJ. (2000). Emerging pathogens. Med. Mycol. 38: 225-236.
- Pope, LM. y Cole, GT. (1982). Comparative studies of gastrointestinal colonization and systemic spread by *Candida albicans* and non-lethal yeast in the infant mouse. Scanning Microsc. 4: 1667-1676.
- Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L. y Fadda, G. (2005). Molecular tools for differentiating probiotic and clinical

BIBLIOGRAFÍA

- strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol. 103: 295-304.
- Posteraro, B., Sanguinetti, M., D'Amore, G., Masucci, L., Morace, G. y Fadda, G. (1999). Molecular and epidemiological characterization of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates. J. Clin. Microbiol. 37: 2230- 2235
- Pramateftaki, PV., Lanaridis, P. y Typas, MA. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strains level a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. J. Appl. Microbiol. 89: 236-248.
- Price, MF., Wilkinson, ID. y Gentry, LO. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 20: 7-14.
- Prusty, R., Grisafi, P. y Fink, GR. (2004). The plant hormona indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 101: 4153-4157.
- Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A. y Tzanetakis, N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infact faeces and Feta cheese. Int J Food Microbiol. 69: 125-133.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. y Pérez-Ortín, JE. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* durinf wine fermentation. Appl. and Env. Microbiology. 5: 2057-2061.
- Q**
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D. (1992a). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2948-2953
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1992b). A comparative study of different methods of yeast strain characterisation. Syst. Appl. Microbiol. 15: 439- 446
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1994). Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. Int. J. Food Microbiol. 21: 315- 323
- Quesada, MP. y Cenis, JL. (1995). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterisation of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 46: 204-208
- R**
- Ramirez, A., Anguita, M., Castillo, JC., Siles, JR., Torres, F. y Valles, F. (2000). Fangal endocarditis in non drug-addict patients. 10 years experience. Rev. Esp. Cardiol. 53: 507-10.
- Rández-Gil, F., Aguilera, J., Codón, A., Rincón, AM., Estruch, F. y Prieto, JA. (2003). Baker's yeast: challenges and future prospects. En: Funcional genetics of Industrial Yeasts, (ed) de Winde, HJ. Topics in Current Genetics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp, 57-97
- Reddy, PS. y Housman, DE. (1997). The complex pathology of trinucleotide repeats. Curr. Opin. Cell. Biol. 9: 364-372.
- Ren, P., Sridhar, S. y Chaturvedi, V. (2004). Use of paraffin-embedded tissue for identification of *Saccharomyces cerevisiae* in a baker's lung nodule by fungal PCR and nucleotide sequencing. J. Clin. Microbiol. 42: 2840-2
- Rhodes, J.C. (1985). Contribution of complement component C5 to the pathogenesis of

- experimental murine cryptococcosis. *Sabouraudia*. 23: 225-234.
- Riciputo, RM., Oliveri, S., Micali, G. y Sapuppo, A. (1996). Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic species. *Mycoses*. 39: 233-235.
- Rijnders, BJ., Van Wijngaerden, E., Verwaest, C. y Peetermans, WE. (2000). *Saccharomyces* fungemia complicating *Saccharomyces boulardii* treatment in a non-immunocompromised host. *Intensive Care Med*. 26:825.
- Rippon, JW. (1988). *Medical Mycology*, third edition.
- Riquelme, AJ., Calvo, MA., Guzman, AM., Depix, MS., Garcia, P., Pérez, C., Arrese, M. y Labarca, J.A. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J. Clin. Gastroenterol*. 36: 41-3.
- Roberts, RL. y Fink, GR. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev*. 8: 2974-2985.
- Rodríguez-Pachón, J. M., Martín, H., North, G., Rotger, R., Nombela, C. y Molina, M. (2002). A novel connection between the yeast Cdc42 GTPase and the Slt2-mediated cell integrity pathway identified through the effect of secreted Salmonella GTPase modulators. *J. Biol. Chem*. 277: 27094-27102.
- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P. y Gallardin, C. (1996). Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Syst. Appl. Microbiol*. 19: 255-264.
- Roncero, C. y Durán, A., 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol*. 163: 1180-1185
- Rubinstein E, Noriega ER, Simberkoff MS, Holzman R, Rahal JJ. (1975). Fungal endocarditis: analysis of 24 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*; 54:331-4.
- Ruiz-Esquide, F., Diaz, MC., Wu, E. y Silva, V. (2002). Verrucous endocarditis secondary to *Saccharomyces cerevisiae*: a case report [in Spanish]. *Rev Med Chil*. 130:1165-9.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, HJ., Madhani, H. y Fink, GH. (1999). MAP Kinase and cAMP filamentation signalling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J*. 18: 1257-1269.
- ## S
- Sabbagh, W., Flatauer, L. J., Bardwell, A. J., y Bardwell, L. (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol. Cell* 8: 683-691.
- Saibeni, S., Folli, C., de Franchis, R., Borsi, G. y Vecchi, M. (2003). Diagnostic role and clinical correlates of anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in Italian patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis*. 35: 862-868
- Salonen, JH., Richardson, MD., Gallacher, K. y col. (2000). Fungal colonization of haematological patients receiving cytotoxic chemotherapy:

BIBLIOGRAFÍA

- emergence of azole-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Hosp. Infect.* 45: 293-301.
- Sanglard, D. y Odds, FC. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Disease.* 2: 73-85.
- Saracheck, A., Brecher, CA. y Rhoads, DD. (1981). Differentiation of *Candida stellatoidea* from *C. albicans* and *C. tropicalis* by temperature dependent growth responses on defined media. *Mycopathologia.* 75: 179-189.
- Schreuder, MP., Mooren, TA., Toschka, HY., Verrips, CT. y Klis, FM. (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* 14: 115-20.
- Schwechheimer, C., Smith, C. y Bevan, MW. (1998). The activities of acidic and glutamine-rich transcriptional activation domains in plant cells: design of modular transcription factors for high-level expression. *Plant Mol. Biol.* 36: 195-204
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, N., Rollinghoff, M. y Schoppel, K. (2000). The TEA/ATTS transcriptor factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 38: 435-445
- Senneville, E., Ajana, F., Gerard, Y. y col., (1996). Bilateral ureteral obstruction due to *Saccharomyces cerevisiae* fungus balls. *Clin Infect Dis.* 23:636-7.
- Sethi, N. y Mandell, W. (1988). *Saccharomyces* fungemia in a patient with AIDS. *N.Y. State J. Med.* 88, 278-279
- Sherman, F., Fink, GR. y Hicks, JB. (1986). En: *Methods in yeast genetics.* Cold Spring Harbord laboratory. Cold Spring Harbor, NY
- Shin, JH., Kook, H., Shin, DH., Hwang, TJ., Kim, M., Suh, SP. y Ryang, DW. (2000). Nosocomial cluster of *Candida lipolytica* fungemia in pediatric patients. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 19: 344-349.
- Sillje, HH., Paalman, JW., ter Schure, EG., Olsthoorn, SQ., Verkleij, AJ., Boonstra, J. y Verrips, CT. (1999). Funtion of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181: 396-400.
- Sindhu SC, Khetarpaul N (2001) Probiotic fermentation of indigenous food mixture: effect on anti nutrients and digestibility of starch and protein, *J Food Comp Anal*, 14, 601-609.
- Singer, MA. y Lindquist, S. (1998). Multiple effects of trehalose on protein holding in vitro and in vivo. *Mol. Cell.* 1: 639-648.
- Singh, N. (2001). Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin. Infect. Dis.* 33: 1692-1696.
- Smith, DL. (1996). Brewer's yeast as a cause of infection. *Clin. Infect. Dis.* 22: 201
- Smith, D., Metzgar, D., Wills, C. y Fierer, J. (2002). Fatal *Saccharomyces cerevisiae* aortic graft infection. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2691-2692.
- Snyder, S. (1992). Peritonitis due to *Saccharomyces cerevisiae* in a patient on CAPD. *Perit Dial Int.* 12:77-8.

- Sobel, JD., Schmitt, CA., Lynch, M., Vazquez, J. y Zervos, M. (1993). Emerging problem of vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*. Clin. Infect. Dis. 16: 93-9
- Sparrelid E, Hagglund H, Remberger M. y col., (1998). Bacteraemia during the aplastic phase after allogeneic bone marrow transplantation is associated with early death from invasive fungal infection. Bone Marrow Transplant. 22:795-800.
- Stein, PD., Folkens, AT. y Hruska, KA. (1970). *Saccharomyces* fungemia. Chest. 58:173-5
- Stephens-Romero, S.D., Mednick, A.J. y Feldmesser, M. (2005). The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. Infection and Immunity. 73: 114-125.
- Strausbaugh, LJ., Sewll, DL., Ward, TT., Pfaller, MA., Heitzman, T. y Tjoelker, R. (1994). High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. J. Clin. Microbiol. 32: 2299-2300.
- Suzuki, T., Kobayashi, I., Kabe, T. y Tanaka, K. (1989). High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic yeast *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 135: 425-434.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. y Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic inference. En: Molecular systematics, (ed.) Hillis, DM., Moritz, D. y Mable BK. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Tachida, H. y Iizuka, M. (1992). Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. Genetics. 131: 471-478.
- Tawfik, OW., Papasian, CJ., Dixon, AY. y Potter, LM. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immune deficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. 27, 1689-1691
- Teml, A., Kratzer, V., Schneider, B y col., (2003). Anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies: A stable marker for Crohn's disease during steroid and 5-aminosalicylic acid treatment. Am. J. Gastroenterol. 98: 2226-2231
- Tiballi, RN., Spiegel, JE., Zarins, LT. y Kauffmann, CA. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* infections and antifungal susceptibility studies by colorimetric and broth macrodilution methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 23:135-40
- Torner, MJ., Martínez-Anaya, MA., Antuña, B. y de Barber, CB. (1992). Headspace flavour compounds produced by yeast and lactobacilli during fermentation of preferments and bread doughs. International Journal of Food Microbiology. 15: 145-152.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, R., Vazquez-Juarez, R. y Lesel, R. (2002). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. 204: 113-123.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 76: 4350-4354.

T

BIBLIOGRAFÍA

- Tsuda, H., Jafar-Nejad, H., Patel, A.J., Sun, Y., Chen, H.K., Rose, M.F., Venken, K.J., Botas, J., Orr, H.T., Bellen, H.J. y Zoghbi, H.Y. (2005). The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins. *Cell.* 4: 633-4
- Tudor, E. y Board, R (1993). Food spoilage yeasts. En: *The Yeasts*, (ed) Rose, A.H. y Harrison, J.S. volume 5, second edition, Academic Press, London. pp 435-516,
- U**
- Ubeda P, Perez-Belles C, Blanes M, Viudes A, Peman J, Gobernado M. (2001). Infective fungal endocarditis [in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 19:500–2.
- Ubeda, P., Viudes, A., Perez Beeles, C., Marques, J.L., Pemán, J. y Gobernado, M. (2000). Endocarditis por *Saccharomyces cerevisiae* sobre la válvula prostética. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.* 18: 142.
- V**
- van Burik, J.H. y Magee, P. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 743-772.
- van der Aa Kuhle, A. y Jespersen, L. (2003). The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26SrDNA, the ITS1-5.85-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome oxidase II gene. *Syst Appl Microbiol.* 26: 564-571.
- van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K. y Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* and foodborne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol.* 101: 29-39.
- Van Doorn, H.C. y Coelingh, B.F. (1995). Vaginal infection caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *Ned Tijdschr. Geneesk.* 139: 1093-5
- Vaughn-Martini, A y Martín, A. (1998). *Saccharomyces* Meyen ex Rees. En: *The yeasts: a taxonomic study*, (ed) Kurtzman, C.P. y Fell, J.W. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 358-371
- Verstrepen, K.J. y Klis, F.M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeast. Microreview. *Molecular Microbiology.* 1: 5-15.
- Vidotto, V., Koga-Ito, C., Canella, D., Sinico, A., Di Perri, G., Auki, S. y Ito-Kuwa, S. (2000). Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. *Rev. Iberoam. Mycol.* 17: 14-19
- Vidotto, V., Sinicco, A., Di Fraia, D., Cardaropoli, S., Auki, S. y Itokuwa, S. (1997). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 136: 119-123.
- Viggiano, M., Badetti, C., Bernini, V., Garabedian, M. y Manelli, J.C. (1995). *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient with severe burns. *Ann Fr Anesth Reanim.* 14:356–8.
- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J. y de la Torre-Ruiz, M.A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 280: 9149-9159
- W**

- Walker, LJ., Aldhous, MC., Drummond, HE. y col. (2004). Anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies (*ASCA*) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clin. Exp. Immunol.* 135: 490-496.
- Weger, AD., Ganji, A., Clemons, KV., Byron, JK., Minn, Y. y Stevens, DA. (2002). Correlation of the frequency of petite formation by isolates of *Saccharomyces cerevisiae* with virulence. *Medical Mycology.* 40: 161-168
- Wells, CL., Maddaus, MA. y Simmons, RL. (1988). Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 10: 958-978.
- Wheeler, RT., Kupiec, M., Magnelli, P., Abeijon, C. y Fink, GR. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with increased virulence. *Proc Nat Acad Sci, NY.* 100: 2786-2770.
- White, TJ., Bruns, T., Lee, E., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, (ed) Innis, MA., Gelfand, DH., Sninsky, JJ. y White, TJ. San Diego, Academic Press.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, MB. y Johnson, GL. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79: 143-180.
- Wilson, JD., Jones, BM. y Kinghorn, GR. (1988). Bread-making as a source of vaginal infection with *Saccharomyces cerevisiae*: report of a case in a woman and apparent transmission to her partner. *Sex. Transm. Dis.* 15, 35-36
- Witt, W., Bruller, HJ., Falker, G. y Fuhrmann, GF. (1982). Purification and properties of a phospholipids acyl hydrolase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 711: 403-410.
- Witt, W., Mertsching, A. y Konig, E. (1984a). Secretion of phospholipase B from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 795: 117-124.
- Witt, W., Scheweingruber, ME. y Mertsching, W. (1984b). Phospholipase b from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Separation of two forms with different carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta.* 795: 108-116.
- Wittenberg, C. y La Valle, R.. (2003). Cell-cycle-regulatory elements and the control of cell differentiation in the budding yeast. *BioEssays.* 25: 856-867.
- Wolfe, KH. y Shields, DC. (1997). Molecular Evidence for an accident duplication of the entire yeast genome. *Nature.* 387: 708-713
- Wu-Hsieh, B. (1989). Relative susceptibilities of inbred mouse strains C57BL/6 and A/J to infection with *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 57: 3788-3792.
- X**
- Xu, J., Boyd, CM., Livingston, E., Meyer, W., Madden, JF. y Mitchell, TG. (1999). Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonising women. *J Clin Microbiol.* 37: 3835-3843.
- Xuewen, T., Harashima, J. y Heitman. (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohiphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 567-572

BIBLIOGRAFÍA

Y

- Yamada, S., Maruoka, T., Nagai, K., Tsumura, N., Yamada, T., Sakata, Y., Tominaga, K., Motohiro, T., Kato, H., Makimura, K. y Yamaguchi, H. (1995). Catheter-related infections by *Hansenula anomala* in children. *Scand J Infect Dis.* 27: 85-87.
- Yoshida M, Obayashi T, Iwama A. y col., (1997). Detection of plasma (1 α 3)-b-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. *J Med Vet Mycol.* 35:371–465.
- Young, ET., Sloan, JS. y van Riper, K. (2000). Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 154: 1053-1068.

Z

- Zerva, L., Hollis, R.J. y Pfaller, MA. (1996). In Vitro susceptibility testing and DNA typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 34: 3031-3034
- Zheng, L., Campbell, M., Murray, J., Lam, S. y Xu, JR. (2000). The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 724-732
- Zunic, P., Lacotte, J. y Pegoix, M. y col. (1991). *Saccharomyces boulardii* fungemia: apropos of a case. *Therapie.* 46:498–9.