

ESTUDIO DEL POTENCIAL PATÓGENO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS Y PROBIÓTICOS

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la especie más utilizada desde un punto de vista biotecnológico. Además, se emplea como suplemento dietético y como agente probiótico bajo el nombre de *S. cerevisiae* var. *bouardii*. Hasta ahora, su consumo se había considerado beneficioso por sus propiedades biofuncionales y su valor nutritivo intrínseco, y por otra parte, seguro, dado el carácter "GRAS" (de Generally Recognized As Safe) que se atribuye a esta especie de levadura; sin embargo, actualmente se considera a *S. cerevisiae* dentro del grupo de patógenos oportunistas emergentes de baja virulencia, capaz de causar infecciones principalmente en hospedadores inmunodeprimidos.

Con el fin de conocer el posible papel de esta levadura como patógeno emergente, se obtuvieron en este trabajo cepas de *S. cerevisiae* a partir de preparados comerciales con levadura con el fin de valorar el potencial patógeno de dichas cepas, así como contribuir al conocimiento de los mecanismos implicados en la posible virulencia de esta especie de levadura. Este estudio puede ser de gran interés para todas aquellas industrias alimentarias que incluyen a *S. cerevisiae* en sus preparados, con el fin de evitar la administración de dichas cepas de levaduras a individuos inmunodeprimidos.


 Tesis Doctoral
 Silvia Llopis Pla

 Directores: Dra. Amparo Querol Simón
 Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar García

 Tutor: Dra. Emilia Matallana
 Valencia, 2012

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)
Departamento de Biotecnología



**ESTUDIO DEL POTENCIAL PATÓGENO DE CEPAS DE
Saccharomyces cerevisiae AISLADAS DE SUPLEMENTOS
DIETÉTICOS Y PROBIÓTICOS**

Trabajo presentado por Dña. SILVIA LLOPIS PLA para optar al grado
de Doctor por la Universitat de València

Valencia, 2012



INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

La Dra. Amparo Querol Simón, Profesor Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Departamento de Biotecnología de los Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) y la Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar García, Científico Titular del CSIC en el Departamento de Biotecnología de los Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, hacen constar que:

Silvia Llopis Pla, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria, que lleva por título: "Estudio del potencial patógeno de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos y probióticos" para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia, a 3 de Septiembre de 2012.

Dra. Amparo Querol Simón

Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar García

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

- ❖ Beca de Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia

- El trabajo aquí descrito se enmarca dentro del proyecto de investigación que lleva por título “Riesgo de infección por ingesta de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* a través de suplementos dietéticos y probióticos” de la comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) AGL2006-12710-C02-01.

Als meus pares,

Miguel i Chelo

*Nunca te das cuenta de lo que ya has hecho;
sólo puedes ver lo que te queda por hacer*
Marie Curie (1867-1934)

Ha arribat el moment de poder donar les gràcies a totes aquelles persones que m'han ajudat, recolzat i acompanyat durant tota aquesta tesis doctoral; ha sigut una època inoblidable per a mi, on he pogut conèixer a moltes persones que ara formen part de la meua vida. Aquest treball ha tingut molt bons moments i altres de més difícils, però arribat aquest punt només puc sentir alegria.

En primer lloc, agrair a les meues directores de tesis, Amparo i Teresa, l'oportunitat i confiança que em donaren per poder realitzar aquest treball, i per tots aquells consells i coneixement que m'han aportat, el seu esforç, recolzament i la seua dedicació en aquest treball. Ha sigut un plaer per a mi poder formar part del vostre grup de treball, tant a nivell professional com personal.

Volia agrair també a la meua tutora, Emilia Matallana, els consells que em donà quan encara no tenia clar si volia realitzar la tesi i per haver-me transmet el seu optimisme. I a Eladi per la seua ajuda i dedicació en varis aspectes d'aquesta tesis.

Donar les gràcies a tots els meus companys del laboratori 307: Amparo G., Jordi, Patricia R., Roseta, Patricia M., M^a José, Carmela, Roberto i David. Gràcies per fer que el meu treball en el laboratori haja sigut agradable i mai oblidaré tots els bons moments que hem passat junts. A Amparo G. i Jordi per oferir-me la vostra ajuda sempre que l'he necessitada; a Patricia R. pels seus coneixements i conversacions; a M^a José per tractar-me sempre tan bé i preocupar-te per mi, a Patri per la seua ajuda i consells i transmetre-me el seu optimisme; a Roseta gràcies per escoltar-me, per ensenyar-me tot el que necessitava per començar aquesta tesis i per eixes rialles; a Roberto per implicar-te tan en aquesta tesis i ajudar-me quan pareixia que ja no hi havia eixida; a Carmela pels seus consells; i a David per ser tan bon amic i company al mateix temps, per escoltar-me sempre que ho he necessitat i per la teua ajuda en la realització d'aquesta tesis.

Gràcies també a Laura, Armando, Peris i Noé, que encara que no estàvem físicament junts, heu sigut uns companys més. A Armando per transmetre-me la teua tranquil·litat; a Laura per la teua amistat i escoltar els meus “desahogos”, a Peris per la teua ajuda prestada en l’anàlisi dels microarrays, quan estava tan desesperada i a Noé pel teu companyerisme i eixa gràcia andalusa.

També volia agrair a totes aquelles persones que han format part del nostre grup de treball, encara que per poc de temps i que tant m’han aportat. A Mariana, gràcies per transmetre-me eixa alegria; va ser molt gratificant tenir-te al laboratori; a Sandi, gràcies per tots eixos divertits moments, a Serena, per la teua simpatia i rialles i, per últim, al meu amic Christian, que junt amb David, vas fer que l’últim any de la tesis fora menys dur, pels teus consells, i sobretot, per la teua amistat fora del laboratori i eixos bons moments a l’Àmbit (eixes braves i cervesetes!!) i al gimnàs; no els oblidaré mai.

Volia donar les gràcies també a la resta de companys, que formen o han format part del Departament de Biotecnologia, amb els quals he compartit molts bons moments: Rosana (gràcies per ser una bona amiga), Patricia, Maria, Alicia, Empar, Montse, Meritxell, Ricardo, Clara, Juanan, Óscar, Josep Vicent, Pili, Juan, Esther, Maria E., Aida, Fernando, Pedro, J.V., Pepa, Ana, Elena, Rocío, Andrew, Luisa (gràcies pels teus consells), Encarna, Marga, José Manuel, Estefanía, Rosa, Paloma i Salvador. Gràcies a tots pel vostre companyerisme!

Agrair a Ana Cris la seua ajuda en la realització dels microarrays i per la seua companyia i conversa en els molts moments que he passat al laboratori de Genòmica i Proteòmica.

M’agradaria també donar les gràcies a totes aquelles persones dels diferents Departaments del IATA que sempre m’han ajudat quan ho he necessitat.

Agrair especialment a José Sanz per la seua ajuda en les extraccions de sang, i a tots aquelles persones que, desinteressadament, s'oferiren com a donants voluntaris.

A tot l'equip de l'estabulari de la Universitat de València, especialment, a Inma Noguera, per la seua simpatia, amabilitat, i conseguir que els moments a l'animalari foren més agradables.

No podia oblidar-me del meus pas pel laboratori de Microbiologia del HKI en Jena (Alemanya); en primer lloc al Dr. Bernhard Hube per donar-me aquesta fantàstica oportunitat de passar un període al seu laboratori i fer sentir-me com una més; va ser una experiència excepcional que necessitava, i que em va fer aprendre molt. I a tots els membres de l'equip: Antja, Katie, Sascha, Antje, Robbie, Petra, Lidia, Duncan, Ricardo i François. Gràcies a tots per acollir-me tant bé i per la vostra ajuda. I a Duncan, Ricardo, Ana, Isabella, Gabriel i François per la vostra amistat i fer que els moments de nostàlgia foren menys durs.

A tots els meus companys de Biópolis, en especial a Daniel, Marta, Boro (ànim en la teua tesi!), a Maria E. (gràcies per l'ajuda en els dubtes de format), a Aida, Rosa, Angela, Empar, Bea, Fernando i a Pepa (gràcies per la teua serenitat), per escoltar-me i animar-me "a no tirar la toalla" durant l'escriptura d'aquesta tesis. I, per últim, molt en especial a Patri per confiar amb mi, per la teua amistat i fer-me vorer les coses diferent (he après molt de tu!) i a la meua companya Núria, per ser una persona tan excepcional, escoltar-me, animar-me i fer-me passar tan bon moments en el treball.

A les meues companyes de pis, Maria i Nikki, per donar-me suport i per eixa convivència tan bona, que han fet sentir-me sempre com a casa. Marieta, sé que aconseguiràs tot alló que et proposes i a tu, Nikki, et desitge molta sort en la teua tesis.

Als meus amics del poble, en especial a M^aAngeles, Moni, Inés, M^a Carmen Esther, Guillermo, Rober, Mari Fina i Pep, per tots eixos moments de risas, xarraetes i aventures que hem fet junts, sense les quals m'haguera resultat més complicat desconnectar quan més ho necessitava.

A la meua cosina Maria per l'ajuda en el disseny de la portada.

A la meua família, sobre tot als meus pares per confiar sempre amb mi, per preocupar-se sempre de la meua formació, per la seua lluita constant i per recolzar-me durant tots aquest anys; tot el que he aconseguit ha sigut gràcies a vosaltres. Vos estime! Al meu germà Miguel i a Mari, gràcies també per les paraules d'ànim. I a Inés, Rosendo, Mar, Adolfo, Josep i Sole, gràcies també per la vostra comprensió i confiança.

I finalment, agrair a Raül tota la seua paciència i les hores que has passat amb mi mentre he realitzat i escrivia aquesta tesis, per saber tranquil·litzar-me amb els teus consells i fer-me vorer les coses amb optimisme, transmetre-me la teua alegria i vitalitat que sempre portes damunt, inclús en els moments més dolents, i per estar sempre ahí quant t'he necessitat. Gràcies per ser com eres!

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: Aspectos generales	1
2. Papel beneficioso de <i>S. cerevisiae</i>	2
2.1. <i>S. cerevisiae</i> en la industria agroalimentaria	2
2.2. <i>S. cerevisiae</i> como ingrediente funcional	4
3. Aspectos perjudiciales de <i>S. cerevisiae</i>	6
3.1. Papel de <i>S. cerevisiae</i> en la alteración de alimentos	6
3.2. <i>S. cerevisiae</i> como patógeno oportunista emergente	6
3.2.1. Incidencia de <i>S. cerevisiae</i> en el ámbito clínico	7
3.2.2. Casos clínicos	9
3.2.3. Tipos de infecciones	11
3.2.4. Tratamientos	14
4. Origen de los aislados clínicos de <i>S. cerevisiae</i>	15
4.1. Origen evolutivo	15
4.2. Origen de colonización	17
5. Origen de las infecciones sistémicas por <i>S. cerevisiae</i>	19
5.1. Translocación a través de la barrera intestinal	19
5.2. Adquisición nosocomial	21
5.3. Vía respiratoria	22
6. Mecanismos de virulencia	23
6.1. Factores potenciales de virulencia	23
6.1.1. Crecimiento a altas temperaturas	24
6.1.2. Crecimiento pseudofilamentoso e invasivo	24
6.1.3. Secreción de hidrolasas extracelulares	26
6.1.4. Variación fenotípica o “switching”	27
6.1.5. Adherencia como factor de virulencia	28
6.1.6. Resistencia al estrés oxidativo como factor de virulencia	29
6.2. Factores de supervivencia	30

6.2.1. Síntesis de pirimidinas y purinas	31
6.2.2. Nitrógeno	31
6.2.3. Hidratos de carbono	33
6.2.4. Ciclo del glioxilato	34
6.2.5. Proteínas de choque térmico	34
6.2.6. Dimorfismo	35
7. Estudio de la virulencia en sistemas <i>in vivo</i>	36
7.1. Modelo murino de infección sistémica	37
7.2. Modelo murino de infección gastrointestinal	41
8. Técnica de hibridación genómica comparada mediante micromatrices de DNA	44
9. Genómica comparada de aislados clínicos y virulentos de <i>S. cerevisiae</i>	48
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS	54
1. Productos dietéticos	54
2. Cepas microbianas	55
3. Medios de cultivo	57
4. Aislamiento de las cepas	59
5. Rasgos fenotípicos asociados con virulencia	60
5.1. Capacidad de crecimiento a altas temperaturas	60
5.2. Producción de proteasas y fosfolipasas	61
5.3. Crecimiento pseudofilamentoso	62
5.4. Crecimiento invasivo	63
6. Obtención de sangre y separación en sus diferentes fracciones	63
6.1. Obtención de plasma	64
6.2. Obtención de las fracciones sanguíneas	64

7. Ensayos con sangre o sus fracciones	68
7.1. Determinación de la supervivencia de las levaduras en sangre, plasma y fracciones sanguíneas (MNCs y PMNs)	68
7.2. Cinética de fagocitosis	69
7.3. Incubación de las levaduras en sangre para extracción de su RNA	69
8. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	70
8.1. Extracción del RNA total de levadura incubada en sangre	70
8.2. Aislamiento de DNA	71
8.2.1. Aislamiento de DNA genómico de levaduras	71
8.2.2. Tratamiento del DNA genómico de levaduras para la realización de micromatrices de DNA genómico	72
8.3. Medida de la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos	73
8.4. Amplificación mediante PCR convencional	73
8.4.1. Oligonucleótidos	73
8.4.2. Amplificación de la región 5,8-ITS del DNA ribosómico	74
8.4.3. Identificación de híbridos interespecíficos del grupo <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	75
8.4.4. Amplificación de elementos delta (δ)	76
8.5. Tratamientos enzimáticos del DNA	77
8.5.1. Digestión del producto de amplificación de la región 5,8S-ITS del DNA ribosómico	77
8.5.2. Digestión del producto de amplificación de los genes nucleares <i>APM3</i> , <i>PEX2</i> y <i>BRE5</i>	78
8.5.3. Digestión del DNA mitocondrial	78
9. Citometría de flujo	79

10. Análisis genómico y transcriptómico mediante micromatrices de DNA	80
10.1. Preparación de las muestras para el estudio de genómica comparada	80
10.1.1. Digestión del DNA genómico	80
10.1.2. Marcaje del DNA genómico	81
10.2. Preparación de la muestra para el ensayo de transcriptómica	82
10.2.1. Amplificación del RNA	82
10.2.2. Síntesis y purificación de aminoalil-cDNA(AA-cDNA)	83
10.2.3. Acoplamiento de los fluoróforos al AA-cDNA y purificación de los Cy's-cDNA	84
10.3. Hibridación de las micromatrices con muestras de DNA y cDNAs	85
10.4. Adquisición y procesado de las imágenes	87
10.4.1. Análisis y tratamiento de los datos de genómica comparada	87
10.4.2. Análisis y tratamiento de los datos de transcriptómica	88
10.4.3. Ontologías génicas (GO)	89
10.5. Validación de los resultados obtenidos por genómica y transcriptómica	89
10.5.1. Validación de los resultados obtenidos por genómica	89
10.5.2. Validación de los resultados obtenidos por transcriptómica	91
11. Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad en modelo murino	96
11.1. Infección sistémica	96
11.1.1. Preparación y administración del inóculo	97
11.1.2. Parámetros estudiados	98

11.2. Infección gastrointestinal	99
11.2.1. Preparación y administración del inóculo	100
11.2.2. Tratamiento con antibióticos	101
11.2.3. Tratamiento con antifúngico	101
11.2.4. Inducción de inmunosupresión y daño intestinal	102
11.2.5. Parámetros estudiados	102
11.3. Estudios de histopatología	103
11.4. Análisis estadístico	104
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
CAPÍTULO 1. Aislamiento, identificación y caracterización de aislados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> procedentes de suplementos dietéticos	105
1. Aislamiento de levaduras a partir de suplementos dietéticos	105
2. Identificación de los aislados	108
3. Caracterización a nivel de cepa	112
3.1. Análisis de restricción del DNA mitocondrial	112
3.2. Amplificación por PCR de elementos delta	114
3.3. Combinación de ambas técnicas	114
4. Discusión	116
CAPÍTULO 2. Estudio del potencial patógeno de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aisladas de productos dietéticos	123
1. Estudio de rasgos fenotípicos asociados con virulencia	123
1.1. Crecimiento a altas temperaturas	125
1.2. Secreción extracelular de proteasas y fosfolipasas	127
1.2.1. Actividad proteasa	128
1.2.2. Actividad fosfolipasa	131

1.3. Crecimiento pseudofilamentoso	131
1.4. Crecimiento invasivo	133
1.5. Comparación de los resultados obtenidos para los rasgos fenotípicos de virulencia analizados en cepas aisladas de productos dietéticos	135
2. Estudio <i>in vivo</i> de la patogenicidad en modelos murinos	137
2.1. Modelo murino de infección sistémica	137
2.1.1. Selección de las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	138
2.1.2. Infección sistémica de los aislados de <i>S. cerevisiae</i>	138
2.1.3. Estudio histopatológico	146
2.2. Modelo murino de infección gastrointestinal	148
2.2.1. Desarrollo de modelos de translocación e infección intestinal para el estudio del aislado D14	149
2.2.2. Comportamiento del aislado avirulento D23 en un modelo de infección gastrointestinal	166
2.3. Aplicación de técnicas moleculares para la confirmación de la identidad de las colonias recuperadas de los ratones infectados	170
3. Discusión	173
3.1. Relación de los rasgos de virulencia con los aislados de productos dietéticos	173
3.2. Potencial patógeno de las cepas aisladas de productos dietéticos	177
3.3. Capacidad de colonización, translocación y diseminación de un aislado considerado virulento y otro avirulento	186
CAPÍTULO 3. Estudio de la composición genómica de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	196
1. Determinación de la ploidía mediante citometría de flujo	196
2. Caracterización genómica mediante micromatrices de DNA	198

2.1. Características comunes en la composición genómica de los aislados virulentos	206
2.2. Confirmación de la técnica de micromatrices de DNA	212
2.2.1. Comprobación del número de copias génicas mediante PCR cuantitativa	212
2.2.2. Determinación del crecimiento a diferentes concentraciones de cobre	213
3. Discusión	215
3.1. Citometría de flujo	215
3.2. Composición genómica de las cepas virulentas	216
3.3. Cambios comunes en el genoma de los aislados virulentos	220
3.4. Posible origen de los aislados virulentos	224
CAPÍTULO 4. Identificación de posibles genes implicados en la virulencia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	226
1. Supervivencia de las cepas de la levadura en sangre total y en sus fracciones (PMN o MNC)	227
2. Perfil transcripcional de levaduras incubadas en sangre humana	230
2.1. Selección de cepas para el estudio transcripcional en sangre	230
2.2. Perfil transcripcional de levaduras incubadas en sangre humana	230
3. Comparación de la expresión génica entre cepas virulentas (D14 y 60) y no virulentas (CECT 10.431 y W303) en sangre humana	236
4. Resistencia al estrés oxidativo de las cepas virulentas y no virulentas	242
5. Discusión	244
5.1. La sangre como modelo para mimetizar las infecciones	245

sistémicas por <i>S. cerevisiae</i>	
5.2. Expresión diferencial de genes y grupos funcionales durante la incubación en sangre en cada una de las cepas	247
5.2.1. Diferencias de expresión específicas entre cepas virulentas y no virulentas	252
5.3. Resistencia al estrés oxidativo	254
CONCLUSIONES	258
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	261
ANEXO I	266
ANEXO II	277
ANEXO III	279
BIBLIOGRAFÍA	293

Índice de Abreviaturas

AMP	Adenosín monofosfato cíclico
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	DNA complementario
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
cRNA	RNA complementario
Cy3	Cyanina 3 (fluoróforo)
Cy5	Cyanina 5 (fluoróforo)
DEPC	Dietil pirocarbonato
dl	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Fetal bovine serum (Suero bovino fetal)
g	Gramo
GRAS	Generally Regarded As Safe (Considerados generalmente como seguros)
h	Hora
HEPES	Ácido 2-[4-(2-Hidroxiethyl)-1-Pireracínil-Etanosulfónico
HSP	Heat Shock Protein (Proteína de choque térmico)
i.p.	Inyección intraperitoneal
ITS	Internal transcribed spacer (Espaciador interno transcrito)
Kb	Kilobases
l	Litro
Log ₂	Logaritmo en base 2
Log ₁₀	Logaritmo en base 10
M	Molar
m	Marcador

Índice de Abreviaturas

MAPK	Quinasa de tipo MAP
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Militro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MNC	Mononuclear cell (Célula mononuclear)
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	ADN mitocondrial
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
O.D.	Densidad óptica
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PCR-DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante)
pm	Picomol
PMN	Polymorphonuclear cell (Célula polimorfonuclear)
p/v	Peso/volumen
Pz	Zona de la actividad fosfolipasa o proteasa
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
rDNA	DNA ribosómico
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de

	restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Reactive Nitrogen Species (especies reactivas de nitrógeno)
ROS	Reactive Oxygen Species (especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
S	Subunidad
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGD	<i>Saccharomyes</i> Genome Database
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SLAD	Synthetic Low Amonium Dextrose (Medio de dextrosa sintético de bajo amonio)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleótido simple)
SSC	Citrato de sodio estándar
tRNA	RNA de transferencia
TSA	Tripticasa Soja Agar
U	Unidades
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
YNB	Yeast Nitrogen Base (Base Nitrogenada de levaduras)
µg	Microgramo
µl	Microlitro

Índice de Abreviaturas

μm	Micrometro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
Δ	Delección

Introducción

1. *Saccharomyces cerevisiae*: Aspectos generales

Saccharomyces cerevisiae está taxonómicamente bien definida. El género *Saccharomyces* Meyen ex Reess es taxonómicamente un miembro de la familia *Saccharomycetaceae*, el cual pertenece al orden *Saccharomycetales* colocado en la clase *Hemiascomycetes* y el filo *Ascomycota* (Kurtzman y col., 2011). *S. cerevisiae*, junto con las especies *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces arboricolus* y *Saccharomyces eubayanus*, constituyen actualmente el género *Saccharomyces* (Kurtzman y col., 2011; Libkind y col., 2011).

Las células vegetativas de *S. cerevisiae* son redondas, ovaladas o elongadas y se aíslan normalmente en pequeños grupos (Vaughan-Martini y Martin, 1998); las colonias son de color blanco cremoso (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). Bajo ciertas circunstancias de limitación de nutrientes las células son capaces de elongarse, dando lugar al crecimiento pseudohifal (Gimeno y col., 1992). Se reproducen vegetativamente por gemación sin formación de filamentos, excepto posible formación de pseudohifas simples (Barnett y col., 2000).

Esta levadura se encuentra en el ambiente cómo célula haploide o diploide, creciendo vegetativamente cuando hay abundancia de nutrientes. Cuando se encuentra ante una limitación de nutrientes puede presentar dos tipos diferentes de crecimiento, o bien en forma de pseudohifas o bien esporulando dando lugar a ascas permanentes conteniendo de 1 a 4 ascosporas. Estas ascosporas germinarán, dando lugar a células haploides α o a que se unirán rápidamente para dar lugar a

una célula diploide, pudiendo así reproducirse vegetativamente por gemación y dar inicio al ciclo sexual.

S. cerevisiae aparece en la superficie de muchos frutos y además, puede ser aislada a partir de una gran variedad de alimentos y bebidas, tales como bebidas alcohólicas (vinos, cervezas, sidras, sake), refrescos, productos de repostería y panadería, productos lácteos y fermentados, productos salados y conservas (Deák y Beuchat, 1996).

S. cerevisiae es uno de los organismos más estudiados y mejor caracterizados que existen, y además, fue el primer organismo eucariota del que se conoció la secuencia completa de su genoma (Goffeau y col., 1996). Todo esto, junto con la facilidad para cultivarla y manipularla, ha hecho que esta levadura sea considerada como un modelo eucariota por excelencia.

2. Papel beneficioso de *S. cerevisiae*

2.1. *S. cerevisiae* en la industria agroalimentaria

Las levaduras han jugado un papel importante en la producción de alimentos y bebidas desde las civilizaciones más antiguas de forma inadvertida. Con el paso del tiempo, *S. cerevisiae* ha sufrido un proceso progresivo de domesticación de manera que, actualmente, su manipulación está completamente dirigida y controlada. *S. cerevisiae*, conocida comúnmente como “levadura de cerveza o de panadería”, ha sido y sigue siendo todavía la levadura más explotada en la industria agroalimentaria, gracias a la capacidad fermentativa que muestra sobre diferentes sustratos. De hecho, es bien conocido su papel fermentativo en

la producción de bebidas alcohólicas como el vino, cerveza, sake, sidra y de alimentos como el pan y ciertos quesos.

Debido a su carácter inocuo, también se usa como fuente de ingredientes o aditivos, como es el caso de la obtención de la vanilina o del coenzima A, de antioxidantes, aromas, sabores, colorantes y vitaminas (Fleet, 2006); además, se usa como una fuente alternativa de obtención de proteínas para consumo humano, y en la preparación de suplementos nutricionales debido a su gran contenido en vitamina B, proteínas, aminoácidos y minerales. También es conocido su uso como probiótico, concretamente a través de *S. cerevisiae* var. *boulardii*, que se usa como agente bioterapéutico para el tratamiento de diarreas y otros desórdenes gastrointestinales (McFarland y Bernasconi, 1993; Czerucka y Rampal, 2002). Estos dos aspectos se tratarán con más detalle en el siguiente apartado.

Como ya se comentó anteriormente, la levadura *S. cerevisiae* fue el primer organismo eucariota que se secuenció. Como consecuencia, esta levadura ha sido muy estudiada y caracterizada y se ha usado ampliamente como modelo eucariota. En el sector biotecnológico ha sido utilizada como sistema de clonación, como sistema de expresión heteróloga (secretando las proteínas al medio de cultivo o bien reteniéndolas en la pared celular (Schreuder y col., 1996)), en la producción de interferón o citoquinas (importantes en la regulación de la respuesta del sistema inmune frente a diversas infecciones (Murphy y Kavanagh, 1999)) y en el estudio de identificación y caracterización de genes heterólogos, como por ejemplo, genes de *Candida albicans* (Fu y col., 1998).

2.2. *S. cerevisiae* como ingrediente funcional

Además de la importancia de *S. cerevisiae* en procesos fermentativos, cabe destacar su valor alimenticio intrínseco que le confiere utilidad como suplemento dietético o para mejorar el perfil nutricional de las cervezas enriquecidas. Estos preparados, además del valor nutritivo, poseen algunas propiedades biofuncionales con efectos positivos sobre una o más funciones fisiológicas para el huésped, por lo que se ajustan al concepto de ingrediente funcional.

El interés de *S. cerevisiae* como alimento funcional se centra especialmente en dos atributos nutricionales: fuente natural de proteínas concentradas de alta calidad y abundancia del complejo vitamínico B (reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis). En concreto, posee proteínas de valor biológico medio con buena composición en aminoácidos que constituyen su elemento nutricional más importante. Presentan un elevado contenido en lisina, por lo que es de gran utilidad para combinarlas con las proteínas de los cereales, que generalmente carecen de ella; además, son abundantes en isoleucina y treonina. Por tanto, la levadura de cerveza es un suplemento proteico muy útil para dietas hipocalóricas deficientes en proteínas. Por otra parte, en la levadura se encuentran minerales y oligoelementos (reducen el riesgo de osteoporosis y fortalecen el sistema inmune), lípidos (ácido oleico y linoleico que reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y disminuyen los síntomas de la menopausia) y es rica en fibra. Es importante destacar que la levadura seca tiene la propiedad de ser un prebiótico, característica que principalmente se debe a la estructura de su pared celular.

S. cerevisiae se emplea también como probiótico; concretamente *S. cerevisiae* var. *boulardii* se ha descrito recientemente en la literatura

clínica como un agente bioterapéutico o probiótico humano potencial, ya que su consumo tiene efectos positivos para promover la salud. Su inclusión en la literatura como probiótico es muy reciente (Fleet, 2006) y su uso como aditivo a ciertos alimentos se encuentra hoy en día en desarrollo.

S. cerevisiae var. *boulardii* fue aislado originariamente del fruto del lichi en Indochina, y no fue hasta principios de los años 50 cuando se usó en Francia para tratar un caso de desorden gastrointestinal (McFarland y Bernasconi, 1993). Esta levadura actualmente se encuentra disponible comercialmente como un preparado liofilizado, y su distribución es en forma de cápsulas o en paquetes en Europa, U.S.A. y África (McFarland y Bernasconi, 1993). Sus diferentes designaciones comerciales son Ultralevura[®], Precosa[®], Perentecol[®], Codex[®], Floratil[®] y Florastor[™].

Se recomienda la administración de *S. cerevisiae* var. *boulardii* como agente probiótico en el caso de diarreas con múltiples orígenes, como es el uso prolongado de antibióticos, diarreas crónicas en pacientes con SIDA, las causadas por *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* y varias *Enterobacteriaceae* (Czerucka y Rampal, 2002), diarreas asociadas con la enfermedad de Chron, a desórdenes por inflamaciones del intestino (Guslandi y col., 2000), diarreas asociadas al “síndrome del viajero” (Kirchhelle y col., 1996) y a gastroenteritis agudas, tanto en niños como en adultos.

3. Aspectos perjudiciales de *S. cerevisiae*

3.1. Papel de *S. cerevisiae* en la alteración de alimentos

S. cerevisiae también puede desempeñar un papel negativo a través de la alteración de ciertos productos alimenticios. Entre estos efectos, destaca la producción de CO₂ en productos lácticos, dando lugar a la rotura de los envases (Fröhlich-Wyder, 2003), la fermentación de refrescos, la alteración de las aceitunas, el crecimiento en superficie sobre el pan (Tudor y Board, 1993) y el crecimiento durante el almacenamiento del vino (Dequin y col., 2003). *S. cerevisiae* se encuentra también frecuentemente entre las levaduras salvajes que se aíslan de la cerveza (van der Aa Kühle y Jespersen, 1998) y que tienen como efecto negativo la producción de olor a fenol y ésteres, además de turbidez (Lawrence, 1988). Algunas cepas de *S. cerevisiae* son capaces de producir el factor “killer”, que es letal para otras cepas de la misma especie, lo que produce efectos indeseables en el proceso de elaboración de la cerveza (Lawrence, 1988).

3.2. *S. cerevisiae* como patógeno oportunista emergente

Los aspectos beneficiosos de *S. cerevisiae* son bien conocidos, sin embargo, en general no se ha prestado gran interés a su potencial patógeno a pesar de su creciente incidencia en el ámbito clínico, principalmente por haber sido considerada tradicionalmente como una levadura segura.

3.2.1. Incidencia de *S. cerevisiae* en el ámbito clínico

La incidencia de infecciones fúngicas ha aumentado significativamente en las dos últimas décadas y constituyen una importante causa de mortalidad y morbilidad entre los pacientes hospitalizados. Mientras que la mayoría de infecciones causadas por levaduras son causadas por *C. albicans* y otras especies de este género (Erdem y col., 2003), otras especies de levadura, como *S. cerevisiae*, previamente consideradas como no patogénicas, están emergiendo en las últimas décadas como patógenos importantes, principalmente entre los pacientes inmunodeprimidos y críticos (Casadevall y Pirofski, 2001). Por ello, la visión que se ha tenido hasta ahora de estas levaduras como no patógenas está cambiando, y recientemente, se ha acuñado el término de patógenos emergentes oportunistas de baja virulencia para referirse a ellas (Murphy y Kavanagh, 1999; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005).

El aumento de las infecciones atribuidas a *S. cerevisiae* se debe en gran parte al incremento de individuos inmunodeprimidos como resultado de enfermedades (por ejemplo, SIDA y cáncer) (Pontón y col., 2000) o de tratamientos terapéuticos (quimio y radioterapia, antibióticos de amplio espectro, inmunosupresión para trasplante de órganos), así como por el extenso uso de catéteres intravasculares permanentes (Zerva y col., 1996). Además, teniendo en cuenta los avances médicos experimentados en lo referente a la eficiencia de todos estos tratamientos, se ha conseguido aumentar la expectativa de vida de los pacientes, y por tanto, la probabilidad de que desarrollen una infección también ha aumentado considerablemente.

Por otra parte, el desarrollo de nuevas técnicas de identificación (análisis y secuenciación de regiones ribosomales, restricción de la región ribosómica 5,8S-ITS, RFLPs, PCR a tiempo real, PCR-DGGE) con mayor

poder de resolución o de nuevos sistemas comerciales de identificación, como el sistema Vitek Yeast Biochemical Card y API 20C han hecho posible la diferenciación inequívoca entre *S. cerevisiae* y *Candida* sp., permitiendo revelar que *S. cerevisiae* es el agente causal de muchas infecciones que hasta ese momento se atribuían sistemáticamente a especies del género *Candida* (Sobel y col., 1993; Smith, 1996).

Un resumen de los factores de predisposición se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores que contribuyen al establecimiento de una infección causada por patógenos oportunistas en humanos

Factores que favorecen infecciones fúngicas oportunistas en humanos
Desarrollo de nuevas técnicas de detección e identificación de patógenos
Hospitalización: aumenta la posibilidad de sufrir una infección nosocomial
Incremento de pacientes con cáncer o SIDA: disposición de mayor número de individuos de sufrir una infección fúngica oportunista
Uso de nuevos agentes inmunosupresores para aumentar el éxito de los trasplantes: aumenta el número de personas inmunodeprimidas 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 y alteran la flora gastrointestinal
Inserción de catéteres: una nueva vía de entrada de patógenos oportunistas

3.2.2. Casos clínicos

Desde los años 50 se ha relacionado a la levadura *S. cerevisiae* con casos de fungemia, vaginitis e infección de órganos, pero es desde los años 90 donde el número de casos relacionados con esta levadura ha aumentado llamativamente. El primer estudio fue en el año 1943, donde se describía 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 descrito fue en el año 1970, en un paciente con una prótesis en la válvula mitral (Stein y col., 1970).

En un estudio reciente llevado a cabo por Enache-Angoulvant y Hennequin (2005), documentaron un total de 92 casos de infección invasiva causados por *Saccharomyces*, de los cuales 15 casos fueron diagnosticados antes de los años 90, mientras que los 76 restantes tuvieron lugar con posterioridad. Todos los pacientes tenían en común que poseían al menos un factor de riesgo: 47 pacientes habían sufrido cateterismo y otros 45 pacientes se les había administrado terapia antibiótica. En 37 del total de los casos se determinó que *S. cerevisiae* var. *boulardii* fue el agente etiológico de la infección. La gran mayoría de estos casos clínicos se recopilaron también en un trabajo previo muy similar de Muñoz y colaboradores (2005); documentaron 60 casos de fungemia causada por *S. cerevisiae*: el 60% de los pacientes se encontraban hospitalizados en la UCI, el 71% recibieron nutrición parenteral o enteral, el 93% tenían insertado un catéter y el 88% habían recibido terapia antimicrobiana de amplio espectro. El uso de probióticos se llevó a cabo en 29 de los 60 pacientes con fungemia y otros cinco pacientes con fungemia estuvieron en la vecindad de pacientes que habían recibido este tipo de terapia. Por último, estudios más recientes, han mostrado la ocurrencia de nuevas infecciones fúngicas, cuyo agente

causal fueron cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* (Swinne y col., 2009; Sabino y col., 2010; Arendrup y col., 2011; Chitasombat y col., 2012).

Cabe destacar que aunque la mayoría de las infecciones se han asociado con pacientes inmunodeprimidos y críticos, algunas infecciones graves se han dado en hospedadores aparentemente inmunocompetentes (Jensen y Smith, 1976; Sobel y col., 1993; Fung y col., 1996; Smith y col., 2002; Hamoud y col., 2011). Cabe destacar el caso documentado por Jensen y Smith (1976) donde se describe que la ingestión oral diaria de un suplemente dietético de levadura de cerveza (10^7 a 10^9 células de *S. cerevisiae* por gramo), provocó intervalos de fiebre, fungemia y funguria en un paciente sin ningún factor de predisposición, es decir, inmunocompetente, teniendo como resultado final una diseminación o infección sistémica con sintomatología evidente (fiebre, náuseas, malestar y sudores). Los síntomas desaparecieron una vez suspendida la administración del producto dietético.

En el Anexo I, se recogen un total de 102 casos clínicos de fungemia asociados con *S. cerevisiae* y con el agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii*, desde los años 70 hasta el 2011. Se detalla tanto la enfermedad subyacente, los factores de predisposición, el lugar de aislamiento, así como el resultado final de la infección (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005; de Llanos y col., 2006a; Whelan y Myers, 2010). Estos datos reflejan la importancia de las infecciones provocadas por *S. cerevisiae* a pesar de la creencia acerca de su inocuidad.

3.2.3. Tipos de infecciones

Las infecciones causadas por *S. cerevisiae* pueden ser superficiales o invasivas con una gran variedad de síndromes clínicos (Tabla 2). Las infecciones superficiales causadas por *S. cerevisiae* afectan principalmente a piel, membranas mucosas, cavidad oral, vagina y el tracto respiratorio (Fleet y Roostita, 2006). Las infecciones superficiales más frecuentes son las vaginitis en mujeres y las balinitis en sus parejas (Wilson y col., 1988; Sobel y col., 1993; García-Martos y col., 1998; McCullough y col., 1998a; Murphy y Kavanagh, 1999; Posteraro y col., 1999; Echevarría-Irigoyen y col., 2011) y pueden cursar de forma sintomática a asintomática (Agatensi y col., 1991; Sobel y col., 1993).

Cuando la levadura es capaz de diseminarse alcanzando varios órganos, estamos ante una infección sistémica o invasiva. En el caso de *S. cerevisiae*, se sabe que es capaz de diseminarse y de invadir, ya que se ha aislado de distintos órganos y sitios estériles (Eng y col., 1984; Tawfik y col., 1989; Aucott y col., 1990; Cairolí y col., 1995; Murphy y Kavanagh, 1999). Muchas veces, los síntomas de estas infecciones son indistinguibles de los causados por una candidiasis invasiva (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005). La fungemia es, probablemente, la manifestación clínica más grave de la infección invasiva por *S. cerevisiae* y demuestra el papel de esta levadura como patógeno (Cimolai y col., 1987). Se ha observado tanto en pacientes en situación crítica que presentan los factores de predisposición (Bouza y Muñoz, 2004), como en pacientes sin situación aparente de riesgo (Rijnders y col., 2000; Hamoud y col., 2011).

Hay que destacar que se desconocen aún los síntomas específicos asociados a una infección por *S. cerevisiae*. Se suele observar, en la mayoría de los casos, fiebre, náuseas, malestar general y sudores que suelen remitir o desaparecer cuando se aplica algunos de los posibles

tratamientos. La evolución de la mayoría de los pacientes con fungemia causada por *S. cerevisiae* suele ser buena (Cassone y col., 2003), aunque también se han descrito casos en los que la muerte sobrevino como consecuencia de un choque séptico (Piarroux y col., 1999; Perapoch y col., 2000; Úbeda y col., 2000).

Tabla 2. Síndromes causados por *S. cerevisiae*

Síndrome	Referencia
Neumonía	Tawfik y col., 1989; Aucott y col., 1990; Doyle y col., 1990; Montineri y col., 2008
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
Celulitis	Almanza y col., 1998
Infección del tracto urinario	Eng y col., 1984; Senneville y col., 1996
Peritonitis	Dougherty y Simmons, 1982; Snyder, 1992; Tiballi y col., 1995; Mydlik y col., 1996
Vaginitis	Sobel y col., 1993; Nyirjesy y col., 1995; García-Martos y col., 1998; McCullough y col., 1998a; Posteraro y col., 1999; Echevarría-Irigoyen y col., 2011
Choque séptico con fiebre	Chertow y col., 1991

Síndrome	Referencia
Esofagitis	Eng y col., 1984; Doyle y col., 1990; van Doorn y Coelingh Bennink, 1995; Konecny y col., 1999; Kliemann y col., 2011
Asociada a la enfermedad de Crohn	Main y col., 1988; Darroch y col., 1999; Bernstein y col., 2001; Candelli y col., 2003; 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; Krause y col., 2003; Saibeni y col., 2003; Teml y col., 2003; Czaja y col., 2004; Walker y col., 2004
Asma	Belchi-Hernández 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; Smith y col., 2002; Swinne y col., 2009
Endocarditis	Stein y col., 1970; Ramírez-Moreno y col., 2000; Úbeda y col., 2000; Úbeda y col., 2001; Ruiz-Esqvide y col., 2002
Embolia cutánea	Williams y col., 2007

3.2.4. Tratamientos

Los tratamientos empleados para hacer frente a las infecciones causadas por estas levaduras oportunistas presentan ciertas dificultades. Ya que *S. cerevisiae* causa infecciones principalmente entre individuos inmunodeprimidos, una solución sería mejorar el estado inmunológico del hospedador, pero desgraciadamente esto no siempre es posible. Existen otros posibles tratamientos, como es el uso de terapias antifúngicas o la retirada de catéteres intravenosos (Hazen, 1995). Puesto que la fungemia es la principal infección de las levaduras oportunistas, y como 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 procede, este tratamiento puede ir combinado al mismo tiempo junto con una terapia antifúngica.

La eficacia de los agentes antifúngicos para el tratamiento de *S. cerevisiae* es un tema de continuo estudio, ya que es difícil establecer un agente antifúngico de elección, puesto que los estudios de sensibilidad frente a antifúngicos son escasos en *S. cerevisiae* (Echevarría-Irigoyen y col., 2011; Papaemmanouil y col., 2011). Además, al igual que están emergiendo nuevas levaduras patógenas, también emergen nuevos patrones de susceptibilidad frente a los agentes antifúngicos. 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 (actúa sobre la síntesis de proteínas), los azoles (actúan inhibiendo la biosíntesis de ergosterol en diferentes puntos) como el fluconazol, el itraconazol, el ketoconazol y los triazoles derivados, como voriconazol y posaconazol (Hazen, 1995; Carrillo-Muñoz y col., 2006), las equinocandinas (metabolitos secundarios fúngicos que inhiben la síntesis de beta 1-2-

glucano), caspofungina y micafungina. Con el objetivo de superar los problemas derivados del abuso de los azoles, macrólidos y equinocandinas, se han explorado nuevas dianas y posibles antifúngicos frente a las levaduras, como son los inhibidores de la N-miristilación de las proteínas fúngicas, entre los cuales encontramos el miristato, análogos de la histidina, 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).

4. Origen de los aislados clínicos de *S. cerevisiae*

4.1. Origen evolutivo

Existen varios estudios donde se muestra que los aislados clínicos difieren fenotípicamente de cepas de laboratorio y vínicas (McCusker y col., 1994a, b; Clemons y col., 1996; Zerva y col., 1996; Weger y col., 2002; Ben-Ari y col., 2005; de Llanos y col., 2006b), pero se desconoce si la relación entre el origen clínico y los rasgos virulentos se debe a un ancestro común o a una adaptación en el huésped. Si los aislados clínicos compartiesen un ancestro común, la evolución de la virulencia podría ser atribuida a un evento aislado que hubiera conferido una ventaja selectiva a una o más cepas progenitoras patógenas. Sin embargo, si los aislados clínicos mostrasen múltiples orígenes de evolución, la patogenicidad podría reflejar una ventaja adaptativa conferida por la adquisición de múltiples rasgos de virulencia en diferentes cepas. Un ejemplo es el crecimiento a 37°C, el cual es requerido para patogenicidad. Se puede hipotetizar que esta característica se puede haber adquirido en las

levaduras que crecen en las frutas, las cuales alcanzan altas temperaturas durante la descomposición. Esto es apoyado por algunos trabajos, donde muestran que aislados de *S. cerevisiae* provenientes de fruta en descomposición son más resistentes al calor (Aref y Cruess, 1934; Garza y col. 1994). Así, los aislados clínicos podían haber adquirido la habilidad para sobrevivir a altas temperaturas a través de la recombinación con aislados de levadura que crecen en la fruta (Diezmann y Dietrich, 2009). Wheeler y colaboradores (2003) observaron que un aislado de *S. cerevisiae* procedente de higo fue más virulento que un aislado clínico indicando que, aislados procedentes de material vegetal fermentado podrían servir de fuente de cepas de *S. cerevisiae* encontradas en pacientes inmunodeprimidos.

Otros estudios demuestran que aislados clínicos se relacionan genéticamente con cepas vínicas, cerveceras y panaderas (de Llanos y col., 2006a; Schacherer y col., 2009); por otro lado, Muller y McCusker (2009b) observaron, además, que no existía ninguna diferencia significativa en la composición de microsatélites y la ploidía y la diversidad genética entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*, y estudios de polimorfismo en aislados clínicos no consiguieron relacionarlos entre sí ni asociarlos a ningún origen geográfico o nicho ecológico específico, indicando la gran diversidad genética entre cepas virulentas de *S. cerevisiae*. Por tanto, en base a estas observaciones parece poco probable la ocurrencia de un origen único para los aislados clínicos (Liti y col., 2009; Muller y McCusker, 2009b; Schacherer y col., 2009). Sin embargo, existen estudios que muestran justo lo contrario, al demostrar que los aislados clínicos son genéticamente más diversos y diferentes de los aislados domésticos y vínicos debido a diferentes niveles de recombinación y diferenciación genética que podrían explicar su origen y mantenimiento (Diezmann y Dietrich, 2009). Otros estudios previos

basados en el análisis de microsatélites y polimorfismos en la longitud de los cromosomas también mostraron una diferenciación genética significativa entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* (Malgoire y col., 2005; Klingberg y col., 2008). Además, recientemente se han descrito diferentes polimorfismos asociados a un origen clínico en *S. cerevisiae* relacionado con la capacidad de pseudofilamentación, mantenimiento de la pared celular y la detoxificación celular (Muller y col., 2011).

A la vista de estos trabajos, parece existir una gran controversia respecto a un origen evolutivo concreto y una composición genética específica asociada a un carácter clínico, por lo que se desconoce con exactitud si cualquier tipo de cepa, independientemente de su nicho ecológico o origen geográfico, podría ser capaz de llevar a cabo una colonización si encuentra las condiciones favorables en el hospedador (Klingberg y col., 2008).

4.2. Origen de colonización

Existe un interés creciente por aclarar el origen de colonización de los aislados clínicos, es decir, de dónde proceden y cómo han llegado hasta el hospedador. Teniendo en cuenta que la colonización es el paso previo a la infección, esta información es muy importante. Además, el hecho de que la principal exposición a altas dosis de células vivas de esta especie de levadura sea a través de alimentos, bebidas, suplementos dietéticos y probióticos, hace que los microbiólogos clínicos y de alimentos estén especialmente interesados en conocer si éstos pueden ser fuente de levaduras con potencial patógeno. En este sentido, el estudio de la biodiversidad de los aislados clínicos nos puede proporcionar mucha información acerca de su origen, y es de gran interés estudiar su

asociación genética con aislados de origen no clínico. Estudios de este tipo indican que al menos algunos aislados clínicos tienen un origen exógeno y en concreto asociado con cepas comerciales de panadería (Wilson y col., 1988; McCullough y col., 1998a; Posteraro y col., 1999; Hennequin y col., 2001; de Llanos y col., 2004; de Llanos y col., 2006a) y con el agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (de Llanos y col., 2004 y 2006a; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Herbrecht y Nivoix, 2005; MacKenzie y col., 2008). En dos de estos trabajos se mostró una clara predisposición por parte de las citadas cepas para colonizar, ya que 32% de los aislados clínicos analizados (96 aislados en de Llanos y col., 2004 y 4 aislados en de Llanos y col., 2006a) se asociaron con dos cepas comerciales de panadería (Cinta Roja) y que otros 20% fueron indistinguibles de la cepa de *S. cerevisiae* var. *boulardii* obtenida del preparado comercial llamado Ultralevura®. La alta incidencia de estas cepas comerciales en muestras clínicas, podría estar relacionada con el hecho de que se trata de cepas que se manipulan con mucha más frecuencia que otras cepas. En otro estudio reciente, se demuestra de nuevo la relación existente entre algunos aislados clínicos y cepas de panadería y probióticas, no sólo a nivel filogenético, sino también a nivel metabólico (MacKenzie y col., 2008). Sin embargo, esta relación no puede ser aplicada a todas las cepas clínicas por la alta diversidad presentada por estas cepas tanto a nivel filogenético como metabólico.

Estos trabajos han supuesto un gran avance al explicar la presencia en humanos de ciertos aislados de *S. cerevisiae*, y no se puede descartar que otras fuentes de células vivas como es el caso de los suplementos dietéticos a base de levaduras, bebidas enriquecidas o alimentos contaminados puedan ser otra fuente de aislados clínicos. Por otra parte, esta asociación no se ha mostrado para todos los aislados clínicos que han sido objeto de estudio. Por ello, no se puede descartar que existan

aislados específicos de humanos, pero esto, de momento no se ha demostrado.

5. Origen de las infecciones sistémicas por *S. cerevisiae*

Se piensa que las infecciones por *S. cerevisiae* sobrevienen por vía oral u otras maneras de inoculación exógena como inhalación (Ren y col., 2004) o autoinoculación (Jensen y Smith, 1976; Wilson y col., 1988; Fung y col., 1996). Una vez que la levadura ha colonizado el tracto gastrointestinal, respiratorio o genitourinario por una de estas vías puede permanecer allí de forma inocua. Sin embargo, si la levadura consigue alcanzar el torrente sanguíneo y desde allí diseminarse a órganos vitales, puede desarrollar una infección sistémica. Se proponen tres vías de entrada de *S. cerevisiae* a la sangre, que se detallan a continuación.

5.1. Translocación a través de la barrera intestinal

Las células vivas de *S. cerevisiae* pueden ingerirse de forma inadvertida a través de alimentos y bebidas con niveles significativos de células de levadura viables. Esto puede llegar a ser bastante frecuente si tenemos en cuenta las numerosas especies de levadura que se pueden encontrar en los diferentes tipos de alimentos (Tudor y Board, 1993; Deák y Beuchat, 1996; Romano y col., 1996). Por ejemplo, en ciertos quesos donde *S. cerevisiae* y otras especies de levaduras participan en su maduración, el número de células de levadura puede llegar hasta niveles de 10^9 UFCs/g (Fröhlich-Wyder, 2003; Jacques y Casaregola, 2008). Otra fuente importante de células vivas la constituyen los productos fermentados (vino, cerveza, productos de panadería), donde *S. cerevisiae*

se encuentra presente de forma natural o es añadida como cultivo iniciador para llevar a cabo la fermentación. Entre estos productos, la cerveza tipo Weissbier, muy popular en Europa central, contiene un alto número de células viables de *S. cerevisiae*, ya que no es filtrada antes del embotellado. Sin embargo, en el resto de los citados productos fermentados, dado su proceso de elaboración, la presencia de células vivas de levadura en el producto final es improbable, aunque no hay que descartar contaminaciones como resultado de errores durante el procesado o después de éste por una mala manipulación. En este caso, las levaduras podrían crecer sin control durante el almacenamiento, constituyendo una fuente de células vivas en el momento de su consumo (Deák y Beuchat, 1996; Loureiro y Querol, 1999; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Lo mismo ocurre en todos aquellos alimentos susceptibles de alteración por *S. cerevisiae* como frutas, zumos, refrescos, productos con alto contenido en azúcar, vegetales fermentados, así como en productos lácteos y de panadería (Deák y Beuchat, 1996). Por último, no hay que olvidar que la principal ingestión de células vivas de *S. cerevisiae* tiene lugar a través de productos dietéticos (consumo en aumento) o del agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii*. El incremento de la población de levaduras en el tracto intestinal como consecuencia de su ingestión, junto con la ocurrencia de lesiones de la mucosa intestinal (diarreas, uso de inmunosupresores) o la aplicación de tratamientos con antibióticos, favorecen la entrada de las levaduras en el torrente sanguíneo (Muñoz y col., 2005; Fleet y Roostita, 2006). Existen evidencias clínicas de que este mecanismo tiene lugar *in vivo*, en concreto, se describió un caso de fiebre en un paciente que ingirió diariamente un suplemento dietético que contenía entre 10^7 y 10^8 células de *S. cerevisiae* por gramo (Jensen y Smith, 1976) y además, se conocen numerosos casos de fungemia atribuidos a la translocación intestinal de *S. cerevisiae* var.

boulardii (Lherm y col., 2002; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005). Esta puerta de entrada también ha sido documentada para algunas bacterias (Wells y col., 1988) y en *C. albicans* (Cole y col., 1996).

5.2. Adquisición nosocomial

La adquisición nosocomial se refiere a las rutas de entrada a las que se exponen las personas durante su ingreso en centros hospitalarios, y constituyen una forma de entrada al torrente sanguíneo sin necesidad de atravesar la barrera intestinal. La principal ruta de contaminación la constituye la mala manipulación de catéteres venosos centrales, que rompen la integridad de la barrera cutánea dejando de esta manera una puerta de entrada para las levaduras y otros microorganismos; Whelan y Myers (2010) describieron que 25 pacientes con fungemia causada por *S. cerevisiae* var. *boulardii* habían recibido alimentación vía catéter venoso central. Las levaduras contaminantes provienen de las manos y uñas del personal sanitario tras la manipulación de paquetes y cápsulas de Ultralevura[®] (Bouakline y col., 2000; Salonen y col., 2000) o tal y como se ha descrito recientemente, de alimentos conteniendo altos niveles de levadura introducidos en el ámbito del hospital (Fleet y Roostita, 2006; Clemons y col., 2010). Se han descrito casos en los que los trabajadores mostraban una colonización persistente de la levadura en sus manos de esta levadura, incluso después de un lavado vigoroso (Hennequin y col., 2000). Esto podría explicar los casos de fungemia causados por *S. cerevisiae* var. *boulardii* en pacientes que no habían recibido el probiótico, pero que estaban en camas cercanas a pacientes que sí lo habían recibido (Cassone y col., 2003; Graf y Gavazzi, 2007).

La cateterización no es la única causa de infección nosocomial, ya que se han descrito casos de transmisión a través del ambiente o incluso de persona a persona (Nyirjesy y col., 1995; Zerva y col., 1996; Olver y col., 2002; Cassone y col., 2003). Además, se han descrito casos de autoinoculación (Jensen y Smith, 1976; Wilson y col., 1988; Fung y col., 1996).

5.3. Vía respiratoria

Esta vía de entrada se puede dar cuando tiene lugar la inhalación de dosis elevadas de levadura. Esto ocurre en el caso de *S. cerevisiae* var. *bouardii* (Ultralevura®), ya que a nivel hospitalario se manipulan paquetes con 250 o 500 mg de levadura antes de su administración enteral. Por ello, tanto el personal sanitario manipulador como los pacientes ubicados en las proximidades quedan expuestos al polvo. Se ha demostrado que 2 horas después de la apertura de cápsulas y paquetes conteniendo *S. bouardii*, se ha detectado la presencia de levadura en el aire y en las superficies de la habitación (Hennequin y col., 2000). Se ha sugerido que la levadura primero colonizaría las vías respiratorias altas, siendo posteriormente aspirada hacia los pulmones donde pasaría al torrente sanguíneo y se diseminaría hacia otros órganos (Murphy y Kavanagh, 1999).

Otros grupos susceptibles de inhalación de altas concentraciones de levaduras son los panaderos, bodegueros y los productores de levaduras, habiéndose descrito la presencia de un nódulo pulmonar causado por la inhalación de levadura de panadería en polvo en un individuo expuesto a la misma durante su trabajo como panadero (Ren y col., 2004).

6. Mecanismos de virulencia

La virulencia es un proceso multifactorial y complejo que requiere, por una parte, la presencia de factores de virulencia que permitan a la levadura invadir los tejidos del hospedador causando síntomas, y por otra parte, la expresión de múltiples genes en las diferentes etapas y sitios de la infección que permitan la supervivencia y la proliferación de la levadura en el hospedador.

Además, al ser las levaduras patógenos oportunistas, la respuesta del hospedador juega un papel importante en el desarrollo de la infección. Se conoce muy poco acerca de los mecanismos de virulencia que median en el caso concreto de *S. cerevisiae*, principalmente por su reciente introducción en el ámbito hospitalario y por su carácter oportunista de baja virulencia; ambos motivos han hecho que los estudios centrados en esta levadura sean muy escasos hasta la fecha. Los conocimientos generados al respecto se resumen a continuación.

6.1. Factores potenciales de virulencia

Los factores de virulencia que pueden participar en las infecciones causadas por la levadura oportunista *S. cerevisiae* no se conocen con exactitud. 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. Actualmente, no es posible determinar un factor específico de virulencia que pueda ser usado para diferenciar cepas de origen clínico o no clínico. A continuación, se describen los factores de virulencia más destacados descritos en la levadura *S. cerevisiae*.

6.1.1. Crecimiento a altas temperaturas

La habilidad de crecer a la temperatura del cuerpo (37°C) y a la temperatura característica de fiebre del huésped es un importante factor de virulencia de un patógeno (van Burik y Magee, 2001). Varios trabajos muestran que una gran mayoría de aislados clínicos de *S. cerevisiae* poseen la habilidad de crecer a 42°C (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006b) y además, esta capacidad se ha relacionado con la virulencia *in vivo* de alguno de estos aislados (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2011). Sin embargo, no es del todo claro que exista asociación entre la capacidad de crecimiento a altas temperaturas y la virulencia *in vivo*. En un trabajo reciente, se demostró que no había diferencias en la capacidad de crecimiento a 37°C y a 39°C entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* (Klingberg y col., 2008) y además, ninguno de ellos fue capaz de crecer a 42°C, por lo que estos autores sugieren que el crecimiento a 42°C no es un requisito para poder persistir en el huésped.

6.1.2. Crecimiento pseudofilamentoso e invasivo

El crecimiento pseudohifal e invasivo en *S. cerevisiae* es un fenómeno relacionado con el desarrollo de cambios y modificaciones en la organización de la colonia en respuesta a estreses ambientales, como por ejemplo la limitación de nitrógeno, aminoácidos y ausencia de una fuente de carbono abundante (Gimeno y col., 1992; Roberts y Fink, 1994; Cullen y Sprague, 2000; Guo y col., 2000; Pan y col., 2000; Gagliano y col., 2002; Palecek y col., 2002; Braus y col., 2003), la presencia de alcoholes, los cuales pueden venir del propio metabolismo de la levadura (Dickinson, 1996; Lorenz y col., 2000; Zaragoza y Gancedo, 2000), o también ante

una limitación de oxígeno y como respuesta a otros estreses no nutricionales como altas temperaturas y choque osmótico (Gagiano y col., 2002). La habilidad de invadir el medio puede proporcionar una ventaja selectiva a la levadura, como encontrar nutrientes escasos o escapar de un ambiente perjudicial (Gancedo, 2001), de manera que las células pasan de tener un patrón de gemación bipolar a otro unipolar, alargándose y dando lugar a la formación de pseudohifas (Gimeno y col., 1992). Este crecimiento en forma de pseudohifas implica una dramática remodelación de la morfología celular y de la dinámica del ciclo celular (Gancedo, 2001). 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).

Algunas cepas de *S. cerevisiae* son capaces de mostrar fenotipos invasivos y/o de pseudohifas, mientras que otras carecen de estas propiedades (Liu y col., 1996; Stanhill y col., 1999; de Llanos y col., 2006b). Estas pseudohifas son capaces de penetrar en el agar y por analogía podrían tener un papel clave en el proceso de invasión de los tejidos (McCusker y col., 1994b). El crecimiento pseudofilamentoso *in vitro* se estudia creciendo las levaduras en ausencia de nitrógeno y observando la aparición o no de pseudohifas. Aunque se ha visto que las cepas más virulentas muestran mayor crecimiento pseudohifal *in vitro* (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2011), no parece que haya una relación clara de esta capacidad con la virulencia *in vivo*. Este hecho puede deberse a que *in vivo* las fuentes de nitrógeno no sean limitantes para *S. cerevisiae*, y por tanto, no se vea favorecido el desarrollo de estas pseudohifas (Kingsbury y col., 2006).

Por otro lado, en lo que se refiere al crecimiento invasivo, algunos aislados de *S. cerevisiae* 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. Zupan y Raspor (2008) observaron asociación entre el grado de invasión *in vitro* y el grado de virulencia en aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*, y propusieron que la determinación cuantitativa del grado de invasión es útil para predecir el potencial virulento de cepas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, aunque este estudio constituye un gran avance y claramente indica que la invasión en agar representa un rasgo fenotípico para predecir la virulencia, estos mismos autores concluyen en un trabajo posterior que todavía no se ha establecido una buena correlación entre invasión *in vitro* y virulencia (Zupan y Raspor, 2010). Cabe destacar que se observó un efecto estimulante de la invasión *in vitro* a 39°C (temperatura típica de la fiebre humana) y en ayuno de nutrientes (Zupan y Raspor, 2010).

6.1.3. Secreción de hidrolasas extracelulares

Las proteasas y las fosfolipasas son las enzimas hidrolíticas posiblemente más implicadas con la virulencia de *S. cerevisiae* (McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006b). Estas enzimas proporcionan a la levadura la capacidad de degradar las barreras estructurales del hospedador, facilitando así la invasión de los tejidos (van Burik y Magee, 2001) y la adquisición de nutrientes del medio.

Proteasas

Estas enzimas no guardan ninguna relación directa con la virulencia de *S. cerevisiae* o con su origen clínico, ya que aunque parece existir una mayor tendencia en la producción y secreción de las proteasas en los aislados clínicos frente a las cepas industriales, ésta no es significativa (McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006b). Tampoco

se ha observado una relación directa entre la capacidad de secretar este tipo de enzimas y la virulencia *in vivo* en un modelo murino (McCusker y col., 1994b). Para la detección de esta actividad en *S. cerevisiae* se han empleado diversos sustratos como la gelatina, caseína y el BSA (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2006b).

Fosfolipasas

Las fosfolipasas, dependiendo del modo de actuación y la molécula de fosfolípido diana, se clasifican en diferentes subclases: fosfolipasa A, B, C y D, lisofosfolipasa y lisofosfolipasatransacilasa. Esta actividad permite la degradación de superficies celulares, consiguiendo así la levadura una penetración inicial, seguida de una adhesión e invasión posterior. Para la detección de esta actividad en *S. cerevisiae* se dispone de un medio con yema de huevo (Ghannoum, 2000).

Interesantemente, los aislados clínicos de esta levadura muestran una mayor tendencia a la producción de este tipo de enzimas que las cepas industriales (de Llanos y col., 2006b).

6.1.4. Variación fenotípica o “switching”

Esta característica se ha descrito en varios patógenos fúngicos, como *C. albicans* (Slutsky y col., 1985). Se trata de un mecanismo de plasticidad fenotípica desarrollado para adaptarse rápidamente a las distintas condiciones ambientales, observándose una variación en el aspecto de las colonias. Se han descrito casos donde aislados clínicos de *S. cerevisiae* tienden a producir múltiples fenotipos coloniales, los cuales son reversibles y ocurren con una alta frecuencia (10^{-2} y 10^{-5}); por el contrario, aislados no clínicos de *S. cerevisiae* no muestran ninguna

variación en el fenotipo colonial (Clemons y col., 1996). Por tanto, el “switching” parece ser un rasgo importante en los aislados clínicos de *S. cerevisiae*, aunque no se conoce que papel juega en la infección (van Burik y Magee, 2001).

6.1.5. Adherencia como factor de virulencia

La capacidad de adhesión a las células epiteliales y endoteliales permite a la levadura poder colonizar, para a continuación, penetrar e invadir el tejido del hospedador. Por todo ello, la adherencia es un factor esencial en la patogenicidad de *C. albicans*, ya que constituye el prelude del desarrollo de la infección (Karkowska-Kuleta y col., 2009; Liu y Filler, 2011). En el caso de *S. cerevisiae*, se ha descrito que aislados clínicos fueron capaces de adherirse a células epiteliales cuando se compararon con una cepa de laboratorio y una cepa de panadería, aunque en un menor grado que *C. albicans* (Murphy y Kavanagh, 2001).

Recientemente, también se ha demostrado que tanto aislados clínicos de *S. cerevisiae* como no clínicos poseen cierta capacidad, aunque limitada, para adherirse a células endoteliales y especialmente a epiteliales (Klingberg y col., 2008; Yáñez y col., 2009). La identificación de esta habilidad en *S. cerevisiae* podría estar indicando que la adhesión jugaría un papel en la colonización por parte de este patógeno emergente.

Por otra parte, la capacidad de adherirse a las superficies abióticas, tales como prótesis de plástico y catéteres, se ha visto que puede canalizar las levaduras patógenas hacia la corriente sanguínea y órganos internos de los pacientes. Esta capacidad de adherirse a las superficies se ve reforzada por la formación de biopelículas de difícil erradicación y que plantean un grave problema desde el punto de vista

médico, sobre todo, en la unidades de cuidados intensivos (Kojic y Darouiche, 2004). La producción de biopelículas se ha observado en *S. cerevisiae* (Reynolds y Fink, 2001; Mortensen y col., 2007) y en el caso de *S. cerevisiae var. boulardii* (Ultralevura[®]), se sabe que la inserción de catéter venoso central puede ser considerado un factor de riesgo de fungemia (Hennequin y col., 2000; Herbrecht y Nivoix, 2005). De hecho, un porcentaje importante de fungemias relacionadas con *S. cerevisiae var. boulardii* se han descrito en pacientes con catéteres intravenosos (Enache-Angoulvant y Hennequin 2005; Muñoz y col., 2005). Además, no se puede descartar que otras cepas de *S. cerevisiae* introducidas en el ambiente hospitalario a través de alimentos con cargas sustanciales de levadura pudieran alcanzar los catéteres y adherirse a ellos (Fleet y Roostita, 2006; Clemons y col., 2010).

En *S. cerevisiae*, la adhesión podría ser inducida por una limitación de aminoácidos (Braus y col., 2003; Kleinschmidt y col., 2005) y se trata de un proceso donde intervienen muchos factores. La capacidad de cambiar de un estado de no adherencia a otro de adherencia supone probablemente una ventaja adaptativa para *S. cerevisiae* y tiene importancia tanto desde el punto de vista económico, ya que esta plasticidad se puede explotar en muchas aplicaciones biotecnológicas (Verstrepen y col., 2003; Brückner y Mösch, 2011), como desde el punto de vista médico como se acaba de comentar.

6.1.6. Resistencia al estrés oxidativo como factor de virulencia

La capacidad de sobrevivir a un estrés oxidativo es considerada como uno de los rasgos de virulencia que promueven la invasión y la colonización del huésped. Este estrés oxidativo está ejercido por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) generadas por macrófagos,

neutrófilos y otras células fagocíticas que son tóxicas para la mayoría de los microorganismos, causando daño en el DNA, en las proteínas y en los lípidos (Bogdan y col., 2000). Los patógenos fúngicos muestran diferentes grados de resistencia a estas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Brown y col., 2009), de manera que cuanto más resistente es el microorganismo más probabilidades tiene de desarrollar una infección. Esta capacidad está también asociada con la virulencia de algunas bacterias (Abshire y Neidhardt, 1993; Rea y col., 2004; Riboulet y col., 2007). Poco se conoce sobre el papel de la resistencia frente al estrés oxidativo ejercido por aislados clínicos de *S. cerevisiae* durante el transcurso de una infección. Lo que sí se ha demostrado es que ciertos aislados clínicos de *S. cerevisiae* presentan mayor resistencia al estrés oxidativo que los no clínicos, sugiriendo una correlación entre esta habilidad y la patogenicidad (Diezmann y Dietrich, 2009). La expresión de genes de resistencia a estrés oxidativo en *C. albicans* durante la infección en sangre humana o tejido fue crucial en las etapas iniciales de la infección (Fradin y col., 2003; Fradin y col., 2005; Zakikhany y col., 2007) y confieren a la levadura capacidad para poder sobrevivir al ataque de los neutrófilos (Rubin-Bejerano y col., 2003) y macrófagos (Lorenz y col., 2004). Lo mismo se ha observado en *Cryptococcus neoformans*, donde la expresión de ciertos genes también fueron de importancia para sobrevivir en el interior de macrófagos contribuyendo a su virulencia (Missall y Logde, 2005).

6.2. Factores de supervivencia

La supervivencia *in vivo* es esencial para la patogenicidad fúngica y está determinada por genes y rutas específicos. La identificación de estos genes y rutas mejoraría considerablemente nuestros conocimientos

en patogénesis fúngica. En el caso de *S. cerevisiae*, aunque es evidente que puede llegar a desarrollar una fungemia, pues se ha aislado de sangre (de Llanos y col., 2006a, Swinne y col., 2009), se conoce poco sobre qué grupos de genes se expresan para llevar a cabo el proceso.

Existen sólo dos trabajos donde se analiza la importancia de la expresión de ciertos genes, asociados con la virulencia en levaduras típicamente patógenas y en la supervivencia de *S. cerevisiae in vivo* (Goldstein y McCusker, 2001; Kingsbury y col., 2006). Estos estudios se han llevado a cabo mediante el empleo de sistemas murinos y de cepas de *S. cerevisiae* con disrupciones en uno o varios de estos genes.

6.2.1. Síntesis de pirimidinas y purinas

Cepas mutantes de *S. cerevisiae* en los genes *ADE2* y *URA3* fueron deficientes en la supervivencia *in vivo* (Goldstein y McCusker, 2001), al igual que ocurre en *C. albicans* y *C. neoformans* (Kirsch y Whitney, 1991; Varma y col., 1992; Perfect y col., 1993), por tanto, tanto la ruta de biosíntesis de las pirimidinas como la de las purinas parecen ser importantes para la supervivencia *in vivo* de la levadura *S. cerevisiae*.

6.2.2. Nitrógeno

La total disponibilidad de los aminoácidos del huésped por parte de una levadura auxótrofa le podría permitir la supervivencia *in vivo*. Por el contrario, si existe una incapacidad en el transporte o niveles bajos en los tejidos del hospedador de algunos aminoácidos, la capacidad por parte de la levadura para sintetizar sus propios aminoácidos debería ser clave en la supervivencia. A modo de ejemplo tenemos el caso de la leucina, el mutante auxotrófico (*leu2Δ*), causa una severa disminución de la

supervivencia *in vivo*, por tanto, se podría considerar que la ruta biosintética de la leucina tiene un papel importante en la supervivencia de *S. cerevisiae* en un modelo murino. No ocurre lo mismo en el caso del triptófano y la histidina, donde la contribución de estas rutas biosintéticas es menor para el desarrollo de la supervivencia en el hospedador (Goldstein y McCusker, 2001).

Kingsbury y colaboradores (2006) llevaron a cabo un estudio más detallado respecto al papel del nitrógeno en la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae*. Consideraron como posibles fuentes de nitrógeno *in vivo* el amonio, la urea y los aminoácidos. Usando mutantes incapaces de transportar o utilizar alguno de estos componentes, llegaron a la conclusión de que ninguna fuente de nitrógeno era esencial individualmente, sino que esta levadura puede emplear una gran variedad de fuentes de nitrógeno. Además, usando mutantes auxotróficos encontraron que algunos compuestos nitrogenados, tales como poliaminas, y los aminoácidos metionina y lisina podían ser adquiridos directamente desde el huésped, mientras que otros como la treonina, los aminoácidos aromáticos, isoleucina y valina debían ser sintetizados *de novo* por la levadura. Tampoco se encontró un requerimiento especial *in vivo* respecto a la expresión de rutas que controlan “nitrogen-sensing pathways”. Estos fenotipos de supervivencia para *S. cerevisiae* contrastan con los de otras levaduras como *C. neoformans* (Yang y col., 2002; Kingsbury y col., 2004a y b), donde los mutantes *met3Δ*, *lys9Δ* y *spe3Δ* ven disminuida tanto su supervivencia como su virulencia *in vivo*.

En otro trabajo donde se llevó a cabo un estudio transcriptómico de células de *S. cerevisiae* y *C. albicans* incubadas con monocitos y neutrófilos (Rubin-Bejerano y col., 2003), se observó que después de la fagocitosis por neutrófilos en ambas levaduras se inducían genes de la ruta de la biosíntesis de metionina y arginina; por el contrario, estas rutas

no eran inducidas cuando la fagocitosis era llevada a cabo por monocitos, lo que indicaba un ambiente pobre en aminoácidos en el interior del fagosoma de los neutrófilos, pero no en el de los monocitos. Estas diferencias en la respuesta transcripcional de la levadura frente a la ingestión de monocitos o neutrófilos pueden tener diferentes consecuencias biológicas, ya que en un ambiente pobre en aminoácidos, la levadura puede formar pseudofilamentos que ayuden a escapar del interior de la célula fagocítica.

Estos estudios muestran que algunos genes y rutas requeridas para el mantenimiento de un aporte constante de nitrógeno son necesarios para la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae*.

6.2.3. Hidratos de carbono

La glucosa es la fuente de carbono preferida de *S. cerevisiae*, siendo también el azúcar predominante en el suero murino. El uso de mutantes incapaces de transportar o utilizar la glucosa han demostrado que constituye la fuente de carbono más significativa para la supervivencia de la levadura *in vivo* (Kingsbury y col., 2006).

Por otra parte, otro aspecto del metabolismo de carbohidratos es la acumulación y la hidrólisis de carbohidratos de almacenamiento. *S. cerevisiae* acumula glucógeno y trehalosa en condiciones de limitación de nitrógeno, bajas concentraciones de carbohidratos y estrés osmótico y térmico (Lillie y Pringle, 1980; Hottiger y col., 1987; Eleuterio y col., 1993; Parrou y col., 1999), por tanto, la capacidad de esta levadura para responder a bajas concentraciones de glucosa son determinantes en su supervivencia.

La ruptura de los citados carbohidratos de almacenamiento también parece tener una contribución en la supervivencia *in vivo* de esta

levadura, sin embargo, la hidrólisis de trehalosa parece tener un mayor efecto, ya que se ha demostrado que su disociación contribuye en mayor grado a la supervivencia *in vivo* de la levadura. La importante función de la trehalosa *in vivo* puede deberse a su papel en la recuperación del plegamiento correcto de las proteínas tras sufrir estrés (de Virgilio y col., 1994; Parrou y col., 1997; Singer y Lindquist, 1998).

6.2.4. Ciclo del glioxilato

El ciclo del glioxilato es una ruta metabólica que permite el uso de compuestos de dos carbonos, como el etanol y el acetato para generar energía (Fernández y col., 1992); esta ruta es importante en la supervivencia *in vivo* de algunas levaduras patógenos como *C. albicans* (Lorenz y Fink, 2001).

Respecto a *S. cerevisiae*, Goldstein y McCusker (2001), observaron que un mutante en el gen isocitrato liasa *icl1Δ* (enzima clave del ciclo del glioxilato), tuvo una supervivencia *in vivo* (sistema murino) similar a la mostrada por la cepa salvaje; por tanto, este gen no parece contribuir en gran medida a la supervivencia *in vivo* de esta especie de levadura; este hallazgo fue posteriormente validado por Kingsbury y colaboradores (2006) y se ha descrito que el ciclo del glioxilato tampoco es requerido para la virulencia de *C. neoformans* (Rude y col., 2002).

6.2.5. Proteínas de choque térmico

La síntesis de estas proteínas se produce cuando la levadura se expone a altas temperaturas u otras formas de estrés. Su papel en la patogénesis de *S. cerevisiae* ha sido estudiado viendo que la sobreexpresión de la proteína de choque térmico, Hsp90, aumenta la

virulencia de cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* (Clemons y col., 1994; Hodgetts y col., 1996).

Aunque todavía no se ha determinado qué papel pueden tener estas proteínas en la patogénesis de esta levadura, sí se sabe que quizá tenga relación con el hecho de que son antígenos inmunodominantes y están asociadas con la inmunidad humoral protectora, como ocurre en el caso de *C. albicans* (Matthews y col., 1991).

6.2.6. Dimorfismo

El dimorfismo, paso de una forma levaduriforme a una filamentosa, se considera que juega un papel importante en la patogénesis de la mayoría de los patógenos fúngicos en humanos, como se comenta a continuación. Mutantes deficientes en dimorfismo en *C. albicans* son avirulentos o presentan virulencia atenuada (Stoldt y col., 1997; Schweizer y col., 2000). En *S. cerevisiae*, los factores de transcripción Flo8 (ruta del AMP cíclico) y Tec1 (ruta de transducción de las MAPKs) se requieren para la activación del gen *FLO11* (Pan y Heitman, 1999; Rupp y col., 1999) que codifica una floculina necesaria en el dimorfismo de *S. cerevisiae* (Lambrechts y col., 1996; Lo y Dranginis, 1998). El papel de estos genes en la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae* se estudió en un modelo murino (Goldstein y McCusker, 2001). Los mutantes simples *flo8Δ* y *tec1Δ* mostraron una cierta deficiencia en la supervivencia *in vivo*, siendo esta deficiencia un poco más acentuada en el doble mutante *flo8Δtec1Δ*, lo que podría sugerir que la ausencia de Flo8 y Tec1 tiene un efecto aditivo en el fenotipo; sin embargo, mutantes *flo11Δ* mostraron la misma supervivencia *in vivo* que la cepa salvaje, demostrando así que la expresión de Flo11 no confiere ninguna ventaja *in vivo* o simplemente no se expresa (Goldstein y McCusker, 2001).

7. Estudio de la virulencia en sistemas *in vivo*

Para poder estudiar el potencial patógeno de los aislados de *S. cerevisiae* se puede establecer una aproximación *in vitro* basada en la determinación de rasgos fenotípicos de virulencia descritos en el apartado 6.1. McCusker y colaboradores (1994b), llevaron a cabo un estudio comparativo de rasgos fenotípicos de algunas cepas de *S. cerevisiae* con la virulencia *in vivo*, observando que existe asociación para dos de los rasgos, la capacidad de crecer a temperaturas altas y pseudofilamentación. Sin embargo, a pesar de la utilidad de estos sistemas, sobre todo como método de cribado, la asociación entre los rasgos fenotípicos y la virulencia *in vivo* no siempre es evidente, por lo que en último término es necesario el uso de sistemas *in vivo* para la asignación definitiva del grado de virulencia. El sistema *in vivo* más apropiado para el estudio de la determinación del potencial patógeno en hongos y levaduras es el murino. El ratón es la especie animal más utilizada para estudios con microorganismos por su similitud con la fisiología humana, su fácil manipulación y su bajo coste.

Cuando se desarrolla un modelo animal de infección fúngica, se debe de tener en cuenta qué ruta de infección usar. El modelo más utilizado es el de infección sistémica, usando como ruta de infección la inoculación intravenosa. En este modelo se muestra el potencial patógeno de la cepa y su capacidad de diseminación, independientemente de la vía de entrada del hongo en el hospedador. Además, la vía intravenosa constituye una ruta de entrada habitual en el caso de *S. cerevisiae var. boulardii* a través de catéteres contaminados por malas prácticas del personal hospitalario (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005). Por otra parte, en ocasiones se recurre a sistemas de infección localizada para simular diversas patologías en órganos concretos

como pulmón, cerebro, ojos, piel o mucosas (oral, gastrointestinal y vaginal). En el caso de *S. cerevisiae*, dado que la principal vía de entrada de células vivas es oral a través de la ingesta de alimentos, suplementos dietéticos o agentes bioterapéuticos, lo más importante es valorar la capacidad de las distintas cepas para colonizar la mucosa gastrointestinal y atravesarla, para finalmente alcanzar el torrente sanguíneo y diseminarse. Por ello, los modelos de translocación gastrointestinal constituyen la mejor alternativa para determinar qué cepas suponen un riesgo real. Ambos modelos, infección sistémica e infección gastrointestinal, se complementan, ya que el primero permite testar un número relativamente grande de cepas, y por tanto, seleccionar las cepas más interesantes antes de pasar al segundo modelo caracterizado por requerir rutas de infección difíciles de reproducir y tratamientos complejos, como se comenta más adelante.

7.1. Modelo murino de infección sistémica

Como ya se ha comentado, el modelo murino de infección sistémica es el más utilizado para testar la virulencia. La inoculación del microorganismo se hace a través de la vena lateral de la cola del ratón. En el caso de *S. cerevisiae*, la dosis de levadura a inocular para poder obtener alojamientos contundentes sin desencadenar la muerte de la totalidad de los ratones es de 10^7 UFC/ml. Esta dosis fue determinada por Clemons y colaboradores (1994) y es la que ha sido utilizada en trabajos recientes (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011).

Medida de la virulencia

-Nº de muertos sobre el total de ratones inoculados (M/T) y Tiempo medio de supervivencia (TMS)

La severidad de la infección es en primer lugar evaluada en función de la mortalidad y tiempo medio de supervivencia observada en ratones inoculados con una cierta dosis de un microorganismo. Para que los resultados de distintas cepas sean comparables entre sí es necesario que las cepas introducidas estén en el mismo estado biológico y fase de crecimiento, y además, han de usarse unas condiciones experimentales fijas. Una limitación importante en el uso de este parámetro es que la muerte como criterio de punto final actualmente no está permitida por parte de la gran mayoría de los Comités de Bioética por su potencial implicación negativa en el bienestar animal. Estos Comités exigen protocolos de supervisión para paliar el sufrimiento, la angustia y el dolor de los animales y requieren suprimir el procedimiento mediante técnicas de eutanasia como medida correctora cuando el sufrimiento es muy intenso. Los síntomas de sufrimiento pueden variar desde leves (pérdida de peso, posturas anormales, encrespamiento del pelo, secreciones nasales u oculares) hasta severos, como cambios en la conducta (poca movilidad, inquietud, vocalizaciones, automutilación). En el caso de *S. cerevisiae*, puesto que se trata de una levadura de baja virulencia, se espera un nivel de sufrimiento moderado fácilmente controlable con analgésicos, por lo que la medida de M/T y TMS son factibles.

- Alojamiento

La determinación de la carga microbiana en los órganos diana y/o tejidos constituye una determinación común para valorar la severidad de la infección, y por tanto, el grado de virulencia de una cepa; es

especialmente útil para comparar virulencia entre cepas. La metodología que se sigue consiste en la cuantificación de las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por homogenización del órgano seguido por diluciones seriadas y siembra. Los datos obtenidos han de ser evaluados estadísticamente usando distintas pruebas que se elegirán en función del tipo de experimento.

Estudios de virulencia en *S. cerevisiae*

Desde que *S. cerevisiae* fue considerada como un patógeno oportunista, se han llevado a cabo algunos estudios *in vivo* usando modelos murinos de infección sistémica para estudiar la virulencia de cepas clínicas y no clínicas de esta levadura (Clemons y col., 1994; Byron y col., 1995; Okawa y Yamada, 2002; Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011) así como del agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (McCullough y col., 1998b).

Estos trabajos han utilizado distintas cepas de ratón, en concreto BALB/c (de Llanos y col., 2011), DBA/2N (Byron y col., 1995; McCullough y col., 1998b; de Llanos y col., 2011), CD-1 (Clemons y col., 1994; McCullough y col., 1998b; de Llanos y col., 2011) y ddY (Okawa y Yamada, 2002). Los ratones BALB/c (inmunocompetente) y DBA/2N (deficiente en el complemento C5) son isogénicos, es decir, genéticamente idénticos, y son especialmente útiles cuando se quieren comparar cepas entre sí; mientras que los ratones CD-1 y ddY (inmunocompetentes) no son idénticos y se usan sobre todo cuando se quieren estudiar respuestas individuales a la infección. La mayoría de los trabajos con *S. cerevisiae* han incluido en sus estudios más de un tipo de ratón para imitar procesos infecciosos en pacientes con diferente predisposición a la misma. Además, se ha mostrado que no todos los modelos murinos son igualmente

susceptibles a la infección por *S. cerevisiae* (Byron y col., 1995; de Llanos y col., 2011) y no se puede asumir que porque una cepa resulte avirulenta en un modelo no pueda ser virulenta en otro. Durante años, se ha propuesto que los ratones DBA/2N constituyen el modelo más apropiado para caracterizar y diferenciar cepas de *S. cerevisiae* en lo que a la virulencia se refiere (Byron y col., 1995). Sin embargo, un trabajo reciente muestra que los ratones DBA/2N son especialmente sensibles a los aislados clínicos, pero no son los más apropiados para el estudio de aislados de origen no clínico (de Llanos y col., 2011). Este mismo estudio muestra que ratones BALB/c jóvenes (4 semanas de edad) son muy útiles para resaltar las diferencias de virulencia en especies de levadura con baja o moderada patogenicidad, como es el caso de *S. cerevisiae*.

Otro factor que se ha tenido en cuenta por algunos autores ha sido el efecto de la inmunosupresión en la virulencia de *S. cerevisiae*, dado que gran parte de los casos clínicos descritos están asociados con pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de tratamientos con drogas u otros factores (Murphy y Kavanagh, 1999; Muñoz y col., 2005). Uno de los principales factores en el desarrollo de las infecciones por *S. cerevisiae* es la neutropenia (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005). La inducción de la neutropenia en sistemas murinos para el estudio de *S. cerevisiae* se ha llevado a cabo con ciclofosfamida, un agente antineoplásico muy utilizado en quimioterapia y aplicado de forma general en el desarrollo de modelos murinos de inmunosupresión (Okawa y Yamada, 2002; de Llanos y col., 2011).

Los primeros estudios *in vivo* de *S. cerevisiae* utilizando los sistemas anteriormente mencionados mostraron el potencial patógeno de ciertos aislados siendo, en general, más virulentos los aislados clínicos (Clemons y col., 1994) y el agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (McCullough y col., 1998b) que los no clínicos. Los datos de

alojamiento mostraron que el órgano preferido de *S. cerevisiae* es el cerebro (Byron y col., 1995). Estudios recientes han confirmado este tropismo y han indicado que algunos aislados no clínicos, en concreto cepas industriales, también son capaces de mostrar virulencia *in vivo* (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011); este dato es de gran relevancia teniendo en cuenta que estas cepas van a ser ingeridas. Dado que se observó un efecto positivo de la inmunosupresión con ciclofosfamida en la virulencia de estas cepas, sería conveniente evitar su uso en la preparación de productos comerciales, así como ampliar los estudios de virulencia al mayor número posible de cepas comerciales con idea de reemplazarlas por cepas más seguras (de Llanos y col., 2011).

7.2. Modelo murino de infección gastrointestinal

El tracto gastrointestinal se cree que constituye la principal fuente de infecciones sistémicas. Las infecciones fúngicas gastrointestinales en humanos normalmente sobrevienen en el caso de pacientes sometidos a tratamientos de antibióticos de amplio espectro en combinación con altas dosis de inmunosupresores o citostáticos contra el cáncer (Pappas y col., 2004). La mayoría de estas infecciones son de origen endógeno, es decir, causadas por microorganismos que han colonizado la mucosa del tracto gastrointestinal y, por tanto, han translocado. La translocación se define como el paso de microorganismos viables desde el tracto gastrointestinal a través de la barrera de la mucosa a sitios extra-intestinales (Berg y Garlington, 1979).

A la hora de reproducir en el laboratorio infecciones gastrointestinales, se intenta desarrollar sistemas *in vivo* (preferentemente murinos) que imiten los tratamientos anteriormente citados y que se sabe conducen a infecciones sistémicas en clínica. El

fundamento de estos modelos de infección gastrointestinal se comenta a continuación.

Cuando el microorganismo a estudiar no forma parte de la microbiota intestinal natural del animal, se requiere en primer lugar el establecimiento de una colonización persistente del microorganismo en cuestión. El tracto gastrointestinal de animales adultos sanos es normalmente resistente a dicha colonización (Maejima y col., 1980; Pecquet y col., 1991), por lo que existen varias estrategias para conseguirlo (Berg, 1999; Shoham y Levitz, 2005): a) rotura del equilibrio microbiológico normal del tracto gastrointestinal, que lleva al sobrecrecimiento de patógenos en la mucosa (uso prolongado de antibióticos de amplio espectro), b) deficiencia en las defensas del sistema inmune del hospedador (inmunosupresores, neutropenia). Estos dos mecanismos favorecen la colonización intestinal, y además, promueven la translocación de los microorganismos a través de la barrera gastrointestinal, sobre todo, si se combinan con el aumento de la permeabilidad de la mucosa por daño. Además, la colonización en el tracto gastrointestinal de un ratón depende de otros factores como del inóculo de levadura suministrada (Stone y col., 1973; Samonis y col., 1990), de la cepa o especie de levadura (Pope y Cole, 1982), de la edad del ratón, de su estado inmunológico y del tipo de administración de la levadura (agua de bebida o inoculación gástrica), duración tratamiento (nº de dosis) (Ekenna y Sherertz, 1987) o tipo de dieta (Samonis y col., 1990; Yamaguchi y col., 2005). Teniendo en cuenta estas premisas, se han desarrollado varios sistemas murinos que imitan patologías humanas usando ratones adultos. La mayoría de los sistemas usan ratones pretratados oralmente con antibióticos de amplio espectro (Wells y col., 2007; Koh y col., 2008), pero también se han conseguido colonizaciones persistentes de ratones adultos sanos suministrando a los animales

alimentos conteniendo *C. albicans* de forma prolongada (Samonis y col., 1990), manteniendo una dieta pobre en proteínas (Takahashi y col. 2003), suplementando la dieta con carbohidratos (Vargas y col., 1993) o suministrando conjuntamente un antibiótico con glucosa (Mellado y col., 2000). Muchos de estos trabajos consiguen translocación inmunodeprimiendo con drogas y/o induciendo un trauma intestinal, bien quirúrgicamente o con drogas. Parece bastante prometedor un modelo desarrollado recientemente usando un régimen específico de antibióticos y 5-fluorouracil previamente a la inoculación (Clemons y col., 2006).

Por otra parte, muchos laboratorios prefieren utilizar ratones infantiles (entre 4 y 6 días), ya que permiten detectar la diseminación durante las primeras 72 horas tras la inoculación intragástrica y sin necesidad de pretratar los animales, como en el caso de ratones adultos (Pope y col., 1979). Sin embargo, estos modelos se caracterizan por un alto porcentaje de mortalidad y una sobreestimación de la virulencia debido a un sistema inmune inmaduro. Además, los ratones tras la inoculación han de regresar con sus madres durante algunas semanas, lo cual es inviable para muchos laboratorios.

También se han utilizado ratones libres de gérmenes intestinales, pues pueden ser colonizados de forma natural y permanente sin tratamientos previos. Sin embargo, no constituyen un mecanismo adecuado para estudios de diseminación fúngica, ya que es probable que la ausencia de microbiota normal tenga un efecto en la patogenicidad de los microorganismos inoculados (Naglik y col., 2008).

La mayoría de las investigaciones usando los modelos murinos comentados se han centrado en especies de levadura del género *Candida* por su gran prevalencia en comparación con otras levaduras. En consecuencia, hay pocos estudios que aborden si cepas de *S. cerevisiae* son capaces de atravesar la barrera gastrointestinal de ratones y además,

estos trabajos hacen referencia a la funcionalidad de esta especie de levadura como probiótico (Cartwright-Shamoon y col., 1995 y 1996; Peret Filho y col., 1998; Rodrigues y col., 2000; Martins y col., 2005 y 2007; Samonis y col., 2011); sólo en un caso se contempla la virulencia y la posible diseminación (Samonis y col., 2011). Estos estudios muestran la capacidad de *S. cerevisiae* para atravesar la barrera gastrointestinal, aunque no está tan clara su capacidad de diseminación a órganos distantes.

8. Técnica de hibridación genómica comparada mediante micromatrices de DNA

S. cerevisiae ha sido y es un organismo modelo, cuyo estudio y manipulación están, en mayor o menor medida, en la base del desarrollo de muchas de las grandes disciplinas científicas dentro del ámbito de la biología. Muchos de los avances metodológicos recientes de la biotecnología, tales como la genómica, proteómica o metabolómica, también han utilizado *S. cerevisiae* como organismo modelo. Esta posición, junto con la ventaja adicional de ser el modelo más sencillo de célula eucariota y la obtención de la secuencia completa del genoma de una cepa de *S. cerevisiae* hace más de 16 años, ha hecho que se hayan desarrollado multitud de herramientas biotecnológicas que permiten el estudio y la manipulación de esta especie.

Entre estas técnicas se encuentra el análisis genómico mediante la técnica de micromatrices de DNA, que ha permitido el estudio genómico de varios aspectos de la levadura *S. cerevisiae*, así como un análisis comparativo genómico entre cepas virulentas y no virulentas de *S. cerevisiae*, que es en lo que se centra el estudio de esta tesis doctoral.

La técnica de hibridación genómica comparada (CGH) es una técnica útil, rápida y de coste moderado, cuyo objetivo es determinar diferencias entre los genomas de diferentes tipos celulares y organismos. Esta técnica consiste en la hibridación competitiva entre el DNA de una muestra dada (por ejemplo, cepa A) y el DNA de otra muestra de la misma especie o relativamente cercana (por ejemplo, cepa B). Previamente los DNAs de las dos cepas han sido marcados con dos fluorocromos diferentes (por ejemplo: cepa A con fluorocromo rojo y cepa B con el verde), estos dos DNAs se mezclan y entonces se hibridan competitivamente frente a una micromatriz de DNA que contiene cada uno de los genes del genoma de la especie en cuestión, representados como puntos. El resultado final es una matriz en la que cada uno de los puntos está marcada con un determinado color, como se puede observar en la Figura 1. Los puntos son genes y el color simboliza el grado de expresión génica de dicho gen frente a una determinada condición experimental. La posterior identificación se realiza mediante un escáner óptico.

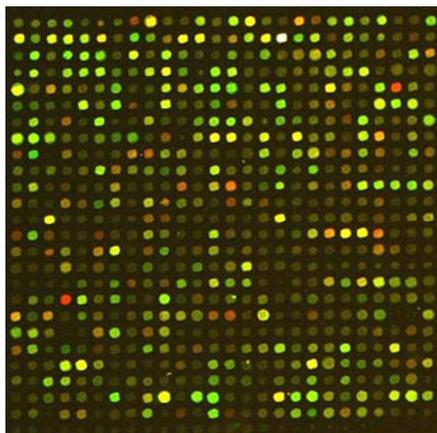


Figura 1. Sección de una micromatriz de DNA.

Mediante un análisis digital de las imágenes capturadas se cuantifica la proporción de verde y de rojo en todos los puntos, de manera que si existe una ganancia de material genético en la cepa A se producirá un aumento de la fluorescencia roja, mientras que si hay una pérdida de material genético en la cepa B, se producirá una disminución de la fluorescencia verde y por tanto, un aumento relativo de la fluorescencia roja.

La mayoría de estudios que han utilizado esta técnica se han dirigido hacia la determinación de anormalidades genómicas en células tumorales, pero también se ha extendido su uso en bacterias (Kato-Maeda y col., 2001; Fukiya y col., 2004) y levaduras (Winzeler y col., 1999; Dunham y col., 2002), con la intención de investigar diversidad en genotipo, patogenicidad y evolución microbiana. Cabe destacar que uno de los requisitos principales para la utilización de esta técnica es la de tener el genoma secuenciado de la especie a estudiar.

Su uso ha permitido llevar a cabo investigación a nivel genómico, tanto para el estudio de la expresión génica (Eisen y Brown, 1999; Holloway y col., 2002), como para el estudio de cambios en el número de copias del DNA y sus reorganizaciones genómicas (Pinkel y col., 1988; Pollack y col., 1999), dando información sobre presencia de aneuploidías, translocaciones no recíprocas y deleciones o amplificaciones de genes aislados. Por ejemplo, mediante el uso de micromatrices de DNA humano, se han detectado cambios en el número de copias en células tumorales (Albertson, 2003). En cuanto a *S. cerevisiae*, el uso de estas micromatrices ha permitido explorar la diversidad genómica de diferentes cepas de *S. cerevisiae* (Lashkari y col., 1997; Primig y col., 2000; Pérez-Ortín y col., 2002a; Infante y col., 2003; Winzeler y col., 2003; Liti y col., 2009; Scharerer y col., 2009), además de la composición genómica del híbrido *S. pastorianus* (Bond y col., 2004), o híbridos naturales de *S.*

cerevisiae y *S. kudriavzevii* (Belloch y col., 2008) y de las especies del género *Saccharomyces sensu stricto* (Edwards-Ingram y col., 2004; Muller y McCusker, 2009a). También se ha usado para el estudio de cambios en el número de copias génicas de cepas vínicas comerciales (Dunn y col., 2005) o para determinar los patrones génicos de expresión en una cepa vínica (Hauser y col., 2001) o entre varias de ellas (Carreto y col., 2011).

En referencia a cepas clínicas de *S. cerevisiae*, son pocos los estudios que han usado esta técnica para llevar a cabo una comparación genómica entre diferentes aislados clínicos. Carreto y colaboradores (2008) asociaron la inestabilidad subtelomérica con este fenotipo clínico, mientras que Muller y colaboradores (2011), identificaron locus genéticos asociados a un origen clínico en *S. cerevisiae* que se relacionaban con la capacidad de pseudofilamentación, mantenimiento de la pared celular y la detoxificación celular. Esta misma técnica también se ha usado para comparar la presencia o ausencia de genes asociados con virulencia entre dos cepas del género *Candida* con diferentes grados de virulencia (*Candida dubliniensis* frente a *C. albicans*) (Moran y col., 2004) o entre dos cepas de *C. albicans*, una considerada invasiva y la otra no (Thewes y col., 2008) donde se observaron diferencias genómicas sustanciales entre ellas.

Respecto a estudios de expresión génica en cepas clínicas de *S. cerevisiae* no se conoce ningún trabajo similar a los que se han llevado a cabo en la especie *C. albicans*. Fradin y colaboradores (2003) realizaron un estudio de expresión génica en sangre humana con la intención de identificar qué grupos de genes se expresaban diferencialmente en el transcurso de una infección sistémica. Por otro lado, Thewes y colaboradores (2008), llevaron a cabo un estudio transcriptómico entre dos cepas de *C. albicans* con diferente grado de virulencia.

9. Genómica comparada de aislados clínicos y virulentos de *S. cerevisiae*

Recientemente se ha secuenciado el genoma de YJM145, una cepa clínica de *S. cerevisiae* aislada del pulmón de un paciente de SIDA con neumonía (Tawfik y col., 1989), y que además ha sido estudiada sucesivas veces como modelo de infecciones fúngicas (McCusker y col., 1994a y b; Clemons y col., 1994; Byron y col., 1995; Goldstein y McCusker, 2001). YJM145 causó muerte en ratones que tenían deficiente el sistema del complemento C5 del sistema inmune (McCusker y col., 1994b). Su forma haploide se conoce como YJM789, y se diferencia fenotípicamente de S288c en que es capaz de flocular, de mostrar el fenómeno de “switching” y que es capaz de crecer a altas temperaturas.

El genoma de YJM789 contiene aproximadamente 60.000 SNPs y alrededor de 6.000 “indels” en comparación con el genoma de S288c distribuidos entre el genoma nuclear y mitocondrial (Wei y col., 2007), lo que conduce a cambios polimórficos en proteínas, los cuales pueden ser los responsables de sus diferencias fenotípicas; además, se han encontrado varias ORFs únicas en la cepa YJM789, algunas de las cuales se han adquirido a través de transferencia horizontal. Estas regiones de variación polimórfica se han encontrado a lo largo de todo el genoma, pudiendo comprender en algunos casos múltiples ORFs y en otros concentrarse únicamente en una región génica. También se observan translocaciones e inversiones, que también están presentes en cepas vínicas como la RM11-1a (Török y col., 1996).

Entre las regiones únicas en el genoma de YJM789 se encuentra una conocida como el gen *KHR1*, que codifica a una toxina killer resistente al calor (Goto y col., 1990). *KHR1* se localiza en una secuencia única en YJM789 que se encuentra flanqueada por repeticiones directas

de un elemento Ty, lo que sugiere que una recombinación entre estas repeticiones puede llevar a la ausencia de *KHR1* en algunas cepas de *S. cerevisiae*, incluyendo S288c. Otros genes son, el gen *RTM1*, que codifica una proteína que confiere resistencia a melaza, y otro gen de función desconocida.

Algunos genes contienen repeticiones intragénicas en tándem, cuyo número de repeticiones varía entre S288c y YJM789. Varios de estos genes codifican proteínas de la superficie celular, como *TIR1*, *HSP150*, *FIT1*, *AGA1*, *MN4* y *FLO10*, cuya variación en el número de repeticiones en tándem intragénicas puede provocar variabilidad en la pared celular, contribuyendo así a una rápida adaptación al ambiente y a una posible evasión del sistema inmune del hospedador (Verstrepen y col., 2005).

Sin embargo, no hay prácticamente diferencias en la secuencia de la mitocondria entre S288c y YJM789, ya que su secuencia es similar en más del 98%. Sin embargo, YJM789 ha perdido aproximadamente 54 elementos transponibles ricos en GC, pero contiene 17 que no están presentes en S288c, entre los cuales se encuentra una matorasa.

Lo que se desconoce todavía es cómo estos cambios polimórficos en la secuencia de esta cepa cambian la información codificada en su genoma para conferirle patogenicidad.

En otro trabajo más reciente de Carreto y colaboradores (2008), se observó una inestabilidad subtelomérica y presencia de retrotransposones en las cepas clínicas, además de variación en el número de copias génicas dentro de las familias que participan en el transporte transmembrana, en el metabolismo de azúcares y alcohol y en la resistencia a droga, respecto a las cepas vínicas. Además, no existía una correlación geográfica del origen y su perfil genómico. Observaron que las cepas clínicas poseían una composición de elementos Ty y elementos Ty asociados a ORFs similar a S288c, por tanto, surge la duda de si estos aislados clínicos y S288c tenían

un ancestro común. Sin embargo, en las cepas clínicas, genes involucrados en la formación de pseudohifas e invasión no mostraron mayor número de copias génicas (Carreto y col., 2008). Esto confirma estudios previos llevados a cabo por Klingberg y colaboradores (2008), que no observaron factores específicos de virulencia que fueran capaces de diferenciar cepas clínicas de no clínicas; sin embargo, nuestro grupo (de Llanos y col., 2006b) encontró que los aislados clínicos mostraban un fenotipo patogénico típico en comparación con cepas industriales, y que además, éstas eran capaces de causar infección sistémica en un sistema murino (de Llanos y col., 2011). Por ejemplo, la secreción de proteasas y fosfolipasas, el crecimiento a 42°C y el crecimiento pseudohifal fueron rasgos más pronunciados en los aislados clínicos.

Los aislados clínicos de *S. cerevisiae* poseen varios niveles de ploidía, que van desde haploide a tetraploide (Muller y McCusker, 2009b). Se demuestra que hay una ventaja selectiva de heterocigosis de la levadura *S. cerevisiae* en ambientes clínicos. Además, también se ha demostrado que cruces entre cepas de *S. cerevisiae* no relacionadas muestran un incremento en la adaptación, ya que son capaces de crecer a altas temperaturas y sobrevivir *in vivo* (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994a, b). Este incremento de heterocigosis de los aislados clínicos de *S. cerevisiae* puede ser debido parcialmente a un incremento en el cruce de diferentes cepas que se encuentran a lo largo del tracto gastrointestinal humano. Estudios en la mosca *Drosophila melanogaster*, que usa la levadura como fuente de alimentación, han mostrado que la pared de la asca se digiere en el tracto gastrointestinal de la mosca y que se recuperan esporas viables de las heces de la mosca (Reuter y col., 2007; Coluccio y col., 2008). Sin embargo, se ha visto que la liberación de las esporas del asca en el tracto digestivo de *D. melanogaster* promueve este cruce debido al aumento de la posibilidad de apareamiento entre

esporas de diferente fondo genético (Reuter y col., 2007). Lo que se desconoce todavía es si las esporas son capaces de germinar *in vivo* y si la carga de esporas en el tracto gastrointestinal humano es suficientemente alta para que se pueda dar este tipo de apareamiento.

Así que se desconoce todavía cuáles pueden ser las causas de que una cepa sea patogénica o no. Probablemente, la habilidad de *S. cerevisiae* para causar infecciones es debido a una combinación de su plasticidad fenotípica y del estado del sistema inmune del hospedador, es decir, muchos aislados podrían ser patógenos si se les da la oportunidad. Klingberg y colaboradores (2008) concluyeron que el estado inmunológico del hospedador debe ser un factor más importante en el desarrollo de las infecciones de *S. cerevisiae* que las propias características genómica y/o fenotípicas de la cepa.

Antecedentes y Objetivos

Actualmente, los alimentos e ingredientes funcionales constituyen un nuevo planteamiento de la dieta saludable. Entre los ingredientes funcionales, encontramos los suplementos dietéticos a base de células de levadura pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Se trata de productos que, en un corto periodo de tiempo, han logrado una amplia presencia en el mercado. Hasta ahora, su consumo se ha considerado beneficioso por sus propiedades biofuncionales y su valor nutritivo intrínseco, y por otra parte, seguro dado el carácter “GRAS” (de Generally Recognized As Safe) que se atribuye a esta especie de levadura; sin embargo, actualmente se considera a *S. cerevisiae* dentro del grupo de patógenos oportunistas emergentes. Nuestro grupo de trabajo posee datos que indican el carácter virulento de cepas de *S. cerevisiae* susceptibles de ser ingeridas por vía oral, en concreto cepas comerciales de panadería y el agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (comercializado como Ultralevura[®]) (de Llanos y col., 2011); estas cepas se han aislado con una frecuencia elevada a partir de muestras humanas (de Llanos y col., 2004) y se han llegado a asociar con aislados de sangre en dos casos de fungemia (de Llanos y col., 2006a). En el caso de *Saccharomyces boulardii*, numerosos trabajos lo describen como el agente causal de infecciones sistémicas (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005). A la vista de estos datos y dada la creciente incidencia de infecciones asociadas con *S. cerevisiae*, cabe preguntarse si esta especie de levadura se debe de seguir considerando como “amiga” o si por el contrario habría perdido su carácter inocente.

Puesto que el carácter virulento de cepas asociadas con suplementos dietéticos y bebidas enriquecidas no ha sido estudiado hasta el momento, se consideró interesante plantear el presente trabajo cuyo **objetivo principal** es valorar el efecto indeseable derivado de su

consumo, así como contribuir al conocimiento de los mecanismos implicados en la posible virulencia de esta especie de levadura.

Con objeto de resolver estas cuestiones, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* a partir de preparados comerciales: suplementos dietéticos y bebidas enriquecidas con levadura.
2. Valoración del potencial patógeno de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas a partir de suplementos dietéticos y bebidas enriquecidas con levadura: estudios *in vitro* de rasgos fenotípicos asociados con la virulencia y estudios *in vivo* en sistemas murinos.
3. Estudio comparativo de la composición genómica entre cepas virulentas y no virulentas de *S. cerevisiae*.
4. Identificación de posibles genes implicados en la virulencia.

Materiales y Métodos

1. Productos dietéticos

Para llevar a cabo este trabajo, se adquirieron productos dietéticos y probióticos disponibles en el mercado (herboristerías, tiendas dietéticas y farmacias) que estuviesen formados íntegramente por levadura de cerveza o bien que ésta se encontrara entre sus componentes.

Así se consiguieron un total de 23 productos comerciales diferentes, entre los cuales se encontraban 20 suplementos nutritivos (13 en forma de comprimidos, 4 en forma de copos, 3 en forma líquida), un agente bioterapéutico compuesto por *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* (Ultralevura®) y 2 cervezas enriquecidas en levadura. La relación y el origen de cada uno de ellos se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de los productos a partir de los cuales se abordó el aislamiento de levaduras

Designación	Nombre Comercial	Presentación	Casa Comercial
D1	Levadura de cerveza y germen de trigo	Comprimidos	ALTANA PHARMA, S.A.
D2	Levivel	Comprimidos	NOVA DIET, S.A.
D3	Arkocaps	Comprimidos	ARKOPHARMA
D4	Levadura A+E	Comprimidos	ALTANA PHARMA, S.A.
D5	Ultralevura®	Comprimidos	UPSAMÉDICA, S.L.
D6	Levadura de cerveza Ferrán	Líquida	INSTITUTO FERRÁN
D7	Levadiet revivificable	Comprimidos	DIETISA
D8	Levadura de cerveza en copos	Copos	TERRA VERDA

Designación	Nombre Comercial	Presentación	Casa Comercial
D9	Levadura de cerveza	Comprimidos	TERRA VERDA
D10	Cerveza Bioland	Líquida	BRAUEREI SCHLESWIG
D11	Panaktivd	Líquida	PANAKTIV/Dr. H. Metz
D12	Levadura y Germen	Comprimidos	SOTYA, S.A.
D13	Strath	Comprimidos	DIETISA
D14	Phytodepur	Comprimidos	INTERSA, S.A.
D15	Bioreal	Copos	RAPUNZEL
D16	Levadura de cerveza viva y Levadura de selenio	Comprimidos	NATURLIFE, S.L.
D17	Depurator	Líquida	INTERSA, S.A.
D18	Levatrig	Comprimidos	Laboratorios BIOSERUM
D19	Levadura de cerveza (Ana Maria La Justicia)	Comprimidos	Distribuciones FELIU
D20	Phytonorm	Comprimidos	INTERSA, S.A.
D21	Int-salim	Copos	SALUDA E IMAGINACIÓN, S.L.
D22	Levadiet-C	Copos	DIETISA
D23	Cerveza PILS	Líquida	RAPUNZEL

2. Cepas microbianas

Para la realización de este trabajo se ha contado con los aislados de levadura recuperados de los productos dietéticos del apartado

anterior, 3 aislados clínicos de *S. cerevisiae* [2 proporcionados por el Servicio de Microbiología del Hospital Vall d’Hebrón de Barcelona, 1 proporcionado por el Departamento de Medicina del Santa Clara Valley Medical Center en California y 4 aislados no clínicos de *S. cerevisiae* (3 cepas de laboratorio y 1 cepa vínica de referencia proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo-CECT)]. Además, se incluyó la cepa tipo de *Candida albicans* SC5314. Las cepas utilizadas, así como su origen, se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas usadas en este estudio

Designación	Origen de aislamiento	Procedencia
Aislados clínicos de <i>S. cerevisiae</i>		
60 ^{a,b,c}	Vagina	Hospital Vall d’Hebrón (Barcelona)
102 ^{a,b,c}	Fluido pleural	Hospital Vall d’Hebrón (Barcelona)
YJM128 ^d	Pulmón	California, USA
Cepas no clínicas de <i>S. cerevisiae</i>		
FY 1679	Cepa de laboratorio	
W303 ^e	Cepa de laboratorio	
S288 ^{c,f}	Cepa de referencia	
10431 ^{b,c}	Vino de Jérez (España)	CECT ^h
Cepa de <i>C. albicans</i>		
SC5314 ^g		Alemania

^a La caracterización molecular de estos aislados fue descrita previamente (de Llanos y col., 2004).

^b Los rasgos fenotípicos de virulencia de estos aislados fueron estudiados en trabajos previos (de Llanos y col., 2006b).

^c La virulencia *in vivo* de estos aislados fue estudiada en trabajos previos (de Llanos y col., 2011).

^d Cepa adquirida en el Departamento de Medicina, División de Enfermedades Infecciosas, Santa Clara Valley Medical Center, San José, California, USA. Su grado de virulencia fue descrito por Clemons y colaboradores (1994).

^e Cepa con el siguiente genotipo: MATa; *ura3-52*; *trp1Δ2*; *leu2-3,112*; *his3-11*; *ade2-1*; *can1-100*.

^f Descrita previamente por Mortimer y Johnston, (1986). No presenta marcadores de auxotrofia y es una de las cepas de laboratorio salvaje más usadas. Su secuencia completa está actualmente disponible.

^g Cepa cedida por el Dr. Bernhard Hube. Departamento de “Microbial Pathogenicity Mechanisms”. Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology. Hans-Knöll-Institute, Jena, Alemania.

^h Colección Española de Cultivos Tipo.

3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo usados en este trabajo se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Medios de cultivo

Medio	Composición
Crecimiento de levaduras	
GPYA	5 g/l extracto de levadura, 5 g/l peptona, 40 g/l glucosa, 20 g/l agar bacteriológico.
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.

Medio	Composición
Crecimiento de levaduras	
GPY + cloranfenicol	5 g/l extracto de levadura, 5 g/l peptona, 40 g/l glucosa, 20 g/l agar bacteriológico, 10 mg/l cloranfenicol ^a
Producción de actividad proteasa	
Medio 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, 8.3 g/l BSA (Fraction V, Sigma, USA) ^a y 20 g/l agar bacteriológico. Se ajusta el pH 5 con 1N HCl.
Determinación de la actividad fosfolipasa	
Medio fosfolipasa Price y colaboradores (1982)	70.62 g/l agar Sabouraud Dextrose (Difco), 63.6 g/l NaCl; 0.6 g/l CaCl ₂ y 20 g/l agar bacteriológico. Una vez estéril se añade un 10% yema de huevo estéril (Pronadisa).
Inducción del crecimiento pseudofilamentoso en un medio pobre en nitrógeno	
SLAD Gimeno y colaboradores (1992)	6.7 g/l base nitrogenada de levaduras (YNB) ^a sin aminoácidos y sulfato amónico; 0.05 mM sulfato amónico ^a y 20 g/l glucosa.
Crecimiento de bacterias	
TSA	15 g/l digerido pancreático de caseína, 5 g/l peptona de soja, 5 g/l cloruro de sodio, 20 g/l agar bacteriológico.

Medio	Composición
Esporulación de levaduras	
Medio de esporulación	10 g/l de acetato potásico, 1.25 g/l de extracto de levadura, 1 g/l glucosa, 20 g/l agar bacteriológico.

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

4. Aislamiento de las cepas

Con el fin de obtener las levaduras presentes en los productos comerciales de la Tabla 3, se hizo un enriquecimiento de cada uno de ellos mediante un crecimiento en 4.5 ml de medio GPY durante 2 días a 30°C. La cantidad de producto varió dependiendo de la forma de presentación, como se indica a continuación. En el caso de los productos en forma de comprimidos se usó uno de ellos, en cuanto a productos constituidos por copos y levadura fresca se añadió al medio de cultivo la cantidad correspondiente a una cuchara sopera y cuando se trataba de productos líquidos se añadió 1 ml de los mismos.

A partir de este crecimiento en medio líquido, se sembraron 50 µl en placa GPYA que se incubó a 30°C durante 24-48 horas. A continuación, se aislaron 6 colonias de cada producto a placa GPYA, para posteriormente identificarlas y caracterizarlas.

5. Rasgos fenotípicos asociados con virulencia

5.1. Capacidad de crecimiento a altas temperaturas

Para la medida de viabilidad a las temperaturas de 28, 37, 39 y 42°C, las cepas de levadura se incubaron en matraces con 15 ml de GPY a 30°C durante toda la noche en agitación. La determinación del crecimiento se llevó a cabo mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu Ltd, Alemania). Las muestras fueron diluidas convenientemente con el fin de conseguir que la absorbancia se encontrara en un intervalo de valores tal que existiera linealidad entre la lectura de la densidad óptica y el número de células del cultivo. En nuestro caso concreto, las muestras fueron llevadas hasta una densidad óptica de 0.1 y se dejaron crecer hasta valores de 0.3-0.4 (fase exponencial temprana).

Tabla 6. Diluciones sembradas en las placas de GPYA para cada temperatura

Temperaturas	Diluciones sembradas					
28°C	5×10^{-3}	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
37°C	10^{-2}	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
39°C	5×10^{-2}	10^{-2}	5×10^{-3}	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}
42°C	Directa	5×10^{-1}	10^{-1}	5×10^{-2}	10^{-2}	5×10^{-3}

A continuación, las células fueron lavadas con solución salina 0.9%, se realizaron diluciones decimales seriadas con dicha solución y se sembraron por goteo 10 µl de las diluciones específicas de cada cepa en

placas de GPYA para cada temperatura, tal como se muestra en la Tabla 6. Las placas se incubaron durante 48 horas a la temperatura correspondiente.

5.2. 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 5). Las levaduras se cultivaron previamente en medio GPY en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, de manera que una vez los cultivos alcanzaron una O.D. de 0.3-0.4 a 600 nm, se recogieron alícuotas de cada uno de ellos que se lavaron con solución salina estéril 0.9%. Para ambas actividades, se depositaron gotas de 5 µl de cada cepa en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo adecuado para cada caso. Se sembraron por placa un máximo de 4 cepas para evitar el solapamiento de los halos de opacidad que aparecen como resultado de ambas actividades enzimáticas.

En el caso de la actividad proteasa, se empleó el método descrito por Aoki y colaboradores (1994) que se basa en el uso de un medio de cultivo con seroalbúmina fetal (BSA). 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 una gran cantidad de fosfolípidos, predominantemente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Se considera un resultado positivo cuando aparece una zona de precipitación 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 liberados por la acción de la

actividad fosfolipasa sobre los fosfolípidos presentes en la yema de huevo.

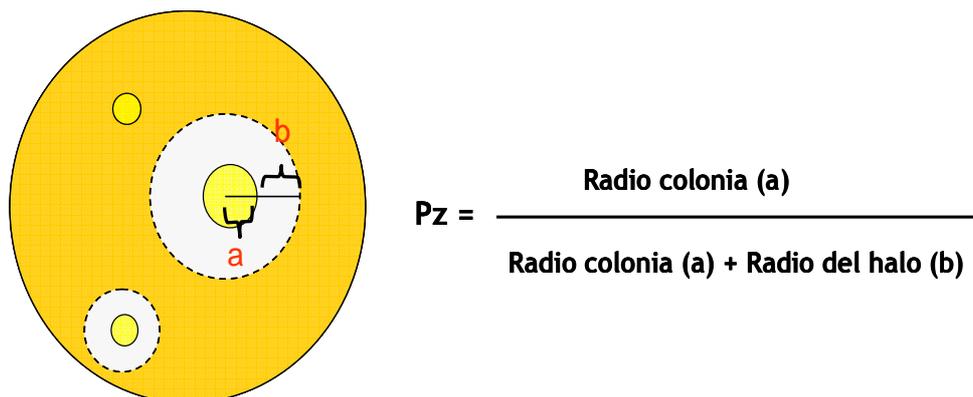


Figura 2. Cálculo del parámetro Pz, según el halo de opacidad y el crecimiento de la colonia.

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), que se describe como el radio de la colonia dividido entre la suma del radio de la colonia más el radio del halo de precipitación. Así que, un valor bajo de Pz indica una alta producción de enzima (ver Figura 2).

5.3. Crecimiento pseudofilamentoso

Para observar este rasgo de virulencia se usaron placas de medio SLAD (Tabla 5). Para analizar la formación de pseudohifas, las cepas se sembraron en placas con este medio 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 óptico a 10X para determinar la aparición o no de pseudohifas, así como la morfología y longitud de las mismas.

5.4. Crecimiento invasivo

Para el estudio del crecimiento invasivo, las cepas se cultivaron en forma de césped en placas de GPYA y se incubaron 5 días a 30°C. En ese momento, las placas se lavaron con agua abundante a cierta presión. De esta manera, se eliminaron aquellas cepas que no se adhirieron vigorosamente al agar. Las placas se fotografiaron antes y después de los lavados, determinando así la presencia de colonias sujetas a la superficie del agar.

6. Obtención de sangre y separación en sus diferentes fracciones

Se utilizó sangre humana venosa periférica de 33 donantes voluntarios sanos. De cada uno de ellos, se extrajeron 100 ml de sangre, que se emplearon bien para los estudios de supervivencia en sangre o bien para los estudios de expresión génica. Para ello se usó el sistema de extracción S-Monovette (Monovette[®], Sarstedt, Alemania) que consiste en un tubo de recolección de sangre con pequeñas bolas recubiertas de NH₄-heparina para evitar la coagulación y unido a un adaptador de aguja mariposa (Figura 3).

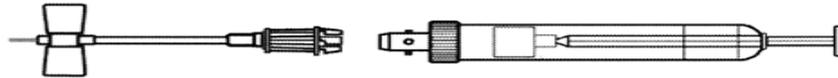


Figura 3. Sistema de extracción S-Monovette.

Una vez obtenida la sangre, ésta se procesó siguiendo los pasos siguientes:

6.1. Obtención de plasma

La sangre, el doble del volumen de plasma que se quería recuperar, se centrifugó en tubos de centrífuga cónicos de 50 ml a una velocidad de 3.000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio repitiéndose la centrifugación cuando la eliminación de células sanguíneas no había sido completa. El plasma así obtenido se usó como medio control en los experimentos de supervivencia de las levaduras.

6.2. Obtención de las fracciones sanguíneas

Para la obtención de las fracciones MNCs y PMNs utilizadas para los estudios de supervivencia (apartado 7.1) se empleó un método (descrito a continuación) que permite la separación de la sangre en las siguientes fracciones:

- Plasma
- MNCs: linfocitos y monocitos
- PMNs: neutrófilos, eosinófilos y basófilos
- Eritrocitos

Para ello se usaron dos soluciones consistentes en mezclas de polisacáridos y medio de contraste radioopaco: HISTOPAQUE®-1077 (polisucrosa, 5.7 g/dl; diatrizoato sódico, 9.0 g/dl; densidad de 1.077; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EE.UU.) y HISTOPAQUE®-1119 (polisucrosa, 6.0 g/dl; diatrizoato sódico, 16.7 g/dl; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EE.UU.). Un doble gradiente se forma al añadir un volumen de HISTOPAQUE®-1077 sobre un volumen igual de HISTOPAQUE®-1119 capaz de aislar las células mononucleares (MNC) y granulocitos (PMN) de la sangre total.

Para ello, en un tubo de centrífuga cónico de 50 ml se añadieron primero 12 ml de HISTOPAQUE®-1119 y seguidamente, y con mucho cuidado, 12 ml de HISTOPAQUE®-1077. Por último, se adicionaron con mucho cuidado 24 ml de sangre venosa anticoagulada sobre el medio superior de HISTOPAQUE®-1077 (Figura 4). La relación entre las soluciones de HISTOPAQUE y la sangre total siempre debe ser 1:2. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 775 rpm durante 30 min. a temperatura ambiente (18-26°C), ya que centrifugaciones a temperaturas más bajas, como por ejemplo a 4°C, puede producir la coagulación de las células y como consecuencia una recogida escasa de las mismas. Terminada la centrifugación, los tubos se manipularon con precaución para no mezclar las fases.

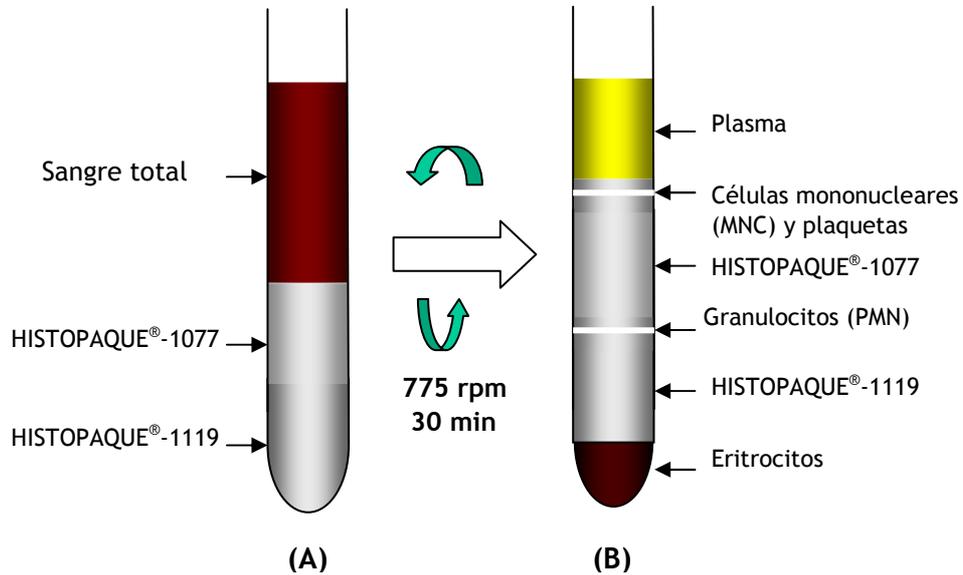


Figura 4. Sistema HISTOPAQUE® de obtención de fracciones sanguíneas. (A) Disposición de las tres fases antes de la centrifugación, (B) distribución de las diferentes fracciones sanguíneas y fases tras la centrifugación.

Durante el centrifugado, los eritrocitos y granulocitos son agregados por la polisucrosa, sedimentándose rápidamente, mientras que los linfocitos y otras células mononucleares permanecen en la zona entre el plasma y el HISTOPAQUE®-1077.

Cuando la sangre se extiende sobre HISTOPAQUE®-1077 y se centrifuga, las células mononucleares permanecen entre el plasma y la solución de HISTOPAQUE®-1077, mientras que los eritrocitos y los granulocitos caen hacia el fondo, tal como se muestra en la Figura 4.

Las células de las series granulocíticas se encuentran entre HISTOPAQUE®-1077 y HISTOPAQUE®-1119, mientras que los linfocitos, otras células mononucleares y las plaquetas se encuentran en la zona entre el plasma y HISTOPAQUE®-1077.

A continuación, se recogieron con cuidado la capa superior (plasma), así como las correspondientes a MNC y a PMN. El resto de fracciones obtenidas se descartaron. Cada una de estas fracciones, se transfirió con una pipeta a un tubo de centrifuga cónico limpio. Aunque la contaminación por eritrocitos es ínfima, se centrifugó a 800 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente para sedimentar cualquier posible resto de MNC y eritrocitos en el plasma, y para concentrar las fracciones sanguíneas, MNC y PMN.

Además, la fracción de PMN, una vez eliminado el sobrenadante, se incubó durante 7 min. a 37°C sin agitación en 10 ml de tampón de lisis (0.83% (p/v) NH_4Cl , 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.0) para romper cualquier eritrocito que pueda quedar, tal y como describen Fradin y colaboradores (2003). Seguidamente, se centrifugó a 330 rpm durante 15 min. a temperatura ambiente para eliminar este tampón, obteniéndose así una fracción más limpia y pura y sin interferencias de ningún tipo. A continuación, con el objetivo de eliminar el mayor número posible de plaquetas de las fracciones MNC y PMN, éstas se lavaron con 5 ml de PBS 1X, se homogeneizaron bien mediante aspiración suave con pipeta y se centrifugaron a 220 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento de células se resuspendió en el plasma obtenido y se realizó un recuento en cámara de Neubauer, ajustando la concentración a la requerida para los posteriores ensayos, tal y como se detalla en el apartado siguiente.

7. Ensayos con sangre o sus fracciones

7.1. Determinación de la supervivencia de las levaduras en sangre, plasma y fracciones sanguíneas (MNCs y PMNs)

Las levaduras se incubaron en sangre total, plasma y en las fracciones sanguíneas MNCs y PMNs con objeto de determinar su supervivencia en cada caso.

Para ello, las levaduras fueron crecidas durante toda la noche en medio YPD a 30°C con agitación. Se recogieron las células, se lavaron una vez y se resuspendieron en tampón PBS 1X a una densidad de 2.5×10^8 células/ml (Fradin y col., 2003; Fradin y col., 2005). A continuación, 100 µl de esta suspensión se incubaron en 5 ml de sangre, de plasma o de las fracciones durante 10 y 60 min. a 37°C usando una relación levadura:leucocito de 1:1. Esta proporción se eligió en base a trabajos previos de supervivencia en sangre total (Fradin y col., 2003; Fradin y col., 2005). De esta manera, fue posible comparar los resultados obtenidos para cada una de las fracciones con los de sangre total. A cada tiempo, se recogieron 500 µl de muestra, se hicieron diluciones seriadas con PBS 1X y se sembraron en placas de GPYA. Tras la incubación durante 24-48 h. a 30°C, se determinó el porcentaje de supervivencia calculando el porcentaje de las células recuperadas en sangre, MNC o PMN, respecto a las células recuperadas en plasma: $(UFC/UFC_{\text{plasma}}) \times 100$. Cada cepa fue ensayada como mínimo tres veces. Los datos se representaron como la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico 'Statgraphics Plus 5.1' (Manugistics, Inc.) aplicando el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba LSD de Fisher para la comparación de medias. Un valor de p-valor ≤ 0.05 se consideró como diferencia significativa.

7.2. Cinética de fagocitosis

Para poder cuantificar el número de células de levaduras interaccionando con leucocitos, 3 μ l de muestras de levadura incubadas en sangre fueron recogidas a 0, 20, 40 y 60 min. Estas muestras se extendieron en un portaobjetos, se secaron, se tiñeron con la tinción de May-Grünwald-Giemsa y se observaron al microscopio Leica DM LB a 40X. Sólo se consideraron como células fagocitadas aquellas que estaban totalmente envueltas por las células fagocíticas. Se contaron 50 campos en todas las muestras y los datos se expresaron como el porcentaje de células fagocitadas por leucocito.

7.3. Incubación de las levaduras en sangre para extracción de su RNA

Las células fueron recogidas y resuspendidas en tampón PBS 1X a una densidad de 2.5×10^9 células/ml, correspondiente aproximadamente a dos células de levadura de *S. cerevisiae* por leucocito (ratio 2:1). Este ratio se decidió con la finalidad de poder obtener una cantidad de levadura suficiente para la extracción de RNA a cada uno de los tiempos de incubación. Previamente a la inoculación en sangre humana, esta suspensión (precultivo) se incubó durante 30 min. a 37°C para minimizar el estrés térmico de las células siguiendo las indicaciones de Fradin y colaboradores (2003).

Las levaduras se incubaron con la sangre fresca sin fraccionar a distintos tiempos (15, 30 y 60 min.). Para ello, a cada tiempo, un volumen de 100 μ l del precultivo fue inoculado en 25 ml de sangre total humana y las muestras se incubaron a 37°C con una agitación de 120 rpm. A tiempo 0 min, las levaduras fueron recogidas del precultivo en un volumen de 0.5

ml, recibiendo el mismo tratamiento que las muestras de los restantes tiempos.

A cada uno de los tiempos indicados, se recogió el tubo que contenía los 25 ml de sangre total con levaduras y se le añadió 2 volúmenes de Triton- X100 0.5% con el fin de romper únicamente las células sanguíneas. A continuación, esta suspensión se centrifugó a 3500 rpm durante 3 min. a 4°C. Al sedimento conteniendo las levaduras y restos de células sanguíneas (especialmente los ácidos nucleicos) se le añadió 1 ml de agua fría, se resuspendió con cuidado y se transfirió a un tubo de centrífuga de 1.5 ml, que se centrifugó a 800 rpm durante 15 segundos. El sobrenadante conteniendo las levaduras se centrifugó a 3.500 rpm durante 2 min. a 4°C recuperándose así en el sedimento las células de levadura. El sedimento se congeló inmediatamente usando nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso para la extracción de RNA.

8. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

8.1. Extracción del RNA total de levadura incubada en sangre

Las muestras de levadura que se obtuvieron en el apartado 7.3 se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 500 µl de LETS (0.1 M CLi; 10 mM EDTA; 0.2 % SDS; 10 mM Tris-HCl; pH 7.4) y en 500 µl de Fenol-Tris (Sigma-Aldrich) para RNA. Se rompieron las células con 500 µl de perlas de vidrio de diámetro 425-600 µm (Sigma-Aldrich) mediante el uso del Mini Beadbeater-8 (Bio Spec Products Inc.) durante 6 períodos de 30 segundos intercalados con 30 segundos en hielo. A continuación, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 5 min. a 4°C. Tras

recoger el sobrenadante se añadieron de nuevo 500 µl de Fenol-Tris y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Se recogió la fase acuosa y se mezcló con 500 µl de fenol:cloroformo (5:1 v/v) (Fluka), centrifugándose posteriormente durante 5 min. a 13.000 rpm a 4°C. Este paso se repitió una vez más. Finalmente, la fase acuosa se mezcló con 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) (Fluka) y se centrifugó a 13.000 rpm 5 min. a 4°C. El RNA contenido en la fase acuosa se precipitó con 1 volumen de CLi 5M, a -20°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras a 4°C durante 20 min. a 13.000 rpm. El sedimento obtenido se lavó con etanol al 70% y se secó. Tras resuspender el pellet en 100 µl de agua DEPC (libre de RNAsas), se añadieron 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto para su precipitación a -80°C durante 2-3 h. Tras centrifugación a 13.000 rpm durante 30 min. a 4°C se volvió a lavar con etanol al 70%. El sedimento (RNA) se dejó secar al aire y se resuspendió en 25-50 µl de agua libre de RNAsas.

8.2. Aislamiento de DNA

8.2.1. Aislamiento de DNA genómico de levaduras

Los DNAs utilizados en los apartados 2 y 3 de Resultados y Discusión correspondientes al Capítulo 1 fueron extraídos según el método descrito por Sherman y colaboradores (1986) y adaptado por Querol y colaboradores (1992b). Las células de levadura se crecieron en 1 ml de GPY a 30°C en agitación durante toda la noche y se recogieron mediante una centrifugación a 12.000 rpm durante 3 min. El sedimento de células se resuspendió en 0.5 ml de solución 1 (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA a pH 7.5). A esta solución se le añadieron 30 µl de Zimoliasa 20T (Seikagaku

Corporation, Tokio, Japón) a una concentración de 1 mg/ml y se incubó a 37°C durante 40 min. en agitación con el fin de obtener los protoplastos. Éstos se recogieron centrifugando a 12.000 rpm 3 min. y se resuspendieron en 0.5 ml de solución 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 20 mM EDTA, pH 7.4) y 13 µl de SDS al 10%. Posteriormente, se añadieron 0.2 ml de acetato potásico 5 M, manteniendo los tubos en hielo durante 10 min. para precipitar las proteínas, se centrifugó 15 min. a 14000 rpm, y el DNA contenido en el sobrenadante obtenido se precipitó mediante la adición de un volumen de isopropanol e incubación 10 min. a temperatura ambiente. El DNA obtenido por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min. se lavó con etanol al 70% (v/v), se centrifugó, se secó y se resuspendió en 15 µl de agua miliQ.

8.2.2. Tratamiento del DNA genómico de levaduras para la realización de micromatrices de DNA genómico

En primer lugar, se obtuvo el DNA como se detalla en el apartado anterior (ver 8.2.1). Tras secar el DNA, se resuspendió en 1 ml de una solución Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, a pH 7.4 y se incubó con 100 µl de RNAsa A (10 mg/ml; Roche Diagnostics) durante 1 hora a 37°C con agitación. Seguidamente, se añadieron 50 µl de Proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen) y se incubó durante 90 min. a 37°C con agitación. Se añadieron 800 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) (Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 13.000 rpm 5 min. Se recogió la fase acuosa y tras la adición de 300 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich) frío, se centrifugó a 13.000 rpm 5 min. Este último paso se repitió 2 veces más. A continuación, se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío (Sigma-Aldrich) a la fase acuosa recuperada, y tras homogeneización mediante inversión, se precipitó el DNA que se recuperó tras centrifugación a

12.000 rpm durante 5 min. Se lavó el DNA con etanol al 70% (v/v) frío y por último, el DNA se secó y se resuspendió en 150 µl de agua milliQ. Las muestras de DNA se guardaron a -20°C hasta su uso.

8.3. Medida de la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos

La cuantificación de la medida de la cantidad y calidad del DNA genómico se llevó a cabo en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, USA), mediante el uso del programa de Nucleic Acids, ds DNA, constante 50.

La cuantificación del RNA se realizó en el mismo espectrofotómetro, usando el programa Nucleic Acids, RNA, constante 40.

Además, la cantidad y la calidad de los ácidos nucleicos se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 2 mM, pH 8.0), estimando el tamaño de los fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 100 pb (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA). La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1X.

8.4. Amplificación mediante PCR convencional

8.4.1. Oligonucleótidos

En este trabajo se utilizaron un conjunto de oligonucleótidos que se emplearon para la identificación de especies de levaduras y para la caracterización de cepas dentro de la misma especie de levadura. Estos oligonucleótidos se detallan en la Tabla 7, donde se describe la secuencia de cada cebador y su región diana. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Isogen Life Science.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' → 3)'	Región diana	T (°C)*	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 AT ^A /T TCT CA	Secuencias δ	45.0	Ness y col., 1993
δ2	GTG GAT TTT TAT TCC AAC A	Secuencias δ	45.0	Ness y col., 1993
APM3 Dir.	AAG TAT TTC TCA ATT ACA AAT AAG CTC AAY TAY TGG TG	APM3	55.5	González y col., 2008
APM3 Rev.	CCT GTG GCA GTT GCT TTA TCA AAR ATC CAY TG	APM3	55.5	González y col., 2008
PEX2 Dir.	GAT AAA GAA CTG TAT GGA CAR TTY TGG	PEX2	55.5	González y col., 2008
PEX2 Rev.	GCC TTT ACA ACG CAC ACA TAR CAR TAR TT	PEX2	55.5	González y col., 2008
BRE5 Dir.	TGA TTA TAG CCA CGG GTG ARA TGT TYT GG	BRE5	55.5	González y col., 2008
BRE5 Rev.	TTC ATT CAT CAA CTT TGA GGC CCA TGT CAT	BRE5	55.5	González y col., 2008

* Temperatura de hibridación empleada en el protocolo de PCR.

8.4.2. 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 llevó a cabo empleando los oligonucleótidos *its1* e *its4* descritos por White y colaboradores (1990). La secuencia de estos cebadores se muestra en la Tabla 7. Las células fueron cogidas directamente de una colonia fresca de levadura y resuspendidas en un

volumen de reacción de 100 µl, que contenía 1 µM de cada cebador, 80 µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) y 10 µl de tampón de reacción 10X (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). La suspensión fue calentada a 95°C durante 15 min. en un termociclador Progene (Techne, Cambridge, UK). A continuación, se añadieron 2.5 unidades de Taq polimerasa Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) a cada tubo.

Se utilizaron las condiciones de amplificación descritas por Esteve-Zaroso y colaboradores (1999): 95°C durante 5 min. para la desnaturalización, 40 ciclos de 94°C durante 1 min., 55.5°C durante 2 min. y 72°C durante 2 min.; por último, se añadió una incubación a 72°C durante 10 min.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.4% (p/v) en tampón TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/µl) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) y se visualizaron con luz UV. Como marcador de peso molecular se utilizó el “100 pb DNA ladder”.

8.4.3. Identificación de híbridos interespecíficos del grupo *Saccharomyces sensu stricto*

La caracterización molecular de híbridos de la especie *Saccharomyces* se basó en el análisis de restricción de tres marcadores moleculares nucleares (*APM3*, *PEX2* y *BRE5*) que se encuentran localizados en los cromosomas II, X y XIV, respectivamente. Los cebadores utilizados para la amplificación de estos genes fueron diseñados por González y colaboradores (2008) y su secuencia se muestra en la Tabla 7.

Para la reacción de PCR se utilizó una mezcla de reacción de 100 µl conteniendo 4 µl de DNA (10-50 ng/ml) obtenido en el apartado 8.2.1,

10 μ l de tampón de reacción, 2.5 unidades de Taq polimerasa (Eppendorf, AG, Hamburg, Alemania), desoxinucleótidos a una concentración de 80 μ M y 1 μ M de cada cebador. Se utilizó un termociclador Progene (Techne, Cambridge, UK). Las condiciones de la PCR fueron de 95°C durante 5 min. para la desnaturalización, 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 55.5°C durante 2 min. y 72°C durante 2 min., seguido de una extensión a 72°C durante 10 min.

Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.4% (p/v) en tampón TAE 1X. Después de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta. Se usó el marcador de “100 pb DNA ladder”.

8.4.4. Amplificación de elementos delta (δ)

La amplificación de elementos delta se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos δ 1 y δ 2 (Ness y col., 1993), descritos en la Tabla 7.

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 μ l con 5 μ l de DNA obtenido en el apartado 8.2.1. (10-50 ng/ μ l), 1 μ M de cada oligonucleótido, 100 μ M de cada desoxinucleótido, 1 unidad de Taq polimerasa Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania), 5 μ l de tampón de reacción 10X 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 95°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos y 72°C durante dos min., 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 45°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 min. Por último, hay una incubación a 72°C durante 10 min. para una extensión final.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.4% (p/v) con tampón TAE 1X, estimando el tamaño de los fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador “100 pb DNA ladder”. A continuación, se comparó visualmente el número y tamaño de los fragmentos en busca de patrones distintivos para cada cepa analizada.

8.5. Tratamientos enzimáticos del DNA

8.5.1. 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 8.4.2), fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *Hinfi* (Boehringer Mannheim, Darmstadt, Alemania). Para la digestión se utilizaron 15 μ l de DNA amplificado sin necesidad de purificación previa. La reacción de digestión contenía, además, 2.5 μ l de tampón específico para cada endonucleasa, 1 μ l de la endonucleasa (10 U/ μ l) y 6.5 μ l de agua miliQ para un volumen final de 25 μ l. 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 ultravioleta tras la tinción con bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l) (Sigma). Como marcador de peso molecular, se utilizó el “100 pb DNA ladder”.

8.5.2. Digestión del producto de amplificación de los genes nucleares *APM3*, *PEX2* y *BRE5*

Los amplificad os de las tres regiones nucleares *APM3*, *PEX2* y *BRE5* (ver apartado 8.4.3) se digirieron con las siguientes endonucleasas: *MspI* (Boehringer, Alemania) para el gen *AMP3*, *HaeIII* (Boehringer, Alemania) para el gen *PEX2* y *Hinfl* (Boehringer, Alemania) para el gen *BRE5*. Las digestiones se llevaron a cabo con 15 μ l del DNA amplificado en un volumen total de 25 μ l. La mezcla de digestión contenía, además, 2.5 μ l del tampón específico para cada endonucleasa, 1 μ l de la endonucleasa (10 U/ μ l) y 6.5 μ l de agua miliQ para un volumen final de 25 μ l.

Los fragmentos de restricción resultantes fueron separados en un gel de agarosa al 3% (p/v) en tampón TAE 1X. Como marcador de peso molecular se utilizó el “100 pb DNA ladder”.

8.5.3. 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, que se extrajo como se ha descrito anteriormente (apartado 8.2.1), se digirió con la endonucleasa de restricción *Hinfl* (Boehringer, Alemania).

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 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), 1 μ l de la endonucleasa y 2.5 μ l del tampón H 10X específico para dicha endonucleasa y agua miliQ hasta completar un volumen total de 25 μ l. 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 µg/µl), y los fragmentos se visualizaron con luz ultravioleta. El DNA del fago λ digerido con *Pst*I sirvió para calcular el tamaño de los fragmentos de restricción.

9. Citometría de flujo

Para llevar a cabo el protocolo de citometría, las células se crecieron en 10 ml de medio GPY a 30°C en agitación durante toda la noche. Se hizo un recuento en cámara de Neubauer para obtener finalmente una cantidad total de células de 10⁶. Este volumen se centrifugó 5 min. a 3000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de tampón PBS pH 7.4. Esta operación se repitió una vez más y a continuación se fijaron las células con 1 ml de etanol 70% frío, y se incubaron a -20°C durante un mínimo de 30 min. Las células se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. y se lavaron de nuevo con 1ml de PBS 1X pH 7.4. El precipitado se resuspendió en 250 µl de tampón PBS 1X pH 7.4 y las células se sonicaron en un desintegrador ultrasónico MSE PG-100 (Ataico Ingenieros, S.A.) durante 5 segundos a potencia máxima para eliminar agregados; este paso se repitió dos veces manteniendo las células en hielo durante 1 min. entre cada paso. El efecto de la sonicación se confirmó por observación de las células con un microscopio óptico Leica DM LB (40X). A continuación, las células se trataron con 50 µl de RNAsa A (0.5 mg/ml) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) durante al menos 1 hora a 37°C y tras su centrifugación (3000 rpm, 5 min.), se resuspendieron en 495 µl de PBS

pH 7.4 con 5 µl de una solución de yoduro de propidio 50 µg/ml (Sigma-Aldrich) y se dejaron tiñendo durante toda la noche a 4°C en oscuridad.

Cada muestra se analizó por triplicado (tres experimentos independientes), como se detalla a continuación. El contenido en DNA de las células se determinó en un citómetro FACScan (Becton Dickinson). Las muestras se analizaron en el canal 3 y de modo lineal (FL3LIN), a un voltaje de 1039 V. En cada muestra se analizaron 10.000 células y se seleccionó el pico de fluorescencia de la población dominante (primer pico observado; pertenece a células en fase G1) para obtener el valor de intensidad de fluorescencia de esa muestra (Bradbury y col. 2006). Como cepas control para la determinación de la ploidía, se utilizaron la cepa haploide de *S. cerevisiae* S288c y la cepa diploide de *S. cerevisiae* FY1679. La ploidía de cada cepa se calculó dividiendo cada uno de los valores de intensidad de fluorescencia por la intensidad de fluorescencia haploide. Con los distintos valores (tres) obtenidos para una misma cepa se calculó una media y una desviación estándar. Para la representación gráfica de la ploidía se utilizó el programa informático WinMDI 2.9.

10. Análisis genómico y transcriptómico mediante micromatrices de DNA

10.1. Preparación de las muestras para el estudio de genómica comparada

10.1.1. Digestión del DNA genómico

Se digirieron por separado 2 µg de DNA genómico obtenido por el método descrito en el apartado 8.2.2 con el enzima *RsaI* (New England

BioLabs, Inc.) y otros 2 µg con el enzima *MseI* (New England BioLabs, Inc.) a 37°C durante 2 h. Tras la inactivación de los enzimas a 65°C durante 10 min., ambas digestiones se combinaron en un mismo tubo y se purificaron mediante el uso del kit MinElute PCR Purification (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. 1 µg del DNA purificado se visualizó en un gel al 1% de agarosa para confirmar la correcta digestión del mismo. El volumen restante que contenía 3 µg de DNA genómico digerido se usó para la realización del marcaje, tal y como se detalla en el siguiente apartado.

10.1.2. Marcaje del DNA genómico

3 µg de DNA genómico digerido y purificado según el apartado anterior, se llevó a un volumen final de 21 µl con agua del kit BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen). Se añadieron 20 µl de la solución de random primers 2.5x, se realizó una incubación de 5 min. a 95°C y se guardó en hielo. A continuación, se añadieron 5 µl de mix dCTP 10x (1.2 mM de dATP, dGTP y dTTP, y 0.6 mM de dCTP), 3 µl de Cy3-dCTP (Amersham) o Cy5-dCTP y 1 µl del fragmento enzimático Klenow (40 U/µl). Tras una incubación de 2 h. a 37°C en oscuridad, se paró la reacción mediante la adición de 5 µl de Stop Buffer (0.5 M EDTA, pH 8.0) y se guardó a -20°C hasta su uso.

El marcaje se purificó mediante el uso del kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen) atendiendo a las recomendaciones del proveedor. Se comprobó la eficiencia y calidad del marcaje en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Programa Microarrays, constante 50). El DNA marcado debe ser ≥ 100 pmoles.

Se mezcló en un tubo un número igual de picomoles de la muestra marcada con Cy3 y de la marcada con Cy5. Las muestras se concentraron

por centrifugación al vacío mediante el uso del Speed-Vac hasta dejar un volumen aproximado de 5 μ l.

La cepa de referencia de *S. cerevisiae* (S288c), se marcó con el fluoróforo verde (Cy3) y los aislados a estudiar (W303, 60, 102 y D14) se marcaron con el fluoróforo rojo (Cy5). Cada cepa fue hibridada por triplicado.

10.2. Preparación de la muestra para el ensayo de transcriptómica

10.2.1. Amplificación del RNA

La concentración de RNA obtenido en el apartado 8.1 no fue suficiente para abordar los ensayos de transcriptómica. Este problema se podría haber solucionado aumentando el volumen de sangre durante las incubaciones, pero esta estrategia fue inabordable debido a las dificultades para encontrar donantes voluntarios. Por este motivo, se procedió a la amplificación del mismo mediante el uso del kit Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification (Agilent Technologies, Inc., EE.UU.).

Se usaron para la amplificación 500 ng de RNA total, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Con este kit se consigue, en un primer paso la síntesis de cDNA usando el cebador oligo(dT) unido al promotor de la polimerasa T7, y en un segundo paso, la síntesis de cRNA (Figura 5). El cRNA amplificado obtenido (150-300 ng/ μ l) es purificado mediante el kit RNeasy mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

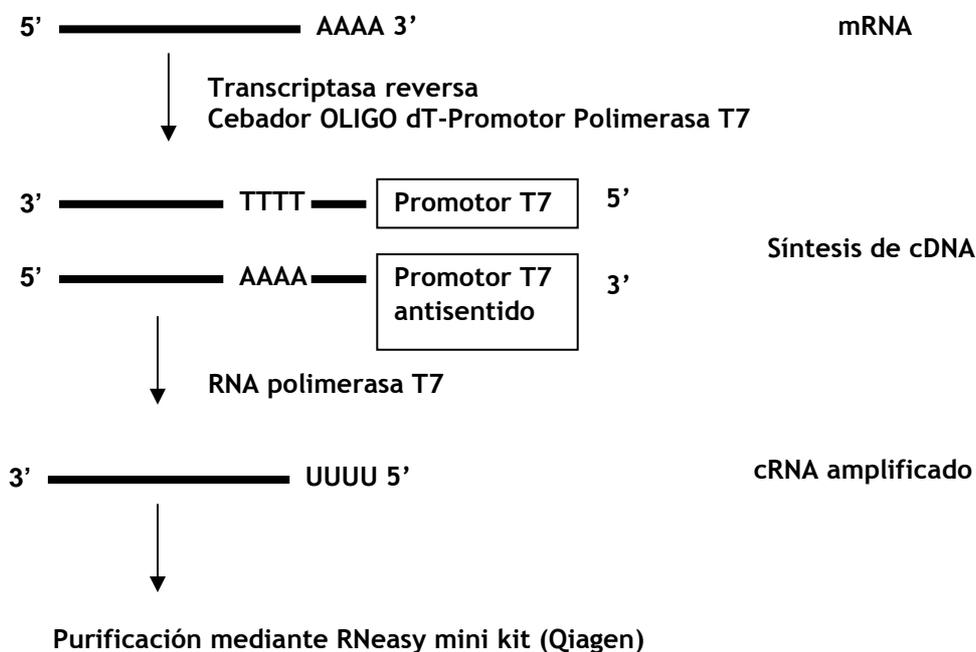


Figura 5. Amplificación de cRNA mediante el kit Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification (Agilent). Este proceso consiste en una primera síntesis de la doble hebra de cDNA, seguido de una síntesis de cRNA.

10.2.2. Síntesis y purificación de aminoalil-cDNA (AA-cDNA)

Para el marcaje de la muestra, se siguió el método de marcaje indirecto con los fluoróforos Cy5 y Cy3. Se partió de 1.5 µg de cRNA presente en un volumen máximo de 16.5 µl. Se añadió 1 µl (0.4 µg/µl) de “random primers” (Agilent Technologies, Inc., EE.UU.), se incubó a 70°C durante 5 min. y se dejó en hielo. A continuación, se añadieron 12.5 µl de una mezcla que contenía por reacción: tampón de primera hebra 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3; KCl 75 mM y MgCl₂ 3 mM) (Invitrogen), DTT 12 mM (Invitrogen), dATP 0.5 mM, dCTP 0.5 mM, dGTP 0.5 mM, dTTP 0.16 mM, 5-[3-aminoalil]-2'-deoxiuridina 5'- trifosfato (AA-dUTP) 0.33 mM

(Fermentas), inhibidor de ribonucleasa (Invitrogen) 10 U y transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen) 400 U. Se centrifugó para asegurar la mezcla completa de todos los reactivos y se incubó a 50°C durante 16 h. en horno de hibridación.

Transcurrido el tiempo de síntesis del cDNA, se inactivó la enzima por calor a 70°C durante 10 min. Para hidrolizar el RNA se añadieron 10 µl de NaOH 1M y 10 µl de EDTA 0.5 M, pH 8. Se mezcló suavemente, se incubó a 70°C durante 15 min, terminando con la adición de 10 µl de HCl 1M para neutralizar el pH. El AA-cDNA se purificó mediante el kit “MinElute PCR Purification” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor, pero con la siguiente modificación: se empleó como tampón de lavado KPO₄ 5 mM a pH 8.5 y etanol al 80% en lugar de Tris para evitar interferencias en la unión de los fluoróforos al extremo amino de la cadena aminoalil. Seguidamente, se comprobó la eficiencia de la síntesis del AA-cDNA en el NanoDrop® ND-1000 (Programa Nucleic Acids, ssDNA, constante 37). Se obtuvo alrededor de 1-2 µg de cDNA. Por último, se concentró el AA-cDNA en el Speed-Vac y se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

10.2.3. Acoplamiento de los fluoróforos al AA-cDNA y purificación de los Cy's-cDNA

Cada muestra de AA-cDNA, que contenía entre 1.5-2 µg, se resuspendió con 3 µl de los fluoróforos Cy3 o Cy5 (Amersham) y se añadió 1 µl de 0.2 M Na₂CO₃ a pH 9, ya que el acoplamiento de los fluoróforos al grupo aminoalil ocurre a pH básico. Se incubaron 2 h. a 25°C (temperatura ambiente) en oscuridad para permitir la incorporación de los fluoróforos mediante un acoplamiento químico.

Se añadieron 35 µl de acetato de sodio 100 mM pH 5.2 a las reacciones de marcaje y se mezcló bien para detener la reacción de acoplamiento. La purificación de los Cy's-cDNA se realizó con el kit de purificación "MinElute PCR Purification" (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante y empleando los tampones que se proporcionan en el mismo. La eficiencia, calidad del marcaje y el secado de las muestras se llevó a cabo como se describe en el apartado 10.1.2.

El tiempo 0 min. se marcó con el fluoróforo Cy5 (rojo) y los tiempos 15, 30 y 60 min. de cada cepa se marcaron con el fluoróforo Cy3 (verde). La hibridación en estas condiciones se hizo por duplicado y por último, se realizó un "dye-swap" (cambio de fluoróforos entre las muestras) para la tercera réplica.

Para determinar la frecuencia de incorporación (FOI) se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{FOI: } [\text{Nucleótidos incorporados} \times 324.5] / [A_{260} \times 37 \times \text{Volumen } (\mu\text{l})]$$

El valor debe estar comprendido entre el 50-100 %.

10.3. Hibridación de las micromatrices con muestras de DNA y cDNAs

Para la hibridación se usaron micromatrices que contenían por duplicado aproximadamente 6.400 pautas abiertas de lectura de *S. cerevisiae*. Para los estudios de genómica comparada, estas micromatrices fueron proporcionadas por la casa comercial Eurogentec S.A. (Bélgica), mientras los estudios de expresión se llevaron a cabo con micromatrices de la casa comercial Microarray Centre (University Health Network, Toronto, Canada).

Las micromatrices se incubaron en solución de prehibridación (3X SSC, SDS 0.1 % (p/v), 0.1 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA)) a 42°C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, se transfirieron a un

contenedor portaobjetos con agua milliQ estéril durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se transfirieron consecutivamente, por periodos de 2 segundos, primero a un contenedor con isopropanol y más tarde a un contenedor con agua milliQ. Finalmente, se secaron por centrifugación a 1.300 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente.

Las muestras, marcadas según se indica en los apartados 10.1 y 10.2, se resuspendieron en 50 μ l de la solución de hibridación (formamida al 50% (v/v), 5X SSC, SDS 0.1% (p/v), 0.1 mg/ml de DNA de esperma de salmón), ajustándose a un volumen final de 60 μ l con agua milliQ estéril. Posteriormente, se desnaturalizaron calentando a 95°C durante 1 min, se centrifugaron y se atemperaron 5 min. a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó la cámara de hibridación “Gene Machines Hyb Chamber” (Genomic Solutions) añadiendo 40 μ l de agua milliQ en cada una de sus cavidades para evitar el secado de la micromatriz durante la hibridación. La muestra se depositó encima de la micromatriz formando una línea central tras lo cual se colocó un cubreobjetos Hybri-slip (60 x 24 mm; Sigma-Aldrich), evitando la formación de burbujas y orientándolo bien para permitir el paso correcto de la muestra de hibridación. Una vez cerrada la cámara de hibridación, se introdujo en un baño a 42°C y se incubó durante 16 h.

Tras la hibridación, las micromatrices se separaron de los cubreobjetos por inmersión durante 5 min. a 42°C en la solución 1 [2X SSC, SDS 0.1% (p/v)] y seguidamente se sometieron a varios lavados consecutivos: 2 lavados de 10 min. cada uno a temperatura ambiente en la solución 2 (0.1X SSC, SDS 0.1% (p/v), 5 lavados de 1 min. cada uno a temperatura ambiente en la solución 3 (0.1X SSC), 5 segundos a temperatura ambiente en la solución 4 (0.01X SSC). Las micromatrices se secaron inmediatamente centrifugando a 1.300 rpm durante 10 min. y se

guardaron en un recipiente protector del polvo y la luz hasta su escaneado.

10.4. Adquisición y procesado de las imágenes

Una vez lavada la micromatriz, se escaneó inmediatamente, para minimizar la pérdida de señal con el tiempo, en un escáner con láser confocal GenePix 4100A (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., USA). Se utilizaron las longitudes de onda de 635 nm y 532 nm, correspondientes a los fluoróforos Cy3 y Cy5 respectivamente. Durante el escaneado se ajustaron las ganancias para que el cociente de las intensidades totales fuera lo más cercano posible a 1. El escaneado se llevó a cabo con una resolución de 10 μm realizando tres pases de lector, obteniendo una imagen en formato TIFF.

Las imágenes de hibridación se capturaron y cuantificaron con el programa “GenePix Pro 6.1” (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., USA). La normalización y el procesado de los datos se llevaron a cabo mediante el programa Acuity 4.0 (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., USA).

10.4.1. Análisis y tratamiento de los datos de genómica comparada

Todos los datos se normalizaron ajustando la media del logaritmo del ratio de la señal de fluorescencia (rojo/verde) de todos los puntos de la micromatriz a 0. Las diferencias en la intensidad de la hibridación debido a las diferencias en la ploidía son de esta forma eliminadas. Así, aunque los aislados sean diploides o poliploides, la normalización permite la comparación directa con la cepa de referencia haploide, de manera

que, solamente se detectarán cambios en el número de copias génicas relativas al estado haploide. De esta manera, si un gen tiene 2 copias en la cepa de referencia haploide y 4 copias en la cepa diploide en estudio, el ratio de hibridación rojo/verde será 1 ($\text{Log}_2 1 = 0$), así el número de copias respecto al haploide es el mismo en las dos cepas. Sin embargo, si una cepa diploide (marcada en rojo, Cy5), ha sufrido una disminución en el número de copias para un gen de manera que solo tiene 2, el ratio de hibridación rojo/verde será 0,5 ($\text{Log}_2 0,5 = -1$), porque el número de copias respecto al estado haploide ha disminuido (Dunn y col., 2005).

Los datos normalizados se filtraron atendiendo a las siguientes condiciones: que la recta de regresión $635/532 > 0.6$, señal de intensidad en ambos canales fuera mayor que 350 unidades y que la señal respecto al ruido (SNR) > 2.5 (Dunham y col., 2002). Se eliminaron del análisis todos los puntos con artefactos o etiquetados como mal hibridados.

Una vez hecha la filtración, todos los datos se representaron como la media de los valores del triplicado de micromatrices para cada aislado. El ratio de Log_2 de Cy5/Cy3 para cada ORF se representó en su correspondiente posición cromosómica mediante el uso de la secuencia de la cepa de referencia de *S. cerevisiae* S288c y los mapas cromosómicos se generaron mediante el uso del programa Microsoft Office Excel.

10.4.2. Análisis y tratamiento de los datos de transcriptómica

Todos los datos (media de tres réplicas biológicas) se normalizaron ajustando la media del logaritmo del ratio de la señal de fluorescencia de todos los puntos de la micromatriz a 0. Se filtraron los datos cuya señal respecto al ruido (SNR) fuera mayor a 1.5. Se eliminaron del análisis todos los puntos con artefactos o etiquetados como mal hibridado y aquellos valores que estaban fuera del intervalo de confianza del 95%. Para los

posteriores análisis se utilizaron los genes cuya inducción o represión estaba 2 veces incrementada o reducida respecto al tiempo 0 min.

Para la realización de los agrupamientos, se utilizó el método k-means (método no jerárquico), donde cada dato correspondiente a la expresión de cada gen es asignado a un grupo basándose en su perfil de expresión.

10.4.3. Ontologías génicas (GO)

GO es probablemente el mejor método para la estandarización de la nomenclatura de las funciones moleculares (las tareas realizadas por los productos de los genes), procesos biológicos (el fin biológico que pretende alcanzar con la función) y localización subcelular (estructuras subcelulares, localización y complejos macromoleculares), sus tres ontologías fundamentales.

El estudio de las ontologías génicas se realizó mediante el uso de las aplicaciones Gostat, DAVID Database y GO term finder (base de datos SGD). Para estos análisis se utilizó un FDR (False Discovery Rate) menor del 5%, que corresponde a la probabilidad de que un resultado se dé como diferencial cuando realmente no lo es (falso positivo).

10.5. Validación de los resultados obtenidos por genómica y transcriptómica

10.5.1. Validación de los resultados obtenidos por genómica

Para validar el resultado de las micromatrices, se siguieron dos tipos de estrategias:

- Análisis del número de copias mediante PCR a tiempo real (qRT-PCR)
- Determinación de la supervivencia frente a concentraciones de cobre

Análisis del número de copias mediante PCR a tiempo real (qRT-PCR)

Para validar los resultados de las micromatrices, se comprobó el número de copias génicas de determinado genes. Para ello, el DNA de las cepas de estudio (W303, S288c, 102, 60 y D14) fue aislado como se indica en el apartado 8.2.2. de Materiales y Métodos y se llevó a cabo una qRT-PCR con 200 nM de los primers específicos para cada gen estudiado, que se detallan en la Tabla 8, en un volumen final de reacción de 20 μ l. Este proceso se llevó a cabo usando el kit Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR green (Roche Applied Science, Alemania) en el termociclador LightCycler® 2.0 System (Roche Applied Science, Alemania). Todas las muestras se procesaron mediante el análisis de la curva de disociación, eficiencia de amplificación y concentración de DNA mediante el sistema LightCycler® 2.0. Para la elaboración de la curva estándar se hizo una mezcla de todas las muestras y diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-5}). Los datos fueron normalizados respecto al contenido de DNA del gen de la actina para cada muestra. Los datos se presentan como la media \pm desviación estandar de tres réplicas biológicas.

Determinación de la supervivencia frente a concentraciones de cobre

Las levaduras fueron crecidas durante toda la noche a 30°C en medio YPD. A continuación, se ajustó la concentración de células a una O.D. de 0.2 en YPD y en medio YPD más cobre a diferentes

concentraciones (0, 0.5, 1 y 2 mM) y se inocularon en una placa multipocillos con un volumen de 200 µl/pocillo. Se midió la O.D. a 600 nm cada 20 min. en un lector de absorbancia (SPECTROstar) y se representó la O.D. máxima normalizada respecto al cultivo sin cobre para cada cepa. Cada cepa fue ensayada por triplicado y los datos se representaron como la media de la supervivencia ± la desviación estándar.

10.5.2. Validación de los resultados obtenidos por transcriptómica

Para validar el resultado de las micromatrices, se siguieron dos tipos de estrategias:

- Determinación de la supervivencia frente al estrés oxidativo
- Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real (qRT-PCR)

Determinación de la supervivencia frente al estrés oxidativo

Las levaduras fueron crecidas durante toda la noche a 30°C en medio YPD. Se ajustó la concentración de células a 1×10^6 células/ml en PBS 1X en un volumen total de 1 ml y se añadió H₂O₂ (Panreac) a una concentración final de 6 mM. Las muestras se incubaron a 30°C durante una hora con agitación. A este tiempo, se hicieron diluciones seriadas y 100 µl de estas diluciones fueron sembradas en placas de GPYA e incubadas durante 24-48 h. Se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) y la supervivencia fue calculada como la relación entre las UFC recuperadas a tiempo 1 hora (células tratadas) respecto a las UFC crecidas a tiempo 0 min. (células no tratadas). Cada cepa fue ensayada tres veces y los datos se representaron como la media

de la supervivencia \pm la desviación estándar y la significancia estadística fue calculada usando el t-test.

Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real (qRT-PCR)

Los oligonucleótidos para amplificar los genes de interés fueron diseñados mediante el programa Primer3 (versión 0.4.0) y sintetizados por Isogen Life Science.

El RNA amplificado de varios genes fue convertido a cDNA para poder cuantificar su expresión mediante qRT-PCR. La mezcla de reacción que contenía 1 mg de RNA, 0.5 mM dNTPs y 50 pmol Oligo(dT) en un volumen total de 10 ml fue calentada a 65°C durante 5 min. y luego mantenida en hielo. Tras añadir 10 mM DTT, 50 U inhibidor de RNAsas (Invitrogen) y 1x First Strand Buffer (Invitrogen) y H₂O hasta un volumen final de 20 ml, la mezcla se incubó durante 2 min. a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 500 U Superscript III (Invitrogen) y se incubó a 42°C durante 50 min. La reacción se detuvo por calentamiento a 70°C durante 15 min.

Para verificar que no había contaminaciones de otros ácidos nucleicos, se llevó a cabo una electroforesis en agarosa al 1%. La qRT-PCR se llevó a cabo usando los cebadores específicos (200 nM) (Tabla 8) para cada gen analizado en un volumen final de 20 μ l. Este proceso se llevó a cabo usando el kit Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR green (Roche Applied Science, Alemania) en el termociclador LightCycler® 2.0 System (Roche Applied Science, Alemania). Todas las muestras se procesaron mediante el análisis de la curva de disociación, eficiencia de amplificación y concentración de DNA mediante el sistema LightCycler® 2.0. Para la elaboración de la curva estándar se hizo una mezcla de todas las muestras y diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-5}).

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la qRT-PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3)'	Región diana	T (°C)*	Procedencia
<i>IMD2</i> Dir.	AAC ATT CCT GTC AAG ACA TCG G	Región codificante gen <i>IMD2</i>	53.0	Este trabajo
<i>IMD2</i> Rev.	TCA GTT ATG TAA ACG CTT TTC GTA A	Región codificante gen <i>IMD2</i>	51.0	Este trabajo
<i>IMD3</i> Dir.	CGG TTT ACA ACA TTC TTG TCA AGA C	Región codificante gen <i>IMD3</i>	54.0	Este trabajo
<i>IMD3</i> Rev.	AAA CGC TTT TCG TAA GAA TGT AAG T	Región codificante gen <i>IMD3</i>	51.0	Este trabajo
<i>CUP1</i> Dir.	TGT TCA GCG AAT TAA TTA ACT TCC A	Región codificante gen <i>CUP1</i>	51.0	Este trabajo
<i>CUP1</i> Rev.	TTC CCA GAG CAG CAT GAC TT	Región codificante gen <i>CUP1</i>	52.0	Este trabajo
<i>SAM3</i> Dir.	GCG GGT GAA ATA TAC GTA TCG G	Región codificante gen <i>SAM3</i>	55.0	Este trabajo
<i>SAM3</i> Rev.	ATT CTC CAC GGA ACA CCC AGT A	Región codificante gen <i>SAM3</i>	55.0	Este trabajo
<i>TSA1</i> Dir.	GGC CTT CAC TTT CGT CTG T	Región codificante gen <i>TSA1</i>	57.8	Este trabajo
<i>TSA1</i> Rev.	AGT CAG TGG AGG CGA AAA G	Región codificante gen <i>TSA1</i>	58.0	Este trabajo
<i>TRX1</i> Dir.	CGC TAT GCC AAC TTT GCT T	Región codificante gen <i>TRX1</i>	57.6	Este trabajo
<i>TRX1</i> Rev.	CTT AAT AGC CGC TGG GTT G	Región codificante gen <i>TRX1</i>	58.4	Este trabajo

Nombre	Secuencia (5' → 3)'	Región diana	T (°C)*	Procedencia
<i>TRX2</i> Dir.	CAT GGT GTG GGC CAT GTA A	Región codificante gen <i>TRX2</i>	58.0	Este trabajo
<i>TRX2</i> Rev.	GGGTAGGCATGG AAGAAAC	Región codificante gen <i>TRX2</i>	57.0	Este trabajo
<i>TTR1</i> Dir.	CAG GAA ACA GTT GCT CAC G	Región codificante gen <i>TTR1</i>	58.0	Este trabajo
<i>TTR1</i> Rev.	GGG CAG TAT GTC TTT GCT G	Región codificante gen <i>TTR1</i>	58.0	Este trabajo
<i>FLO5</i> Dir.	TCG TAG CAC ACC AGC AAG T	Región codificante gen <i>FLO5</i>	58.0	Este trabajo
<i>FLO5</i> Rev.	CTA CCG GCC AGT AAG CTG	Región codificante gen <i>FLO5</i>	58.0	Este trabajo
<i>PHO5</i> Dir.	TGG TCC AGG GTT CTC TTG T	Región codificante gen <i>PHO5</i>	58.0	Este trabajo
<i>PHO5</i> Rev.	TAC TGA CGC TGC TGAC GTT	Región codificante gen <i>PHO5</i>	58.16	Este trabajo
<i>PHO3</i> Dir.	CGGAGAGTTAGC CGATGTT	Región codificante gen <i>PHO3</i>	57.91	Este trabajo
<i>PHO3</i> Rev.	CGC CAG GGA AAG AGA AGT A	Región codificante gen <i>PHO3</i>	58.0	Este trabajo
<i>PHO12</i> Dir.	TGG TCC AGG GTT CTC TTG T	Región codificante gen <i>PHO12</i>	58.0	Este trabajo
<i>PHO12</i> Rev.	TAC TGA CGC TGC TGA CGT T	Región codificante gen <i>PHO12</i>	58.16	Este trabajo

Nombre	Secuencia (5' → 3)'	Región diana	T (°C)*	Procedencia
<i>PSA1</i> Dir.	GTG CAA CTC CAC CAT CAA G	Región codificante gen <i>PSA1</i>	57.56	Este trabajo
<i>PSA1</i> Rev.	CAG TGA CAC CTT CCA AAC G	Región codificante gen <i>PSA1</i>	57.63	Este trabajo
<i>YNL217W</i> Dir.	GTG GGA CAA ATA CGG AGA C	Región codificante gen <i>YNL217W</i>	58.1	Este trabajo
<i>YNL217W</i> Rev.	GGTTTAGTCCCA TGGATGC	Región codificante gen <i>YNL217W</i>	57.79	Este trabajo
<i>YNL313C</i> Dir.	GAT GTT ACC CCG GAT CAA G	Región codificante gen <i>YNL313C</i>	57.8	Este trabajo
<i>YNL313C</i> Rev.	GCC CAC CAC CAA TAA GCT A	Región codificante gen <i>YNL313C</i>	58.6	Este trabajo
<i>GFA1</i> Dir.	CTG CTC TGG AAG GTG CTT T	Región codificante gen <i>GFA1</i>	58.2	Este trabajo
<i>GFA1</i> Rev.	CAA GAC ACC GTG CTT CAA C	Región codificante gen <i>GFA1</i>	57.8	Este trabajo
<i>SPB4</i> Dir.	TCC CTG GAT AAG GAC AGG A	Región codificante gen <i>SPB4</i>	58.0	Este trabajo
<i>SPB4</i> Rev.	ACA AAC GCA GCG GTC TTA C	Región codificante gen <i>SPB4</i>	58.9	Este trabajo

* Temperatura de hibridación empleada en el protocolo de PCR.

11. Estudio *in vivo* de la patogenicidad en modelo murino

El potencial patógeno de los aislados de *S. cerevisiae* se estudió *in vivo* usando modelos murinos de infección sistémica y de infección gastrointestinal. Todos los procedimientos aplicados fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Los ensayos se llevaron a cabo en la Sección de Producción Animal del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València, teniendo en cuenta las exigencias establecidas en el Real Decreto 1201/2005.

11.1. Infección sistémica

El estudio de la capacidad infectiva en un modelo de infección sistémica se llevó a cabo utilizando ratones inmunocompetentes de la cepa consanguínea BALB/c [Harlan Ibérica (Barcelona, España)]. Esta cepa de ratón se eligió porque trabajos previos de nuestro laboratorio proponen este modelo murino como idóneo para resaltar las diferencias en cuanto a virulencia entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2011). Se realizaron los ensayos utilizando por cepa de levadura de 2 a 4 lotes de 10 ratones hembra (Tabla 9) con un peso comprendido entre 18-20 gramos y entre 5-6 semanas de edad.

Tabla 9. Relación del número de ratones usados en total para cada cepa en el ensayo de infección sistémica

CEPA	Nº ratones totales	Nº de lotes totales
CECT 10.431	20	2
D2	20	2
D4	20	2
D14	40	4
D23	20	2
YJM128	30	3
W303	10	1

11.1.1. Preparación y administración del inóculo

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 y pasado dicho período, se pesaron y se dividieron en grupos de 10 ratones por jaula y por cepa. El día de la infección, las células de levadura se lavaron dos veces con tampón PBS 1X a pH 7.4 (GIBCO) 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 a una dosis de 1×10^8 UFCs/ml, inyectando a cada ratón un volumen de 0.2 ml. Dicha cantidad se inyectó en la vena lateral caudal del ratón, que previamente se dilató mediante exposición a una fuente de calor durante 2-3 min. (Díez-Orejas y col., 1999) (Figura 6). Se incluyó un ratón control al que se le administró 0.2 ml de PBS 1X estéril.



Figura 6. Técnica de inoculación intravenosa.

11.1.2. Parámetros estudiados

Dentro de este ensayo, los parámetros que se estudiaron fueron:

Curva de supervivencia

Los ratones fueron monitorizados visualmente en busca de manifestaciones clínicas de infección y se pesaron cada 12 h. desde el inicio la misma. La muerte/supervivencia de los ratones tras la infección con las correspondientes cepas de *S. cerevisiae* se monitorizó durante 30 días.

Estudio del alojamiento

Para estudiar la capacidad colonizadora de las cepas de *S. cerevisiae* se determinó el alojamiento en cerebro y riñón a los 7, 15 y 30 días postinfección. Para ello, el día 7 se sacrificaron por dislocación cervical entre 2 y 4 ratones de cada lote, salvo cuando se detectó alguna

muerte en los días anteriores; en este caso, se sacrificó sólo un ratón reservándose los ratones supervivientes para determinar los alojamientos los días 15 y 30 postinfección. El número de ratones sacrificados a estos dos tiempos varió también entre 2 y 4 por lote.

Inmediatamente después del sacrificio de los ratones, los órganos se extrajeron asépticamente para minimizar los efectos de la lisis tisular.

Los órganos se homogeneizaron con el sistema Polytron® PT 3100 (Kinematica) con un vástago de 10 mm y entre cada homogeneización el vástago se limpió con 2 lavados sucesivos de alcohol absoluto, seguido de un lavado con una mezcla de agua y alcohol (v/v), evitando así contaminaciones entre las muestras. Seguidamente se realizaron diluciones 1/10 de todos los homogeneizados de cerebro. Posteriormente, se sembraron 100 µl de cada homogeneizado y de sus diluciones correspondientes en placas de GPYA con cloranfenicol (10 mg/l), que se incubaron a 28°C durante 48 h. A continuación, se hizo un recuento del número de UFCs y este valor se expresó en base al Log₁₀ UFC.

Para confirmar si las cepas aisladas en cerebro y riñón correspondían con la cepa inoculada, se seleccionaron al azar tres colonias a partir de los homogenizados correspondientes y se analizaron mediante la técnica del análisis del DNA mitocondrial (Querol y col., 1992b).

11.2. Infección gastrointestinal

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratones hembra ICR (cepa no consanguínea) [Harlan Ibérica (Barcelona, España)] de edad comprendida entre 5-6 semanas y de un peso alrededor de 24 gramos (fueron pesados a su llegada). Los animales pasaron un período de cuarentena o adaptación al nuevo lugar de 10 días y tuvieron acceso al agua y a la comida *ad libitum*.

Se consideró como primer día del ensayo el correspondiente al inicio del tratamiento con antibióticos (ver subapartado 11.2.2). A partir de ese momento, los ratones fueron cambiados a jaulas especiales con filtros (impiden la entrada de patógenos y el contagio de enfermedades), serrín, comida y agua estériles.

11.2.1. Preparación y administración del inóculo

Las cepas de *S. cerevisiae* a ensayar fueron crecidas en placas de GPYA a 28°C durante 48 h. Los inóculos se prepararon siguiendo la metodología descrita en el subapartado 11.1.1.

En todos los casos, se administró una dosis única de la levadura a ensayar (0.2 ml de un inóculo conteniendo 1×10^9 células vivas) vía inoculación gástrica mediante una sonda o cánula que se introducía hasta la entrada del estómago (Figura 7). Se incluyó un ratón control al que se le administró 0.2 ml de PBS 1X en sustitución de la suspensión de levaduras. Se optó por la administración de una dosis única para evitar la irritación esofágica.



Figura 7. Técnica de inoculación gástrica.

La levadura fue, además, administrada en el agua de beber a una concentración de 7×10^7 células/ml durante varios días para intentar asegurar una dosis alta de la misma en el tracto intestinal y favorecer así la colonización. Previamente, se comprobó que las levaduras eran capaces de sobrevivir en el agua durante todo el tratamiento.

11.2.2. Tratamiento con antibióticos

Se administró en el agua de bebida (estéril) una mezcla de 3 antibióticos basándose en la metodología descrita por Wells y colaboradores (2007). El tratamiento se mantuvo en todos los casos a lo largo de todo el experimento.

Los antibióticos utilizados, así como la cantidad administrada de cada uno de ellos, se muestran a continuación:

- Bacitracina (Sigma-Aldrich Química, S.A. Madrid): 1 mg/ml agua.
- Sulfato de estreptomina (Laboratorios Reig Jofré, S.A. Barcelona): 2 mg/ml agua.
- Sulfato de Gentamicina (Laboratorios Normon, S.A. Madrid): 0.1 mg/ml agua.

11.2.3. Tratamiento con antifúngico

En los casos donde se requería la administración de un antifúngico (modelo murino 3, Capítulo 2), se usó Fluconazol LOITIN (Fluconazol, Laboratorios Lesvi, S.L. Barcelona) a una concentración de 0.250 mg/ml. Éste se administró durante 4 días en el agua de bebida junto con los antibióticos, interrumpiendo su administración 2 días antes a la

inoculación de la levadura. La administración de este antifúngico se basó en la metodología descrita por Koh y colaboradores (2008).

11.2.4. Inducción de inmunosupresión y daño intestinal

En los casos donde una inmunodepresión era requerida, ésta se llevó a cabo mediante administración intraperitoneal (i.p.) de dexametasona fosfato (Fortecortín 40 mg, Merck Farma y Química, S.L. Madrid) a una concentración de 0.1 mg/g peso ratón como única droga o combinada con metotrexato (25 mg/ml, Pharmacia Spain, S.A. Barcelona) a una concentración de 0.15 mg/g peso ratón.

La dexametasona siempre se administró dos veces al día durante 4 días consecutivos mientras que el metotrexato se aplicó en dosis única.

11.2.5. Parámetros estudiados

Dentro de este ensayo, los parámetros que se estudiaron fueron:

Estudio del efecto de los antibióticos en la flora intestinal y en la colonización por las levaduras

Se recogieron las heces de los ratones para asegurarse de que la composición de la flora intestinal correspondía al momento que nosotros queríamos estudiar. Estas heces se pesaron, se resuspendieron en tampón PBS 1X y se homogeneizaron mediante el sistema Polytron. A continuación, se realizaron diluciones decimales seriadas que se sembraron en placas con medio TSA y/o en medio GPY + cloranfenicol, para ver la presencia de bacterias gastrointestinales o de levaduras, respectivamente.

Estudio del alojamiento

La capacidad de las cepas para atravesar la pared intestinal se estudió determinando el alojamiento en placas de Peyer. Por otro lado, la capacidad de diseminación se estudió determinando su presencia en sangre, así como el alojamiento en órganos extraintestinales; en concreto nódulos mesentéricos, cerebro, hígado y riñones.

El procedimiento seguido en el tratamiento de los órganos fue el mismo que se utilizó en el subapartado 11.1.2. para el estudio de los órganos tras administración intravenosa. En cuanto a la sangre, ésta se obtuvo mediante punción cardiaca y se recogió en tubos de EDTA de 4 ml para evitar su coagulación. Posteriormente, la sangre se cultivó tanto en medio líquido como en medio sólido, con el fin de asegurar la detección de levadura en el caso de que estuviese presente. Para ello, 100 µl de esta sangre fueron cultivados directamente en placas de GPYA + cloranfenicol y 200 µl se inocularon en 5 ml de GPY líquido + cloranfenicol.

11.3. Estudios de histopatología

Se extrajeron 2 cerebros y 4 riñones a partir de ratones BALB/c infectados con la cepa de *S. cerevisiae* D14 y se sometieron a un estudio histopatológico en busca de levaduras en los mismos. Los órganos se extrajeron con mucho cuidado y se fijaron con formalina al 4%. Los cortes y la tinción de las muestras con tinción de Shift con ácido periódico (PAS) fueron llevados a cabo en el Servicio de Patología de la Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense de Madrid).

11.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico para la comparación de las cargas fúngicas de *S. cerevisiae* en cada órgano en ambos modelos de infección, se realizó aplicando el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba LSD de Fisher utilizando el paquete estadístico 'Statgraphics Plus 5.1' (Manugistics, Inc.). Un valor de p-valor ≤ 0.05 se consideró como diferencia significativa.

Resultados y Discusión

Capítulo 1

Aislamiento, identificación y
caracterización de aislados de
Saccharomyces cerevisiae procedentes de
suplementos dietéticos

Como se ha comentado en las secciones anteriores, además de la importancia de *Saccharomyces cerevisiae* en procesos fermentativos, esta levadura destaca por su valor alimenticio intrínseco y sus propiedades biofuncionales, por lo que también es consumida en forma de células vivas a través de los suplementos dietéticos. Los efectos beneficiosos en el hospedador derivados de este consumo son conocidos; sin embargo, no se han estudiado los posibles efectos indeseables, sin duda, debido a que *S. cerevisiae* se ha considerado siempre un microorganismo seguro para uso alimentario. En los últimos años, esta percepción acerca de *S. cerevisiae* ha cambiado debido a un aumento en el número de infecciones causadas por esta levadura, por lo que actualmente *S. cerevisiae* se incluye en el grupo de “patógenos oportunistas emergentes” y su inocencia ya no puede ser sostenida.

En el marco de estas reflexiones se plantea la presente investigación, que se basa en la evaluación del posible riesgo de infección que se podría derivar de la ingesta de suplementos dietéticos a base de *S. cerevisiae*. Para ello, en primer lugar fue necesario abordar el aislamiento de cepas de *S. cerevisiae* a partir de productos comerciales, como se expone en el presente capítulo; como veremos a continuación, los aislados se identificaron para confirmar su adscripción a la especie *S. cerevisiae* y se caracterizaron a nivel de cepa para seleccionar aislados diferentes entre sí para los estudios posteriores.

1. Aislamiento de levaduras a partir de suplementos dietéticos

Los aislados de levadura, con los cuales se realizó el estudio que aquí se presenta fueron obtenidos a partir de un total de 22 productos dietéticos comerciales, y de un lote comercial del agente bioterapéutico

conocido como Ultralevura[®], en cuya composición se encuentra *S. cerevisiae* var. *bouardii* (Tabla 3 de Materiales y Métodos). A partir de estos productos, se consiguió aislar con facilidad levaduras a partir de 9 de ellos (D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D14 y D23); en los 14 productos restantes no se observó crecimiento levaduriforme a pesar de que las etiquetas de algunos de ellos, en concreto D2, D7, D16, D18 y D20, hacían mención expresa a la presencia de levaduras vivas en los mismos. Llama la atención que 8 productos (D1, D9, D12, D15, D18, D19, D20 y D21) mostraron crecimiento bacteriano probablemente como resultado de contaminaciones, teniendo en cuenta que las bacterias no formaban parte de su composición. En el caso concreto de dos productos (D14 y D17), entre sus ingredientes se encuentran *Lactobacillus acidophilus* (100 millares/gramo) y lactobífidos respectivamente, aunque en ninguno de ellos se observó crecimiento bacteriano. En la Tabla 10 se muestran los productos comerciales con lo que se ha trabajado, así como el tipo de crecimiento observado en cada caso.

Por tanto, el estudio se continuó con levaduras aisladas de 9 de los 23 productos iniciales. Estos productos se indican con fondo rojo en la Tabla 10 y fueron D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D14 y D23. De cada uno de estos 9 productos, se seleccionaron 6 colonias al azar para su posterior identificación, tanto a nivel de especie como a nivel de cepa.

Tabla 10. Lista de productos dietéticos donde se especifica el tipo de crecimiento observado (levadura, bacteria o ninguno)

Nº producto	Tipo de producto	Tipo de crecimiento
D1	Levadura de cerveza en comprimidos	Bacteria
D2	Levadura de cerveza en cápsulas	Levadura
D3	Levadura de cerveza en cápsulas	Levadura
D4	Levadura de cerveza en comprimidos	Levadura
D5	Ultralevura (UPSA) en cápsulas (<i>Saccharomyces boulardii</i>)	Levadura
D6	Levadura de cerveza líquida	Levadura
D7	Levadura de cerveza en cápsulas	Levadura
D8	Levadura de cerveza en copos	Levadura
D9	Levadura de cerveza en comprimidos	Bacteria
D10	Cerveza biológica	Ninguno
D11	Levadura de cerveza líquida	Ninguno
D12	Levadura de cerveza en comprimidos	Bacteria
D13	Levadura de cerveza en comprimidos	Ninguno
D14	Levadura de cerveza en cápsulas	Levadura
D15	Levadura de cerveza en copos	Bacteria
D16	Levadura de cerveza en cápsulas	Ninguno
D17	Concentrado lactobífido fermentado con levadura	Ninguno
D18	Levadura de cerveza en comprimidos	Bacteria
D19	Levadura de cerveza en comprimidos	Bacteria

Nº producto	Tipo de producto	Tipo de crecimiento
D20	Levadura de cerveza en cápsulas	Bacteria
D21	Levadura de cerveza en copos	Bacteria
D22	Levadura de cerveza en copos	Ninguno
D23	Cerveza biológica	Levadura

2. Identificación de los aislados

Una vez obtenidos los aislados de estos productos, se procedió a su identificación para saber si todos ellos pertenecían a la especie *S. cerevisiae*. Para ello, se usó la técnica basada en el análisis de restricción de la región ribosomal 5.8S-ITS y su posterior comparación de los tamaños de restricción contenidos en la base de datos <http://yeast-id.com/>. Este método es uno de los más utilizados para la identificación de levaduras debido a su sencillez, rapidez, reproducibilidad y a su capacidad de discriminación a nivel de especie (Esteve-Zarzoso y col., 1999).

Como resultado, todos los aislados procedentes de los 9 productos comerciales seleccionados en el apartado anterior mostraron el patrón típico de amplificación de la región 5.8S-ITS de 850 pb, descrito previamente para las especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* (Esteve-Zarzoso y col., 1999; Fernández-Espinar y col., 2000). Los tamaños de restricción obtenidos para 8 de estos aislados (D2, D3, D4, D5, D7, D8, D14 y D23) usando las endonucleasas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* (375 + 325 + 150; 325 + 230 + 170 + 125; 375 y 365 + 110, respectivamente) mostraron que estos aislados pertenecían a la especie *S. cerevisiae*, como se muestra en la base de datos presentada por Esteve-Zarzoso y colaboradores (1999).

El aislado procedente del producto designado como D6 mostró igualmente los perfiles de restricción para *Cfol* y *Hinfl*, típicos de *S. cerevisiae*. Sin embargo, el perfil de restricción para la endonucleasa *HaeIII* fue 500 + 230+ 125. Según datos previos de nuestro grupo (González y col., 2006a), este perfil podía corresponder a dos especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces bayanus* o *Saccharomyces kudriavzevii*), así que se decidió digerir con el enzima de restricción *AccI* que es útil para distinguir entre ambas especies. Como resultado, el patrón de restricción mostrado por el aislado del producto D6 (730 + 110) correspondió a la especie *S. kudriavzevii* (González y col., 2006a).

Recientemente, cepas vínicas y cerveceras previamente identificadas como *S. cerevisiae* se han descrito como híbridos entre especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* (González y col., 2006a; González y col., 2008). Este mecanismo proporciona a los híbridos una serie de ventajas adaptativas no presentes en las especies parentales. En base a estas observaciones, se consideró interesante determinar la presencia de híbridos interespecíficos en los productos dietéticos con objeto de valorar posteriormente si éstos están mejor adaptados para sobrevivir *in vivo* y desarrollar mejor una infección que el resto de aislados. Para ello, se utilizó el método desarrollado por González y colaboradores (2008) para la identificación de este tipo de híbridos basado en la amplificación por PCR de los genes nucleares *APM3*, *PEX2* y *BRE5* y su posterior restricción con los enzimas de restricción *MspI*, *HaeIII* y *Hinfl*, respectivamente.

La caracterización se llevó a cabo comparando los perfiles de restricción obtenidos para nuestros aislados con los obtenidos en estudios previos (González y col., 2008; Lopes y col., 2010; Pérez-Través y col., manuscrito en preparación) para las cepas tipo de referencia pertenecientes a las especies *Saccharomyces uvarum*, *S. bayanus*, *S.*

cerevisiae y *S. kudriavzevii*, y que aparecen en la Tabla 1 y Tabla 2 del Anexo II. En esos trabajos, se definieron los siguientes patrones para las cepas de referencia: *S. bayanus* (B1), *S. cerevisiae* (C1), *S. kudriavzevii* (K1) así como “patrones raros” (C2 y K2) que se habían encontrado al analizar algunos híbridos y que no coincidían con los esperados para las cepas de referencia; por secuenciación se supo que provenían de otro alelo de estas cepas de referencia y se definieron siguiendo el mismo código de letras, pero con otra numeración (correlativa). Los perfiles de restricción obtenidos para nuestros aislados de productos dietéticos se muestran en la Tabla 11.

Se observó que el aislado procedente del producto D6, identificado como perteneciente a la especie *S. kudriavzevii* mediante el análisis de restricción de la región 5.8S-ITS, consistía en un híbrido interespecífico entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, ya que los patrones de restricción obtenidos tras la digestión de los tres genes nucleares (*APM3*, *PEX2* y *BRE5*) correspondían a la combinación de los patrones descritos en la bibliografía para las especies *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* (González y col., 2008; Lopes y col., 2010). Por otro lado, se observó que el aislado obtenido a partir del producto D23 e identificado previamente como perteneciente a la especie *S. cerevisiae*, era en realidad un híbrido entre las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, teniendo en cuenta la combinación de los patrones de restricción que aparecen en la Tabla 11.

Tabla 11. Patrones de restricción correspondientes a los aislados de productos dietéticos para los genes utilizados en la caracterización de híbridos

Aislado	APM3 (<i>MspI</i>)	PEX2 (<i>HaeIII</i>)	BRE5 (<i>HinfI</i>)	“Patrones raros”	
				APM3 (<i>MspI</i>)	PEX2 (<i>HaeIII</i>)
D2	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		C2 (370+345)
D3	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		
D4	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		
D5	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		
D7	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		
D8	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		
D14	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		
Híbrido <i>S. cerevisiae/S. kudriavzevii</i>					
D6	C1(750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)	K2 (520+310+200)	
			K1 (170 +165 +150 +135+ 95 +65)		
Híbrido <i>S. cerevisiae/S. bayanus</i>					
D23	C1 (750+280)	C1 (345+260+110)	C1 (290+230+100+65+60+40)		
	B1 (680+340)	B1 (270+180+150+100)			

C: perteneciente a *S. cerevisiae*; B: perteneciente a *S. bayanus*; K: perteneciente a *S. kudriavzevii*.

3. Caracterización a nivel de cepa

Una vez realizada la identificación a nivel de especie, se procedió a la caracterización a nivel de cepa mediante la técnica de análisis de restricción del DNA mitocondrial con objeto de determinar, en primer lugar, si en cada uno de los preparados comerciales estaba presente una única cepa y, en segundo lugar, para estudiar si existían preparados comercializados con distinto nombre conteniendo la misma cepa.

Dado que varios estudios concluyeron 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), la comparación entre preparados comerciales se completó mediante la aplicación de la técnica basada en la amplificación por PCR de secuencias δ de genoma. El alto poder de discriminación resultante de la combinación de ambas técnicas se ha mostrado en trabajos previos de caracterización de cepas vínicas comerciales (Fernández-Espinar y col., 2001) y aislados clínicos de *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2004 y 2006a).

3.1. Análisis de restricción del DNA mitocondrial

El análisis de restricción del DNA mitocondrial con la endonucleasa *Hinfl* realizado de 6 colonias aisladas al azar a partir de cada uno de los 9 preparados comerciales seleccionados en el apartado 1, indicó la pureza de los mismos al mostrar un patrón de restricción único en cada caso.

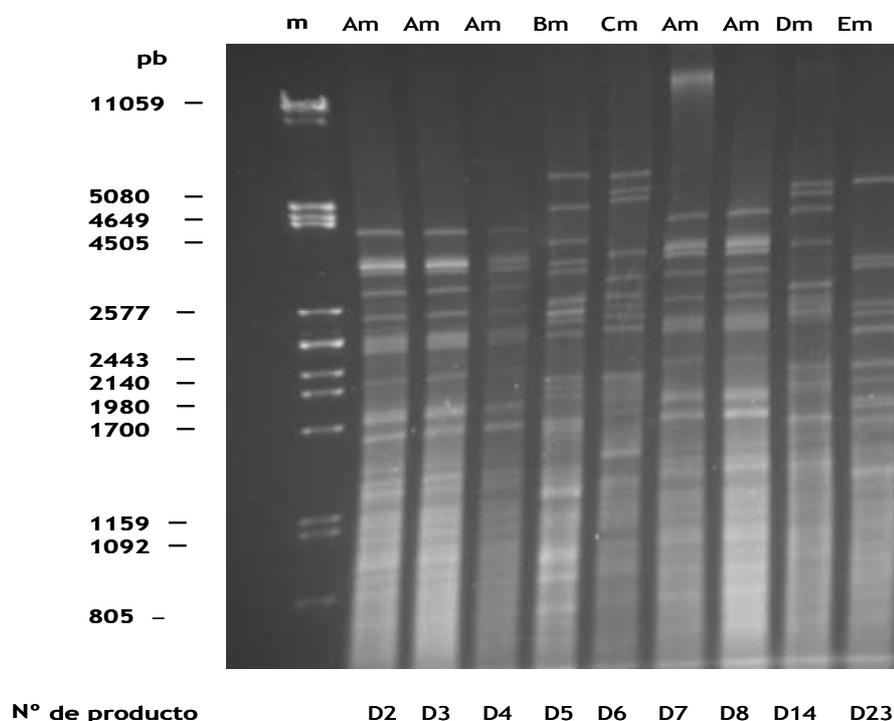


Figura 8. Análisis de restricción del DNA mitocondrial. Patrones de restricción obtenidos al digerir con *Hin*I el DNA mitocondrial de 9 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos comerciales. El marcador de peso molecular utilizado fue λ DNA digerido con *Pst*I (carrera m).

Quando se procedió a la comparación entre preparados comerciales, se observó un total de 5 patrones de restricción diferentes, como se muestra en la Figura 8. Estos datos se resumen en la Tabla 12, asignando una letra diferente a cada patrón obtenido. Cuatro patrones de restricción (B_m , C_m , D_m , E_m) contenían un único aislado, indicando que los mismos eran claramente distintos. Entre estos aislados se encontraba D5, por lo que se puede descartar el uso de la cepa bioterapéutica *S.*

cerevisiae var. boulardii en la elaboración de los productos dietéticos analizados. El patrón denominado A_m fue el único en comprender más de un aislado, en concreto los designados como D2, D3, D4, D7 y D8. Por tanto, las levaduras aisladas de varios preparados dietéticos mostraron el mismo perfil de restricción, a pesar de pertenecer a casas comerciales diferentes.

3.2. Amplificación por PCR de elementos delta

Como se ha comentado anteriormente, la comparación entre los 9 preparados comerciales seleccionados en el apartado 1 se completó mediante la aplicación de una segunda técnica molecular con alto poder de discriminación. Para ello, se llevó a cabo la amplificación por PCR de elementos δ de 1 colonia aislada al azar a partir de cada uno de los preparados.

Como resultado, se obtuvieron un total de 6 patrones de amplificación, tal como se muestra en la Figura 9; a cada patrón obtenido le fue asignada una letra diferente (Tabla 12). Cinco patrones de amplificación (A_δ , C_δ , D_δ , E_δ , F_δ) contenían un único aislado, mientras que el patrón denominado B_δ fue el único que comprendía más de un aislado, en concreto los designados como D3, D4, D7 y D8.

3.3. Combinación de ambas técnicas

Como puede observarse en la Tabla 12, la amplificación por PCR de elementos δ fue la técnica que dio lugar a un mayor nivel de discriminación al diferenciar la cepa D2 del resto de cepas con mismo patrón de restricción de DNA mitocondrial (A_m).

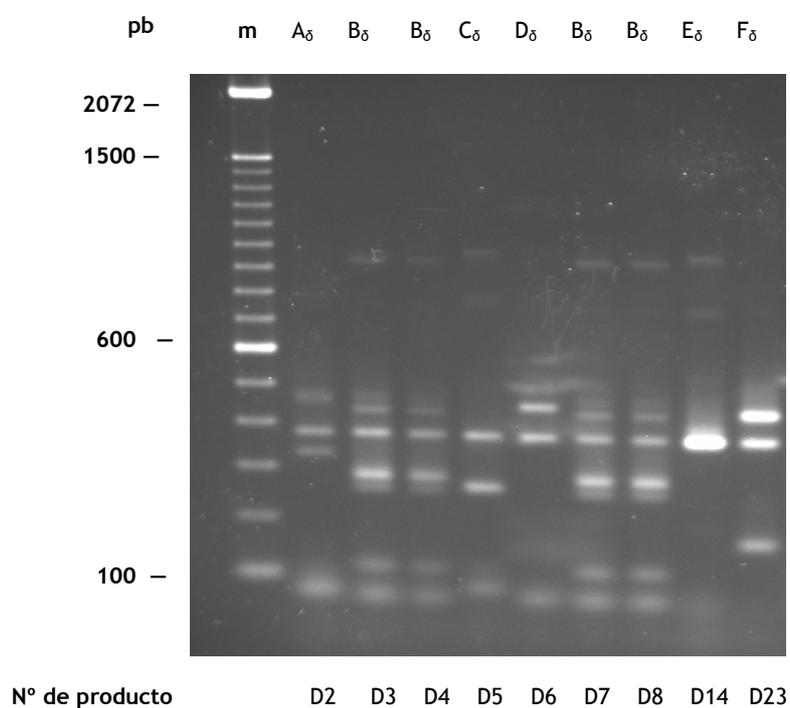


Figura 9. Amplificación de elementos delta. Patrones obtenidos al amplificar el DNA de 9 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos comerciales mediante la técnica de amplificación por PCR de secuencias δ . El marcador de peso molecular utilizado fue “100 bp DNA ladder” de Gibco BRL (carrera m).

Por ello, se decidió combinar los resultados de ambas técnicas obteniéndose 5 patrones compuestos que incluían un único aislado y 1 patrón compuesto (A_m/B_δ) formado por 4 aislados. Esta clasificación aparece en la Tabla 12, donde se asigna una letra distinta para cada patrón único de restricción de mtDNA con *Hinfl* y de amplificación de elementos δ .

Tabla 12. Patrones obtenidos al aplicar las técnicas de análisis de restricción del DNA mitocondrial y la amplificación por PCR de secuencias δ , así como los patrones compuestos obtenidos como resultado de la combinación de ambas técnicas

Patrón mt DNA	Patrón δ -PCR	Patrón compuesto	Nº de Producto
A _m	A _{δ}	A _m /A _{δ}	D2
A _m	B _{δ}	A _m /B _{δ}	D3,D4,D7,D8
B _m	C _{δ}	B _m /C _{δ}	D5
C _m	D _{δ}	C _m /D _{δ}	D6
D _m	E _{δ}	D _m /E _{δ}	D14
E _m	F _{δ}	E _m /F _{δ}	D23

4. Discusión

La levadura saprofítica *S. cerevisiae* está ampliamente distribuida en la naturaleza. Aunque es una levadura muy utilizada industrialmente para la elaboración del vino, la cerveza y el pan, puede encontrarse colonizando el tracto gastrointestinal y genital de algunos humanos. El número de casos de infecciones por este organismo ha ido aumentando significativamente en los últimos años, por lo que está empezando a considerarse como un patógeno oportunista (Murphy y Kavanagh, 1999). Habitualmente, su presencia en fluidos y tejidos estériles suele producirse en pacientes con alguna alteración de las barreras locales (Eng y col., 1984; Cimolai y col., 1987; Sethi y Mandell, 1988; Manzella y col., 1989; Tawfik y col., 1989; Aucott y col., 1990; Nielsen y col., 1990), lo que indica la capacidad que posee esta levadura de diseminar e invadir, además de proliferar y persistir *in vivo*, las cuales son características necesarias para la virulencia.

Teniendo en cuenta por una parte estas observaciones y la ocurrencia de infecciones resultantes de la ingesta de células vivas de *S. cerevisiae* (Jensen y Smith, 1976), y por otra parte, el reciente incremento en el consumo de preparados dietéticos a base de levadura de cerveza como complemento de las populares dietas saludables, pareció interesante plantear el presente trabajo con objeto de valorar hasta qué punto el consumo de estos suplementos dietéticos puede suponer un riesgo para la salud. Para ello se adquirió una representación de productos dietéticos presentes actualmente en el mercado para proceder al aislamiento de las levaduras incluidas en los mismos. Así, se obtuvieron desde preparados de levadura de cerveza presentada en cápsulas, en comprimidos o en copos, hasta cervezas biológicas o productos enriquecidos con levadura.

Se observó que en la mayoría de estos productos (14 de 23), no hubo crecimiento de levadura, aunque sí se detectó la presencia de bacterias vivas. Este dato, por una parte indica que si la levadura realmente estaba presente, no fue posible de revivirla, por tanto, estos productos no presentaban ningún tipo de riesgo para el que las ingiere al tratarse de células muertas. Por otra parte, el crecimiento bacteriano podría estar indicando una falta de esterilidad o de condiciones higiénicas en la elaboración y el manejo del producto, ya que en ningún momento se indica su presencia entre los componentes; por otra parte, en los dos productos (D14 y D17) sí se indicaba en su composición la presencia de bacterias, pero no se observó crecimiento bacteriano. La identificación de las bacterias aisladas no se llevó a cabo por no ser un objetivo de este estudio.

El aislamiento de levaduras fue posible en el resto de productos comerciales obteniéndose 9 aislados. Para confirmar la adscripción de los 9 aislados a la especie *S. cerevisiae*, tal y como se especificaba en las

etiquetas de los mismos, se utilizó la técnica de análisis de restricción del gen ribosomal 5.8S y de los 2 espaciadores internos transcritos flanqueantes, ITS1 e ITS2. Esta técnica molecular es muy útil para la discriminación a nivel de especie (Esteve-Zarzoso y col., 1999) y ha sido aplicada con éxito para fines médicos en la diferenciación de especies de *Saccharomyces* genotípicamente diferentes (McCullough y col., 1998a) y para confirmar la identidad de aislados clínicos de *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2004).

Los resultados mostraron que 8 de los aislados pertenecían a la especie *S. cerevisiae*, tal y como se especifica en las correspondientes etiquetas informativas, y sólo 1 de ellos (D6) perteneció a otra especie distinta, en concreto a *S. kudriavzevii*. Esta especie está muy próxima filogenéticamente a *S. cerevisiae* y ambas forman parte del *Saccharomyces sensu stricto* el cual incluye tanto especies utilizadas desde el punto de vista tecnológico y agroalimentario (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *Saccharomyces pastorianus*) como especies aisladas de ambientes naturales (*Saccharomyces paradoxus*, *S. kudriavzevii*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces arboricolus* y *Saccharomyces eubayanus*) (Kurtzman y col., 2011; Libkind y col., 2011).

Recientemente, cepas vínicas anteriormente identificadas como *S. cerevisiae* se han descrito como híbridos entre especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* (González y col., 2006a). Como se comenta más adelante, este mecanismo parece proporcionar unas ventajas fermentativas a estas cepas, por lo que se consideró interesante determinar si alguna de las cepas de levadura aisladas a partir de productos dietéticos y enriquecidos con *S. cerevisiae* eran híbridos interespecíficos y estudiar si este hecho les confiere habilidades infectivas o todo lo contrario. Como resultado, entre los aislados de los

suplementos dietéticos se encontraron dos híbridos. Uno de ellos, en concreto el aislado D6, previamente identificado como *S. kudriavzevii*, correspondió a un híbrido entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*. El producto comercial del cual se aisló esta cepa consistía en levadura de cerveza líquida con un grado alcohólico de 5.5°. La especie *S. kudriavzevii* es difícil de encontrar en fermentaciones y sólo ha sido aislada en ambientes naturales de Japón y en robles de Portugal y España (Naumov y col., 2000; Sampaio y Gonçalves, 2008; Lopes y col., 2010), por eso nos pareció extraño encontrarla en un preparado dietético y descubrir más tarde que además se trataba de un híbrido. Sin embargo, se han descrito híbridos procedentes de fermentaciones vínicas entre estas dos especies (Bradbury y col., 2006; González y col., 2006a; Lopandíc y col., 2007). Además, en nuestro grupo se han descrito, por primera vez, híbridos *S. cerevisiae/S. kudriavzevii* procedentes de fermentaciones cerveceras (González y col., 2008). El segundo híbrido identificado en el presente estudio, D23, estaba formado por las especies *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, aunque se había identificado como *S. cerevisiae* en el análisis de restricción de la región 5.8S-ITS. Esta clase de híbridos suelen encontrarse en las fermentaciones cerveceras (Nguyen y col., 2000; Casaregola y col., 2001) al igual que D23 que procede de una cerveza biológica (ver Tabla 10). También se ha aislado un híbrido natural entre estas dos especies en fermentaciones vínicas (Masneuf y col., 1998; González y col., 2006a).

El hecho de la falta de correspondencia entre la asignación real de estos 2 aislados y la que aparece especificada en el producto es, seguramente, un hecho fortuito debido a que fueron originariamente identificados usando métodos no apropiados para la identificación de híbridos. El uso de nomenclaturas incorrectas al nivel detectado no tiene implicaciones importantes para los consumidores, puesto que se trata en

cualquier caso de levaduras muy próximas a *S. cerevisiae*, y por tanto, con las mismas características nutritivas y biofuncionales que ésta. Sin embargo, sí tiene interés desde un punto de vista científico, ya que cabría plantearse si el carácter híbrido afecta a la virulencia de dichas cepas. En el caso del género *Saccharomyces*, la formación de híbridos interespecíficos constituye un mecanismo observado en su adaptación a procesos industriales (de Barros Lopes y col., 2002) y se ha descrito que algunos aislados clínicos de *Saccharomyces* identificados como híbridos interespecíficos presentaron una mejor adaptación fenotípica a ciertos nichos ecológicos (Clemons y col., 1997; McCullough y col., 1998c). Por tanto, no se puede descartar que como resultado de la hibridación aparezcan nuevos genotipos con virulencia alterada, como se ha descrito para otras especies de levadura (Boekhout y col., 2001). Además, se ha demostrado que cepas híbridas de *S. cerevisiae*-*S. bayanus* y *S. cerevisiae*-*S. kudriavzevii* son capaces de crecer a bajas temperaturas (Belloch y col., 2008), y resistir al estrés provocado durante las fermentaciones industriales (Querol y Bond, 2009). Cabe pensar, por tanto, que esta capacidad de crecimiento a temperaturas bajas dificulte la supervivencia en un hospedador; en este sentido, el uso de cepas híbridas en la preparación de suplementos dietéticos sería garantía de seguridad. Esta hipótesis será valorada en el capítulo siguiente donde se estudiará la virulencia de estos aislados.

Por otra parte, se abordó la caracterización a nivel de cepa para lo cual se recurrió a técnicas moleculares conocidas por su alto poder de discriminación. En el caso de *S. cerevisiae*, existen trabajos previos referentes a la caracterización de cepas vínicas (Querol y col., 1992 a y b; Querol y col., 1994; Martínez y col., 1995; Guillamón y col., 1996; Ibeas y col., 1997; Fernández-Espinar y col., 2001; González y col., 2006b), de cepas cerveceras (Aigle y col., 1984; Lee y Knudsen, 1985) y de aislados

clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* (McCullough y col., 1998c; Perapoch y col., 2000; Lherm y col., 2002; de Llanos y col., 2004) que han demostrado que el análisis de restricción del DNA mitocondrial y la amplificación por PCR de elementos delta son herramientas adecuadas para este propósito. El alto poder discriminatorio de estas técnicas ha permitido estudiar el origen de colonización de aislados clínicos de *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2004 y 2006a).

Cuando la técnica de análisis de restricción del DNA mitocondrial se aplicó para la caracterización de varios aislados de cada uno de los productos comerciales, se observó que todos ellos contenían una única cepa de *S. cerevisiae* confirmando, por tanto, la pureza de los mismos. Por otra parte, cuando se abordó el estudio comparativo entre los 9 preparados comerciales se observó que la combinación de dos técnicas moleculares (mtDNA y δ -PCR) fue necesaria para la correcta diferenciación de los mismos. Se obtuvieron 6 patrones compuestos, por lo que se concluye que de los 9 aislados, sólo 6 se pueden considerar distintos. 5 de los patrones compuestos comprendían un único aislado, mientras que uno de ellos (A_m/B_δ) era compartido por 4 aislados de suplementos dietéticos. Basándose en estos resultados, parece evidente que existen preparados dietéticos encontrados en el mercado bajo nombres diferentes y pertenecientes a casas comerciales distintas y que, sin embargo, contienen la misma cepa de levadura.

Al margen de todas estas observaciones, el estudio de caracterización permitió seleccionar los aislados D2, D6, D14 y D23, así como el aislado D4 (representante del grupo de aislados que compartieron el patrón compuesto A_m/B_δ), para abordar los ensayos de virulencia *in vitro* e *in vivo*, objeto del siguiente capítulo. Estos estudios están encaminados a valorar el posible riesgo que se podría derivar de la ingesta de los citados aislados. Además, en el estudio *in vitro* se incluyó

el aislado D5, obtenido a partir del preparado comercial Ultralevura[®], porque sus rasgos fenotípicos de virulencia fueron establecidos previamente en nuestro laboratorio usando las mismas condiciones de trabajo que en el presente estudio (de Llanos y col., 2006b). Por ello, se consideró que D5 podría ser útil como control interno.

Capítulo 2

Estudio del potencial patógeno de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de productos dietéticos

La revisión de la literatura médica indica una creciente incidencia de infecciones asociadas con *Saccharomyces cerevisiae* como agente causal (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005). Estas infecciones se han descrito principalmente en hospedadores inmunodeprimidos y enfermos críticos, sin embargo, se ha mostrado que bastantes aislados clínicos y algunos no clínicos tienen características propias que los hacen más virulentos, independientemente del estado del sistema inmune del hospedador (McCusker y col., 1994b; Byron y col., 1995; Wheeler y col., 2003). El principal factor de riesgo en las infecciones por *S. cerevisiae* lo constituye la ingesta de la misma en forma de células vivas. Dicha ingesta puede tener lugar principalmente a través de productos fermentados, alimentos alterados, suplementos dietéticos o probióticos. Hay que prestar especial atención a la ingesta de suplementos dietéticos y probióticos, ya que son ingeridos en altas dosis y de forma continuada durante largos períodos de tiempo. En este sentido, es especialmente importante valorar si las cepas utilizadas en la elaboración de estos productos, poseen atributos virulentos propios que pongan en duda su inocuidad, sobre todo pensando en individuos pertenecientes a grupos de riesgo, y que por tanto, justifiquen el abordaje *in vivo* de su virulencia como veremos en el presente capítulo.

1. Estudio de rasgos fenotípicos asociados con virulencia

Se han descrito una serie rasgos fenotípicos que están típicamente presentes en levaduras patógenas como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y que se cree están relacionados con la virulencia de las mismas (Yang, 2003). Estudios *in vitro* apuntan a que algunos de estos rasgos de virulencia también se expresan en muchos aislados clínicos de

S. cerevisiae, lo que podría explicar la presencia de los mismos en humanos (McKusker y col., 1994b). Cabe destacar que algunos aislados no clínicos también poseen parte de estas características (de Llanos y col., 2006b), por lo que resulta de gran interés estudiar en este sentido otras cepas no clínicas, haciendo especial hincapié en cepas que van a ser ingeridas, como es el caso de los aislados del presente trabajo.

En el capítulo anterior, se llevó a cabo la identificación molecular de 9 cepas de levadura aisladas de productos dietéticos comerciales. Siete de los aislados pertenecieron a la especie *S. cerevisiae* y 2 resultaron ser híbridos interespecíficos del complejo *Saccharomyces sensu stricto*. Por otro lado, mediante la combinación de dos técnicas moleculares con alto poder de discriminación a nivel de cepa, se concluyó que 4 de los aislados (D2, D6, D14 y D23) eran cepas claramente diferentes y que un grupo de 4 aislados (D3, D4, D7 y D8) resultaron indistinguibles. En base a estos resultados y para abordar los ensayos *in vitro* de virulencia objeto del presente capítulo, se seleccionaron los aislados D2, D6, D14 y D23 y un representante del grupo de aislados indistinguibles (D4).

Por otra parte, también se aisló una cepa de *S. cerevisiae* var. *boulardii* (denominada D5 en este estudio) a partir de un lote comercial de Ultralevura®. Confirmada su identidad y su diferenciación del resto de aislados, se utilizó como control en el estudio *in vitro* de virulencia, por tratarse de una cepa con positividad para la mayoría de los rasgos fenotípicos que nos interesaban (de Llanos y col., 2006b). Con idea de comparar nuestras cepas con controles negativos, se incluyó la cepa vínica *S. cerevisiae* CECT 10.431 que no manifestó habilidades virulentas *in vitro* (de Llanos y col., 2006b). Además, existe correlación entre los rasgos fenotípicos y la virulencia *in vivo* tanto en el caso de D5 como en el de la cepa CECT 10.431 (de Llanos y col., 2011), por lo que constituyen

buenos modelos de comparación. Finalmente, se incluyó una cepa de laboratorio (W303), cuya virulencia no había sido previamente estudiada.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los rasgos estudiados: crecimiento a altas temperaturas, secreción extracelular de hidrolasas, crecimiento pseudofilamentoso y crecimiento invasivo.

1.1. Crecimiento a altas temperaturas

La capacidad de crecimiento a altas temperaturas se seleccionó por su relación con el potencial patógeno de aislados clínicos de *S. cerevisiae* (Clemons y col., 1994). El estudio de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas se realizó mediante la siembra por goteo de 5 µl de diluciones determinadas para cada temperatura sobre placas de GPYA que se incubaron a temperaturas de 28, 37, 39 y 42°C, tal y como se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Como control positivo de crecimiento se eligió la temperatura de 28°C, ya que se considera la temperatura óptima de crecimiento para *S. cerevisiae*. La temperatura de 37°C se seleccionó por ser la temperatura óptima del cuerpo humano y la temperatura de 39°C se eligió por observarse normalmente en pacientes febriles; ambas temperaturas se han usado en la caracterización de otras levaduras patógenas como *C. albicans* (Sarachek y col., 1981) y *C. neoformans* (Kwon-Chung y col., 1982). Por otro lado, la temperatura de 42°C se evaluó, ya que es una característica asociada al origen clínico de los aislados, y además, está relacionada con los aislados virulentos de *S. cerevisiae* (McCusker y col., 1994 a y b; de Llanos y col., 2006b).

En la Figura 10 se muestra el crecimiento observado en las placas de GPYA a 37, 39 y 42°C. Excepto los aislados híbridos (D6 y D23), que

sólo fueron capaces de crecer a la temperatura control de 28°C, el resto de aislados (D2, D4 y D14) tuvieron el mismo comportamiento que la cepa control D5, ya que fueron capaces de crecer a 37 y 39°C hasta prácticamente la última dilución. Además, estos 3 aislados pudieron crecer a 42°C, aunque ya en forma de colonias pequeñas en la dilución de 5×10^{-1} . Por otro lado, la cepa de laboratorio presentó el mismo tipo de crecimiento que la cepa control de baja virulencia incluida en este ensayo (CECT 10.431), ya que a excepción de su crecimiento a la temperatura control de 28°C, solamente fue capaz de crecer a la temperatura de 37°C.

En la Figura 10 y en la Tabla 14 se representa el resultado observado codificado, de forma que se consideró como crecimiento negativo (-) la total ausencia del mismo, como resultado positivo (+) crecimiento en la siembra directa y primera dilución o de forma débil a diluciones mayores, y crecimiento positivo (++) cuando el crecimiento fue denso en prácticamente todas las diluciones.

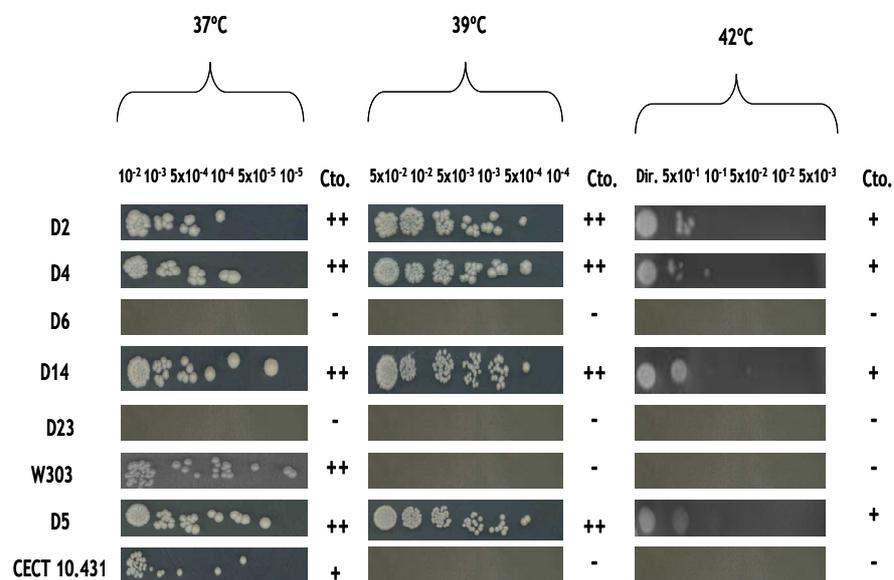


Figura 10. Crecimiento observado a 37, 39 y 42°C. A partir del cultivo directo de una O.D. de 0.3-0.4 se realizaron diluciones seriadas que fueron las mismas para las tres temperaturas. Para cada caso, se muestra únicamente el rango de diluciones en el cual las diferencias de crecimiento entre las cepas son apreciables (37°C: 10⁻²-10⁻⁵; 39°C: 5x10⁻²-10⁻⁴; 42°C: directa-5x10⁻³). Los signos representan la codificación del crecimiento observado para cada una de las temperaturas en cada una de las cepas.

1.2. Secreción extracelular de proteasas y fosfolipasas

La función de actividades enzimáticas como proteasas y fosfolipasas es la de iniciar la invasión a través de los tejidos del hospedador mediante la destrucción de lípidos y proteínas para atravesar así las membranas, y se consideran propiedades muy importantes en la patogénesis de levaduras patógenas oportunistas, como *C. albicans*

(Kantarcioglu y Yücel, 2002) y *C. neoformans* (Vidotto y col., 2000). Estudios previos han demostrado que existe relación entre la habilidad 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; McCusker y col., 1994b). Por otra parte, aunque se sabe que la levadura *S. cerevisiae* posee actividad fosfolipasa (Witt y col., 1982; Witt y col., 1984 a y b; Lee y col., 1994), no se había descrito nada hasta el momento respecto a la relación entre la secreción de fosfolipasas y el origen clínico de los aislados de *S. cerevisiae*. Sin embargo, un trabajo de nuestro grupo consideró la actividad fosfolipasa como un rasgo fenotípico de virulencia que marcó la diferencia entre los aislados clínicos potencialmente virulentos y las cepas industriales (de Llanos y col., 2006b). Por todo lo expuesto, se consideró interesante incluir la secreción de ambas actividades hidrolasas en el estudio de rasgos fenotípicos de nuestros aislados de suplementos dietéticos. Ambas actividades se determinaron usando métodos cualitativos de crecimiento en placa específicos para cada una de ellas mediante el parámetro Pz (descrito en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos). Los valores de Pz obtenidos se codificaron como negativo (-), bajo (+), moderado (++) o alto (+++), teniendo en cuenta que valores de Pz cercanos a 1 indican actividad baja y cuanto más cercanos a 0 indican una actividad mayor. Este criterio se estableció siguiendo los rangos propuestos por otros autores para diferentes especies del género *Candida* (Kantarcioglu y Yücel, 2002) y *C. neoformans* (Vidotto y col., 2000).

1.2.1. Actividad proteasa

Esta actividad se determinó mediante el empleo de un medio de cultivo en placas de agar que contiene seroalbúmina bovina (BSA). La

digestión del BSA da lugar a un halo de precipitado blanco alrededor de la colonia como consecuencia de la actividad proteolítica durante 4 días a 37°C.

No pudo valorarse en el caso de los 2 aislados híbridos (D6 y D23), ya que como se ha comentado en el apartado 1.1., ambos aislados no fueron capaces de crecer a 37°C (temperatura de trabajo para la determinación de la actividad proteasa). El valor de Pz observado para el resto de los aislados se muestra en la Tabla 13. Los aislados D4 y D14 presentaron una actividad alta, al igual que la cepa control positivo (D5), con valores muy similares entre ellos (0.49 y 0.44, respectivamente); por otro lado, el aislado D2 mostró una actividad moderada, con valor de 0.53; por último, la cepa de laboratorio W303 presentó un valor de Pz alto (0.77) que corresponde a una actividad baja. La cepa vínica CECT 10.431 (cepa control de baja virulencia) mostró una actividad proteasa nula. En la Figura 11 (A) se muestra, a modo de ejemplo, el halo de opacidad obtenido en el caso de los aislados D2 y D5.

Tabla 13. Resultados observados para las actividades proteasa y fosfolipasa

Nº Aislado	Actividad enzimática			
	Proteasa		Fosfolipasa	
	Pz	Nivel de actividad	Pz	Nivel de actividad
Aislados dietéticos				
D2	0.53	Moderada (++)	0.76	Baja (+)
D4	0.49	Alta (+++)	0.83	Baja (+)
D6		n.d.	0.90	Baja (+)
D14	0.44	Alta (+++)	0.60	Moderada (++)
D23		n.d.	0.85	Baja (+)
Cepa de laboratorio				
W303	0.77	Baja (+)	1	Negativa (-)

N° Aislado	Actividad enzimática			
	Proteasa		Fosfolipasa	
	Pz	Nivel de actividad	Pz	Nivel de actividad
Cepas control				
D5	0.35	Alta (+++)	0.76	Baja (+)
CECT10.431	1	Negativa (-)	1	Negativa (-)

n.d.: no determinado; Pz= 1 (Actividad negativa); $0.99 \geq Pz \geq 0.70$ (Actividad baja); $0.69 \geq Pz \geq 0.50$ (Actividad moderada); $Pz \leq 0.50$ (Actividad alta)

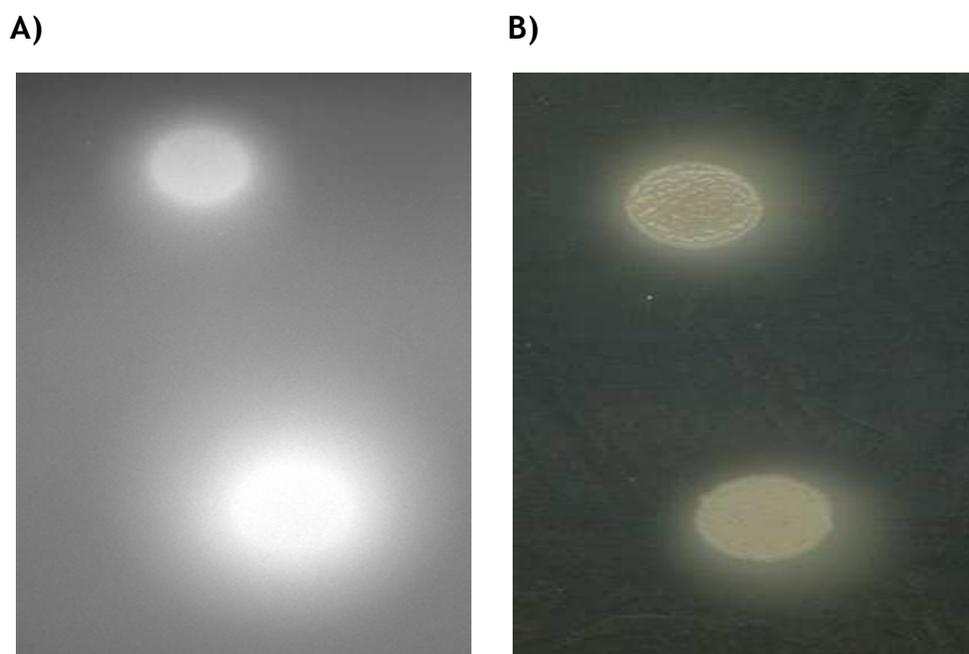


Figura 11. Ejemplos del crecimiento observado de los aislados en placas para la determinación de la actividad proteasa (A) y fosfolipasa (B). En (A) se muestran los halos de opacidad de los aislados D2 (parte superior) y D5 (parte inferior). En (B) se indican los halos de opacidad pertenecientes a la actividad fosfolipasa de D5 (arriba) y D14 (abajo).

1.2.2. Actividad fosfolipasa

La actividad fosfolipasa se determinó en placas de medio con yema de huevo (Price y col., 1982). Este medio es rico en fosfolípidos, como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. Se consideró resultado positivo la aparición de una zona de precipitación bien definida, blanca y densa alrededor de la colonia.

Este halo de precipitación corresponde 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. Para poder determinar el valor de Pz, estas placas se incubaron durante 10 días a 30°C. La mayoría de los aislados, incluidos los híbridos y la cepa control D5, presentaron una actividad fosfolipasa baja, siendo el aislado D14 el único con una actividad moderada (Tabla 13). La cepa de laboratorio W303 y la cepa control CECT 10.431 mostraron una actividad nula. A la vista de los resultados, no parece que exista relación entre la producción de actividad fosfolipasa con el nivel de virulencia, ya que las cepas usadas como control positivo y negativo mostraron un comportamiento similar. En la Figura 11 (B) se muestran, a modo de ejemplo, los halos de opacidad para los aislados D5 y D14.

1.3. Crecimiento pseudofilamentoso

Una de las principales características de los hongos patogénicos es la capacidad de filamentar bajo ciertas condiciones ambientales y se asocia con su poder invasivo, ya que esta característica les facilita la penetración en los tejidos del hospedador. *S. cerevisiae* no forma hifas, pero presenta un cambio dimórfico (de célula ovoide a pseudohifa) en respuesta a una limitación nutricional (Gimeno y col., 1992). Murphy y

Kavanagh (1999) describieron que los aislados clínicos mostraban cierta capacidad de pseudofilamentar bajo ciertas condiciones de limitación de nitrógeno, dando lugar a la penetración e invasión del medio sólido.

Para determinar esta actividad se usó el medio SLAD (apartado 5.3 de Materiales y Métodos), caracterizado por tener bajos niveles de nitrógeno. Tras 4 días de incubación a 30°C, se observaron diferentes grados de pseudofilamentación que se definieron según la ausencia o presencia de este tipo de crecimiento, de su morfología y de la longitud de las pseudohifas desarrolladas (Figura 12). Como puede observarse, el aislado D2 presentó un crecimiento pseudofilamentoso positivo, el mismo que mostró la cepa control D5, mientras que los aislados D4 y D14 mostraron un mayor grado de pseudofilamentación por presentar un mayor número y longitud de los filamentos. Por tanto, estas cepas son susceptibles de poder causar una infección teniendo en cuenta datos previos de nuestro grupo, que indican que entre un grupo de cepas clínicas, comerciales e industriales, aquellas con capacidad para pseudofilamentar *in vitro*, mostraron la habilidad de diseminar, colonizar y persistir en cerebro y riñones de ratones BALB/c, y en algunos casos incluso se observó mortalidad (de Llanos y col., 2011). Los 2 aislados híbridos (D6 y D23) y la cepa de laboratorio W303 no exhibieron crecimiento pseudofilamentoso comportándose igual que la cepa utilizada como control negativo (CECT 10.431).



Crecimiento pseudohifal negativo (-): ausencia de pseudohifas en la colonia. Corresponde al fenotipo observado para los aislados **D6** y **D23**, la cepa de laboratorio **W303** y en la cepa control **CECT 10.431**.



Crecimiento pseudohifal positivo (+): presencia de pseudohifas en la colonia. Corresponde al grado de pseudofilamentación observado en los aislados **D2** y en la cepa control **D5**.



Crecimiento pseudohifal máximo (++): presencia de pseudohifas, pero éstas se encuentran en mayor número y longitud que en el crecimiento pseudohifal positivo. Este tipo de crecimiento se observó en los aislados **D4** y **D14**.

Figura 12. Grados de pseudofilamentación observados. Las imágenes se tomaron con una cámara Leica asociada al microscopio Leica HPS60 a 4X aumentos.

1.4. Crecimiento invasivo

Algunos aislados de *S. cerevisiae* son capaces de penetrar el agar, produciendo filamentos que son capaces de resistir un lavado vigoroso de la superficie del medio sólido de crecimiento; dicha característica se conoce como crecimiento invasivo (Gancedo, 2001).

Se determinaron tres grados de crecimiento invasivo (Figura 13) en base al crecimiento residual que permaneció tras lavar los cultivos crecidos sobre placas de GPYA durante 5 días a 28°C (apartado 5.4 de Material y Métodos). Se encontraron dos aislados (**D4** y **D23**), además de la cepa de laboratorio y la cepa control **D5**, cuyo crecimiento fue eliminado por completo tras el lavado (crecimiento invasivo negativo: -). Por otra parte, los aislados **D2** y **D14** se mantuvieron anclados al agar formando

una fina capa de levadura tras ser eliminada la parte superficial del cultivo en la placa (crecimiento invasivo intermedio: \pm); este mismo crecimiento fue mostrado también por la cepa control CECT 10.431. Únicamente el aislado D6 mostró un crecimiento invasivo positivo (+), quedando prácticamente todo el cultivo sujeto a la superficie del agar.

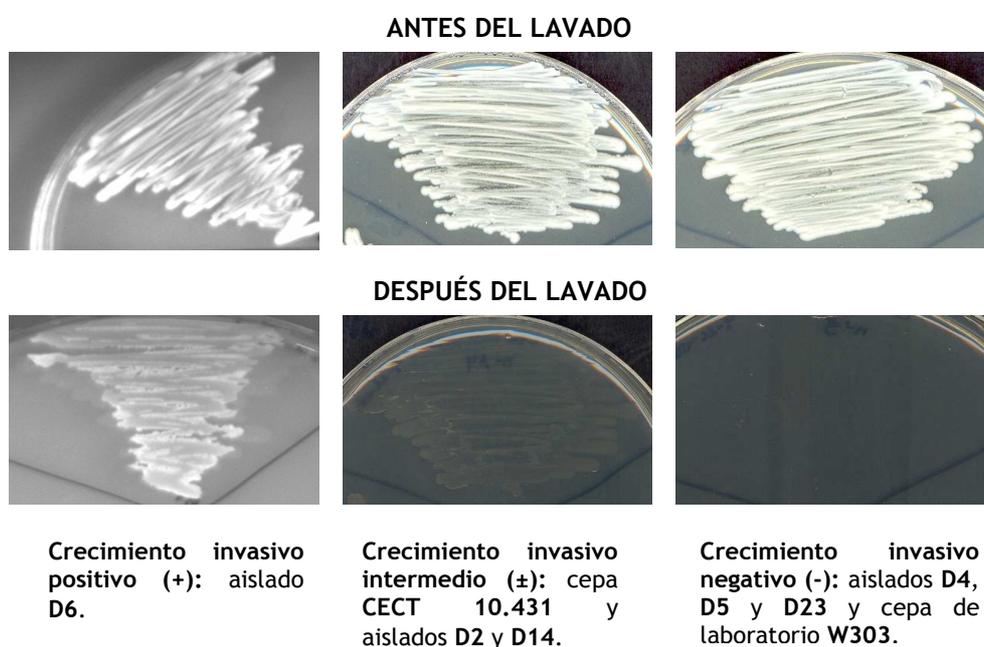


Figura 13. Ejemplos de crecimiento invasivo en los aislados de productos dietéticos. Se determinaron tres grados de crecimiento en función del crecimiento residual que permaneció tras el lavado.

1.5. Comparación de los resultados obtenidos para los rasgos fenotípicos de virulencia analizados en cepas aisladas de productos dietéticos

En este estudio, los rasgos fenotípicos estudiados fueron capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas (28, 37, 39 y 42°C), secreción de enzimas hidrolíticas (proteasas y fosfolipasas), crecimiento pseudofilamentoso en condiciones limitantes de nitrógeno (medio SLAD) y crecimiento invasivo. En la Tabla 14, se resumen los resultados obtenidos para los aislados de nuestro estudio y se compararon con los existentes en la bibliografía para un aislado clínico (YJM128) considerado virulento (Clemons y col., 1994; de Llanos y col., 2006b). Se observan claramente dos grupos de aislados; por una parte, tenemos los aislados D6 y D23 que mostraron negatividad para la mayoría de los rasgos estudiados, al igual que el control negativo (CECT 10.431) cuya avirulencia *in vivo* se ha mostrado en estudios previos (de Llanos y col., 2011). Por otra parte, los aislados D2, D4 y D14 presentaron rasgos fenotípicos de nivel moderado o alto claramente diferenciables del control negativo (CECT 10.431) y se comportaron de forma similar a las cepas D5 y YJM128 caracterizadas *in vitro* como cepas con virulencia intermedia o alta (Clemons y col., 1994; de Llanos y col., 2006b) y cuyos rasgos fenotípicos se han podido además asociar con su patogenicidad *in vivo* (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2011). Concretamente, D2, D4 y D14 fueron capaces de crecer a 42°C, de pseudofilamentar y secretar proteasas y fosfolipasas. La única diferencia entre ellas fue la capacidad de crecimiento invasivo que fue negativa en D4. Estos datos sugieren que D2, D4 y D14 poseen características propias que les podrían conferir una capacidad infectiva independientemente del sistema inmune del hospedador.

Como era esperable, la cepa de laboratorio W303 mostró un comportamiento similar al de la cepa usada como control negativo, es decir, negatividad para casi todos los rasgos fenotípicos de virulencia.

Tabla 14. Comparación de los rasgos fenotípicos de virulencia obtenidos para los aislados procedentes de productos dietéticos

Nº aislado	Crecimiento a				Crecimiento pseudofilamentoso	Crecimiento invasivo	Actividad enzimática	
	28°C	37°C	39°C	42°C			Proteasa	Fosfolipasa
Aislados dietéticos								
D2	++	++	++	+	+	±	++	+
D4	++	++	++	+	++	-	+++	+
D6	++	-	-	-	-	+	n.d.	+
D14	++	++	++	+	++	±	+++	++
D23	++	-	-	-	-	-	n.d.	+
Cepa de laboratorio								
W303	++	++	-	-	-	-	+	-
Cepas control								
D5	++	++	++	+	+	-	+++	+
CECT 10.431	++	+	-	-	-	±	-	-
YJM128 ^(a)	++	++	++	++	++	+	++	-

^{a)} Datos publicados previamente por McCusker y col., (1994b) y de Llanos y col., (2006b).
Crecimiento a diferentes temperaturas: (+), crecimiento al menos en la siembra directa y primera dilución o en todas las diluciones, pero con crecimiento poco denso; (++) crecimiento denso en prácticamente todas las diluciones; (-) ausencia de crecimiento.
Crecimiento pseudofilamentoso: (+), presencia de pseudohifas en la colonia; (++) presencia de pseudohifas en mayor número y longitud; (-), ausencia de pseudohifas.
Crecimiento invasivo: (+), todo el cultivo queda sujeto a la superficie del agar tras el lavado; (±) se mantiene una fina capa de levadura tras el lavado; (-), ausencia de levadura tras el lavado.
Actividades enzimáticas: (+++), actividad alta; (++) actividad moderada; (+) actividad baja; (-), actividad negativa.

2. Estudio *in vivo* de la patogenicidad en modelos murinos

El estudio *in vivo* del potencial patógeno de los aislados obtenidos de productos dietéticos, se llevó a cabo usando un modelo murino de infección sistémica con el objetivo de establecer la capacidad infectiva de los mismos, en base a su capacidad para invadir distintos órganos tras una inoculación intravenosa. Puesto que se trata de aislados que van a ser ingeridos en forma de células vivas, se planteó además, un estudio para valorar la capacidad por parte de alguno de los aislados para atravesar la mucosa intestinal y diseminarse sistémicamente mediante el uso de un modelo de infección gastrointestinal.

2.1. Modelo murino de infección sistémica

Dado que entre nuestros aislados encontramos un grupo de cepas con rasgos fenotípicos de virulencia (crecimiento a 42°C, pseudofilamentación y secreción de enzimas extracelulares), que han sido asociados con patogenicidad *in vivo* (McCusker y col., 1994b), se planteó la posibilidad de abordar un estudio *in vivo* mediante infección sistémica en modelo murino para comprobar si realmente estos aislados procedentes de productos dietéticos son potencialmente patógenos. Como modelo animal para llevar a cabo la infección sistémica, se emplearon ratones BALB/c. Esta especie de ratón había sido utilizada previamente por nuestro grupo de trabajo con buenos resultados para estudiar el potencial patógeno de aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2011).

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

El criterio de selección de las cepas ensayadas en este estudio se basó en los resultados obtenidos en el apartado anterior, en relación con los factores de virulencia. Se eligieron los aislados D2, D4 y D14 por poseer capacidad de crecimiento a altas temperaturas, secreción de proteasas y fosfolipasas y formación de pseudohifas (ver Tabla 14). Por otra parte, se consideró interesante determinar si existía correspondencia entre la ausencia de rasgos fenotípicos de virulencia y el nivel de patogenicidad *in vivo*, por lo que se decidió ensayar el aislado D23. Como control positivo, se incluyó la cepa YJM128 por su gran capacidad de colonización en un sistema murino inmunocompetente (Clemons y col., 1994) y como control negativo, la cepa vínica CECT 10.431 por su baja capacidad de colonización y proliferación tras su inoculación intravenosa en ratón (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011). Además, se ensayó la cepa de laboratorio W303 que había mostrado negatividad para los rasgos fenotípicos.

2.1.2. Infección sistémica de los aislados de *S. cerevisiae*

Tal y como se detalla en Materiales y Métodos, se usó como modelo de infección sistémica ratones inmunocompetentes de la variedad BALB/c. La infección se realizó inyectando en la vena lateral del ratón una dosis de 2×10^7 células de levadura en 0.2 ml.

Tras la infección, se determinó la supervivencia de cada uno de los ratones inoculados y se analizó el nivel de colonización de cada una de las cepas de levadura ensayadas; para ello, se midió la carga fúngica en cerebro y riñón a los 7, 15 y 30 días postinfección. El alojamiento se

expresó como el logaritmo en base 10 de la media del número de unidades formadoras de colonia por ratón.

La severidad de la infección fue evaluada, en primer lugar, teniendo en cuenta el porcentaje de mortalidad. Tres días después de la inoculación intravenosa, se observó que los ratones inoculados con las cepas D2, D4, D14, así como con el control positivo (YJM128), mostraron signos evidentes de infección, en concreto, pérdida de peso, encrespamiento del pelo que podría estar indicando un proceso febril y escasa movilidad. Una vez transcurridos los primeros 7 días, se observó una recuperación en la mayoría de los ratones afectados salvo en el 27.5% de los ratones inoculados con el aislado D14, donde la infección acabó con la muerte de los mismos. Como puede verse en la Tabla 15, las muertes se produjeron entre el segundo y cuarto día postinfección; el número de ratones muertos varió dependiendo del ensayo. Cabe resaltar que para el resto de aislados la mortalidad fue nula, siendo el aislado D14 el único que mostró cierta letalidad. Estos resultados se visualizan más claramente en las curvas de supervivencia para cada uno de los aislados (Figura 14).

Tabla 15. Relación del número de ratones muertos y día de la muerte en el aislado D14

1º ensayo			2º ensayo			3º ensayo	4º ensayo		
Muertos	Día	NM/TR ^a	Muertos	Día	NM/TR ^a	Muertos	Muertos	Día	NM/TR ^a
3	2	4/10	3	2	5/10	0	1	3	2/10
1	3		2	3			1	4	

^a NM/TR, N° de ratones muertos/total de ratones

La patogenicidad fue también evaluada mediante la determinación de los alojamientos de cada una de las cepas en cerebro y riñón a lo largo de los 30 días que duró el experimento. Para ello, se sacrificó un número variable de ratones (Tabla 16) que osciló dependiendo del aislado y del momento del sacrificio (7, 15 ó 30 días postinfección). Los datos de alojamientos obtenidos se compararon estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) usando el test LSD.

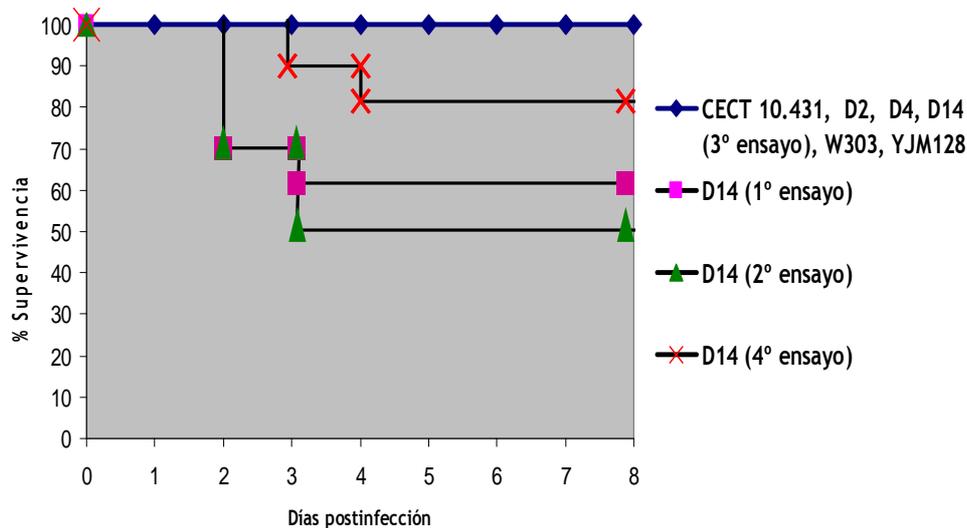


Figura 14. Representación del porcentaje de supervivencia frente a los días postinfección para los aislados estudiados.

Tabla 16. Relación del número de ratones sacrificados para cada aislado y tiempo

Cepas	N° de ratones totales sacrificados/cepa		
	7 días postinfección	15 días postinfección	30 días postinfección
Aislados dietéticos			
D2	4	4	6
D4	4	4	6
D14	6	7	11
D23	6	7	6
Cepa de laboratorio			
W303	4	3	3
Cepas control			
CECT 10.431	4	4	6
YJM128	10	9	11

En la Tabla 17, se muestran los valores de alojamiento expresados como el logaritmo en base 10 de la media del número de unidades formadoras de colonia, para las cepas control y para cada uno de los aislados, en ambos órganos y a los distintos tiempos. En la Figura 15 se representan estos resultados observándose que todos los aislados de productos dietéticos, excepto el aislado D23, mostraron capacidad para colonizar cerebro y riñones de ratones BALB/c, como se deduce de los alojamientos observados a tiempo 7 días postinoculación. Cabe destacar que la baja virulencia de este aislado ya se había apuntado al estudiar los rasgos fenotípicos asociados con la virulencia, ya que presentó negatividad para 4 de los 5 rasgos (ver Tabla 14). Tampoco se detectaron alojamientos para la cepa de laboratorio (W303). Como se ve en la Figura

15 (A y B), existe una clara predilección de todas las cepas por el cerebro, ya que los alojamientos detectados en este órgano fueron significativamente superiores a los contabilizados en riñón ($p > 0.05$). Las diferencias entre ambos órganos fueron especialmente evidentes a los 15 días postinoculación, ya que algunos aislados (D2, D4 y CECT 10.431) fueron indetectables en los riñones, pero no así en cerebro.

Tabla 17. Valores de alojamiento obtenidos en cerebro y riñón a distintos tiempos

Aislado	Alojamientos* Log ₁₀ UFC 7 días		Alojamientos* Log ₁₀ UFC 15 días		Alojamientos* Log ₁₀ UFC 30 días	
	Cerebro	Riñón	Cerebro	Riñón	Cerebro	Riñón
Aislados dietéticos						
D2	4.54±0.43	2.00±0.38	3.18±0.55	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
D4	5.11±0.11	2.60±0.46	3.77±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
D14	5.31±0.65	3.10±0.88	5.11±0.29	3.10±0.56	0.65±0.89	0.71±1.00
D23	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Cepa de laboratorio						
W303	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Cepas control						
CECT 10.431	2.55±0.13	1.60±1.09	0.55±1.1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
YJM128	4.86±0.53	2.60±0.57	3.64±0.91	2.41±0.69	0.31±0.72	0.40±0.98

*Valores expresados como el logaritmo en base 10 de la media del número de unidades formadoras de colonia y la desviación estándar.

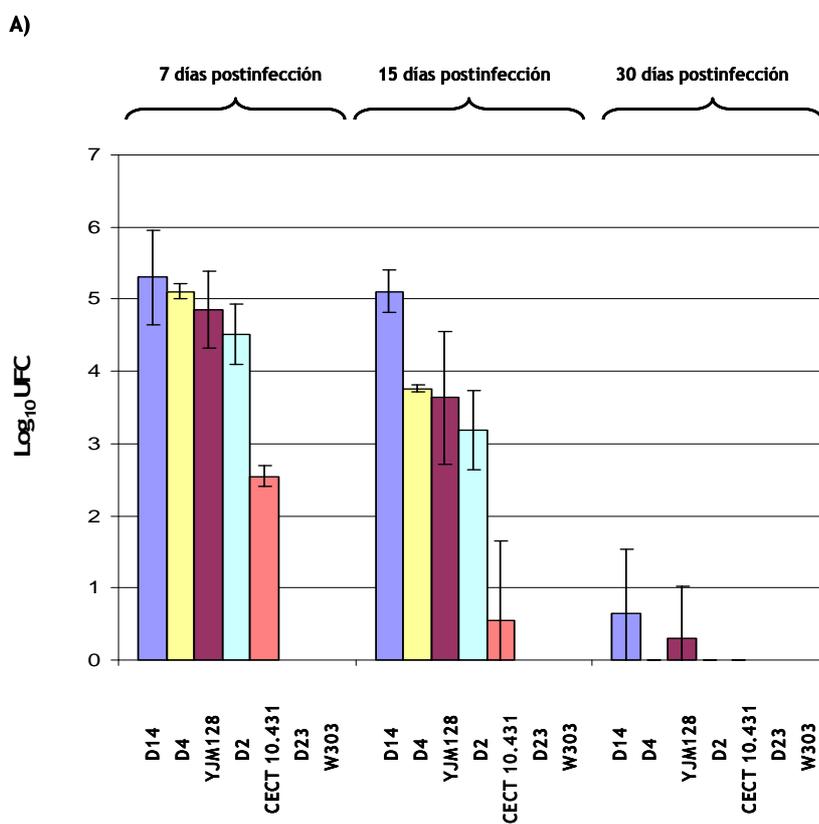
Aunque todos los aislados de productos dietéticos mostraron capacidad para diseminar y colonizar órganos distantes, en ocasiones se

podieron observar diferencias entre ellos, las cuales se comentan a continuación. Siete días después de la inoculación y en cerebro, los aislados D2, D4 y D14 presentaron alojamientos claramente superiores a los del control negativo (CECT 10.431) ($p < 0.05$), y por otra parte, equivalentes a los del control positivo (YJM128) ($p > 0.05$). Este dato contrasta con el hecho de que D23 y la cepa de laboratorio mostraran alojamientos nulos. En riñón se observó una situación similar, aunque los alojamientos obtenidos en el caso de D2 no fueron significativamente diferentes a los obtenidos para el control negativo CECT 10.431 ($p > 0.05$).

Las diferencias entre los aislados empezaron a ser evidentes a los 15 días postinfección; además, los datos de alojamientos a este tiempo proporcionan información sobre el perfil de aclaramiento de cada cepa, y por tanto, sobre su potencial patógeno. Como puede observarse en la Figura 15 (A), los valores de alojamiento en cerebro para este tiempo fueron significativamente inferiores a los obtenidos el día 7 en todos los casos ($p < 0.05$), salvo para D14. Esto indica que de todos los aislados, éste es el que posee mayor resistencia al aclaramiento. El comportamiento de D14 es además destacable por mostrar niveles de alojamientos significativamente superiores a los del resto de aislados, incluyendo al control positivo (YJM128). Los valores de alojamiento que mostraron los aislados D2 y D4 en cerebro fueron equivalentes a los mostrados por el control positivo (YJM128) ($p > 0.05$), y por otra parte, claramente superiores a los alojamientos del control negativo (CECT 10.431), el cual presentó niveles muy bajos.

En el caso del riñón (Figura 15, B), el aclaramiento a los 15 días fue evidente en el caso de D2 y D4, ya que ambos aislados mostraron alojamientos indetectables, al igual que el control negativo. De nuevo, el aislado D14 destacó por ser el único aislado capaz de persistir en este órgano, y además, en niveles equivalentes a los mostrados a tiempo 7 días

($p > 0.05$); este patrón de comportamiento es comparable al de la cepa utilizada como control positivo, aunque D14 la superó en cuanto a alojamientos ($p < 0.05$). A los 30 días postinfección, la mayoría de los aislados fueron totalmente eliminados en ambos órganos o como en el caso de D14 y YJM128, fueron detectados en niveles estadísticamente despreciables en comparación con el control negativo ($p > 0.05$).



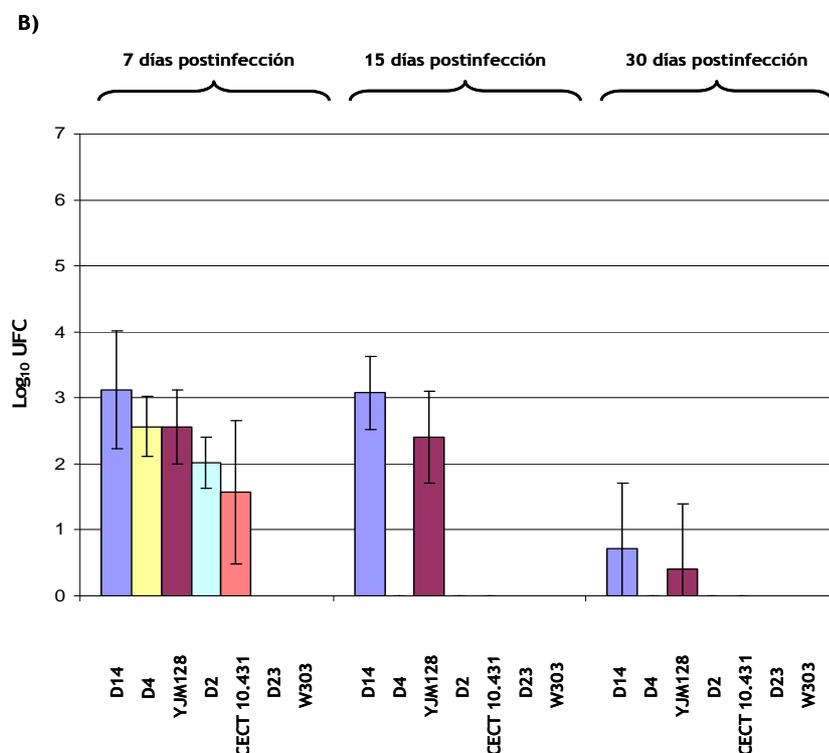


Figura 15. Alojamiento observado en cerebro (A) y riñones (B) de los ratones BALB/c para los diferentes aislados de *S. cerevisiae* ensayados.

Así que atendiendo a los niveles de alojamiento y a la capacidad de causar muerte, se podría considerar al aislado D14 como una cepa de virulencia alta por presentar los alojamientos más altos, tanto en cerebro como en riñón, y por su carácter letal; a los aislados D2 y D4 como de virulencia intermedia, porque a pesar de mostrar altos niveles de alojamiento en cerebro a los 7 y 15 días postinfección fueron incapaces de causar muerte; finalmente, el aislado D23 junto con la cepa de laboratorio W303, se pueden considerar avirulentas por su incapacidad para colonizar en el sistema murino ensayado.

2.1.3. Estudio histopatológico

Con objeto de confirmar la presencia de *S. cerevisiae* en el cerebro y riñones de los ratones infectados, se llevó a cabo la evaluación del alojamiento mediante cortes histopatológicos. Por otra parte, este estudio se ha planteado para conocer la morfología adoptada por *S. cerevisiae in vivo*, así como la ocurrencia de lesiones en el órgano colonizado. Dado que la cepa D14 fue la que presentó mayor capacidad de colonización, se usó para inocular 2 ratones BALB/c que se sacrificaron a los 7 días postinfección por ser éste el momento de máximo alojamiento. Se extrajeron los cerebros y riñones con cuidado y se introdujeron en formalina al 4%. El proceso posterior de fijado de la muestra, cortes y de tinción Shift con ácido periódico (PAS) se realizó en el Servicio de Patología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

En ambos cortes de cerebro se observaron levaduras ovoides en el interior de los vasos o en los espacios perivasculares del cerebro y en pequeño número; además, en uno de los ratones se originó una reacción inflamatoria de células mononucleares y astrocitosis, diagnosticando una encefalitis no supurativa multifocal moderada (Figura 16, B); por el contrario, el otro corte era histológicamente normal (Figura 16, A). Aunque en las muestras no se apreciaron levaduras en gran cantidad, las lesiones que se observaron pudieron ser consecuencia de la colonización de dicho órgano por la levadura.

En los cortes de riñones, uno de ellos era histológicamente normal y no se observaron levaduras en él (Figura 16, C); por el contrario, el segundo corte, aunque tampoco se encontró presencia de levaduras, mostró algunos glomérulos con aumento del espesor de las membranas, determinándose una glomerulonefritis membranosa segmental de carácter

focal (Figura 16, D). No encontramos explicación al hecho de que no se observasen levaduras a este tiempo, teniendo en cuenta los altos alojamientos obtenidos para el aislado D14 en riñones de ratones sacrificados en ese momento de la infección (7 días postinfección), tal y como se describió en el apartado anterior.

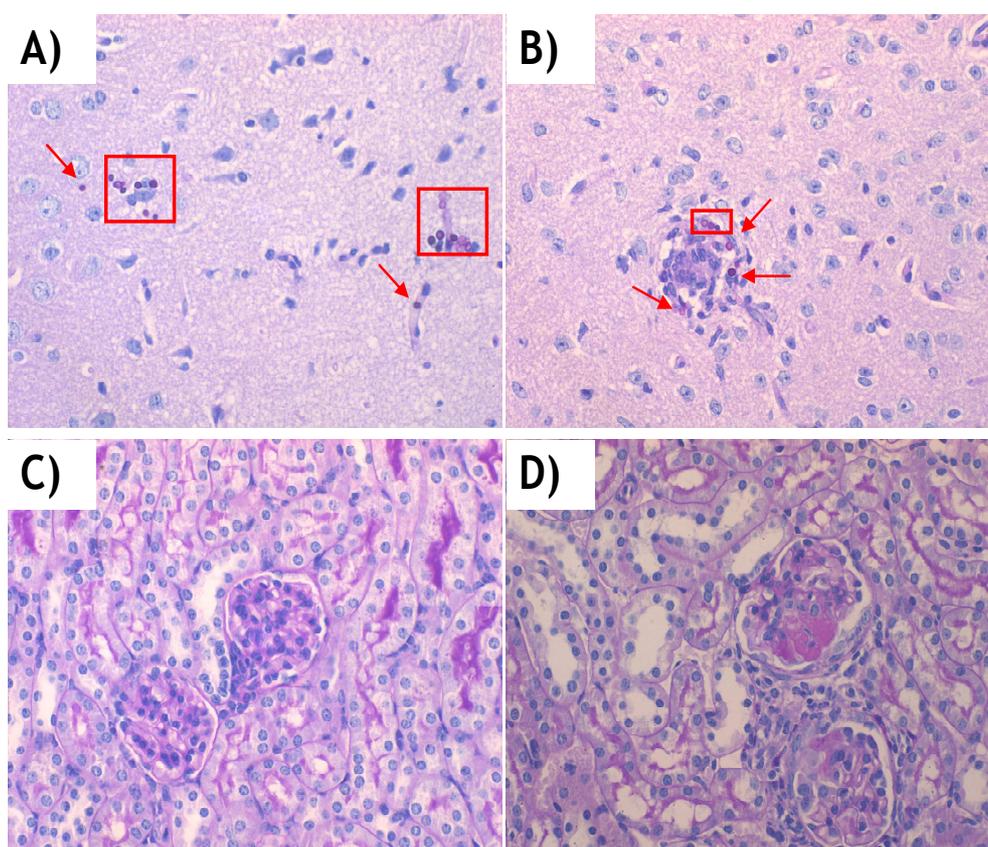


Figura 16. Análisis histopatológico de cortes de cerebro y riñón de ratones infectados con la cepa de *S. cerevisiae* D14. Los cortes se tiñeron mediante la tinción de Shift. A y B: cortes de cerebro de ratones BALB/c infectados con la cepa D14 y sacrificados a los 7 días (40x). C y D: cortes de riñón de ratones BALB/c infectados con la cepa D14 y sacrificados a los 7 días de la inoculación (40x). Las células de levadura se indican mediante recuadros y flechas rojas.

Respecto a la morfología presentada por *S. cerevisiae* en el cerebro, se observó que ésta era siempre ovoide y no pseudohifal, como cabría esperar en el caso de una levadura patógena. Es posible que la forma ovoide le permita atravesar con mayor facilidad la barrera hematoencefálica, como se comenta en el apartado de Discusión.

2.2. Modelo murino de infección gastrointestinal

Las cepas contenidas en suplementos dietéticos llegan al organismo en forma de células vivas a través de la ingesta oral de los mismos. Por tanto, las cepas en cuestión pueden suponer un riesgo potencial para la salud únicamente si son capaces de colonizar la mucosa intestinal, atravesarla y desde allí diseminarse alcanzando órganos internos. Los resultados derivados de los estudios de infección sistémica basados en la inoculación intravenosa son fundamentales, ya que proporcionan información acerca del potencial patógeno de las cepas, independientemente de la vía de entrada de las mismas. Por ello, son útiles como método de rastreo para decidir qué cepas poseen potencial patógeno, y que por tanto, vale la pena ensayar en los complejos modelos de infección gastrointestinal. En nuestro caso concreto, el aislado D14 fue el que mostró la mayor capacidad para alojar y persistir en los órganos analizados (cerebro y riñón) y fue el único capaz de desencadenar la muerte en el modelo de infección sistémica previamente estudiado (ver apartado 2.1. de esta sección). Puesto que este aislado es el que plantea más riesgo, se seleccionó para los estudios de infección gastrointestinal y se comparó con el aislado avirulento D23.

En humanos, los principales mecanismos que promueven las infecciones gastrointestinales son la quimioterapia, radioterapia, inmunosupresión, administración de altas dosis glucocortico-esteroides y

en muchas ocasiones, terapias prolongadas con antibióticos. Estos mecanismos se pueden imitar en modelos murinos disruptiendo el equilibrio de la flora natural del tracto intestinal, incrementando la permeabilidad de la pared intestinal e inmunodeprimiendo las defensas del animal (Koh y col., 2008). De esta manera, es posible establecer modelos animales para el estudio de la patogénesis de levaduras adquiridas a través de la ruta intestinal, como veremos a continuación.

2.2.1. Desarrollo de modelos de translocación e infección intestinal para el estudio del aislado D14

Cuando se estudia la patogenicidad de una levadura adquirida a través de la ruta intestinal hay que tener en cuenta que ésta no se encuentra en el tracto digestivo del animal de experimentación, y que éste suele ser bastante resistente a la colonización. Por tanto, un paso previo imprescindible para el establecimiento de un modelo de infección gastrointestinal es conseguir un sistema murino colonizado por la cepa objeto del estudio. La colonización intestinal se puede facilitar usando distintas estrategias siendo la más común el uso de antibióticos, combinados o no con fungicidas, que alteren la flora indígena del ratón. Por otra parte, en el caso de levaduras de baja virulencia, como es el caso de *S. cerevisiae*, es necesario mantener artificialmente altas dosis de células viables en el tracto gastrointestinal. Ambas estrategias fueron utilizadas en el presente trabajo para conseguir ratones colonizados por el aislado D14. Para inducir la translocación y diseminación extraintestinal, los ratones colonizados se sometieron a inmunosupresión y daño de la mucosa intestinal mediante la administración de las drogas dexametasona y metotrexato, dando lugar a tres modelos de infección gastrointestinal. Los pasos que se siguieron en el desarrollo de cada uno

de los modelos, así como los resultados obtenidos, se detallan a continuación.

En todos los modelos murinos, los datos de alojamiento obtenidos se compararon estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) usando el test LSD para la comparación de las medias.

Modelo murino 1. Administración de dexametasona en ratones pretratados con antibióticos

En esta aproximación se pretende conseguir un modelo de inmunosupresión y barrera intestinal dañada en ratones previamente tratados con antibióticos. En la Figura 17 se muestra un esquema del modelo propuesto para este ensayo.

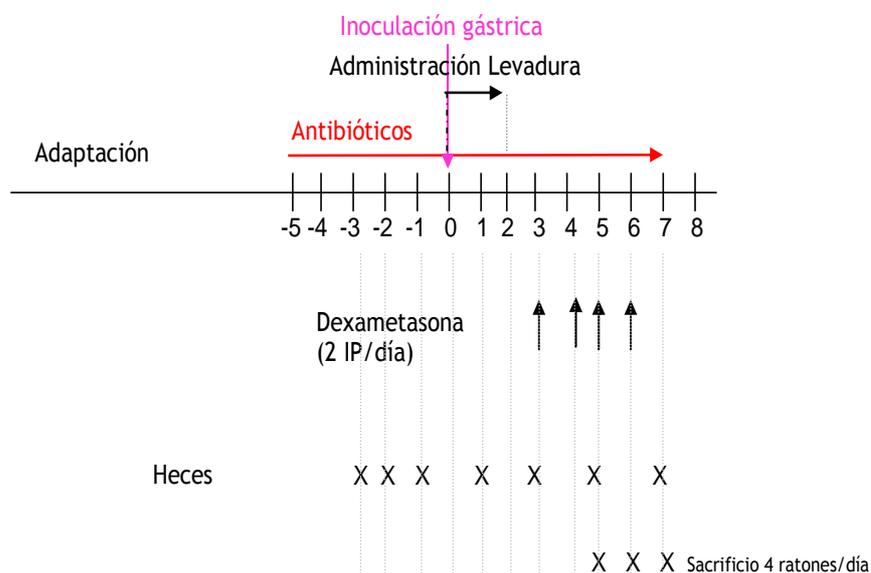


Figura 17. Esquema del modelo murino 1.

1. Se utilizaron 12 hembras ICR de 5-6 semanas de edad y con un peso comprendido entre 24 y 26 gramos.

2. Se añadieron tres antibióticos (bacitracina, gentamicina y estreptomina) al agua de beber y se mantuvieron durante todo el ensayo. La levadura se administró por inoculación gástrica cinco días después del inicio del tratamiento antibacteriano. A partir de ese día (día 0), la levadura se añadió además al agua de bebida donde se mantuvo durante 3 días (día 0, 1 y 2).
3. A los tres días del inicio de la administración de levadura en el agua de beber (día 3), se inyectó dexametasona intraperitonealmente dos veces al día durante cuatro días consecutivos.
4. Los días 5, 6 y 7, se sacrificaron 4 ratones/día y se extrajeron las placas de Peyer (para valoración de la ocurrencia de translocación intestinal), los nódulos mesentéricos (NMS), cerebro, hígado, riñones y sangre (para valoración de la ocurrencia de diseminación extraintestinal).
5. Durante los 3 días previos a la inoculación y los días 1, 3, 5 y 7, se recogieron heces para valoración de la efectividad del tratamiento con antibióticos.
6. Los días 1, 3, 5 y 7 se recogieron heces para la observación de la colonización gastrointestinal por parte de la levadura.

Seguimiento de la colonización intestinal

Para conseguir una disminución en el número de bacterias intestinales y favorecer de este modo la colonización del aislado D14, se administraron tres antibióticos (bacitracina, gentamicina y estreptomina) simultáneamente en el agua de beber (ver apartado 11.2.2. de Materiales y Métodos).

La colonización se evaluó determinando la carga en heces del aislado en estudio desde el inicio de su administración (día 0) hasta el final del ensayo (día 7) (Figura 17). En concreto, se recogieron heces durante el periodo de administración de la levadura (día 1) y después de interrumpir el aporte de la misma (días 3, 5 y 7). Como puede apreciarse en la Figura 18, los ratones excretaron niveles de levadura que se mantuvieron siempre en valores entre 6.5 y 7.3 Log₁₀ UFC/gramo de heces durante todo el experimento, inclusive después de suprimida la administración de D14 (a partir del día 3). Además, durante el régimen de

inmunosupresión (días 3, 5 y 7), la concentración de levadura en las heces sufrió un incremento entre el día 5 y 7 que, aunque aparentemente fue ligero, resultó ser significativo ($p < 0.05$). Estos datos indican que la colonización tuvo lugar con éxito y que disponíamos de un sistema apropiado para estudiar la translocación gastrointestinal de D14.

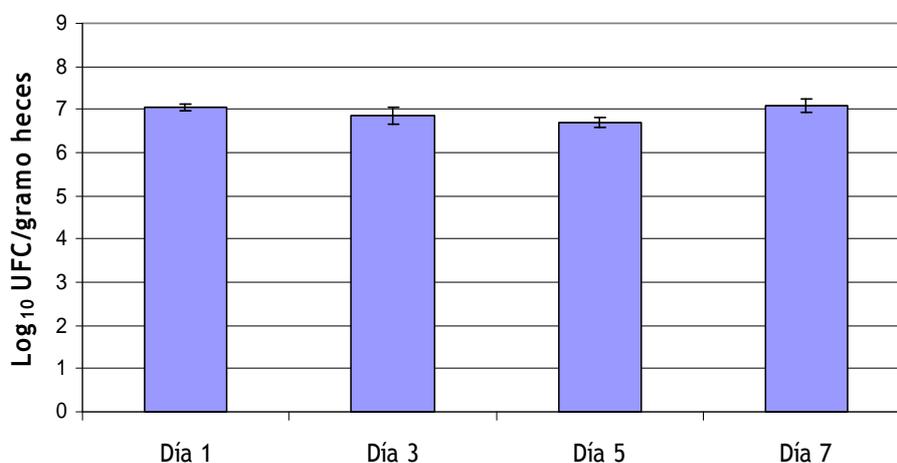


Figura 18. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D14 los días 1, 3, 5 y 7. Los valores son la media de las unidades formadoras de colonias obtenidas en un gramo de heces a partir de 12 ratones (día 1), 6 ratones (día 3), 5 ratones (día 5) y 4 ratones (día 7).

Por otra parte, la administración de antibióticos se mantuvo a lo largo de todo el experimento para minimizar complicaciones por infecciones bacterianas que pudieran sobrevenir como resultado del tratamiento con dexametasona. El seguimiento de la carga bacteriana

mostró un descenso importante en el número total de bacterias en las heces indicando la efectividad del tratamiento (datos no mostrados).

Translocación y diseminación

Previamente al estudio del comportamiento de D14 en el modelo murino establecido, se valoró la incidencia de muertes resultantes del efecto del tratamiento con dexametasona. Para ello, se incluyó un grupo control sin adición de levadura y como resultado no se observaron muertes ni síntomas de enfermedad, indicando que el sistema murino conseguido era idóneo para estimar el efecto de la adición de levadura.

Un día después de la inoculación gástrica (día 1), los ratones empezaron a presentar el pelo erizado, síntoma de proceso de infección, aunque conservaron buena movilidad y no experimentaron pérdida de peso. Esta característica se mantuvo durante el resto del experimento, siendo más acentuada en los últimos días. Los días 5, 6 y 7 se extrajeron los órganos diana elegidos (placas de Peyer, nódulos mesentéricos, cerebro, hígado, riñones) y se obtuvo sangre con objeto de valorar la ocurrencia de translocación intestinal y de diseminación extraintestinal en base al número de ratones colonizados y a los alojamientos encontrados (Tabla 18 y Figura 19).

No se observó presencia de levadura en sangre, pudiendo ser debido al hecho de que la sangre es un órgano de transición hacia otros órganos donde ha podido tener lugar una rápida diseminación del aislado D14, aunque también pudo suceder una rápida eliminación de la levadura por parte del sistema inmunitario del ratón. Por otra parte, se detectaron alojamientos en placas de Peyer, indicativo de translocación, y en el resto de órganos, indicativo de ocurrencia de diseminación, aunque no en la totalidad de los ratones ensayados; las placas de Peyer mostraron

alojamiento en el 100% de los ratones y durante los 3 días postinoculación (Tabla 18), mientras que sólo en el 25% de los ratones la levadura alcanzó y colonizó nódulos mesentéricos y en el caso de órganos distantes (riñón, hígado y cerebro), la colonización tuvo lugar en el 75% de los ratones (Tabla 18). En la Figura 19 se representan los niveles de levaduras encontrados en los casos en los que los alojamientos fueron positivos. Los valores obtenidos en las placas de Peyer ($3.91 \text{ Log}_{10} \text{ UFC} - 4.38 \text{ Log}_{10} \text{ UFC}$) fueron los más elevados y se mantuvieron con niveles similares, sin diferencias significativas entre los 3 días ensayados ($p > 0.05$). En cuanto al resto de órganos, los niveles de alojamiento encontrados en los nódulos mesentéricos, hígado, riñones y cerebro fueron equivalentes, excepto en el día 6 postinoculación, donde el hígado mostró una carga fúngica significativamente mayor que los nódulos mesentéricos ($p < 0.05$); tampoco se observó un aclaramiento significativo en ninguno de los órganos a lo largo de los 3 días que duró el estudio, ya que los alojamientos obtenidos fueron equivalentes ($p > 0.05$).

Tabla 18. Translocación y diseminación intestinal del aislado D14 en el modelo murino 1 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana

Día del sacrificio ^a	n° de ratones con D14/total de ratones sacrificados (%)		
	Placas Peyer	NMS	Otros órganos ^b
Día 5	4/4 (100)	1/4 (25)	3/4 (75)
Día 6	4/4 (100)	2/4 (50)	3/4 (75)
Día 7	4/4 (100)	1/4 (25)	3/4 (75)
Total	12/12 (100)	4/12 (25)	9/12 (75)

^a Día del sacrificio tras inicio de la administración oral de D14.

^b Otros órganos: cerebro, hígado, riñones.

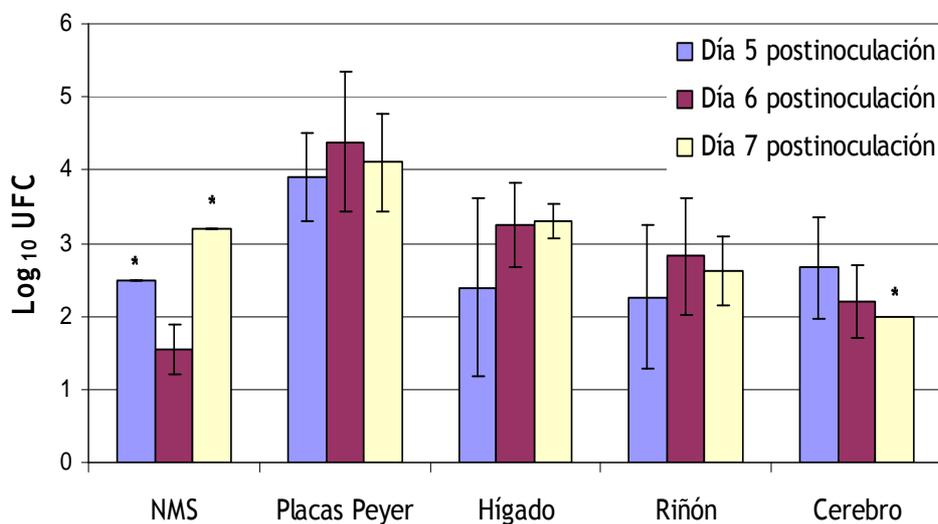


Figura 19. Alojamiento de D14 observados en órganos diana de ratones sacrificados los días 5, 6 y 7 en el modelo murino 1. No se han tenido en cuenta los ratones con alojamientos indetectables. El asterisco indica que el dato de alojamiento corresponde únicamente a 1 ratón.

Modelo murino 2. Administración de dexametasona y metotrexato en ratones pretratados con antibióticos

Aunque con el modelo anterior se había conseguido la colonización, translocación y diseminación de D14, se diseñó otro modelo caracterizado por un mayor daño de la barrera intestinal, mediante la administración conjunta de dexametasona y metotrexato (Figura 20).

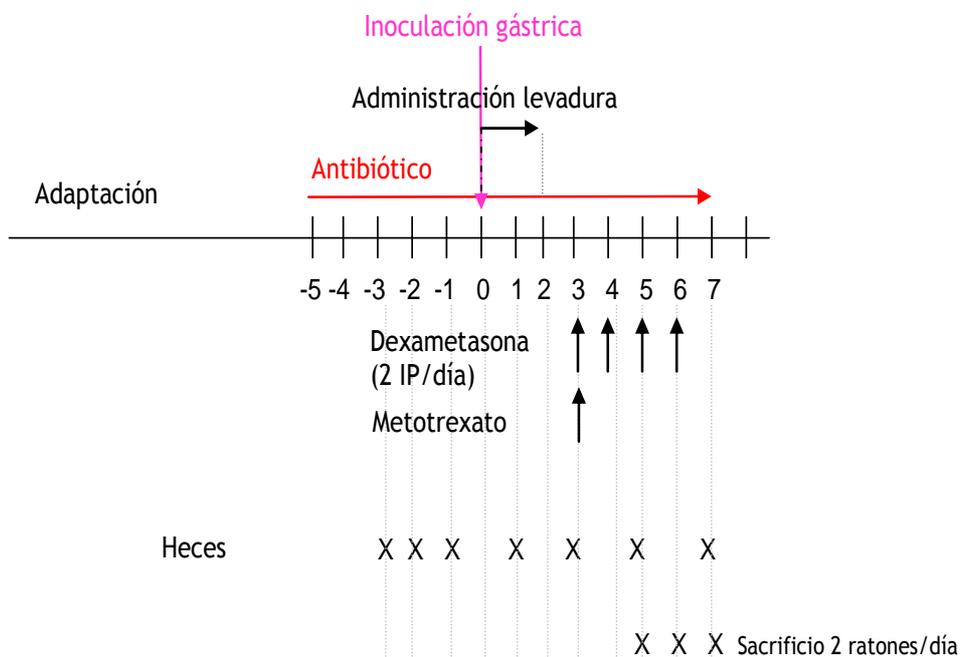


Figura 20. Esquema del modelo murino 2.

1. Se utilizaron 6 hembras ICR de 5-6 semanas de edad y con un peso comprendido entre 24 y 26 gramos.
2. Se añadieron tres antibióticos (bacitracina, gentamicina y estreptomicina) al agua de beber y se mantuvieron durante todo el ensayo.
3. La levadura se administró por inoculación gástrica cinco días después del inicio del tratamiento antibacteriano. A partir de ese día (día 0), la levadura se añadió además al agua de bebida donde se mantuvo durante 3 días (día 0, 1 y 2).
4. El día 3 se inyectó dexametasona intraperitonealmente dos veces al día durante cuatro días consecutivos y metotrexato en dosis única.
5. Los días 5, 6 y 7, se sacrificaron 2 ratones/día y se extrajeron las placas de Peyer (para valoración de la ocurrencia de translocación intestinal) y los NMS, cerebro, hígado, riñones y sangre (para valoración de la ocurrencia de diseminación extraintestinal).
6. Durante los 3 días previos a la inoculación y los días 1, 3, 5 y 7, se recogieron heces para valoración de la efectividad del tratamiento con antibióticos.
7. Los días 1, 3, 5 y 7 se recogieron heces para la observación de la colonización gastrointestinal por parte de la levadura.

Seguimiento de la colonización intestinal

Al igual que en el modelo murino 1, se controlaron los niveles bacterianos y de levadura como indicadores de la correcta evolución de los ensayos. La colonización se evaluó determinando la carga fúngica en heces a los mismos tiempos que en el modelo anterior, es decir, los días 1, 3, 5 y 7. Como se puede ver en la Figura 21, los niveles de D14 excretados oscilaron entre valores de 6.5 y 7.2 Log₁₀ UFC/gramo de heces. Una vez suprimido el aporte de levadura e iniciado el régimen de inmunosupresión, se observó un descenso en la carga fúngica que fue especialmente significativo el día 7 ($p < 0.01$); sin embargo, esta significancia no se puede tener en cuenta dado que sólo se dispone de los datos de alojamiento correspondientes a un único ratón. En cualquier caso, de nuevo fue posible obtener un sistema apropiado para estudiar la translocación gastrointestinal de D14.

Por otra parte, se consiguió un descenso de la carga bacteriana que se mantuvo hasta el final del experimento (datos no mostrados).

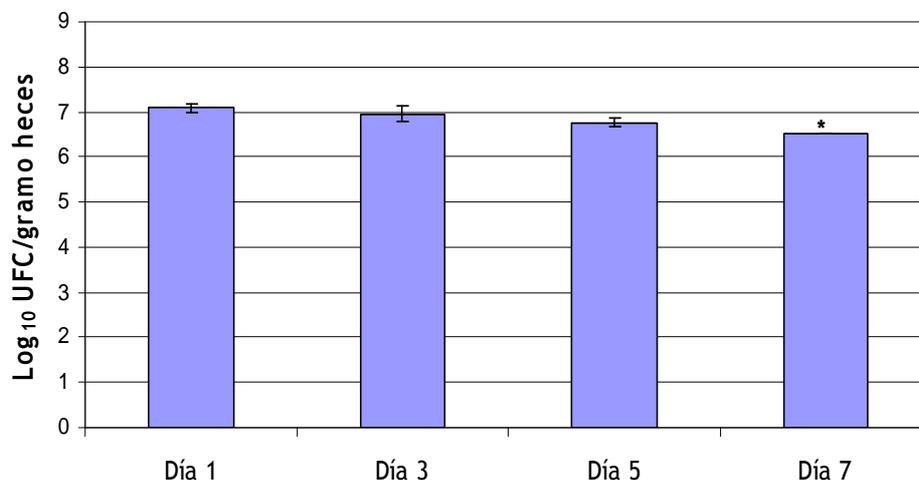


Figura 21. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D14 los días 1, 3, 5 y 7. Los valores son la media de las unidades formadoras de colonias obtenidas en un gramo de heces a partir de 6 ratones (días 1 y 3), 3 ratones (día 5) y 1 ratón (día 7). El asterisco indica que el dato de alojamiento corresponde únicamente a 1 ratón.

Translocación y diseminación

Se siguió el mismo esquema de trabajo que en el modelo 1, confirmándose en primer lugar que el tratamiento combinado con dexametasona y metrotexato no provocaba muertes ni síntomas de enfermedad que pudieran enmascarar los efectos de la adición de la levadura. Como ocurrió en el modelo 1, la adición de levadura desencadenó sintomatología infecciosa que fue evidente desde el principio y se acentuó hacia el final del ensayo, aunque sin efecto en la movilidad y en el peso de los animales.

Tabla 19. Translocación y diseminación intestinal del aislado D14 en el modelo murino 2 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana

Día del sacrificio ^a	n° de ratones con D14/total de ratones sacrificados (%)		
	Placas Peyer	NMS	Otros órganos ^b
Día 5	2/2 (100)	1/2 (50)	2/2 (100)
Día 6	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)
Día 7	2/2 (100)	1/2 (50)	2/2 (100)
Total	6/6 (100)	4/6 (67)	6/6 (100)

^a Día del sacrificio tras inicio de la administración oral de D14.

^b Otros órganos: cerebro, hígado, riñones.

Se detectó la presencia de D14 en todos los órganos y a lo largo de todo el ensayo, a excepción de la sangre como ocurrió en el modelo murino 1. Como puede verse en la Tabla 19, se observó la presencia de levadura en placas de Peyer, y por tanto, translocación en el 100% de los ratones. En lo que respecta a la diseminación, el drenaje de la levadura desde las placas de Peyer hasta los nódulos mesentéricos sólo tuvo lugar en el 67% de los ratones, mientras que el 100% de los ratones mostraron alojamientos en los órganos distantes (hígado, riñón y cerebro). Cuando se compararon los alojamientos se vio que los niveles de carga fúngica entre los distintos órganos fueron casi siempre equivalentes ($p > 0.05$); sólo los alojamientos detectados en placas de Peyer el día 7 resultaron ser significativamente superiores a los encontrados en nódulos mesentéricos y en cerebro ($p < 0.05$) (Figura 22). No se observó un aclaramiento significativo en ninguno de los órganos a lo largo de los 3 días que duró el estudio, ya que los alojamientos obtenidos fueron equivalentes ($p > 0.05$).

Estos resultados están indicando que en las condiciones establecidas en este sistema murino, D14 fue capaz de atravesar la barrera intestinal y de diseminarse a otros órganos.

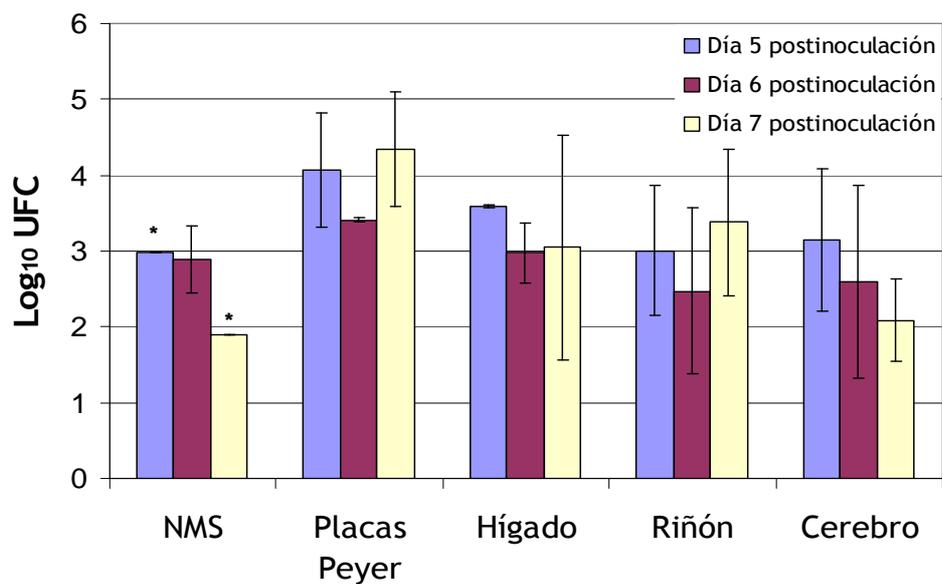


Figura 22. Alojamiento de D14 observados en órganos diana de ratones sacrificados los días 5, 6 y 7 en el modelo murino 2. No se han tenido en cuenta los ratones con alojamientos indetectables. El asterisco indica que el dato de alojamiento corresponde únicamente a 1 ratón.

Modelo murino 3. Administración de dexametasona y metotrexato en ratones pretratados con antibióticos + fungicida y altas dosis de levadura

Basándonos en el modelo de inmunosupresión y daño de barrera intestinal planteado en el apartado anterior, se pasó a estudiar si un tratamiento inicial con fungicida, así como la administración de dosis superiores y prolongadas de levadura tiene un efecto positivo en la translocación y diseminación de la misma (Figura 23).

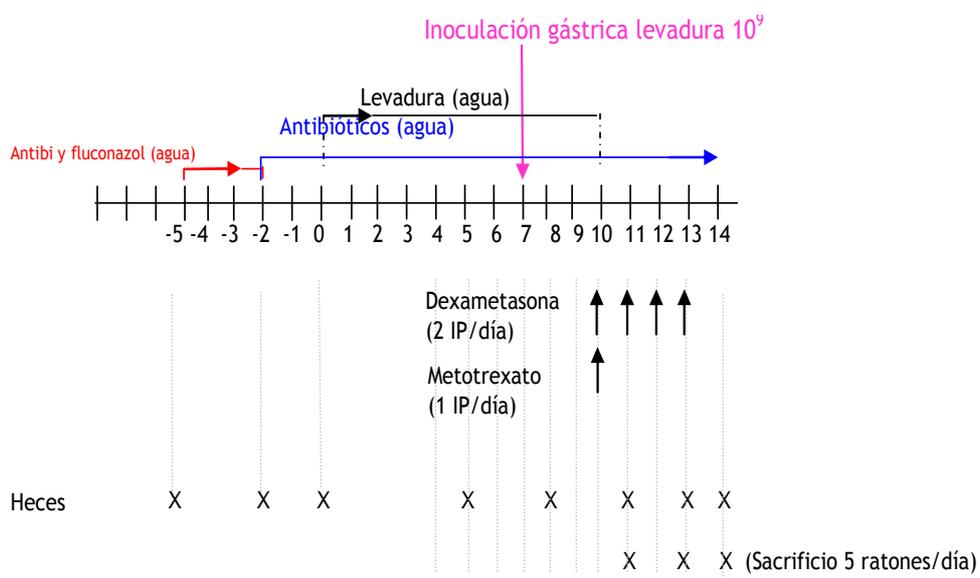


Figura 23. Esquema del modelo murino 3.

1. Se utilizaron 15 hembras ICR de 5-6 semanas de edad y con un peso comprendido entre 24 y 26 gramos.
2. Se añadieron tres antibióticos (bacitracina, gentamicina y estreptomina) al agua de beber y se mantuvieron durante todo el ensayo.
3. Entre los días -5 y -2 previos a la inoculación, se añadió el fungicida fluconazol junto con los antibióticos en el agua de beber.
4. La levadura se añadió el día 0 al agua de beber donde se mantuvo durante 11 días.
5. El día 7 la levadura se administró por inoculación gástrica.

6. El día 10 se inyectó dexametasona intraperitonealmente dos veces al día durante cuatro días consecutivos y metotrexato en dosis única.
7. Los días 11, 13 y 14, se sacrificaron 5 ratones/día y se extrajeron los nódulos mesentéricos y placas de Peyer (para valoración de la ocurrencia de translocación intestinal) y el cerebro, hígado, riñones y sangre (para valoración de la ocurrencia de diseminación extraintestinal).
8. Durante los días -5, -2 y 0 previos a la inoculación y a los días 5, 8, 11, 13 y 14, se recogieron heces para valoración de la efectividad del tratamiento con antibióticos.
9. A los días 5, 8, 11, 13 y 14 se recogieron heces para la observación de la colonización gastrointestinal por parte de la levadura.

Seguimiento de la colonización intestinal

Se siguió el mismo esquema de estudio de colonización gastrointestinal que en los modelos murinos anteriores. Teniendo en cuenta que en este caso el periodo de administración de levadura fue superior, se decidió coger muestras a más tiempos. En concreto, se recogieron heces a los 5 y a los 8 días tras el inicio de la administración oral de la levadura. A esos tiempos, todavía se ofrecía agua con levadura a los ratones y además, a día 8 ya se había llevado a cabo la inoculación gástrica de una dosis única de la misma. También se tomaron muestras después de interrumpir el aporte de levadura, en concreto los días 11, 13 y 14 teniendo en cuenta que el día 0 se correspondía con el primer día de levadura en el agua de bebida.

Aunque en la Figura 24 se observan oscilaciones en la carga fúngica que llegan a ser significativas ($p < 0.05$), los niveles de D14 excretados no bajaron de $6.3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/gramo}$ de heces. El día 8, los niveles de levadura fueron claramente superiores, probablemente debido a la inoculación gástrica (10^9 UFC) que tuvo lugar el día 7. A partir de ese momento y coincidiendo con la administración de la inmunosupresión, tuvo lugar un descenso significativo de la carga fúngica, que

progresivamente se fue recuperando hasta alcanzar niveles equivalentes a los obtenidos en el momento de la inoculación gástrica ($p>0.05$).

Como en modelos anteriores, la carga bacteriana se controló eficazmente con la combinación de antibióticos usada.

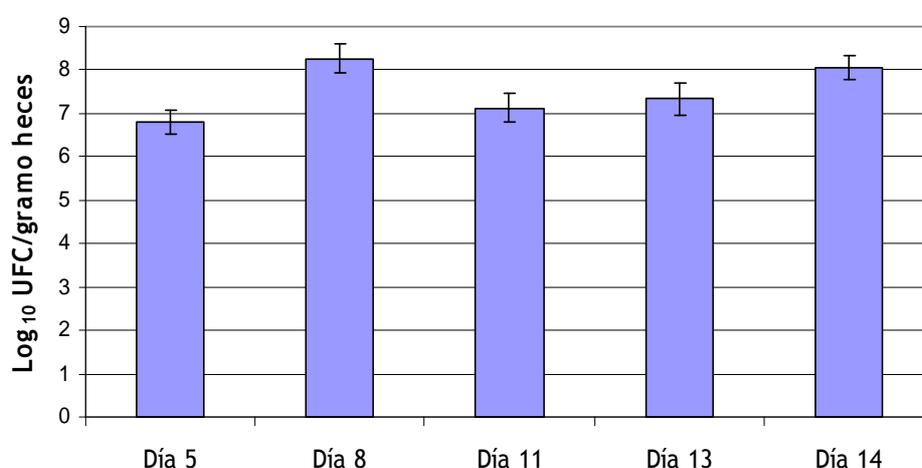


Figura 24. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D14 a los días 5, 8, 11, 13 y 14. Los valores son la media de las unidades formadoras de colonias obtenidas en un gramo de heces a partir de 15 ratones (día 5 y 11), 14 ratones (día 8), 10 ratones (día 13) y 5 ratones (día 14).

Translocación y diseminación

En este modelo murino, al día siguiente de la inoculación gástrica y coincidiendo con el octavo día del inicio de administración de levadura en el agua de beber, se empezó a observar que los ratones presentaban el pelo erizado, aunque continuaban teniendo buena movilidad y tampoco

mostraban una pérdida de peso. Estas características se mantuvieron durante el resto del experimento, siendo más acentuada en los últimos días del ensayo, donde se empezó a observar en algunos ratones síntomas más evidentes de infección, como poca movilidad y un ligero descenso de peso que no se habían detectado en los modelos anteriores.

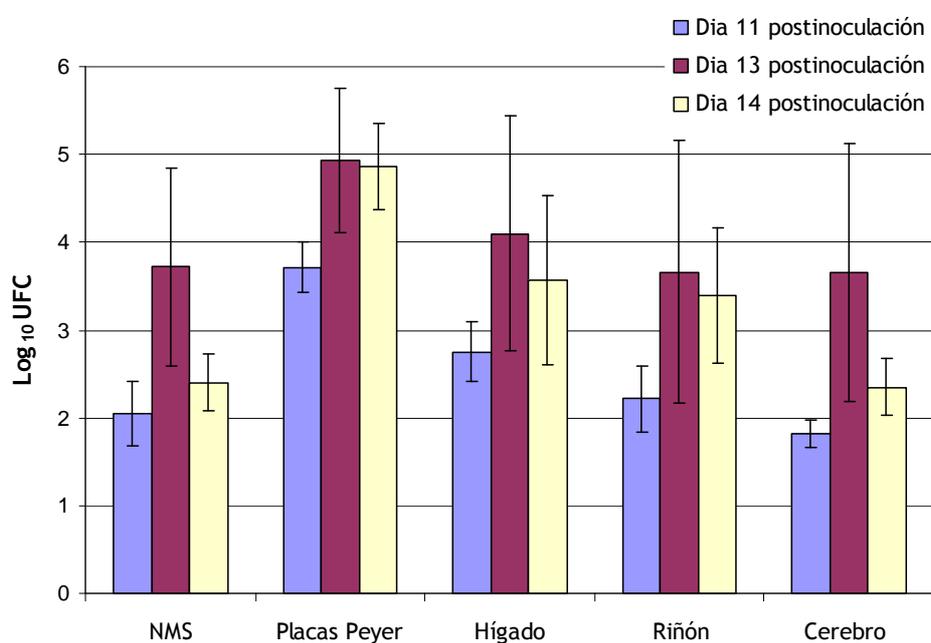


Figura 25. Alojamiento de D14 observados en órganos diana de ratones sacrificados los días 11, 13 y 14 postinoculación oral en el modelo murino 3. No se han tenido en cuenta los ratones con alojamientos indetectables.

En este caso, tampoco se detectó crecimiento de levadura en sangre, pero si en el resto de órganos (placas de Peyer, nódulos mesentéricos, hígado, riñón y cerebro). En la Tabla 20 se muestran los

resultados obtenidos en base al número de ratones que mostraron alojamientos. Se observa la ocurrencia de translocación en el 100% de los ratones (ver placas de Peyer); en lo que respecta a la diseminación, el drenaje de la levadura hasta nódulos mesentéricos tuvo lugar en casi la totalidad de los ratones (93%) y en el 100 % de los ratones la levadura alcanzó los órganos distantes analizados (hígado, riñón y cerebro). En la Figura 25, se representan los valores de carga fúngica cuando los alojamientos fueron positivos. Al comparar los alojamientos obtenidos para todos los órganos se observó que las placas de Peyer mostraron siempre, salvo frente al hígado a día 11 y 13, los niveles más elevados como resultado de la ocurrencia de translocación. No se observó diseminación preferencial por ningún órgano, ya que los valores de alojamientos obtenidos en ellos fueron equivalentes ($p > 0.05$); sólo el hígado a día 14 mostró valores superiores a los de los nódulos mesentéricos ($p < 0.05$). Por otro lado, en todos los órganos tuvo lugar un incremento significativo de los niveles de levadura conforme aumentó el número de dosis de inmunosupresor (entre los días 11 y 13), y los valores se mantuvieron incluso después de la supresión del mismo (día 14, fin del experimento), salvo en el caso de los nódulos mesentéricos, donde se detectó un descenso significativo ($p < 0.05$).

Tabla 20. Translocación y diseminación intestinal del aislado D14 en el modelo murino 3 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana

Día del sacrificio ^a	n° de ratones con D14/total de ratones sacrificados (%)		
	Placas Peyer	NMS	Otros órganos ^b
Día 11	5/5 (100)	4/5 (80)	5/5 (100)
Día 13	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
Día 14	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
Total	15/15 (100)	14/15 (93)	15/15 (100)

^a Día del sacrificio tras inicio de la administración oral de D14.

^b Otros órganos: cerebro, hígado, riñones.

2.2.2. Comportamiento del aislado avirulento D23 en un modelo de infección gastrointestinal

Con este estudio se pretende analizar si un aislado considerado avirulento en un sistema de infección sistémica es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal y provocar, a continuación, una diseminación. Para este propósito, se eligió de entre todos nuestros aislados, el aislado D23, por presentar negatividad para el 80% de los rasgos fenotípicos asociados con la virulencia estudiados en el apartado 1 de este capítulo y no mostrar alojamientos en cerebro y riñón cuando se llevó a cabo una infección sistémica en ratones BALB/c (ver apartado 2.1.2).

Para ello, se siguió un modelo de inmunosupresión y barrera intestinal dañada en ratones previamente tratados con antibióticos, al igual que se hizo en el modelo murino 1 para el aislado D14. En la Figura 26 se muestra el esquema de trabajo seguido para este ensayo.

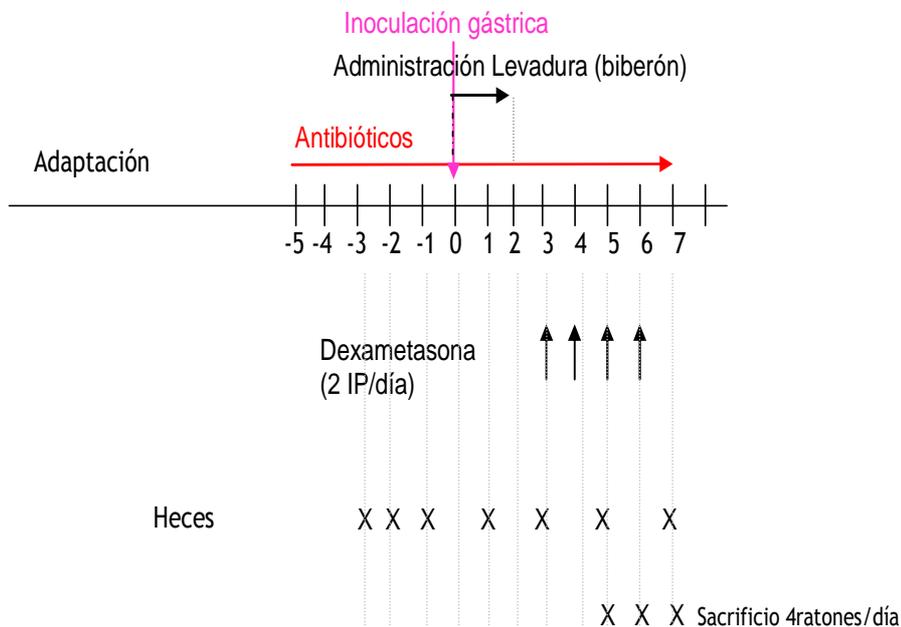


Figura 26. Esquema de trabajo seguido para el estudio del comportamiento del aislado D23.

1. Se utilizaron 12 hembras ICR de 5-6 semanas de edad y con un peso comprendido entre 24 y 26 gramos.
2. Se añadieron tres antibióticos (bacitracina, gentamicina y estreptomicina) al agua de beber y se mantuvieron durante todo el ensayo. La levadura se administró por inoculación gástrica cinco días después del inicio del tratamiento antibacteriano. A partir de ese día (día 0), la levadura se añadió, además, al agua de bebida, donde se mantuvo durante 3 días (día 0, 1 y 2). El día 3 se inyectó dexametasona intraperitonealmente dos veces al día durante cuatro días consecutivos.
3. Los días 5, 6 y 7, se sacrificaron 4 ratones/día y se extrajeron las placas de Peyer (para valoración de la ocurrencia de translocación intestinal), los nódulos mesentéricos (NMS), cerebro, hígado, riñones, y sangre (para valoración de la ocurrencia de diseminación extraintestinal).
4. Durante los 3 días previos a la inoculación y los días 1, 3, 5 y 7, se recogieron heces para valoración de la efectividad del tratamiento con antibióticos.
5. Los días 1, 3, 5 y 7 se recogieron heces para la observación de la colonización gastrointestinal por parte de la levadura.

Seguimiento de la colonización intestinal

Para conocer el grado de colonización desarrollado por el aislado D23 durante el tratamiento, se recogieron heces a los días 1, 3, 5 y 7. Como se observa en la Figura 27, este aislado fue detectado en heces de ratones que lo recibieron oralmente. Los valores detectados oscilaron entre 4.9 y 6.8 Log_{10} UFC/gramo de heces, observándose un descenso significativo de la carga fúngica ($p < 0.05$) a medida que nos alejamos del periodo de inoculación y a pesar de la inmunosupresión.

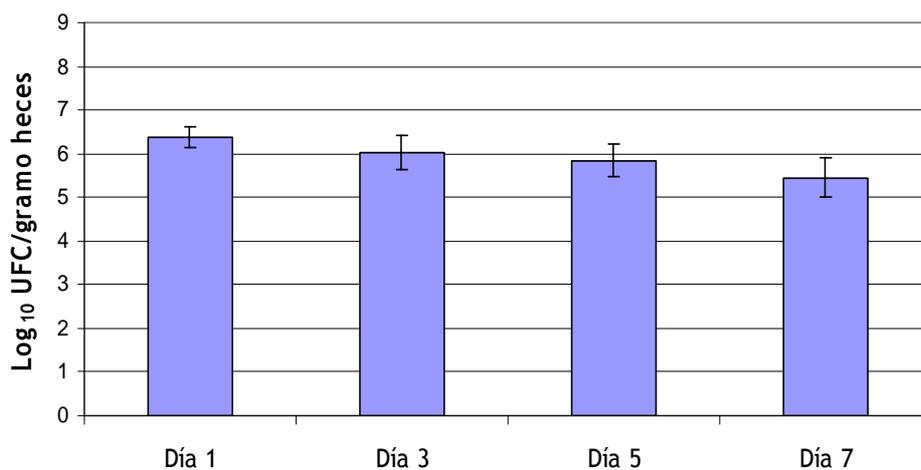


Figura 27. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D23 a los días 1, 3, 5 y 7. Los valores son la media de las unidades formadoras de colonias obtenidas en un gramo de heces a partir de 12 ratones (día 1), 6 ratones (día 3), 5 ratones (día 5) y 4 ratones (día 7).

Translocación y diseminación

En los ratones inoculados con el aislado D23, no se observó sintomatología infecciosa en ningún caso. Respecto al porcentaje de ratones donde se recuperó la levadura (Tabla 21), en el 75% de los casos se detectó ocurrencia de translocación (ver valores en placas de Peyer) y por lo que indican los datos, ésta fue más eficiente el día 6, ya que a ese tiempo todos los ratones analizados mostraron positividad en ese órgano. Por tanto, este aislado avirulento fue capaz de atravesar la barrera intestinal en las condiciones de nuestro ensayo. En cuanto a la diseminación, ésta no se detectó en nódulos mesentéricos y fue muy débil en órganos distantes ya que sólo fueron alcanzados en el 25% de los ratones. Como se muestra en la Figura 28, los únicos órganos que mostraron alojamientos fueron hígado y riñón, además sólo a día 5 y a niveles bajos (entre 1.7 y 2.5 Log₁₀ UFC en el caso del hígado y entre 1.7 y 2 Log₁₀ UFC en el riñón). Como en el caso del aislado D14, no se detectó levadura en las muestras de sangre.

Tabla 21. Translocación y diseminación intestinal del aislado D23 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana

Día del sacrificio ^a	n° de ratones con D23/total de ratones sacrificados (%)		
	Placas Peyer	NMS	Otros órganos ^b
Día 5	3/4 (75)	0/4 (0)	3/4 (75)
Día 6	4/4 (100)	0/4 (0)	0/4 (0)
Día 7	2/4 (50)	0/4 (0)	0/4 (0)
Total	9/12 (75)	0/12 (0)	3/12 (25)

^a Día del sacrificio tras inicio de la administración oral de D23

^b Otros órganos: cerebro, hígado, riñones

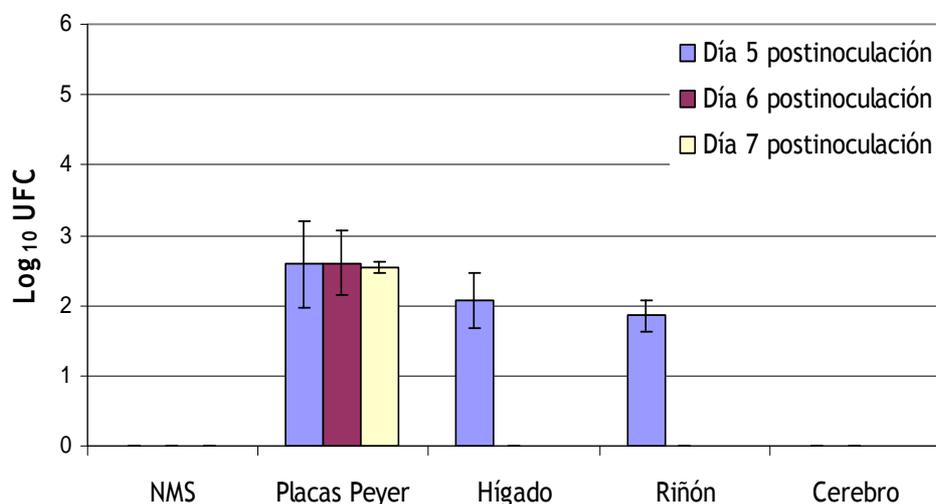


Figura 28. Alojamientos de D23 observados en órganos diana de ratones sacrificados los días 5, 6 y 7 postinoculación oral. No se han tenido en cuenta los ratones con alojamientos indetectables.

2.3. Aplicación de técnicas moleculares para la confirmación de la identidad de las colonias recuperadas de los ratones infectados

Como complemento a los estudios *in vivo* realizados en la presente sección, se comprobó si las colonias de *S. cerevisiae* recuperadas de los ratones infectados correspondían al aislado inoculado en cada caso, descartando contaminaciones accidentales por otras levaduras u otras cepas de *S. cerevisiae*. Esta comprobación se llevó a cabo tanto en las colonias recuperadas de cerebro y riñón en el modelo de infección sistémica, como en las recuperadas de heces y resto de órganos analizados en el modelo de administración oral.

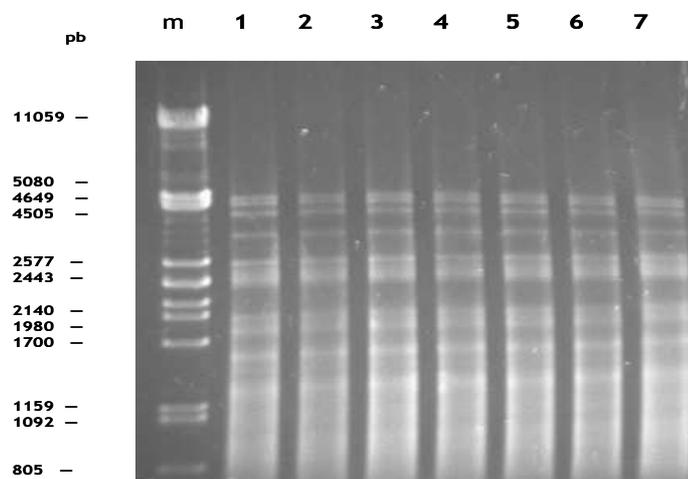


Figura 29. Comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de ratón tras infección sistémica en el caso del aislado D14. Ejemplo de perfiles de restricción obtenidos tras aplicar la técnica de análisis de restricción del DNA mitocondrial con el enzima *HinfI* para el aislado original (1) y las colonias recuperadas de cerebro y riñón de un ratón infectado a los 15 días postinfección (carreras 2-7). El marcador empleado (m) fue DNA de fago λ digerido con el enzima de restricción *PstI*.

Para ello, inicialmente se observaron al microscopio entre 2-3 colonias recuperadas por órgano o heces y por ratón, comprobándose que la morfología se correspondía con la de la especie *S. cerevisiae*, es decir, células ovoides. A continuación, se utilizó la técnica de análisis de restricción del DNA mitocondrial que se había aplicado en el apartado 3.1 del Capítulo 1 para caracterizar las colonias aisladas de los diferentes productos dietéticos; por tanto, disponemos de los perfiles de restricción de cada uno de los aislados en estudio para la comparación (ver Figura 8).

En la Figura 29 se muestra a modo de ejemplo los perfiles de restricción obtenidos en el caso del aislado D14 en el sistema murino de

infección sistémica y en la Figura 30 el caso del aislado D23 en el sistema murino de infección gastrointestinal. Como puede observarse, las colonias recuperadas pertenecían al aislado inoculado en ratón, ya que mostraron los mismos perfiles de restricción que el aislado original. Este resultado fue extensible al 100% de las colonias analizadas y para todos los aislados, descartando así posibles contaminaciones.

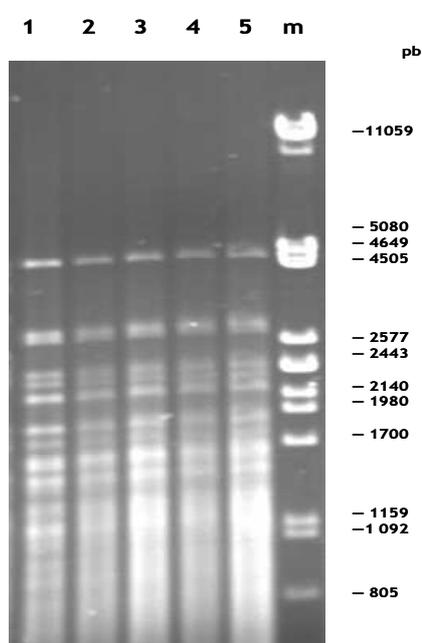


Figura 30. Comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de ratón tras administración oral con el aislado D23. Ejemplo de perfiles de restricción obtenidos tras aplicar la técnica de restricción del DNA mitocondrial con el enzima *HinfI* para el aislado original (1) y las colonias recuperadas a los 5 días postinoculación de placas de Peyer (carreras 2 y 3), hígado (carrera 4) y riñón (carrera 5) en un ratón al cual se le administró oralmente el aislado D23. El marcador empleado (m) fue DNA de fago λ digerido con el enzima de restricción *PstI*.

3. Discusión

3.1. Relación de los rasgos de virulencia con los aislados de productos dietéticos

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. La finalidad de estos factores es la de eludir las defensas del hospedador, con el objetivo de incrementar su potencial patógeno.

Una característica común entre los organismos patógenos es su capacidad para crecer a temperaturas próximas a la del cuerpo humano (Casadevall y Pirofski, 2001). En el presente trabajo, la capacidad de crecer a 42°C estuvo presente en el 67% de las cepas aisladas de productos dietéticos; únicamente los aislados D6 y D23 no pudieron crecer a una temperatura mayor a la óptima (28°C). D6 y D23, por su carácter híbrido, están adaptados a temperaturas bajas, por lo que no sorprende que no pudieran crecer por encima de 37°C. El hecho de que un porcentaje tan alto de cepas de origen no clínico haya mostrado esta habilidad, contrasta con trabajos previos donde se indica que este rasgo es mayoritariamente expresado por los aislados clínicos (McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006b). Otros autores sostienen que no existen diferencias entre la capacidad de crecimiento a 37°C y a 39°C entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* y ninguno de ellos fue capaz de crecer a 42°C (Klingberg y col., 2008). La metodología seguida por estos autores para la determinación de la capacidad de crecimiento es diferente y podría explicar la falta de correspondencia con los resultados de otros estudios. El hecho de que un aislado usado en el presente

trabajo como control positivo (YJM128), se comportara de forma totalmente distinta en el mencionado estudio, nos reafirma en esta idea. Por tanto, la hipótesis planteada por Klingberg y colaboradores (2008) de que crecer a 42°C no es un prerrequisito para la persistencia en el hospedador es dudosa y no se sostiene con estudios que apuntan a una asociación entre esta capacidad y la virulencia *in vivo*; las cepas virulentas que mostraron tener mayor capacidad para proliferar y persistir en ratones inmunocompetentes CD-1 o BALB/c fueron capaces de crecer a 42°C (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2011). Resultará de gran interés valorar esta asociación en el caso de nuestros aislados de suplementos dietéticos

La capacidad de crecer a la temperatura del cuerpo humano no es el único factor asociado con virulencia; otro factor determinante en la virulencia de un microorganismo es la capacidad de dimorfismo, paso de una forma ovoide a una forma filamentosa de la levadura. En *S. cerevisiae*, esta transición dimórfica está mediada principalmente por limitaciones nutricionales (Gimeno y col., 1992). Esta característica está muy correlacionada con la capacidad de persistir y proliferar en sistemas *in vivo* (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2011). En nuestro trabajo, empleando el medio SLAD (limitante en nitrógeno), se determinó que, a excepción de los aislados híbridos, el resto de aislados mostraron esta actividad, y que además, ésta fue mayor en D4 y D14. Esto no parece corresponderse con datos previos de nuestro grupo donde se muestra la incapacidad para pseudofilamentar por la mayoría de las cepas no clínicas analizadas (de Llanos y col., 2006b). Esto puede ser debido al tipo de cepas que se usaron, cepas vínicas y panaderas, ya que en otro trabajo se muestra que esta capacidad si está presente, y además en un porcentaje alto (83%), en el caso de aislados de queso (Klingberg y col., 2008). Por tanto, la capacidad para pseudofilamentar no es exclusiva de los aislados

clínicos y dentro de los aislados no clínicos ésta parece ser muy dependiente del origen de los mismos.

Aunque el dimorfismo constituye un componente importante en la invasión de los tejidos del hospedador, los microorganismos poseen además enzimas hidrolíticas que facilitan este proceso. La secreción extracelular de enzimas se considera una propiedad muy importante en la patogénesis de levaduras patógenas oportunistas como *C. albicans* y *C. neoformans*. Estas enzimas son proteasas, que hidrolizan péptidos (Naglik y col., 2003) y fosfolipasas, que hidrolizan fosfolípidos (Ghannoum, 2000). Ambos tipos de sustratos son constituyentes principales de las membranas, por tanto, su hidrólisis facilita el mecanismo de invasión, destruyendo o alterando los componentes de las membranas de las células del hospedador, dejándolas no funcionales o con interrupciones físicas (Ghannoum, 2000). En el caso de *S. cerevisiae*, se ha estudiado la producción de proteasas entre aislados clínicos y no clínicos de esta levadura y no se ha establecido relación alguna entre dicha actividad enzimática y el origen de los aislados (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2006b; Klingberg y col., 2008), por tanto, la actividad proteasa podría ser una cualidad ampliamente distribuida para esta levadura. En nuestro caso, los aislados D2, D4, y D14 presentaron esta actividad fuertemente inducida al igual que el control virulento (D5) y a diferencia del control avirulento que presentó actividad nula. También el aislado virulento YJM128 se ha descrito como productor de la citada actividad (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2006b). Este resultado apunta a una asociación entre esta propiedad y la virulencia, aunque sería necesario extender el estudio a un mayor número de cepas con nivel de virulencia *in vivo* previamente establecido.

Respecto a la actividad fosfolipasa, la relación entre la secreción de fosfolipasa y la virulencia ha sido demostrada en las levaduras

patógenas oportunistas *C. albicans* (Ghannoum, 2000; Marcos-Arias y col., 2011) y *C. neoformans* (Chen y col., 1997). Se conoce que *S. cerevisiae* posee esta actividad (Witt y col., 1982; Witt y col., 1984 a y b; Lee y col., 1994), aunque en la bibliografía apenas se dispone de información sobre la secreción de esta actividad enzimática en *S. cerevisiae*, un trabajo de nuestro grupo mostró su asociación con el origen clínico de los aislados, ya que el 85% de los mismos mostraron niveles moderados y altos que contrastaron con los bajos niveles mostrados por la gran mayoría de los aislados no clínicos (de Llanos y col., 2006b). Esto concuerda con los bajos niveles de actividad fosfolipasa obtenidos para las cepas de nuestro estudio y los controles. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados, no está claro que esta propiedad esté además asociada con la capacidad para desarrollar infección si tenemos en cuenta que el control virulento (D5) mostró unos niveles de actividad bajos.

Otro rasgo estudiado fue la capacidad de crecimiento invasivo. De Llanos y colaboradores (2006b) mostraron que el crecimiento invasivo parece estar poco representado tanto en los aislados clínicos como en cepas industriales, por lo que no parece ser una capacidad asociada con la patogenicidad. En nuestro estudio, únicamente el aislado D6 mostró esta característica, siendo prácticamente nula para los aislados D2 y D14 e inexistente para los aislados D4 y D23. La baja expresión de esta habilidad pudo deberse en parte al uso de medio YPD, pues se ha mostrado que esta característica se ve afectada negativamente cuando se usa este medio en lugar de un medio pobre en nitrógeno como SLAD (Klingberg y col., 2008).

En resumen, los aislados de *S. cerevisiae* (sin carácter híbrido) procedentes de productos dietéticos poseen la capacidad de crecer a 42°C, de pseudofilamentar y de secretar proteasas y fosfolipasas; por tanto, de acuerdo con estudios previos que demuestran una relación

entre la capacidad de crecer a altas temperaturas y el crecimiento pseudofilamentoso con el potencial patógeno de aislados clínicos de *S. cerevisiae* (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b), se podría pensar que estos aislados poseen características virulentas propias y en consecuencia, que son potencialmente virulentos independientemente del sistema inmune del hospedador. Por tanto, ante ciertos factores de predisposición (enfermedades debilitantes, terapias antibacterianas agresivas, SIDA, tratamiento de quimioterapia) y en determinados grupos de riesgo, estas cepas tendrían muchas más posibilidades de desarrollar una infección. Por el contrario, dada la incapacidad de D6 y D23 para crecer a temperaturas altas y para pseudofilamentar, es muy probable que el carácter híbrido no contribuya a su patogenicidad. Se ha demostrado que otras cepas híbridas de *S. cerevisiae*-*S. bayanus* y *S. cerevisiae*-*S. kudriavzevii* son capaces de crecer a bajas temperaturas (Belloch y col., 2008). Esta incapacidad de crecimiento a temperaturas altas podría tener una influencia negativa en la capacidad de supervivencia en un hospedador por una menor adaptación de crecimiento a la temperatura óptima del cuerpo humano. Por tanto, si se confirmara la avirulencia *in vivo* de este tipo de híbridos, su uso en la elaboración de suplementos dietéticos sería ventajoso por constituir una garantía de seguridad.

3.2. Potencial patógeno de las cepas aisladas de productos dietéticos

En el presente estudio se ha evaluado la virulencia *in vivo* de algunos de los aislados cuyo potencial patógeno se evaluó previamente *in vitro*. En concreto, se seleccionaron todos los aislados con positividad para al menos el 80% de los rasgos fenotípicos estudiados (D2, D4 y D14) y el aislado que presentó menos rasgos positivos (D23). Diversos trabajos

han abordado el estudio *in vivo* del potencial patógeno de cepas clínicas de *S. cerevisiae* comparándolo en ocasiones con aislados de alimentos y el agente bioterapéutico Ultralevura® (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b; Byron y col., 1995; de Llanos y col., 2011). Sin embargo, estos trabajos no incluyen cepas de productos dietéticos, a pesar de que debido a las dosis a las que se recomienda su consumo (2.1×10^7 células de levadura al día durante varios meses) suponen la principal vía de entrada de células vivas de *S. cerevisiae* en el hombre. Cabe resaltar que en la bibliografía médica existe un caso de fiebre de origen desconocido en un individuo inmunocompetente tras la ingesta prolongada de un producto dietético con 10^7 - 10^8 células de *S. cerevisiae* por gramo (Jensen y Smith, 1976). Nuestro grupo de trabajo posee datos que muestran que el aislado D14 destaca frente a un grupo reducido de aislados de origen variado (3 aislados clínicos, 1 aislado vínico y Ultralevura®) en cuanto a habilidad para invadir órganos en el transcurso de una infección sistémica en tres tipos de ratón, llegando incluso a observarse la muerte de un ratón DBA/2 y de un ratón C3H/HeN (Yáñez y col., 2009). Aunque este estudio parecía indicar que un aislado usado en la elaboración de un producto dietético comercial poseía habilidades virulentas destacables, los datos no eran suficientes para concluir que las muertes fueran resultado de su acción. Por todo ello, consideramos importante profundizar en el estudio de la virulencia *in vivo* de este aislado, así como ampliar el estudio a un mayor número de aislados de productos dietéticos.

Los resultados obtenidos muestran que los aislados establecidos como potencialmente patógenos en base a rasgos fenotípicos de virulencia (D2, D4 y D14) fueron los únicos capaces de alojar y persistir un cierto tiempo en los órganos analizados (cerebro y riñón). Esta capacidad ya fue descrita para una gran mayoría de aislados clínicos (Clemons y

col., 1994; Byron y col., 1995; Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011) y para algunos aislados no clínicos (Clemons y col., 1994; Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011). Teniendo en cuenta que el sistema murino que hemos utilizado (ratones BALB/c de 6 semanas de edad) se corresponde con un hospedador inmunocompetente, cabe pensar que los aislados de nuestro estudio poseen características propias que los hacen potencialmente más infectivos que otros aislados de *S. cerevisiae*, independientemente del sistema inmune del hospedador; los resultados obtenidos tras los estudios *in vitro* de rasgos de virulencia ya lo sugerían. Los valores de alojamientos obtenidos fueron superiores o similares a los observados en el caso del control positivo (YJM128), a pesar de que esta cepa fue descrita como muy virulenta en un sistema murino inmunocompetente (CD-1) en base a su capacidad para alojar (Clemons y col., 1994). Este hecho probablemente es debido a que una misma cepa de levadura puede presentar diferencias en la virulencia dependiendo de tipo de ratón utilizado (Byron y col., 1995); YJM128 es más virulento en ratones DBA/2N (deficientes en el factor C5 del complemento) que en ratones CD-1 (Clemons y col., 1994; Byron y col., 1995) y a la vista de nuestros datos, también parece ser menos virulento en ratones BALB/c. No se puede descartar además una pérdida de virulencia de la cepa con el paso del tiempo como describen Clemons y colaboradores (1994) para otro aislado; hay que tener en cuenta que YJM128 fue descrita en un trabajo del año 1994. A pesar de esta observación, nos seguiremos refiriendo a YJM128 como control positivo.

Por otro lado, únicamente los ratones inoculados con los aislados D2, D4 y D14 mostraron claros signos de infección (letargia, encrespamiento del pelo, pérdida de peso) al igual que el control positivo (YJM128). Estos mismos signos de infección han sido descritos en el curso de infecciones causadas por *C. albicans*, levadura típicamente patógena

(MacCallum y Odds, 2005), por lo que este dato estaría apuntando que estos aislados no sólo pueden sobrevivir en la sangre del ratón para después diseminarse y colonizar los distintos órganos, sino que además este conjunto de acciones son capaces de desencadenar una infección. Este dato es importante ya que la colonización no siempre va ligada con síntomas de infección (de Llanos y col., 2011) y resalta la particularidad de estos aislados. Solamente en el caso de D14, la infección acabó con la vida de los ratones; en concreto murieron el 27.5% de los ratones inoculados.

En base a todos estos datos, está claro que entre los aislados de nuestro estudio no tenemos aislados virulentos y avirulentos, sino que hay que referirse a un gradiente de virulencia como había sido descrito previamente para otras cepas de *S. cerevisiae* (Clemons y col., 1994; Byron y col., 1995). Por una parte, el mayor potencial patógeno correspondió al aislado D14, ya que 15 días después de la infección superó en carga fúngica al control positivo (YJM128) y al resto de aislados y fue capaz de persistir en cerebro hasta el día 30 junto con YJM128. Además, como ya se ha comentado, D14 fue el único aislado que causó mortalidad siendo esta la primera vez que se describe el carácter letal de una cepa de *S. cerevisiae* en ratones BALB/c adultos (6 semanas), ya que estudios previos muestran a este sistema murino como resistente a la infección letal por parte de esta especie de levadura (Byron y col., 1995; Wheeler y col., 2003; de Llanos y col., 2011); este dato hace pensar en el carácter especialmente virulento de esta cepa y confirman datos previos de nuestro grupo donde se le presumía una virulencia destacable (Yáñez y col., 2009). La nula mortalidad observada en uno de los ensayos de infección con D14 pudo ser resultado de un incremento de la resistencia a la infección asociada con un sistema inmune más maduro en ese lote de ratones. La influencia del grado de madurez del sistema inmune en el

caso de ratones BALB/c fue mostrada en un estudio previo de nuestro laboratorio (de Llanos y col., 2011). Por otra parte, los aislados D2 y D4 muestran un nivel de virulencia intermedio ya que fueron capaces de alojar, pero a diferencia de D14, presentaron menor capacidad de persistencia y no causaron muerte. Por último, el aislado D23 se puede considerar avirulento por su incapacidad para colonizar; la capacidad para alojar de este aislado fue incluso menor que la mostrada por el control negativo (CECT 10.431), el cual llegó a detectarse en cerebro hasta 15 días después de la inoculación y en riñón el día 7 postinoculación, aunque siempre en niveles inferiores al resto de aislados.

Cabe plantearse si existe asociación entre los rasgos fenotípicos expresados por los aislados de nuestro estudio y la virulencia *in vivo* de los mismos. Como ya se ha comentado anteriormente, en términos generales se observa una concordancia entre los rasgos de virulencia obtenidos *in vitro* y los agrupamientos descritos en base a los alojamientos en el sistema *in vivo*; los aislados establecidos como potencialmente patógenos en base a rasgos fenotípicos de virulencia (D2, D4 y D14) fueron los únicos capaces de alojar y persistir un cierto tiempo en los órganos analizados, y además, produjeron en los ratones claros signos de infección. Por otro lado, el aislado D23, que sólo mostró positividad para uno de los rasgos fenotípicos (actividad fosfolipasa), resultó ser completamente avirulento *in vivo*. Este mismo patrón de comportamiento se observó en el caso de las cepas utilizadas como control positivo y negativo. Cuando analizamos por separado cada uno de los rasgos fenotípicos estudiados, se observa que la capacidad de crecimiento a altas temperaturas (39° y 42°C) y el crecimiento pseudofilamentoso mostraron clara asociación con la virulencia *in vivo*, ya que estas capacidades estuvieron presentes en todas las cepas asignadas como virulentas y también en el control positivo, pero no en la cepa

avirulenta y en el control negativo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos de otros grupos donde, tras analizar un número amplio de aislados de distintos orígenes, se muestra que la capacidad de crecer a 42°C no es una característica común para todos los aislados de *S. cerevisiae* y está relacionada con la capacidad de colonizar ratones inmunocompetentes CD-1 (McCusker y col., 1994b). En ese mismo trabajo, se indica también esta relación en el caso de la capacidad de pseudofilamentación, al menos para los aislados del estudio (McCusker y col., 1994b). El hecho de que el aislado D23 sea incapaz de crecer a temperaturas $\geq 37^\circ\text{C}$ está muy probablemente asociado con su carácter híbrido, como se ha comentado anteriormente. Parece lógico que los microorganismos con dificultades para crecer a la temperatura del cuerpo humano, así como a las alcanzadas durante los estados febriles no sean capaces de desarrollar una infección sistémica. Por tanto, todo indica que las cepas híbridas son seguras para ser usadas en la preparación de suplementos dietéticos, tal y como se apuntaba al analizar los rasgos fenotípicos de virulencia; sin embargo, sería necesario extender el estudio a un mayor número de aislados antes de generalizar. Si esto fuera cierto, el carácter híbrido podría usarse como criterio a la hora de seleccionar aislados que no supongan un riesgo para su consumo como células vivas.

En el caso de la actividad proteasa, su expresión tuvo lugar a niveles altos en todos los aislados de suplementos dietéticos asignados con virulencia alta e intermedia, así como en el caso de YJM128 (control positivo), mientras que estuvo ausente en el control negativo. Estos datos sugieren una asociación entre esta propiedad y la virulencia, a pesar de que en la bibliografía no se establece esta relación, ya que tanto los aislados patógenos como los no patógenos fueron capaces de licuar *in vitro* gelatina como fuente de proteínas (Clemons y col., 1994). En lo que

respecta a la cepa considerada avirulenta (D23), no fue posible determinar esta actividad por la incapacidad de este aislado para crecer a la temperatura óptima para la determinación de la misma, y por tanto, no nos proporciona ninguna información. Sin duda, sería necesario extender este estudio a un número más amplio de cepas para confirmar la posibilidad de esta asociación. En cuanto a la actividad fosfolipasa y el crecimiento invasivo, resultaron no estar relacionados con la virulencia *in vivo* de nuestros aislados, al menos en las condiciones de nuestro estudio, siendo esta la primera vez en que estas propiedades se estudian en cepas de *S. cerevisiae* con virulencia *in vivo* conocida.

Puesto que D14 presenta un comportamiento similar a D2 y D4 en cuanto a la expresión de los rasgos fenotípicos de virulencia estudiados, cabe plantearse qué es lo que confiere a este aislado la capacidad de matar, y por tanto, una mayor virulencia *in vivo*. Dada la gran complejidad que se le atribuyen a los mecanismos de virulencia, es fácil pensar que intervengan otros rasgos de virulencia o mecanismos que no hemos tenido en cuenta en este trabajo. Se ha descrito el papel que puede jugar la pared de la levadura a la hora de ser reconocida por el hospedador, ya que alteraciones en su composición pueden influir en la respuesta inmune (Mansour y Levitz, 2002) y variar, por tanto, la virulencia de la misma. Estas alteraciones pueden provocar una falta de reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedador o bien una sobreestimulación del sistema inmunitario, conduciendo finalmente a un choque séptico, como se observó en un mutante de *S. cerevisiae* con alteraciones en la arquitectura de la pared celular (Wheeler y col., 2003). Estas alteraciones van acompañadas de cambios físicos, como la floculación y/o la hidrofobicidad; podría ser que las cepas de levadura con capacidad floculante presenten una virulencia aumentada por su acción obstructiva en vasos sanguíneos, sin embargo, no se ha descrito

una relación directa entre la floculación *in vitro* y el grado de virulencia *in vivo* (Byron y col., 1995; Wheeler y col., 2003). La hidrofobicidad si se ha correlacionado positivamente con la virulencia en *C. albicans* (Hazen y Glee, 1995). La expresión diferencial de moléculas superficiales que interactúan con receptores del hospedador también pueden influir en la virulencia de las cepas, alterando la capacidad de adhesión, producción de citoquinas y fagocitosis (Yáñez y col., 2009). Por tanto, es muy posible que diferencias en la composición de la pared celular entre las cepas influya en la capacidad virulenta de las mismas.

Aunque los resultados muestran que existen diferencias entre los aislados en cuanto al potencial patógeno, se observa un rasgo común en el comportamiento de los mismos durante el proceso de colonización, y hace referencia a que los niveles de carga fúngica fueron siempre mayores en cerebro que en riñón. Este tropismo por el cerebro fue descrito previamente para otras cepas de *S. cerevisiae* (Clemons y col., 1994; de Llanos y col., 2011). El riñón no parece ser un órgano preferido durante el transcurso de la infección por *S. cerevisiae*, ya que no sólo se observan alojamientos menores, sino que además las levaduras persisten por menos tiempo en él. Una posible causa podría ser que en este órgano las levaduras son eliminadas más eficazmente durante las dos primeras semanas tras infección debido a la acción de los neutrófilos presentes en el mismo. En *C. albicans*, una elevada acumulación de levadura en el órgano diana (riñones) se ha correlacionado con la muerte (Hurtrel y col., 1980; Odds, 1988); sin embargo, en el caso de *S. cerevisiae* no parece ser así, ya que los alojamientos obtenidos a la semana de inoculación en el cerebro (órgano diana) de aislados que no desencadenaron la muerte son en muchas ocasiones equivalentes a los de los aislados letales (de Llanos y col., 2011), tal y como ocurre en el presente trabajo para el aislado D14 y los 2 aislados de virulencia intermedia (D2 y D4).

Pareció interesante observar la morfología de las levaduras en los órganos infectados, para lo cual se realizaron cortes histológicos. Se observó la ausencia de signos de necrosis y la morfología que presentó *S. cerevisiae* en el cerebro fue siempre ovoide y no pseudohifal, como cabría esperar en el caso de una levadura patógena. Es posible que la forma ovoide le permita atravesar con mayor facilidad la barrera hematoencefálica. Esta morfología fue observada por diferentes autores (Clemons y col., 1994; Byron y col., 1995; de Llanos y col., 2011), lo que sugiere que la levadura *in vivo* no es capaz de pseudofilamentar. Kingsbury y colaboradores (2006) determinaron 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, se propone que éste puede ser el motivo por el cual *S. cerevisiae* no forme pseudohifas cuando crece en el interior de un hospedador, al igual que ha sido descrito para *C. glabrata* (Fidel y col., 1999). Sin embargo, no se puede descartar que en algún momento durante el transcurso de la infección, las células de *S. cerevisiae* sufran una transición dimórfica en la invasión de ciertos tejidos ante determinadas condiciones nutricionales, como se ha descrito para *C. albicans* (Feng y col., 1999). También es posible que la capacidad de pseudofilamentación no sea esencial para la patogénesis en el caso de *S. cerevisiae*.

En resumen, una cepa de *S. cerevisiae* aislada de un suplemento dietético, en concreto el aislado D14, fue capaz de producir la muerte del 27.5% de los ratones inoculados. Este dato es relevante, teniendo en cuenta que el resto de aislados fueron capaces de colonizar, pero no de matar, y muestra por primera vez que una cepa aislada de un suplemento dietético posee habilidades virulentas independientemente del sistema inmune del hospedador.

3.3. Capacidad de colonización, translocación y diseminación de un aislado considerado virulento y otro avirulento

Las cepas de *S. cerevisiae* contenidas en suplementos dietéticos llegan al organismo en forma de células vivas a través de la ingesta oral de los mismos, y además, en altas dosis, como resultado de una administración diaria y continuada en el tiempo. Evidencias derivadas de casos clínicos apoyan la idea de que la mucosa gastrointestinal constituye una vía de entrada a la sangre de ciertas cepas de *S. cerevisiae*: un caso de fiebre provocado por la ingestión prolongada de un suplemento dietético que contenía entre 10^7 y 10^8 células de *S. cerevisiae* por gramo (Jensen y Smith, 1976) y varios casos de infección sistémica como consecuencia de la administración oral del agente bioterapéutico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Lherm y col., 2002; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005). Por tanto, teniendo en cuenta que en nuestro estudio de infección sistémica un aislado, en concreto D14, destacó por su capacidad virulenta, consideramos interesante valorar su patogénesis cuando es adquirido a través de la ruta intestinal. Para ello, usando sistemas murinos de infección gastrointestinal, se ha llevado a cabo un estudio comparativo de la capacidad de translocación intestinal y diseminación de dicho aislado y de un aislado caracterizado como avirulento (D23).

Para un estudio de infección gastrointestinal es fundamental establecer un modelo *in vivo* de infección adecuado para el microorganismo en cuestión. Existen diversas maneras de establecer modelos de diseminación fúngica intestinal, pero no siempre se consiguen diseminaciones consistentes ni alojamientos altos. Los primeros estudios de infección gastrointestinal tuvieron lugar con bacterias, y muestran que en animales adultos sanos, la infección gastrointestinal ocurre en

contadas ocasiones, mientras que es frecuente ante una afectación del sistema inmune del hospedador, un sobrecrecimiento de la bacteria en el intestino o ante un incremento de la permeabilidad de la barrera intestinal o daño de la misma (Berg, 1999). Por tanto, los modelos animales que se utilizan en los estudios de infección gastrointestinal bacteriana se basan en promover los citados mecanismos de forma individual o sinérgicamente. En el caso de las levaduras, estas premisas se han tenido en cuenta a la hora de diseñar en el laboratorio sistemas *in vivo* de infección gastrointestinal de especies patógenas, como las pertenecientes al género *Candida*, mostrándose la necesidad de combinar el daño intestinal con neutropenia para la obtención de diseminación (Takahashi y col., 2003; koh y col., 2008). En muchas de las fungemias derivadas de la ingesta de células vivas de *S. cerevisiae*, en concreto *S. boulardii*, se ha postulado que la translocación desde el intestino hacia el torrente sanguíneo sobreviene en pacientes debilitados con mucosa digestiva dañada, tratamiento con antibióticos de amplio espectro y/o inmunosupresión severa (Cesaro y col., 2000; Lherm y col., 2002; Riquelme y col., 2003; Herbrecht y Nivoix, 2005). Por tanto, cabe esperar el mismo patrón de comportamiento en el caso de los aislados de suplementos dietéticos, justificándose el uso de sistemas animales que mimeticen las condiciones recién mencionadas. Hasta la fecha, los escasos trabajos que hacen referencia a la ocurrencia de translocación intestinal en el caso de *S. cerevisiae* consisten en estudios acerca de sus propiedades probióticas, en concreto de la capacidad protectora frente a la infección por bacterias patógenas y rotavirus (Pope y Cole, 1982; Cartwright-Shamoon y col., 1995 y 1996; Peret Filho y col., 1998; Rodrigues y col., 2000; Martins y col., 2007). Sólo existe un estudio que investiga la virulencia de *S. cerevisiae* cuando es administrado como probiótico (Samonis y col., 2011). Ante la falta de estudios que

contemplan la infección gastrointestinal en *S. cerevisiae*, nos hemos basado en trabajos existentes en especies de levaduras del género *Candida* para el desarrollo de sistemas murinos que nos permitan comparar los aislados D14 y D23. Dentro del género *Candida*, *C. glabrata* es la especie que está más próxima filogenéticamente a *S. cerevisiae*, y ambas presentan algunas similitudes en cuanto a sus mecanismos infectivos; por ejemplo, muestran morfología pseudohifal únicamente *in vitro* y en condiciones de falta de nitrógeno (Csank y Haynes, 2000; Gancedo, 2001; Li y col., 2007). La aplicación de varios modelos murinos imitando condiciones clínicas habituales de trauma y/o inmunosupresión capaces de inducir diseminación en *C. albicans* no fueron eficaces en el caso de *C. glabrata*, a excepción de la administración de altas dosis de dexametasona en ratones pretratados con una combinación de 3 antibióticos (estreptomicina, gentamicina y bacitracina) (Wells y col., 2007); estas condiciones fueron ensayadas con las cepas de nuestro estudio. Además, puesto que se ha definido la patogenicidad de *S. cerevisiae* como inferior a la de *C. glabrata* (Roetzer y col., 2011), se valoró si la aplicación de un daño adicional de la mucosa es necesario en el caso de *S. cerevisiae* para poder observar diseminación y translocación. Estas y otras cuestiones tenidas en cuenta para la consecución del presente estudio se discuten con más detalle a continuación.

Puesto que *S. cerevisiae* no forma parte de la microbiota indígena de los ratones, el primer reto que se planteó fue mantener artificialmente la levadura en el tracto gastrointestinal en niveles suficientes para abordar el estudio de infección. Para ello, por una parte se administraron antibióticos de amplio espectro (estreptomicina, gentamicina y bacitracina) los días previos a la inoculación de la levadura, ya que debido a su acción inhibitoria sobre el crecimiento de la flora intestinal bacteriana, facilitan la adhesión y el crecimiento de

levaduras en el tracto gastrointestinal (Samonis y col., 1994; Cole y col., 1996); como resultado, favorecen la translocación de las mismas (Kennedy y Volz, 1983).

Por otra parte, en base a la metodología seguida en trabajos previos donde se observó translocación (Martins y col., 2007; Koh y col., 2008), se decidió administrar la levadura en el agua de beber (entre 3 y 11 días, según el modelo murino) para favorecer su presencia continuada en el tracto gastrointestinal; además, se llevó a cabo la inoculación gástrica de una dosis única de una suspensión concentrada de la levadura. Los resultados obtenidos muestran que, en los tres modelos murinos, los recuentos en heces del aislado D14 fueron siempre positivos y nunca fueron inferiores a valores de 6 Log₁₀ UFC/gramo de heces, aunque se detectaron oscilaciones que fueron significativas, sin duda, a consecuencia de la ingesta incontrolada de levadura a través del agua de beber. Por tanto, el tratamiento antibacteriano resultó eficaz en la colonización intestinal del aislado D14 en ratones adultos sanos con altas dosis de levadura en el tracto gastrointestinal de los mismos. Aunque el efecto positivo del uso de antibióticos en la colonización se ha mostrado repetidas veces en el caso de especies de *Candida* (Ekenna y Sherertz, 1987; Kennedy y Volz, 1985; Kennedy y col., 1987; Mellado y col., 2000; Bendel y col., 2002; Pultz y col., 2005; Clemons y col., 2006; Wells y col., 2007; Koh y col., 2008), hasta la fecha no se había ensayado con cepas de *S. cerevisiae*. Al comparar los resultados obtenidos en los modelos murinos 2 y 3, se observa que cuando se prolongaron en el tiempo altas dosis de D14 como inóculo en el agua de bebida, se detectaron niveles de levadura significativamente diferentes únicamente en las muestras de heces correspondientes al tercer día desde la suspensión del inóculo ($p < 0.05$); por tanto, en términos generales, no se puede considerar que esta aproximación haya tenido un efecto potenciador en la colonización

en las condiciones ensayadas, aunque se valoró su posible influencia en la translocación y diseminación como se comenta más adelante. En cuanto al aislado considerado avirulento (D23), los niveles en heces fueron claramente inferiores a los encontrados para D14 y experimentaron un descenso significativo a lo largo del experimento. Este dato es indicativo de que la capacidad de colonización de D23 es menor que la de D14. Martins y colaboradores (2005) describieron diferencias en la capacidad de colonización en un grupo de cepas de *S. cerevisiae* procedentes de ambientes naturales y de bebidas fermentadas tradicionales.

En cualquier caso, lo que es importante es que se consiguió establecer un sistema intestinal adecuado para los estudios de infección de cepas pertenecientes a *S. cerevisiae*, a pesar de lo dificultoso que es trabajar con una especie de levadura que, como se ha documentado, es eliminada rápidamente del tracto digestivo de mamíferos con la flora indígena intacta (Martins y col., 2009). Aunque el uso de antibióticos no eliminó por completo la flora bacteriana, las bacterias residuales no parecieron tener un efecto patógeno significativo, ya que ratones control que no recibieron *S. cerevisiae* no mostraron signos de infección ni murieron. Sí que es verdad que el uso de dexametasona siempre aumentó la flora bacteriana en los días finales del ensayo, pero esto no perjudicó al estudio. En un estudio anterior, ya habían observado que el uso de ciclofosfamida provoca un aumento de bacterias en el tracto gastrointestinal de ratones (Mellado y col., 2000). Por otro lado, la adición de un antifúngico los días previos a la inoculación (modelo murino 3) fue útil a la hora de analizar los resultados, ya que se disminuyó considerablemente el ruido de fondo derivado de la translocación de levaduras presentes en la microbiota indígena de los ratones.

Los alojamientos detectados en placas de Peyer (primer órgano que actúa fagocitando los agentes patógenos que atraviesan la pared del

intestino) muestran que ante la aplicación de daño intestinal con dexametasona sola o combinada con metotrexato, han permitido establecer la translocación intestinal de los aislados D14 y D23. En el caso de D14, la translocación fue consistente (100% de los ratones mostraron la presencia del aislado en placas de Peyer en todos los modelos murinos), pero no así para D23, puesto que en el 25% de los ratones los alojamientos fueron negativos en este órgano; además, los alojamientos en el caso de D23 fueron claramente inferiores ($p < 0.05$). Por tanto, ante mecanismos favorecedores de translocación intestinal, se observan diferencias entre cepas que podrían tener relación con sus atributos virulentos. La presencia de levaduras en placas de Peyer indica que al menos un mecanismo de translocación intracelular (a través de los enterocitos), como el descrito por Berg (1999) en el caso de la translocación bacteriana, ha mediado en el paso de los aislados D14 y D23 a través de la pared intestinal, con migración clara a nódulos mesentéricos (NMS) en el caso del aislado considerado virulento (D14). No se puede descartar que la presencia de levadura en NMS sea en parte debida a una translocación paracelular por afectación de las uniones estrechas entre los enterocitos (“tight junctions” en terminología anglosajona) (Ramiro-Puig y col., 2008); la ocurrencia de tal mecanismo de translocación se ha descrito en el caso de *S. boulardii* usando ratones infantiles, es decir, con enterocitos inmaduros (Cartwright-Shamoon y col., 1996). Aunque existen muy pocos trabajos que aborden la absorción intestinal de *S. cerevisiae*, ya se había descrito la translocación de esta levadura y en algunos casos su presencia en nódulos mesentéricos usando ratones inmunodeprimidos (Peret Filho y col., 1998) y jóvenes (21 días) (Rodrigues y col., 2000; Martins y col., 2007) o infantiles (Pope y Cole, 1982; Cartwright-Shamoon y col., 1995). Sin embargo, en los casos en los que su diseminación a órganos distantes fue estudiada, ésta no tuvo lugar (Martins y col., 2007; Samonis y col.,

2011) o fue inconsistente y ocasional (Pope y Cole, 1982; Peret Filho y col., 1998). Este hecho podría ser debido al uso de modelos murinos no apropiados; como ya se ha comentado anteriormente, incluso en el caso de especies con claros atributos virulentos como el caso de *C. albicans*, donde la combinación de daño e inmunosupresión son necesarias para la ocurrencia de diseminación consistente (Takahashi y col., 2003; Koh y col., 2008). Tampoco se puede descartar que en algunos casos, la cepa analizada fuera avirulenta y por tanto, incapaz de diseminarse y alojarse en un sistema de infección sistémica, dado que en estos trabajos no se aporta información al respecto (Pope y Cole, 1982; Martins y col., 2007).

En nuestro estudio, la aplicación durante 4 días de dexametasona, droga que además de dañar la mucosa gastrointestinal resulta en inmunosupresión, permitió la diseminación del aislado D14 a órganos distantes (modelo murino 1). Estos datos muestran que las condiciones establecidas por Wells y colaboradores (2007) como favorecedoras de diseminación gastrointestinal en el caso de *C. glabrata* también lo fueron para *S. cerevisiae*. Por otra parte, se ha descrito que la administración de metotrexato, fármaco de quimioterapia anticanceroso e inductor de ulceraciones intestinales, junto con un inmunosupresor aumentó la diseminación extraintestinal de *C. albicans* (Takahashi y col., 2003). Cuando se compararon los alojamientos obtenidos en los distintos órganos (incluidas placas de Peyer) en los modelos murinos 1 (dexametasona) y 2 (dexametasona + metotrexato), sólo se observaron valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) en nódulos mesentéricos el día 6 postinoculación (4 días después de suspender la administración de la levadura), siendo estos valores superiores en el modelo 2. Estos resultados sugieren que la translocación y diseminación de D14 no se vieron favorecidas por la aplicación de un daño intestinal adicional; sin embargo, en el modelo 2 (dexametasona + metotrexato) la diseminación

fue más consistente teniendo en cuenta que un mayor porcentaje de ratones, 67% frente a 25% en el modelo 1, presentaron alojamientos en nódulos mesentéricos y que el 100% de los ratones presentaron alojamientos en órganos distantes mientras que en el modelo 1 esto ocurrió en el 75%. El hecho de que algunos ratones no mostraran alojamientos en nódulos mesentéricos, pero sí en órganos distantes podría estar indicando, además de una diseminación vía sistema linfático, la ocurrencia de invasión vascular directa con el subsecuente transporte de la levadura a través del sistema porta hasta el hígado y de éste al resto de órganos distantes. Esto no concuerda con el hecho de que nunca se haya encontrado levadura en la sangre. Posiblemente esto fuera debido a su consideración como sólo un órgano de paso hacia otros órganos internos; únicamente en un trabajo donde se establecía un modelo de colonización gastrointestinal en *C. albicans* se encontraron alojamientos en sangre (Takahashi y col., 2003).

Por otra parte, la prolongación de la presencia del aislado D14 en tracto gastrointestinal mediante su administración en el agua de bebida durante más días (modelo 3), tampoco afectó a los alojamientos de D14 (valores no diferentes significativamente, $p > 0.05$, en modelo 2 y 3 al comparar días equivalentes desde el inicio del tratamiento inmunosupresor/daño mucosa); sí se observó que el porcentaje de ratones con levadura en nódulos mesentéricos fue mayor en el modelo 3 (93% en modelo 3 frente a 67% en modelo 2).

A modo de resumen, cabe resaltar que nuestro estudio resultó con la diseminación del aislado D14 a órganos distantes estableciéndose de esta manera un sistema *in vivo* de translocación y diseminación gastrointestinal que nos ha permitido comparar la infectividad intestinal de este aislado con la de un aislado considerado avirulento (D23). Los resultados obtenidos para el aislado D14 contrastan con el

comportamiento de D23 y concuerdan con el grado de virulencia asignado a ambos tras los estudios de infección sistémica del subapartado 2.1.2. Por tanto, ante condiciones que promueven la translocación intestinal, la diseminación hacia órganos internos es muy dependiente de la cepa y sólo parece tener lugar cuando ésta posee atributos virulentos propios; en dos cepas de *C. albicans*, una virulenta y otra no virulenta, se observó que la cepa no virulenta tuvo una diseminación más pobre (Andruti y col., 2000). El hecho de que existan cepas de *S. cerevisiae* capaces de diseminar a órganos distantes ante determinadas condiciones es especialmente relevante, sobre todo, si las cepas en cuestión forman parte de suplementos dietéticos. Por tanto, el aislado D14 podría suponer un riesgo para pacientes receptores de tratamientos con antibacterianos y de terapias con inmunosupresores y glucocortico-esteroides en altas dosis. Puesto que el consumo de suplementos dietéticos está ampliamente distribuido entre individuos inmunocompetentes como parte de una dieta saludable, cabría plantearse en estudios futuros valorar la capacidad de diseminación de los correspondientes aislados de *S. cerevisiae* en sistemas murinos sanos basados en un sobrecrecimiento intestinal de la levadura; en el caso de *S. boulardii*, la diseminación en estas condiciones no tuvo lugar al estudiar su virulencia durante su administración como probiótico (Samonis y col., 2011) ni tampoco se observó en el caso de una cepa aislada de una bebida tradicional brasileña “cachaça” durante el transcurso de un estudio para valorar sus posibles propiedades bioterapéuticas (Martins y col., 2007).

La intención de este estudio no es la de causar una alarma social frente al uso de *S. cerevisiae*, pero sí la de mejorar el control de seguridad de preparados dietéticos y probióticos; por tanto, en la preparación de ambos tipos de preparaciones comerciales, se debería valorar el potencial patógeno de las cepas a usar para garantizar el uso de

cepas inocuas; dada la gran diversidad de aislados de *S. cerevisiae* actualmente disponibles, esto es perfectamente posible. Por otra parte, la disponibilidad de cepas virulentas y avirulentas es muy útil en el estudio de posibles mecanismos involucrados en la virulencia de *S. cerevisiae*, tal y como se plantea en los siguientes capítulos.

Capítulo 3

Estudio de la composición genómica de
diferentes cepas de *Saccharomyces*
cerevisiae

En los capítulos anteriores, hemos observado que la cepa D14, que fue aislada de un producto dietético, fue capaz de colonizar y persistir en cerebro y riñón en un modelo murino de infección sistémica, y que además, colonizó el tracto gastrointestinal y se diseminó hacia órganos internos en un modelo murino de infección gastrointestinal.

Poco se conoce sobre la estructura y composición genómica de los aislados virulentos de *S. cerevisiae*. No se puede descartar que la composición genómica afecte al carácter virulento de estos aislados de *S. cerevisiae*, ya que una variación en el número de copias de determinados genes involucrados en patogenicidad podrían ser la causa del fenotipo observado en dicho aislado. Recientemente, la cepa clínica YJM789 fue secuenciada (Wei y col., 2007) y Carreto y colaboradores (2008) estudiaron la estructura genómica de algunos aislados clínicos de *S. cerevisiae*. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos en este estudio llevar a cabo un análisis genómico de cepas potencialmente virulentas de *S. cerevisiae*, tanto de origen clínico (60 y 102) (de Llanos y col., 2004) como de alimentos (D14). Previamente, se determinó la ploidía de los tres aislados a analizar mediante citometría de flujo, y posteriormente se llevó a cabo el análisis genómico mediante la técnica de micromatrices de DNA.

1. Determinación de la ploidía mediante citometría de flujo

Para determinar la ploidía de las cepas se empleó la técnica de citometría de flujo. Mediante esta técnica se comparó la señal de fluorescencia obtenida para cada aislado y la obtenida para una cepa haploide y para una diploide. En este caso, se usó como control haploide la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* S288c y como control diploide la cepa

de *S. cerevisiae* FY 1679. En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos. El hecho de que la señal obtenida para las cepas de estudio se solape con aquella obtenida para la cepa control diploide FY 1679 es indicativo del carácter diploide de estas cepas. Así que, esta técnica nos muestra que los aislados D14, 60 y 102 son diploides o cercanos a la diploidía. Para determinar el grado de ploidía, se usó la representación gráfica que aparece en la Figura 31, pero también se utilizó el programa informático WinMDI 2.9, que permite calcular las intensidades de fluorescencia de los picos de cada aislado y poder compararlo respecto a la obtenida con los controles haploide y diploide. Esto se hizo por triplicado, y se obtuvieron los valores expuestos en la Tabla 22.

Tabla 22. Valores de ploidía para los aislados D14, 60 y 102

Cepa	Ploidía
D14	2.05 ± 0.03
60	2.11 ± 0.09
102	2.02 ± 0.05

Valores representados como media y desviación estándar

Para determinar si estas cepas eran homotáticas o herotáticas, se hicieron esporular estos aislados en medio acetato (descrito en la Tabla 5 de *Materiales y Métodos*) y se observó que los aislados D14 y 102 formaban ascas con 3 y 4 esporas y, además, se vio que éstas eran viables; sin embargo, el aislado 60 formaba ascas que contenían 2, 3 y 4 esporas, pero muchas de ellas no eran viables. Cuando se pusieron a crecer otra vez las esporas de los tres aislados en medio de esporulación fueron capaces de volver a esporular, por tanto, los tres aislados se pueden considerar homotáticos. La presencia de diferente número de ascosporas en las ascas para una cepa ha sido ampliamente observado

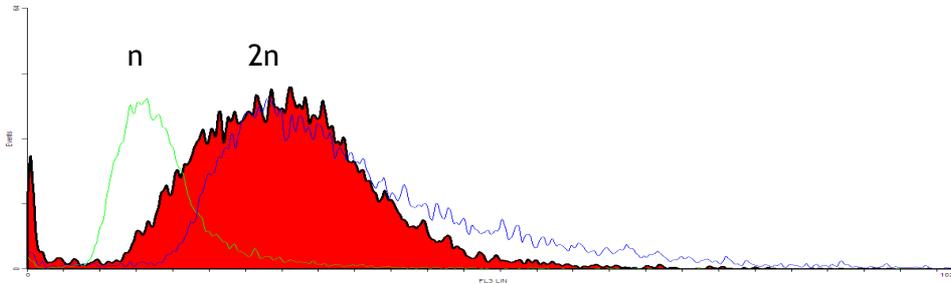
entre las cepas industriales de *S. cerevisiae*, relacionándose con fenómenos de aneuploidía (Barrio y col., 2006). Nuestros resultados indicarían que estos aislados podrían ser aneuploides. Mediante la citometría de flujo es difícil confirmar la aneuploidía, aunque los datos numéricos estarían indicando una ligera aneuploidía, pudiendo presentar copias adicionales de algunos cromosomas, al menos en el caso del aislado 60 y D14.

2. Caracterización genómica mediante micromatrices de DNA

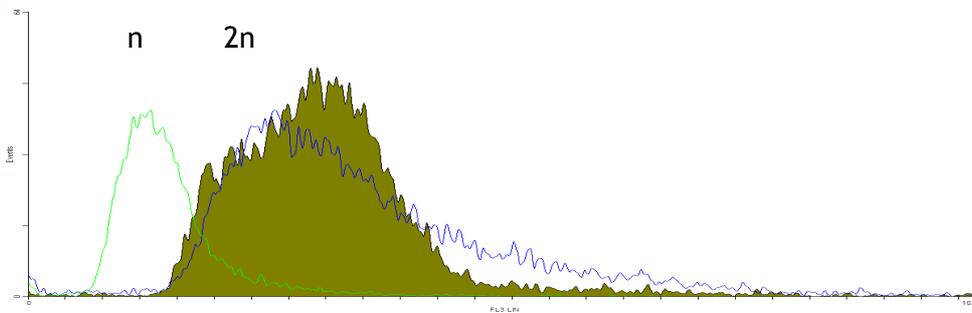
Con la finalidad de encontrar características específicas de cepas virulentas de *S. cerevisiae* que ayuden a entender su habilidad para producir infecciones oportunistas, llevamos a cabo un estudio de la estructura genómica mediante la técnica comparativa de hibridación de micromatrices de DNA. Esta técnica nos permite identificar qué genes se encuentran en mayor o menor número de copias en las cepas oportunistas comparado con otras cepas no virulentas.

Para llevar a cabo este estudio comparativo de hibridación genómica, el DNA genómico del aislado experimental (D14, 60, 102 y W303) fue marcado fluorescentemente con Cy5 (rojo), mientras que la cepa S288c (cepa de laboratorio) fue marcada con Cy3 (verde). Las dos muestras marcadas fueron mezcladas e hibridadas en una micromatriz de DNA en el que cada punto de hibridación estaba compuesto de DNA amplificado por PCR (oligonucleótidos) correspondiente a cada gen de la cepa de referencia S288c.

A) Aislado 102



B) Aislado 60



C) Aislado D14

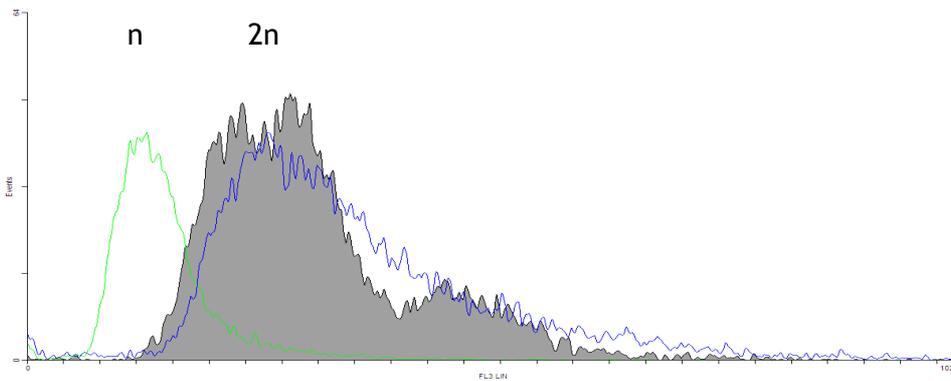


Figura 31. Citometría de flujo de los aislados D14, 60 y 102. La línea verde corresponde a la cepa control haploide (S288c), la línea azul a la cepa control diploide (FY 1679) y el pico con color muestra la respuesta del aislado en estudio. A) aislado 102, B) aislado 60 y C) aislado D14.

La cepa S288c es la cepa de referencia de *S. cerevisiae* y con la cual ha sido construida la micromatriz; además, está considerada avirulenta en ratones (Clemons y col., 1994). Como cepas virulentas, se incluyeron el aislado D14 caracterizado a lo largo del presente estudio, y los aislados clínicos 60 y 102 (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011); la cepa de laboratorio W303, cuyo comportamiento en cuanto a virulencia se muestra en los capítulos anteriores, se incluyó como control avirulento.

Una vez obtenidos los datos, éstos fueron normalizados y filtrados y se representaron como la media de los valores del triplicado de micromatrices para cada aislado. El ratio de Log_2 de Cy5/Cy3 para cada ORF se representó en su correspondiente posición cromosómica mediante el uso de la secuencia de la cepa de referencia de *S. cerevisiae* S288c y los mapas cromosómicos se generaron mediante el uso del programa Microsoft Office Excel. En la Figura 32, se muestra un mapa cromosómico que contiene la distribución genómica de todos los genes de cada una de las cepas estudiadas (60, 102, D14 y W303). La longitud de cada barra vertical es proporcional al valor del Log_2 del ratio entre la intensidad roja y la intensidad verde para cada gen. Si el ratio es mayor que 1 (valor de Log_2 positivo), la barra se encuentra sobre el cromosoma y representa una amplificación de ese gen en el aislado en estudio respecto a S288c. Por el contrario, si el valor del ratio es menor que 1 (valor de Log_2 negativo), la barra estará posicionada debajo del cromosoma, y representa una delección o una disminución en el número de copias de ese gen en la cepa de estudio respecto a S288c.

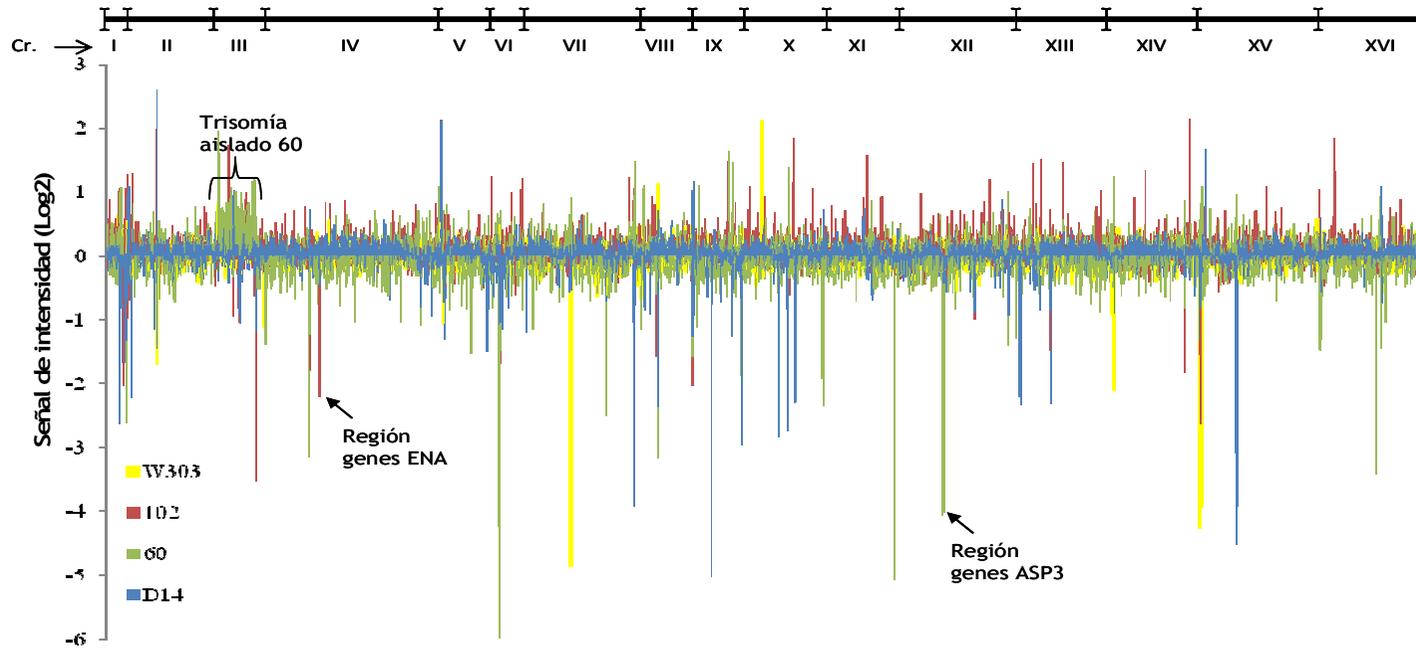


Figura 32. Mapa cromosómico correspondiente al aislado D14, aislado 60, aislado 102 y la cepa W303. La línea horizontal corresponde al eje del cromosoma; las líneas verticales orientadas hacia la parte inferior de este eje indican los genes en menor número de copias, mientras que las líneas verticales orientadas hacia la parte superior del eje indican los genes en mayor número de copias respecto a la cepa de referencia S288c.

Este mapa cromosómico obtenido (Figura 32) nos ofrece la posibilidad de conocer la variabilidad del genoma de estos aislados respecto a la cepa de referencia S288c y la cepa de laboratorio W303. En primer lugar, observamos que gran parte de las alteraciones presentes en el genoma de estas cepas corresponden a cambios relacionados con un menor número de copias de los genes en comparación con la cepa S288c, mientras que las amplificaciones de ORFs estaban en menor número, especialmente en la cepa de laboratorio W303.

La mayoría de las alteraciones se encontraban en las regiones subteloméricas de cualquiera de los 16 cromosomas; estas regiones presentaban diferentes extensiones, aunque la mayoría de ellas se ubicaban dentro de los 20 Kb del final del cromosoma; además, estas regiones suelen contener pocas ORFs que correspondan a genes con función anotada. Además, se observa que la variabilidad entre los aislados 60, 102 y D14 reside en la composición genómica de las zonas subteloméricas. En el aislado 60, se aprecia un mayor número de copias en la mayoría de genes del cromosoma III (Figura 32).

En la Figura 33 se representa el porcentaje de distribución de todos los genes significativos que sufrieron cambio en el número de copias, según fuera en la zona subtelomérica, en el centrómero o en el interior del brazo cromosómico. Al observar esta figura, se aprecia también que la mayoría de estos genes con cambio se encuentran en las zonas subteloméricas; por el contrario, cambios en ORFs cercanas al centrómero fueron prácticamente nulos. El resto de alteraciones encontradas, en menor número, se situaban en el interior del cromosoma. Cabe destacar que el porcentaje de ORFs que presentaban cambios fue similar en las zonas subteloméricas y en el brazo cromosómico en el aislado clínico 60; esto es probablemente debido a que este aislado presenta la mayoría de los genes del cromosoma III en mayor número de

copias (Figura 32), lo cual hace equilibrar el porcentaje entre genes encontrados con cambios entre las zonas subteloméricas y la zona interior del brazo del cromosoma; esta característica, además, le hace ser el aislado que presenta un mayor número de cambios en la composición genómica respecto al resto de aislados y a la cepa de referencia S288c.

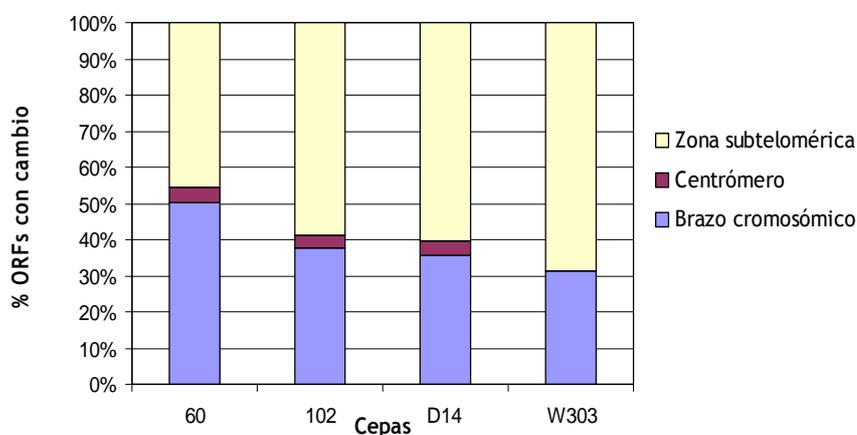


Figura 33. Distribución de las ORFs significativas con cambio en el número de copias dentro del cromosoma en cada una de las cepas estudiadas. Las ORFs elegidas para esta representación fueron únicamente las significativas y las que presentaban cambios en 1 o más copias.

También se observa que la cepa de laboratorio W303 presenta cambios respecto a la cepa S288c, aunque menores comparado con los aislados clínicos. Este resultado era esperable ya que W303 fue creada mediante cruces entre S288c y otras cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, por tanto, está relacionada directamente con S288c (Thomas y Rothstein, 1989); sin embargo, se observaron cambios muy significativos para las ORFs YEL070w (no caracterizada), YGL259w (no caracterizada),

YGL263w (codifica para el gen *COS12* que es de función desconocida y miembro de la subfamilia DUP380), YMR326c (función desconocida), YNR072w (codifica para el gen *HXT17* que es un transportador de hexosa) y YNR073c (posible manitol deshidrogenasa).

De todos los cambios que se observaron en cada una de las cepas, queríamos destacar la ausencia de las repeticiones en tandem de la región *ASP3*, localizada en el cromosoma XII del aislado clínico 60, además de la región *ENA*, situada en el cromosoma IV del aislado clínico 102, también en menor número de copias (indicadas en la Figura 32), respecto a la cepa de referencia S288c por ser variaciones que también se observaron en cepas vínicas y clínicas por Carreto y colaboradores (2008). Estas regiones incluyen los genes *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3* y *ASP3-4* y las ORFs *YLR156w*, *YLR159w*, *YLR161w* y *YLR162w*. El gen *ASP3* se repite al menos 4 veces en la cepa S288c para crear *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3* y *ASP3-4* y codifica para una L-asparaginasa II de la pared celular regulada por nitrógeno (Kim y col., 1988) y se induce en ausencia de nitrógeno (Bon y col., 1997). El resto de ORFs son de función desconocida, aunque se sabe que *YLR156w*, *YLR159w* y *YLR161w* son tres ORFs idénticas, y de *YLR162w* se conoce que una sobreexpresión de este gen causa arresto en el crecimiento de la levadura. Los genes *ENA1*, *ENA2* y *ENA5* codifican para una ATPasa que participa en el flujo de iones sodio y litio, necesarios para la tolerancia a sal. La cepa de referencia S288c presenta estos tres genes (Wieland y col., 1995).

Respecto a los cambios observados en el cromosoma III del aislado clínico 60, de todos los genes que se encuentran en este cromosoma en mayor número de copias, hemos destacado aquellos que podrían estar implicados en favorecer un aumento de su potencial patógeno o ayudar a sobrevivir dentro del huésped, detallados en la Tabla 23. Así que dentro de este grupo de genes, podemos encontrar genes que participan en la

biogénesis de ribosomas o en la biosíntesis de proteínas (*RPS14A*, *SRO9*, *KRR1*, *MRPL32*, *RRP7*, *IMG2*); genes encargados de la respuesta al estrés oxidativo como *TRX3* y *GRX1*; el gen *CIT2* (citrato sintasa) que interviene en el ciclo del glioxilato; genes que participan en el metabolismo de ácidos grasos (*FEN1*); genes que intervienen en la síntesis de aminoácidos (*ILV6*, *HIS4*), genes implicados en el metabolismo de carbohidratos (*PGK1*, *GLK1*), el gen *NFS1* que codifica para una cisteína desulfurasa involucrada en la biogénesis de cluster hierro-sulfuro (Fe/S), el gen *STE50* que codifica una proteína que participa en el crecimiento filamentoso e invasivo, el gen *POL4* que se encarga de la reparación del DNA y el gen *PHO87* que es un transportador de fosfato. Todos estos genes podrían proporcionarle una ventaja selectiva para el crecimiento frente a nuevos ambientes.

Tabla 23. Relación de los valores del Log₂ (Rojo/Verde) de los genes con mayor número de copias en el cromosoma III del aislado clínico 60

Gen	Cepas				Descripción
	D14	60	102	W303	
<i>ILV6</i>	0.053	0.696	0.348	0.105	Subunidad reguladora de acetolactato sintasa
<i>NFS1</i>	0.122	0.688	0.044	-0.035	Cisteína desulfurasa
<i>HIS4</i>	-0.029	0.677	0.280	-0.065	Histidinol deshidrogenasa
<i>RRP7</i>	0.123	0.542	0.125	-0.133	Proteína que participa en el procesamiento del rRNA y en la biogénesis de ribosomas
<i>STE50</i>	-0.091	0.660	0.060	0.005	Regulador de proteína quinasa
<i>GRX1</i>	0.073	0.830	-0.075	0.081	Oxidoreductasa disulfido
<i>SRO9</i>	0.021	0.559	0.215	0.115	Proteína de unión al RNA
<i>GLK1</i>	-0.038	0.619	0.482	-0.056	Glucocinasa
<i>CIT2</i>	0.035	0.691	0.117	-0.108	Citrato sintasa

Gen	Cepas				Descripción
	D14	60	102	W303	
<i>KRR1</i>	0.101	1.073	-0.002	0.162	Proteína implicada en la síntesis de rRNA
<i>MRPL32</i>	0.045	0.607	0.056	0.061	Componente estructural del ribosoma
<i>PGK1</i>	0.126	0.524	0.245	0.002	3-fosfoglicerato quinasa
<i>POL4</i>	0.176	0.554	-0.064	-0.128	DNA polimerasa
<i>RPS14A</i>	-0.014	0.991	-0.140	0.059	Componente estructural del ribosoma
<i>FEN1</i>	0.189	0.760	-0.146	0.130	Elongasa de ácidos grasos
<i>PHO87</i>	0.149	0.525	0.090	0.200	Transportador transmembrana de fosfato inorgánico
<i>IMG2</i>	-0.219	0.674	0.000	-0.007	Componente estructural del ribosoma
<i>TRX3</i>	0.049	0.816	-0.028	0.013	Tioredoxina

2.1. Características comunes en la composición genómica de los aislados virulentos

A continuación, se van a destacar los genes comunes en al menos dos de las cepas virulentas (60, 102 y D14), tanto en mayor como en menor número de copias, y que además, no se encuentran en la cepa de laboratorio W303. Los valores del Log_2 del ratio de la intensidad roja/intensidad verde de cada uno de los genes que comentamos se muestran en la Tabla 24 y en la Tabla 25.

En cuanto a los genes en mayor número de copias (Tabla 24), todos se localizaban en zonas subteloméricas, a excepción del gen *IMD3*. De todos los genes encontrados con estas características, cabe destacar los genes relacionados en el transporte y metabolismo de S-adenosilmetionina (*SAM3* y *SAM4*) por su implicación en la producción de

glutation, y los genes *IMD2* y *IMD3* que participan en la síntesis de nucleótidos y en el primer paso de la síntesis de GMP, implicado en la actividad oxidoreductasa. Este grupo de genes podría contribuir en la protección de la levadura frente a un estrés oxidativo a través de su implicación en la síntesis de glutatión y síntesis de GMP. Los genes *FDH2*, *SAM3*, *SAM4* y *IMD2* también se encontraron en mayor número de copias en cepas vínicas (Dunn y col., 2005). El resto de genes, a excepción del gen *MAL33* (activador de proteínas MAL) y el gen *SUC2* (invertasa), son de función desconocida (Tabla 24).

Respecto a los genes en menor número de copias en las cepas virulentas (Tabla 25), éstos superan en número a los genes que están presentes en un mayor número de copias, y aunque se pueden encontrar en el brazo del cromosoma, la mayoría se localizaban en zonas subteloméricas; de estos genes destacamos los que codifican para genes relacionados con el metabolismo de alcoholes, como *AAD6*, *AAD15*, *AAD3* y *AAD16*; el gen *BDS1* (sulfatasa) y el gen *FLO10* (floculina), ya que también se han visto que aparecen en menor número de copias en trabajos anteriores en la caracterización de cepas vínicas y clínicas (Dunn y col., 2005; Carreto y col., 2008).

En cuanto a los genes delecionados y localizados fuera de las regiones subteloméricas, encontramos los genes *CUP1-1*, *CUP1-2* y *RSC30*. Se sitúan en una región interna del cromosoma VIII. La cepa de referencia S288c presenta dos copias de *CUP1* que se sitúan en tándem. Entre estos tres aislados hay variabilidad en el número de copias de estos genes, presentando el aislado clínico 60 la deleción más fuerte, seguido del aislado clínico 102. El gen *CUP1* es una metalotioneína que participa en la unión al cobre y confiere resistencia a altas concentraciones de cobre y cadmio. La deleción de los genes *CUP1* ha sido observada también previamente en cepas vínicas (Pérez-Ortín y col., 2002a; Dunn y col.,

2005; Carreto y col., 2008). El gen *RSC30* aparece en los aislados D14 y 102 en menor número de copias, y interviene en el remodelado de la cromatina; los genes *PRM8*, *MST27* y *MST28*, que forman parte de la familia génica DUP240 e intervienen en la organización del transporte vesicular, y el gen *URA3* (orotidina 5-fosfato descarboxilasa) que interviene en la biosíntesis de novo de pirimidinas, también son genes que se encuentran en menor número de copias y se localizan en regiones internas del cromosoma.

Tabla 24. Genes con mayor número de copias en los aislados clínicos 60 y 102 y en el aislado dietético D14

Gen	Cepas				Descripción
	D14	60	102	W303	
<i>SAM3</i>	1.075	0.972	1.096	0.136	Permeasa de alta afinidad por S-adenosilmetionina
<i>SAM4</i>	0.662	0.913	0.775	-0.117	S-adenosilmetionina-homocisteína metiltransferasa
<i>IMD2</i>	1.040	0.540	0.568	0.394	Inosina monofosfato deshidrogenasa
<i>IMD3</i>	0.884	0.190	0.691	0.192	Inosina monofosfato deshidrogenasa
<i>FDH2</i>	0.619	-1.435	0.519	0.128	Formato deshidrogenasa NAD(+)-dependiente
<i>MAL33</i>	0.177	1.949	0.966	0.210	Activador de proteínas MAL
<i>PAU8</i>	-0.144	1.070	0.500	0.417	Proteína de función desconocida
<i>YAL066w</i>	0.182	0.990	1.056	0.023	Proteína de función desconocida
<i>YAR064w</i>	0.671	0.364	1.275	0.168	Proteína de función desconocida
<i>SEO1</i>	0.034	0.775	0.942	0.223	Posible permeasa

Gen	Cepas				Descripción
	D14	60	102	W303	
<i>YBR300c</i>	0.074	0.603	0.815	0.220	Proteína de función desconocida
<i>SUC2</i>	-0.052	1.633	1.241	0.302	Invertasa
<i>YGR293c</i>	-0.118	1.490	0.759	0.436	Proteína de función desconocida
<i>YOL160w</i>	0.074	0.961	0.769	0.464	Proteína de función desconocida
<i>YOL159c</i>	0.010	0.840	0.679	0.149	Proteína soluble de función desconocida
<i>YPR196w</i>	0.225	1.418	0.500	0.139	Posible factor de transcripción de respuesta a maltosa

Los datos mostrados en esta tabla para cada gen son la media del Log_2 (Rojo/Verde) de tres ensayos independientes. Genes indicados en negrita se encuentran en mayor número de copias en los tres aislados virulentos analizados. El resto de genes sólo en dos de los tres aislados virulentos (60, 102 y D14).

Tabla 25. Genes con menor número de copias en los aislados clínicos 60 y 102 y en el aislado D14

Gen	Cepas				Descripción
	D14	60	102	W303	
<i>CUP1-1</i>	-0.906	-3.172	-1.447	0.431	Metalotioneína
<i>CUP1-2</i>	-0.723	-2.704	-1.374	1.126	Metalotioneína
<i>AAD16</i>	-0.539	-3.405	-0.568	-0.103	Posible alcohol deshidrogenasa
<i>AAD15</i>	-1.700	0.043	-1.237	0.035	Posible alcohol deshidrogenasa
<i>AAD6</i>	-1.076	-1.601	-0.467	0.468	Posible alcohol deshidrogenasa
<i>AAD3</i>	-1.200	0.125	-1.502	0.120	Posible alcohol deshidrogenasa

Gen	Cepas				Descripción
	D14	60	102	W303	
AGP3	0.065	-5.274	-0.599	0.199	Permeasa de aminoácidos de baja afinidad
DDI2	0.112	-1.045	-1.454	0.269	Proteína de función desconocida
MST28	-0.749	-0.093	-0.612	0.236	Posible proteína de membrana involucrada en formación de vesículas
DAK2	0.184	-4.236	-0.817	0.271	Dihidroxiacetona quinasa
FLO10	0.070	-4.441	-2.403	0.060	Miembro de la familia FLO
HXT15	0.385	-1.242	-0.936	-0.023	Proteína de función desconocida con similitud a transportador de hexosa
MPH2	0.656	-2.047	-1.527	0.354	Alfa-glucósido permeasa
MST27	-0.741	-0.059	-0.577	0.046	Posible proteína de membrana involucrada en formación de vesículas
URA3	-0.947	-0.886	-0.629	-0.222	Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa
BDS1	-3.601	-0.696	-3.285	0.266	Sulfatasa
NFT1	-0.056	-5.062	-3.902	-0.007	Posible transportador de la subfamilia MRP
RSC30	-0.660	-0.045	-0.773	0.091	Componente del complejo RSC de remodelado de la cromatina
SNO2	0.154	-0.846	-1.833	0.107	Proteína de función desconocida
SNO3	0.239	-1.489	-1.684	0.237	Proteína de función desconocida
PAU21	-0.579	0.060	-0.658	0.156	Proteína de función desconocida, miembro de la familia multigénica seripauperina
PAU3	-0.567	0.606	-0.517	0.230	Proteína de función desconocida, miembro de la familia multigénica seripauperina

Gen	Cepas				Descripción
	D14	60	102	W303	
SOR2	0.735	-0.789	-1.783	0.075	Proteína de función desconocida
PRM8	-0.693	-0.843	-0.512	0.269	Feromona regulada por proteína
YAL064w	-1.717	-0.164	-2.072	0.518	Proteína de función desconocida
YAR053w	-1.087	-1.703	-2.032	0.234	Proteína de función desconocida
YAR060c	-1.347	-1.403	-1.742	0.386	Proteína de función desconocida
YAR061w	-1.229	-2.604	-1.815	0.131	Pseudogen con similitud a Flo1p
YAR062w	-0.696	0.453	-0.965	0.515	Pseudogen con similitud a Flo1p
YER188w	-1.495	-0.297	-1.211	0.149	Proteína de función desconocida
YFL054c	0.056	-5.981	-0.793	0.271	Posible canal similar a Fps1p
YGL052w	-1.210	-0.642	-0.857	0.255	Proteína de función desconocida
YHR054c	-2.385	-2.689	-2.914	0.790	Proteína de función desconocida
YOL162w	-4.509	-0.641	-3.671	0.008	Proteína de función desconocida
YOL166c	-3.912	-0.485	-2.465	0.158	Proteína de función desconocida

Los datos mostrados en esta tabla para cada gen son la media del Log_2 (Rojo/Verde) de tres ensayos independientes. Genes indicados en negrita se encuentran en menor número de copias en los tres aislados virulentos analizados. El resto de genes sólo en dos de los tres aislados virulentos (60, 102 y D14).

2.2. Confirmación de la técnica de micromatrices de DNA

2.2.1. Comprobación del número de copias génicas mediante PCR cuantitativa

Con la intención de confirmar si el resultado obtenido mediante las micromatrices era correcto, se eligieron 4 genes (*IMD2*, *IMD3*, *SAM3* y *CUP1*) para cuantificar el número de copias génicas presentes en los aislados virulentos mediante la técnica de PCR cuantitativa. Para ello se obtuvo el DNA de un mismo número de células de cada uno de los aislados (60, D14 y 102), de manera que, al comparar la cantidad de DNA amplificado para un determinado gen en comparación a una cepa diploide (W303) y una cepa haploide (S288c), se podía cuantificar el número de copias génicas para dicho gen. En el caso de *IMD2* y *SAM3*, donde se encontraban estos genes alterados en mayor número de copias en las tres cepas virulentas (60, 102 y D14), se observa lo mismo al aplicar esta técnica, siendo el número de copias mayor que W303 y S288c, como se observa en la Figura 34. El gen *IMD3* solamente se encontró en mayor número de copias en los aislados 102 y D14, coincidiendo con los resultados obtenidos mediante las micromatrices. Por último, el gen *CUP1* se observó en menor número de copias en las tres cepas mediante la técnica de micromatrices de DNA, y así fue para el caso de los aislados 60 y D14 que prácticamente tienen este gen delecionado, mientras que el aislado 102 mostró 1 copia de este gen, igual que S288c. Una posible explicación de este resultado podría ser que en este aislado este gen tuviera una copia incompleta que no hibridara bien con la micromatriz, y por tanto, diera un resultado menor a 1 copia.

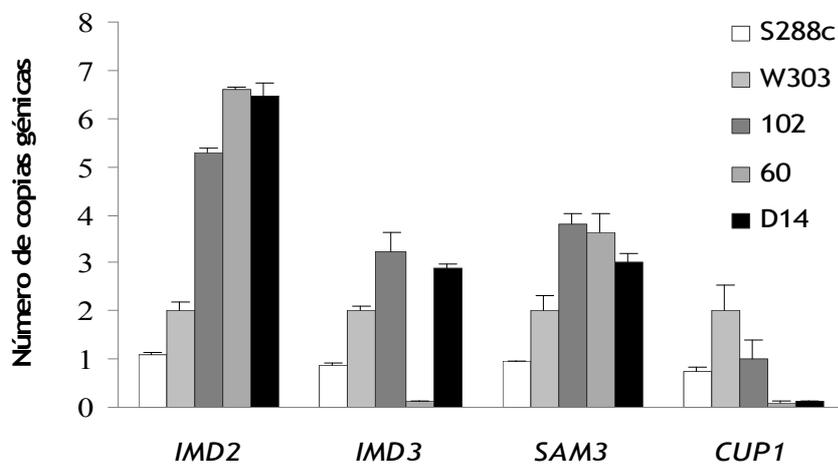


Figura 34. Determinación del número de copias génicas de los genes *IMD2*, *IMD3*, *SAM3* y *CUP1* en las cepas no virulentas (W303 y S288c) y en los aislados virulentos (60, 102 y D14). En la gráfica se representan el valor promedio de tres ensayos independientes y la desviación estándar.

2.2.2. Determinación del crecimiento a diferentes concentraciones de cobre

Otra forma de determinar que realmente los aislados virulentos tenían prácticamente ausente en su genoma la presencia del gen *CUP1*, fue llevando a cabo un ensayo de determinación del crecimiento en un medio a diferentes concentraciones de cobre.

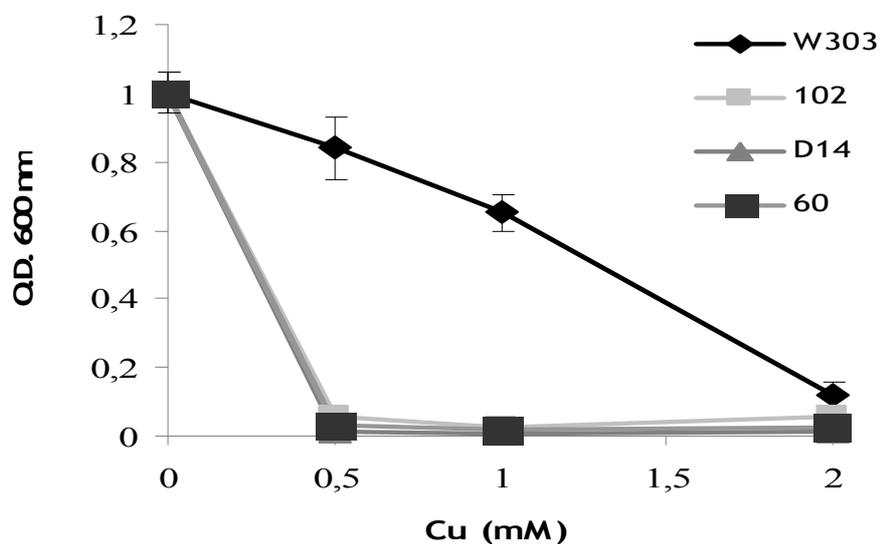


Figura 35. Determinación del crecimiento de la cepa W303 y los aislados 60, 102 y D14 en un medio con diferentes concentraciones de cobre. Los valores representan el promedio de tres ensayos independientes y la desviación estándar.

El gen *CUP1* codifica para una metalotioneína que une cobre y confiere resistencia a altas concentraciones de cobre, por tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados previos mediante micromatrices de DNA, nuestros aislados deberían ser incapaces de crecer en un medio rico en cobre debido a la ausencia de este gen. Esto es, efectivamente, lo que se observa en la Figura 35, donde los aislados virulentos son capaces de crecer en un medio con ausencia de cobre, pero en el momento que el cobre es añadido este crecimiento decrece hasta valores de prácticamente 0. Por el contrario, la cepa W303 es capaz de crecer a las concentraciones de 0.5 y 1 mM, mientras que a la concentración de 2 mM su crecimiento es también ausente (Figura 35).

3. Discusión

3.1. Citometría de flujo

Mediante la técnica de la citometría de flujo se puede conocer la ploidía de una cepa, aunque si la aneuploidía no es muy fuerte es difícil saber cuántos cromosomas están afectados. Sin embargo, mediante la técnica de hibridación de micromatrices de DNA, se puede detectar a qué cromosomas afecta esta aneuploidía, e incluso postular duplicaciones de genes concretos (Bond y col., 2004). Según el valor de ploidía obtenida para los aislados de este estudio, el aislado D14 y el aislado clínico 60 podían ser aneuploides, aunque tanto el valor de 2.05 para D14, como el valor de 2.11 para el aislado 60 son indicativos de un bajo nivel de aneuploidía. Sin embargo, finalmente, mediante la técnica de micromatrices de DNA hemos comprobado que sólo presenta aneuploidía el aislado 60 en el cromosoma III, lo cual correspondería a una ploidía esperada de más de 2.11 (dos copias para todos los cromosomas y tres para un cromosoma, en este caso el III), por tanto, los valores mayores a 2 observados por citometría de flujo en el resto de cepas nos estarían indicando ciertas duplicaciones de genes.

Otro dato que nos indica que estos aislados son diploides y homotáticos es su alta eficiencia de esporulación y la alta viabilidad de las esporas. Por otro lado, el aislado 60 formó ascas que en su interior contenían 2, 3 y 4 esporas, pero muchas de ellas no eran viables. La presencia de diferente número de ascosporas en las ascas se ha relacionado en la bibliografía con fenómenos de aneuploidía (Barrio y col., 2006) y esto ha sido observado varias veces en las cepas industriales de *S. cerevisiae*, por tanto, es otro dato indicativo de la aneuploidía del aislado clínico 60. En un estudio reciente se ha demostrado mediante el

genotipado con microsatélites que los aislados clínicos pueden ir de haploides a tetraploides (Muller y McCusker, 2009b), como ya se sabe que ocurre también en cepas vínicas, cerveceras, panaderas y ambientales (Ezov y col., 2006). Se ha demostrado que las aneuploidías pueden proporcionar una ventaja selectiva a la cepa (Hughes y col., 2000). Otro trabajo muestra que *S. cerevisiae* puede controlar y mantener la aneuploidía a un nivel individual de cromosoma (Waghmare y Bruschi, 2005). Una razón importante para el mantenimiento de la ploidía debe ser la ventaja selectiva que proporciona a la levadura la presencia de copias extra de un gen o genes presentes en el cromosoma duplicado (Schatz y col., 1986; Adams y col., 1992). Por ejemplo, en *C. albicans*, también se ha propuesto la aneuploidía como una característica que proporciona ventaja selectiva sobre ciertas condiciones ambientales, como es la adaptación de las células a la utilización de L-sorbosa como fuente secundaria de carbono mediante una pérdida reversible del cromosoma V (Janbon y col., 1998 y 1999). *S. cerevisiae* var. *boulardii* presenta una trisomía en el cromosoma IX, donde se encuentran genes relacionados con la síntesis de proteínas y genes de respuesta a estrés, que le pueden proporcionar una mayor tasa de crecimiento, un mayor crecimiento pseudohifal y una mejor supervivencia a pH ácido (Edwards-Ingram y col., 2007). Un aumento en el número de copias en el cromosoma III del aislado 60 podría tener un efecto positivo en su potencial patógeno.

3.2. Composición genómica de las cepas virulentas

Mediante la comparación de los genomas correspondientes a dos cepas diferentes (como por ejemplo, una cepa vínica y una cepa de laboratorio) se puede llegar a determinar deleciones, duplicaciones o

recombinaciones (Pérez-Ortín y col., 2002a). Las reordenaciones estructurales del genoma se pueden clasificar en inserciones, deleciones, inversiones, variaciones en el número de copias, translocaciones y transposiciones. Aunque no se conoce en todos los casos el efecto de estos cambios genéticos y su relación con cambios fisiológicos.

El genoma de *S. cerevisiae* evoluciona a través de procesos dinámicos y con frecuencia contiene duplicaciones de genes y deleciones o incluso reorganizaciones cromosómicas. Muchos estudios han demostrado que las reordenaciones cromosómicas pueden tener lugar en los organismos durante la adaptación a nuevos ambientes. Un ejemplo de ello es el que presentan Dunham y colaboradores (2002), donde vieron que la cepa de laboratorio S288c sufrió amplificaciones y deleciones génicas cuando fue crecida en un cultivo limitante de glucosa durante un número relativamente corto de generaciones (100-500), lo que condujo a la adquisición de características ventajosas. Las secuencias flanqueantes con elementos transponibles generaron esta variabilidad en el genoma de *S. cerevisiae*, probablemente debido a la recombinación ectópica que implica secuencias repetitivas de elementos Ty, desde que estos elementos juegan un papel en la movilización de fragmentos genómicos a través de todo el genoma, resultando frecuentemente en reordenaciones cromosómicas y duplicaciones génicas (Dujon, 2006). Cepas industriales de levadura también parecen mostrar una evolución adaptativa, ya que Pérez-Ortín y colaboradores (2002b), mostraron que una cepa vínica presentaba resistencia a sulfito como resultado de un reordenamiento cromosómico entre los cromosomas XVI y VIII. Aunque algunos cambios genómicos observados en las levaduras pueden ser pequeños (de uno a pocos nucleótidos), muchos cambios pueden afectar a genes enteros o incluso cromosomas enteros, dando como resultado alteraciones en el número de copias (Hughes y col., 2000; Dunham y col. 2002).

En nuestro caso, la alta variabilidad fue asociada a las regiones subteloméricas de prácticamente todos los cromosomas y tanto en el aislado dietético D14 como en los aislados clínicos 60 y 102. La inestabilidad genómica ocurre, generalmente, en todo el genoma, pero es más frecuente en algunas regiones particulares, como en la cercanía a elementos Ty, debido a translocaciones recíprocas o a regiones subteloméricas, posiblemente causadas por la alta frecuencia de recombinación ectópica (Liti y col., 2005). Los genes situados en las regiones subteloméricas o teloméricas pueden sufrir un entrecruzamiento desigual intercromosómico o conversión génica a través de secuencias subteloméricas dispersas compartidas entre los finales de los cromosomas (Mortimer, 2000), provocando fácilmente cambios en el número de copias. Estudios comparativos del genoma llevados a cabo por Winzeler y colaboradores (2003) demostraron que la variabilidad genómica entre especies está predispuesta hacia las regiones subteloméricas, donde se encuentran los genes relacionados con el metabolismo y transporte de los carbohidratos. Aparentemente, la variabilidad en el telómero es importante para adaptarse a nuevos ambientes, a diferentes fuentes metabólicas, y así, poder superar el estrés ambiental.

También, en otro estudio se ha visto que las cepas clínicas mostraron un alto porcentaje de ORFs delecionadas cerca de los telómeros (Carreto y col., 2008), al igual que ocurre en nuestras cepas de estudio. Otras cepas no vínicas y de laboratorio diferentes a S288c también presentan alteraciones, generalmente deleciones, en las zonas subteloméricas de genes relacionados con el metabolismo de azúcares (Winzeler y col., 2003). Por tanto, nuestros datos sugieren que la recombinación telomérica fue el principal mecanismo que generó diversidad en el genoma de estos tres aislados virulentos.

Las diferencias genómicas que existen entre estos diferentes aislados y entre éstos y la cepa de laboratorio, tanto W303 como S288c deben ser consecuencia de presiones selectivas que se han encontrado durante su propagación en sus diferentes medios. Por tanto, esta variabilidad puede tener un impacto positivo en la adaptación de las cepas durante la colonización de nuevos ambientes, hecho bastante probable en las cepas clínicas.

Cabe añadir que la técnica de hibridación de micromatrices de DNA es una herramienta útil para analizar la estructura de las cepas clínicas de *S. cerevisiae*, pero también es verdad que puede que no haya tenido en cuenta todas las variaciones genómicas, porque puede haber errores técnicos, como que la secuencia en la micromatriz de S288c no sea 100% homóloga a la que contienen nuestros aislados en estudio (la hibridación generalmente ocurre entre moléculas de DNA con un 75% o más de secuencia idéntica), y por supuesto, no podemos tener en cuenta las mutaciones puntuales, ya que éstas no pueden ser detectadas mediante esta técnica, y que pueden generar pseudogenes no funcionales o alteraciones en la función de la proteína que podría explicar mejor las diferencias fenotípicas entre estos tres aislados. Además, los aislados clínicos 60 y 102 y el aislado dietético D14 pueden contener genes adicionales que no pueden ser detectados mediante esta técnica porque los puntos de hibridación de la micromatriz fueron diseñados mediante la secuencia genómica de la cepa de referencia S288c. Para confirmar esta hipótesis se necesitaría llevar a cabo estudios adicionales, como una hibridación sustractiva de DNA o una secuenciación del genoma de los aislados clínicos o D14, como ya se ha hecho con la cepa clínica YJM789 (Wei y col., 2007) y que nuestro laboratorio está abordando en estos momentos con los aislados clínicos usados en este trabajo. En su secuenciación se vio que había 165 ORFs ausentes en S288c a causa de

codones de stop tempranos o por la ausencia de codones de iniciación, generados por SNPs o por elementos Ty. No obstante, con la técnica de hibridación de micromatrices de DNA, se puede obtener una información sobre la estructura genómica de las cepas de levadura. Por otra parte, hemos llevado a cabo una confirmación de estos resultados mediante la técnica de PCR cuantitativa, verificando la fiabilidad de nuestros resultados.

3.3. Cambios comunes en el genoma de los aislados virulentos

Una región común delecionada en los tres aislados potencialmente virulentos fue la *CUP1*. Dunn y colaboradores (2005) consideraron esta región como una zona delecionada que caracteriza a cepas vínicas comerciales; sin embargo, ellos encontraron variabilidad en el número de copias de estos genes dentro de los aislados de una misma cepa vínica comercial. También observaron que estos genes estaban ausentes en la mayoría de las cepas vínicas. Este locus es amplificado variablemente en diferentes cepas de levadura (Karin y col., 1984; Winge y col., 1985), y no es exclusivo de cepas vínicas, aunque la deleción de los genes *CUP1* ha sido observada también previamente en una cepa vínica (Pérez-Ortín y col., 2002a). El gen *CUP1* se considera un gen de respuesta a droga, ya que las cepas vínicas donde este gen estaba ausente presentaban hipersensibilidad a metil sulfometuron (Dunn y col., 2005). *S. cerevisiae* var. *boulardii* también presenta menos copias del gen *CUP1*, lo cual le hace ser más sensible a concentraciones de iones cobre que la cepa salvaje (Edwards-Ingram y col., 2007), como se ha visto también en nuestros aislados al crecerlos en medio en presencia de cobre (Figura 35). También se ha visto que la fuerte expresión de este gen ha sido implicada en la resistencia a azoles (Barker y col., 2003), lo que indica que, además

de jugar un papel en la respuesta a drogas, interviene en la detoxificación por cobre. En la bibliografía no se ha descrito ningún papel beneficioso de la ausencia de esta región en cepas clínicas de *S. cerevisiae*.

Los genes *IMD2* y *IMD3*, que se encuentran en un mayor número de copias, codifican ambos para una inosina monofosfato deshidrogenasa y confieren resistencia al ácido micofenólico, el cual es producido por el hongo *Penicillium stoloniferum* (McPhillips y col., 2004). Estos genes participan frente a la resistencia a compuestos que inhiben la proliferación de células eucariotas. Su mayor número de copias podría ofrecer una ventaja para competir en diferentes ecosistemas en presencia de otros organismos que secreten el ácido micofenólico o cicloheximida como un inhibidor del crecimiento. Nosotros también hipotetizamos que este aumento en el número de copias en los genes que participan en la síntesis de nucleótidos puede favorecer la reparación del daño causado en el DNA que es provocado por especies reactivas de oxígeno cuando la levadura es atacada por las células fagocitarias, aumentando así la resistencia al estrés oxidativo por parte de los aislados clínicos.

Por otra parte, los genes *SAM3* y *SAM4* que codifican ambos una permeasa de alta afinidad por S-adenosilmetionina, la cual es necesaria para la utilización de S-adenosilmetionina como fuente de sulfuro, también se vio incrementado su número de copias génicas en las cepas virulentas. Se ha visto que la adición de este compuesto en células sometidas a un estrés oxidativo aumenta la supervivencia celular a través de la producción de glutatión mediante la ruta de transsulfuración (Malakar y col., 2008), por tanto, la expresión de este gen podría conferir resistencia frente a estrés oxidativo en nuestros aislados y aumentar la supervivencia de la levadura cuando es atacada por las células fagocitarias presentes en la sangre.

En los aislados clínicos 60 y 102, y en el aislado dietético D14, no se observaron alteraciones en el número de copias de genes asociados a patogénesis, tal y como se ha descrito para *C. albicans*, como genes que participan en el crecimiento pseudohifal o en la capacidad de adherir e invadir. Estos estudios fueron confirmados previamente por Klingberg y colaboradores (2008), que no encontraron factores específicos de virulencia que diferenciaran cepas clínicas de no clínicas, argumentando que las condiciones encontradas en el hospedador eran más importantes para el establecimiento de la infección que las características de la levadura en sí. Sin embargo, en nuestro grupo (de Llanos y col., 2006b) se observó que los aislados clínicos presentaban un fenotipo patogénico típico en comparación con cepas industriales, como por ejemplo, la secreción de proteasas y fosfolipasas, crecimiento a altas temperaturas (39 y 42°C) y crecimiento pseudohifal. En otro estudio reciente llevado a cabo por Muller y colaboradores (2011), identificaron varios locis genéticos asociado a cepas clínicas de *S. cerevisiae*, indicando la importancia del crecimiento pseudohifal, el mantenimiento de la pared celular y la detoxificación celular para la patogénesis de *S. cerevisiae*.

El genoma de *C. albicans* muestra un alto grado de plasticidad. Esta plasticidad incluye reordenaciones cromosómicas, aneuploidías y pérdida de heterocigosis (Magee, 2007; Rustchenko, 2007; Larriba y Calderone, 2008). Estas variaciones en la organización cromosómica y en el número de copias génicas son mecanismos comunes usados por levaduras patógenas para generar rápidamente diversidad en respuesta a condiciones de crecimiento estresante, como por ejemplo, exposición a drogas antifúngicas (Selmecki y col., 2010) y como medida de adaptación.

Trabajos recientes han revelado la cantidad de variaciones fenotípicas y genéticas que aparecen en cortos períodos de tiempos en aislados de *C. albicans* tras pasar por un hospedador mamífero (Forche y

col., 2005 y 2009). Sin embargo, un estudio reciente examinó y comparó los perfiles transcripcionales de dos cepas de *C. albicans* virulentas y muy cercanas filogenéticamente durante una infección *in vivo* y encontraron un mínimo solapamiento entre sus transcriptomas. Esto sugiere que gran parte de la regulación génica observada durante el establecimiento de una infección puede no ser esencial para la virulencia de esta levadura (Walker y col., 2009). En la levadura *S. cerevisiae* se desconoce si existen reorganizaciones cromosómicas tras su paso por el hospedador.

Nuestros datos podrían sugerir que los cambios en el número de copias génicas que hemos encontrado en los aislados virulentos podrían conferirles una ventaja a la hora de adaptarse al ambiente del hospedador; sin embargo, por otra parte, desconocemos si la causa de la virulencia diferencial de estos aislados de *S. cerevisiae* es debida a la ausencia y/o presencia de determinados genes específicos, o más bien a una expresión diferencial de genes comunes que la levadura pueda usar cuando se encuentra dentro de un hospedador. Esto por ejemplo, ocurre cuando se comparan dos cepas clínicas de *C. albicans*, donde no se observan grandes cambios genotípicos, pero sí fenotípicos (Thewes y col., 2008). Por otro lado, Bond y colaboradores (2004), vieron que no existía una mayor expresión de los genes que presentaban un mayor número de copias, lo que sugería que tenía lugar algún mecanismo de compensación génica para controlar la expresión de estos genes en estas cepas, que es lo mismo que puede que ocurra en el cromosoma III del aislado clínico 60. De todos modos, para ver si realmente estos genes con mayor número de copias también se observa aumentada su expresión, y por tanto, son decisivos en el establecimiento de una infección, sería necesario llevar a cabo un modelo de infección en sangre, como se abordará en el siguiente capítulo de esta tesis.

3.4. Posible origen de los aislados virulentos

En este estudio se ha visto que tanto los aislados clínicos 60 y 102, como el aislado dietético D14 contienen genes en mayor o menor número de copias que también lo están en cepas vínicas, por tanto, podrían tener estos aislados cierta relación filogenética con cepas vínicas. Por ejemplo, genes como *FDH2*, *SAM3*, *SAM4*, *AAD15*, *BDS1*, *CUP1-1*, *CUP1-2* y *RSC30* está incluidos dentro del grupo de genes que etiquetan a una cepa como vínica, según Dunn y colaboradores (2005), aunque habría que destacar que en este artículo solo tuvieron en cuenta para el estudio cepas vínicas procedentes de Francia. Por otra parte, los genes *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3* y *ASP3-4*, y los genes *ENA1*, *ENA2* y *ENA5* también se han visto en cepas vínicas y clínicas (Carreto y col., 2008), aunque también hay que decir que estos cambios se han observado en otras cepas industriales u otras cepas de laboratorio diferentes a S288c (Lashkari y col., 1997; Primig y col., 2000; Hauser y col., 2001; Daran-Lapujade y col., 2003; Winzeler y col., 2003; Bond y col., 2004; Edwards-Ingram y col., 2004), por tanto, no sería determinante asociar un origen vínico a las cepas clínicas.

Por otra parte, Carreto y colaboradores (2008) vieron que la composición en número de elementos Ty en las cepas clínicas era muy similar a S288c, mientras que en las cepas vínicas que analizaron difería más, por tanto, plantearon que quizás las cepas clínicas y la cepa de laboratorio S288c podrían compartir un ancestro común, aunque la diversidad genética entre cepas patógenas de *S. cerevisiae* es grande y un origen común es improbable (Muller y McCusker, 2009b).

También se ha visto que cepas virulentas de *S. cerevisiae* están filogenéticamente relacionadas con cepas cepas vínicas, cerveceras y panaderas (de Llanos y col., 2006a; Schacherer y col., 2009). Por otro lado, Muller y McCusker (2009b) observaron, además, que no existía

ninguna diferencia significativa en la composición de microsatélites y la ploidía y la diversidad genética entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae*, y estudios de polimorfismo en aislados clínicos no consiguieron relacionarlos entre sí ni asociarlos a ningún origen geográfico o nicho ecológico específico, indicando la gran diversidad genética entre cepas virulentas de *S. cerevisiae*. Por tanto, en base a estas observaciones parece poco probable la ocurrencia de un origen único para los aislados clínicos (Liti y col., 2009; Muller y McCusker., 2009b; Schacherer y col., 2009). Sin embargo, existen estudios que muestran justo lo contrario al demostrar que los aislados clínicos son genéticamente más diversos y diferentes de los aislados domésticos y vínicos debido a diferentes niveles de recombinación y diferenciación genética que podrían explicar su origen y mantenimiento (Diezmann y Dietrich, 2009). Otros estudios previos basados en el análisis de microsatélites y polimorfismos en la longitud de los cromosomas también mostraron una diferenciación genética significativa entre aislados clínicos y no clínicos de *S. cerevisiae* (Malgoire y col., 2005; Klingberg y col., 2008).

A la vista de estos trabajos, un único origen para estos aislados parece improbable y favorecería la idea de que muchos aislados pueden ser patógenos si se les presenta la oportunidad (de Llanos y col., 2006a; Klingberg y col., 2008), reflejando una tendencia de la alta plasticidad fenotípica entre los patógenos fúngicos oportunistas (Rypien y col., 2008).

Capítulo 4

Identificación de posibles genes implicados
en la virulencia de *Saccharomyces
cerevisiae*

En capítulos anteriores, se muestra que no todas las cepas de *S. cerevisiae* poseen los mismos rasgos de virulencia ni la misma habilidad para alojar y persistir en un modelo murino de infección sistémica. Tampoco poseen exactamente la misma composición genómica, lo cual les podría conferir una ventaja selectiva de adaptación frente a nuevos ambientes. Resultaría de gran interés conocer si las diferencias genómicas encontradas entre estas cepas se traducen en una expresión diferencial de ciertos genes, ya que esto explicaría las diferencias de comportamiento y probaría la existencia de que no todas las cepas tienen las mismas aptitudes para adaptarse y sobrevivir en hospedadores mamíferos. Además, es esperable que la identificación de posibles genes implicados en la virulencia de *S. cerevisiae* aporte información interesante a los escasos conocimientos que, hasta el momento, se tienen acerca de los mecanismos que median durante el desarrollo de la infección en esta especie de levadura.

Por todo ello, se decidió abordar el estudio comparativo de los perfiles de expresión entre cepas virulentas y avirulentas de *S. cerevisiae*. Puesto que la diseminación de cualquier microorganismo en el torrente sanguíneo constituye una etapa esencial en el desarrollo de la infección sistémica, se utilizó sangre humana para llevar a cabo las incubaciones. En el caso de *S. cerevisiae*, el hecho de que algunas cepas hayan sido aisladas de la sangre de hospedadores humanos (Herbrecht y Nivoix, 2005; Muñoz y col., 2005; de Llanos y col., 2006a; Swinne y col., 2009) hace pensar que estas condiciones experimentales son adecuadas para imitar una infección sistémica por esta levadura.

1. Supervivencia de las cepas de la levadura en sangre total y en sus fracciones (PMN o MNC)

El objetivo de este experimento era estudiar si el uso de sangre, en este caso humana, constituye un sistema idóneo para mimetizar *in vitro* la infección sistémica en la levadura *S. cerevisiae*. Además, se estudió la influencia de sus distintas fracciones, en concreto MNCs (linfocitos y monocitos) y PMNs (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) sobre la supervivencia. El estudio se llevó a cabo con cepas establecidas previamente como virulentas y avirulentas. En concreto, como cepas virulentas se incluyeron el aislado dietético D14 caracterizado a lo largo del presente estudio, el aislado clínico 60 (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011) y el agente bioterapéutico Ultralevura® (*S. cerevisiae* var. *boulardii*) (McCullough y col., 1998b; de Llanos y col., 2011); la cepa de laboratorio W303, cuyo comportamiento en cuanto a virulencia se muestra en los capítulos anteriores, fue incluida como control avirulento. Los resultados se compararon con los de una cepa patógena de *C. albicans* (SC5314). En la Tabla 26 se muestran los porcentajes de supervivencia obtenidos tras incubar cada cepa en sangre y en sus diferentes fracciones a la temperatura de 37°C y como puede verse, la supervivencia de la cepa usada como avirulenta (W303) fue claramente inferior a la mostrada por la cepa patógena, salvo en sangre tras 10 min. de incubación.

En lo que respecta a los aislados del estudio, a los 10 min. de incubación en sangre total, se observó que, aunque todas las cepas presentaron una supervivencia mayor que el control negativo (W303), únicamente fue significativamente superior el valor presentado por la cepa 60, que presentó un valor próximo al 100% (equivalente a la supervivencia de *C. albicans* SC5314). La supervivencia de todas las cepas disminuyó a los 60 min. de incubación y fue significativamente superior a

la de W303 en todos los casos. Cabe resaltar que Ultralevura[®], el aislado clínico 60 y el aislado dietético D14 no mostraron diferencias significativas en comparación con la cepa *C. albicans* SC5314 a ninguno de los dos tiempos de incubación.

Tabla 26. Supervivencia de las diferentes cepas de levadura en sangre y sus fracciones sanguíneas

Especie	C.	S.	S.	S.	S.	
	<i>albicans</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>boulardii</i>	<i>cerevisiae</i>	
Cepa	SC5314	60	D14	Ultralevura [®]	W303	
10 min	Sangre	87.4 ± 8.7	98.8 ± 8.7*	76.5 ± 13.8	76.0 ± 13.8	66.0 ± 11.2
	PMN	81.0 ± 5.6**	84.0 ± 6.3***	37.3 ± 7.3##	35.3 ± 6.3###	34.8 ± 6.3
	MNC	96.4 ± 5.8*	83.9 ± 4.9	95.5 ± 6.5*	98.0 ± 6.5*	72.7 ± 7.5
60 min	Sangre	56.4 ± 3.7**	56.4 ± 3.7**	60.5 ± 5.8*	60.0 ± 5.8*	35.7 ± 4.8
	PMN	52.7 ± 3.8***	48.3 ± 5.0**	17.5 ± 5.0###	14.0 ± 5.0###	22.1 ± 3.8
	MNC	85.2 ± 3.9***	67.3 ± 3.6*,##	63.3 ± 5.1*,##	57.3 ± 4.4##	49.0 ± 4.4

Los valores representan el porcentaje de supervivencia ($UFC_{recuperadas}/UFC_{plasma}$) x 100 y corresponden a la media de al menos tres repeticiones.

Las diferencias que resultaron significativas al comparar cada cepa con W303 se indican de la siguiente manera: * p < 0.05, ** p < 0.005 y ***p < 0.0001.

Las diferencias que resultaron significativas al comparar cada cepa con SC5314 (*C. albicans*) se indican de la siguiente manera: # p < 0.05, ## p < 0.005 y ### p < 0.0001.

Cuando las células fueron incubadas en la fracción PMN, la cepa 60 mostró un porcentaje de supervivencia equivalente al de *C. albicans* SC5314 a ambos tiempos. Sin embargo, las cepas D14 y Ultralevura[®] mostraron un comportamiento diferente al de *C. albicans*, con valores de supervivencia equivalentes a los de W303 a 10 y 60 min.

En la fracción MNC, a los 10 min. de incubación, sólo la cepa Ultralevura[®] y la cepa D14 presentaron una tasa de supervivencia

significativamente mayor a la de la cepa W303. Por otro lado, los valores de estas dos cepas, junto con la cepa 60, fueron equivalentes a los presentados por *C. albicans* SC5314 ($p > 0.05$). A los 60 min. de incubación en esta fracción, las cepas Ultralevura[®], 60 y D14 mostraron los porcentajes de supervivencia más altos en comparación con la cepa W303 ($p < 0.005$); sin embargo, la supervivencia presentada por estas mismas cepas fue significativamente menor a la de la cepa patógena SC5314.

Estos resultados muestran que tres cepas de *S. cerevisiae*, cuyo nivel de virulencia en sistemas murinos varió de medio a alto, fueron capaces de sobrevivir en sangre humana y sus fracciones y además, el porcentaje de supervivencia fue en ocasiones equivalente al de una cepa perteneciente a la especie patógena *C. albicans*. En base a estos resultados, y teniendo en cuenta que la capacidad para sobrevivir y escapar de este ambiente hostil constituye una etapa esencial en las infecciones sistémicas, cabe pensar que este sistema sea útil como modelo para mimetizar una infección sistémica por *S. cerevisiae*. Puesto que durante la incubación en sangre total la diferencia de supervivencia entre las cepas en estudio y la cepa usada como control avirulento fue más evidente, se eligió este medio para los estudios de expresión génica. Por otra parte, el uso de sangre total frente a sus fracciones contaba con una serie de ventajas como es la eliminación de los pasos de fraccionamiento y purificación y además, la sangre total mimetiza mejor una situación real al contemplar las interacciones entre sus distintos componentes. Por otra parte, el estudio de supervivencia permitió determinar que los tiempos de incubación adecuados para el análisis transcripcional eran 15, 30 y 60 minutos.

2. Perfil transcripcional de levaduras incubadas en sangre humana

2.1. Selección de cepas para el estudio transcripcional en sangre

Para obtener una visión global de la respuesta de *S. cerevisiae* en un medio sanguíneo y para investigar qué conjuntos de genes se expresan, se llevó a cabo un análisis del perfil transcripcional comparando cepas avirulentas y virulentas de *S. cerevisiae* durante la exposición a sangre. Dicho análisis se llevó a cabo mediante el uso de micromatrices de DNA.

Dada la complejidad a la hora de interpretar los datos resultantes de este tipo de técnicas y teniendo en cuenta que se analizaron tres tiempos de incubación en sangre, se eligieron para el estudio sólo 4 cepas. Como cepas avirulentas se incluyeron la cepa de laboratorio W303, usada en el estudio de supervivencia, y el aislado vínico CECT 10.431. La avirulencia *in vivo* de ambas cepas se ha mostrado en el Capítulo 2 y en trabajos previos de nuestro grupo (de Llanos y col., 2011). Como cepas virulentas, se incluyeron el aislado clínico 60 y el aislado dietético D14, ambas con capacidad para sobrevivir en sangre y cuya virulencia *in vivo* se ha mostrado en esta Tesis y en trabajos previos (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011). Además, la cepa D14 fue capaz de atravesar la barrera intestinal y diseminarse hacia órganos distantes, como hemos visto en el capítulo 2.

2.2. Perfil transcripcional de levaduras incubadas en sangre humana

Para llevar a cabo este estudio, se incubaron células de levadura en sangre humana, utilizando el modelo establecido con anterioridad por Fradin y colaboradores (2003) para *C. albicans*, y nos centramos en la

búsqueda de grupos funcionales o genes expresados o reprimidos significativamente durante el transcurso del experimento.

Para ello, los precultivos de células se crecieron en medio YPD, y a continuación se preadaptaron en tampón PBS a una densidad de dos células de levadura por leucocito, incubándolas 30 min. a 37°C antes de su inoculación en sangre humana (Fradin y col., 2003). La sangre fue recogida en tubos que contenían heparina; se eligió este tipo de coagulante para la recolección de la sangre porque se sabía que no afectaba a la expresión de los genes, como demostraron en un trabajo previo Fradin y colaboradores (2003). La suspensión de células preadaptadas se inocularon en sangre humana fresca y se incubaron durante 0, 15, 30 y 60 min. a 37°C.

Los niveles de expresión de mRNA se determinaron mediante la hibridación de micromatrices, comparando cada punto respecto al tiempo 0 min. para cada una de las cepas. Los datos fueron normalizados respecto al ratio y se utilizó un intervalo de confianza del 5% para seleccionar los datos estadísticamente significativos. Los datos transcriptómicos presentados corresponden a la media de tres réplicas biológicas, incluyendo un “dye swap”. Los datos fueron validados midiendo la expresión génica de 7 de estos genes por qRT-PCR (Tabla 27), observándose que las inducciones o represiones difieren menos del 40% entre los dos métodos usados.

Tabla 27. Validación de los datos transcriptómicos mediante qRT-PCR

Gen	Cepa	Tiempo (min)	Micromatrices	qRT-PCR	% Diferencia
<i>PHO5</i>	60	60'	2.85	2.97	4.21
<i>GFA1</i>	60	60'	1.39	1.34	3.95
<i>PHO3</i>	60	60'	2.30	2.16	5.73
<i>PHO12</i>	60	60'	3.18	2.98	6.36
<i>PSA1</i>	D14	60'	3.35	3.07	8.21
<i>YNL217W</i>	60	60'	1.64	1.34	18.19
<i>TRX1</i>	60	60'	1.73	1.35	21.97
<i>GFA1</i>	D14	60'	1.11	0.80	28.22
<i>PSA1</i>	60	60'	3.81	2.70	29.04
<i>YNL217W</i>	D14	60'	1.16	1.61	38.39

En primer lugar, se realizaron búsquedas en los datos para encontrar grupos funcionales expresados de forma significativa, con un FDR (False Discovery Rate) menor del 5%. Todos estos grupos funcionales expresados a lo largo del ensayo en cada una de las cepas estudiadas aparecen en la Tabla 28. En las Tablas S1 y S2 (Anexo III) se pueden ver los valores de expresión génica de algunos de los genes que se incluyen en estos grupos funcionales. A los 15 min. de infección en sangre, tres grupos funcionales (Traducción, Biogénesis de ribosomas y Expresión génica) se encontraron inducidos significativamente en todas las cepas, a excepción de la cepa de laboratorio W303. Estos grupos funcionales comprenden genes relacionados con el crecimiento vegetativo de la levadura y se mantuvieron expresados durante todo el experimento, excepto a tiempo 0 min., indicando una continua adaptación de estas levaduras en el medio donde se encontraban.

Para la cepa W303, el grupo funcional “Biogénesis de ribosomas” no se indujo hasta los 60 min. de la incubación, mostrando un retraso en la adaptación al nuevo entorno por parte de esta cepa. Los genes que pertenecen a estos grupos funcionales incluyen genes de proteínas ribosomales, como *RPL32* y *RPS10A*, genes de factores traduccionales de elongación como *TEF2* y *EFB1*, y genes que codifican para tRNA-sintetasas, como *THS1*. Las cepas CECT 10.431, 60 y D14 no mostraron diferencias entre ellas dentro de este conjunto de grupos funcionales.

El grupo funcional “Biosíntesis de aminoácidos” se observó activado únicamente a los 15 min. en la cepa 60 y a los 30 y 60 min. en las cepas D14 y CECT 10.431. Además, los grupos funcionales “Biosíntesis de los aminoácidos familia del aspartato” y “Biosíntesis de arginina” fueron significativos para las cepas 60, D14 y CECT 10.431 a los 30 min. de incubación y manteniéndose su activación en la cepa 60 en el último tiempo del ensayo (60 min.).

Algunos grupos funcionales fueron reprimidos significativamente (Tabla 29). El grupo funcional relacionado con el “Plegamiento de proteínas” se observó reprimido en CECT 10.431 a los 15 min. de incubación y en la cepa de laboratorio W303 a los 15, 30 y 60 min.; en las cepas virulentas únicamente se observó en la cepa D14 a los 60 min. de incubación. La principal función de los genes incluidos en este grupo, tales como *SSA2*, es la de codificar para chaperonas moleculares, las cuales se unen a proteínas recién traducidas para asistir en su correcto plegamiento y evitar la agregación (Becker y Craig, 1994; Bukau y Horwich, 1998).

Tabla 28. Grupos funcionales inducidos significativamente a los 15, 30 y 60 min. de incubación en sangre para las cepas virulentas (60 y D14) y no virulentas (CECT 10.431 y W303)

Grupos funcionales inducidos	Tiempo (min)											
	15				30				60			
	60	CECT 10431	W303	D14	60	CECT 10431	W303	D14	60	CECT 10431	W303	D14
Traducción	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Biogénesis de ribosomas	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Expresión Génica	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Biosíntesis de aminoácidos	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
Biosíntesis de aminoácidos familia del aspartato	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Biosíntesis de arginina	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-

La represión de estos genes dentro de este grupo funcional en la cepa W303 es compatible con el retraso observado en los grupos funcionales relacionados con la adaptación al crecimiento, como es la biogénesis de ribosomas. En el conjunto de genes reprimidos, el grupo funcional “Fosforilación oxidativa” se observó reprimido en la cepa CECT 10.431 a los 30 y 60 min. Respecto a la cepa virulenta 60, no se observó ningún grupo funcional que se encontrara reprimido significativamente.

Tabla 29. Grupos funcionales reprimidos significativamente a los 15, 30 y 60 min. de incubación en sangre para las cepas virulentas (60 y D14) y no virulentas (CECT 10.431 y W303)

Grupos funcionales reprimidos	Tiempo (min)											
	15				30				60			
	60	CECT 10.431	W303	D14	60	CECT 10.431	W303	D14	60	CECT 10.431	W303	D14
Plegamiento de proteínas	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
Fosforilación oxidativa	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

Por otro lado, hemos encontrado cambios significativos en la expresión de genes específicos implicados en procesos biológicos importantes, como es el caso del metabolismo de carbohidratos y el ciclo del glioxilato (ver Tablas S1 y S2 de Anexo III). A los 15 min. de incubación, varios genes que codifican enzimas glicolíticas se encontraban inducidos. Los genes que codifican la glucosa-6-fosfato isomerasa (*PGI1*), fosfofructoquinasa (*PFK2*) y aldolasa (*FBA1*) se encontraron inducidos durante las primeras etapas de la incubación, pero los niveles de expresión aumentaron a los 30 min. para la cepa vínica CECT 10.431 y los aislados virulentos D14 y 60. Para la cepa de laboratorio W303, la

expresión de estos tres genes, estuvo reprimida o fue prácticamente nula durante todo el ensayo. En la cepa 60, otros genes que codifican enzimas glicolíticas, fueron mayoritariamente reprimidos a los 15 min. en comparación con el tiempo 0 min., pero sus transcritos aumentaron considerablemente en la última etapa de incubación en sangre, como fue el caso, por ejemplo, de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*TDH3*), fosfoglicerato quinasa (*PGK1*) y enolasa (*ENO1*); estos genes, en D14 y CECT 10.431 se encuentran expresados durante todo el ensayo (más en los tiempos 30 y 60 min), mientras que en W303 están reprimidos a lo largo de todo el ensayo. Además, la expresión de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*PCK1*) estuvo fuertemente reprimida en los aislados virulentos y en la cepa CECT 10.431 durante todo el ensayo, mientras que en la cepa de laboratorio W303 se encontraba expresado este gen.

Los genes que codifican las enzimas clave del ciclo del glioxilato, isocitrato liasa (*ICL1*) y malato sintasa (*MLS1*), estuvieron reprimidos en todas las cepas a lo largo de todo el experimento, aunque su nivel de represión disminuyó en la última etapa de incubación en las cepas D14 y 60; sin embargo, en W303 se expresaron durante todo el ensayo. La represión catabólica de estos genes (*ICL1* y *MLS1*), sugiere que las células de levadura disponen de glucosa durante todo el ensayo.

3. Comparación de la expresión génica entre cepas virulentas (D14 y 60) y no virulentas (CECT 10.431 y W303) en sangre humana

Para identificar grupos funcionales expresados específicamente en las cepas virulentas de *S. cerevisiae* durante la incubación en sangre, se analizó, en primer lugar, la expresión de genes en los diferentes tiempos

de incubación. A continuación, se comparó el promedio de datos de las cepas no virulentas (W303 y CECT 10.431) frente a las virulentas (60 y D14) y se seleccionaron los datos estadísticamente significativos. En la Tabla 30 se muestran los grupos funcionales de genes cuya expresión se asoció específicamente con cepas virulentas de *S. cerevisiae*.

A los 15 min. de incubación en sangre, se encontraron tres grupos funcionales inducidos significativamente en las cepas virulentas en comparación con las cepas no virulentas: Organización vacuolar, Transporte de xenobióticos y Reparación de bases. El grupo funcional “Organización vacuolar”, se expresó de nuevo a los 30 min. de incubación; este grupo incluye genes relacionados con la biogénesis de la vacuola, señalización de proteínas vacuolares y fusión vacuolar (*CUP5*, *VPS3* y *VTC1*). La ruta de “Reparación de bases” elimina las lesiones causadas por la exposición a las especies reactivas de oxígeno endógenas o exógenas (ROS) (Memisoglu y Samson, 2000). Incluye genes como *POL30* (factor de procesividad de la DNA polimerasa), *RAD27* (flap 5' endonucleasa), *APN1* (liasa de sitio de DNA apirimidínico o apurínico) y *OGG1* (N-glicosilasa específica de purinas oxidadas que causan lesión en el DNA). El nivel de expresión de estos genes disminuyó a lo largo del experimento en las cepas virulentas.

Tabla 30. Grupos funcionales inducidos significativamente sólo en las cepas virulentas (60 y D14) tras 15, 30 y 60 min. de incubación en sangre

Grupos funcionales inducidos	Tiempo (min)			Genes
	15	30	60	
Reparación de bases	+	-	-	<i>POL30, RAD27, APN1, OGG1</i>
Organización vacuolar	+	+	-	<i>CMD1, VPS3, CUP5, VTC1, SFK1, VID24, TRX2, TRX1, VAC7, VTC3, PDR5</i>
Transporte de xenobióticos	+	-	-	<i>PDR5, SNQ2, PDR12</i>
Biosíntesis de aminoácidos/ Biosíntesis de aminas/ Biosíntesis de compuestos nitrogenados	-	+	+	<i>ARO4, ARO3, LYS4, HIS1, ARG5,6, SER3, ILV1, SER33, HIS5, LYS1, TRP3, ARG1, ARG8, LEU9, ORT1, SAM4</i>
Metabolismo de aminoácidos	-	+	+	<i>ADH5, ARO4, ARO3, LYS4, HIS1, ARG5,6, SER3, ILV1, SER33, HIS5, LYS1, URA2, TRP3, ARG1, ARG8, LEU9, ORT1, SAM4</i>
Actividad fosfatasa	-	+	+	<i>PHO3, PHO5, LPP1, SDT1, PHO12, INP51, SAP185, SAC1, PPZ1, FCP1, YNL217W</i>
Transporte transmembrana	-	+	-	<i>CTP1, ATP17, HXT10, ZRT1, TPO2, TNA1, VMA5, YBT1, SMF3, ZRT2, ATR1, ORT1, ODC2, PDR12, ANT1, TPO3, GNP1, YHM1</i>
Homeostasis redox celular	-	-	+	<i>TTR1, TRX2, TRX1, TSA1, TPS1, PGM2, LYS20, TKL1, TAL1</i>

Siete grupos funcionales más, incrementaron su expresión a los tiempos 30 o 60 min. en las cepas virulentas. Cuatro de ellos fueron grupos estrechamente relacionados, como la “Biosíntesis de

aminoácidos”, “Metabolismo de aminoácidos”, “Biosíntesis de aminas” y “Biosíntesis de compuestos nitrogenados”, que incluyen genes que intervienen en la biosíntesis de algunos aminoácidos, tales como aminoácidos aromáticos (*ARO3*, *ARO4*), histidina (*HIS1*, *HIS5*), arginina (*ARG1*, *ARG5,6*, *ARG8*), triptófano (*TRP3*), lisina (*LYS1*, *LYS4*), leucina (*LEU2*, *LEU9*) y serina (*SER3*, *SER33*). Para descartar que la presencia de varias auxotrofías en la cepa de laboratorio W303 pudieran indirectamente afectar a la aparición de este grupo funcional en nuestro análisis, repetimos el análisis comparando las dos cepas virulentas (D14 y 60) frente a la cepa única control CECT 10.431, excluyendo a W303. Los resultados mostraron, una vez más, la aparición de grupos funcionales del metabolismo de aminoácidos, como proceso metabólico celular de aminoácidos, que contienen genes como *LEU9*, *SER3*, *ARG1* y *ARG8*. Por tanto, podemos concluir que las auxotrofías de W303 no enmascaran nuestros resultados, probablemente debido al corto tiempo de incubación o que realmente, los genes relacionados con el metabolismo de los aminoácidos están activados en las cepas virulentas 60 y D14.

Un quinto grupo funcional, “Actividad fosfatasa”, incluye genes tales como *PHO3*, *PHO5* y *PHO12* que se expresan bajo condiciones de concentraciones bajas de fosfato. Esto puede estar indicando una respuesta frente a un ayuno de fosfato durante la incubación en sangre. Además, *PHO3* es capaz de hidrolizar fosfatos de tiamina en el espacio periplásmico, aumentando la absorción de tiamina celular. Otro grupo funcional fue la “Actividad de transporte transmembrana”, que incluye genes que intervienen en el transporte mitocondrial (*CTP1*, *YHM1*), transporte de zinc (*ZRT1*) y transporte de aminoácidos (*GNP1*).

Por último, se encontró que la expresión de un grupo funcional clave (“Homeostasis celular redox”), fue mayor durante la incubación en sangre en las cepas virulentas a los 60 min. de incubación. Los genes que

pertenecen a este grupo participan en la homeostasis redox celular, lo que ayuda a mantener un ambiente reductor en la célula; estos genes se han asociado con virulencia en varias bacterias (Sbarra y Karnovsky, 1959; Iyer y col., 1961; Abshire y Neidhardt, 1993; Rea y col., 2004; Riboulet y col., 2007) y juegan un papel importante en la defensa de la célula contra el estrés oxidativo ejercido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) provocadas por las defensas del hospedador. Los leucocitos estimulados pueden ser una fuente de ROS, los cuales pueden causar estrés oxidativo. La defensa contra este estrés parece estar aumentada a los 60 min. de incubación en sangre, cuando la mayoría de las células de levadura fueron fagocitadas por los leucocitos (84% de las células de levadura se encontraban fagocitadas en este tiempo). De hecho, al observar los genes relacionados con estrés oxidativo (10 genes), todos ellos muestran niveles de expresión significativamente superiores en las cepas virulentas en comparación con las cepas no virulentas (Figura 36). Varios componentes del sistema de la tiorredoxina se incluyen en este conjunto de genes. En concreto, un gen de la tiorredoxina peroxidasa (*TSA1*) y dos genes de la tiorredoxina (*TRX1* y *TRX2*) se activaron fuertemente en las cepas virulentas a los 60 min. También los niveles de expresión de *TTR1*, un gen que codifica para la reductasa tiorredoxina-disulfuro, aumentaron durante la incubación en sangre en las cepas 60 y D14.

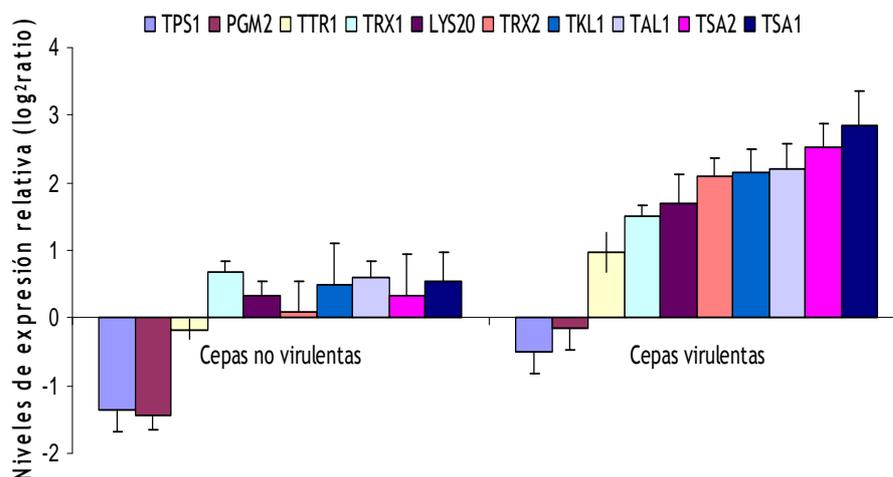


Figura 36. Niveles de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo obtenidos al comparar cepas virulentas frente a no virulentas a los 60 min. de incubación en sangre humana. Todos los genes presentaron diferencias significativas al comparar los dos grupos ($p < 0.05$, t-Student).

Tabla 31. Grupos funcionales reprimidos significativamente sólo en las cepas virulentas (60 y D14) tras 30 min. de incubación en sangre

Grupos funcionales reprimidos	Tiempo (min)			Genes
	15	30	60	
Metabolismo de la piridoxina	-	+	-	SNZ3/ SNZ2/ SNO2

Solamente el grupo funcional “Metabolismo de la piridoxina” se encontró reprimido respecto a las cepas no virulentas en el tiempo de 30 min (Tabla 31). Este grupo incluye a los genes *SNZ2*, *SNZ3* y *SNO2* que participan en el metabolismo de la piridoxina y biosíntesis de tiamina.

4. Resistencia al estrés oxidativo de las cepas virulentas y no virulentas

Para confirmar la relevancia de la respuesta al estrés oxidativo en la naturaleza de las cepas virulentas de *S. cerevisiae*, analizamos el porcentaje de supervivencia de estas cuatro cepas después de una hora en presencia de 6 mM de H₂O₂. Las cepas virulentas exhibieron mayores tasas de supervivencia, mientras que W303 y CECT 10.431 mostraron una supervivencia muy baja, como se aprecia en la Figura 37. El análisis estadístico mediante la prueba t-Student confirmó diferencias significativas en el estrés oxidativo entre cepas virulentas y no virulentas ($p < 0.0005$), mientras que no hubo diferencias significativas entre CECT 10.431 y W303 o 60 y D14, como se muestra en la Tabla 32.

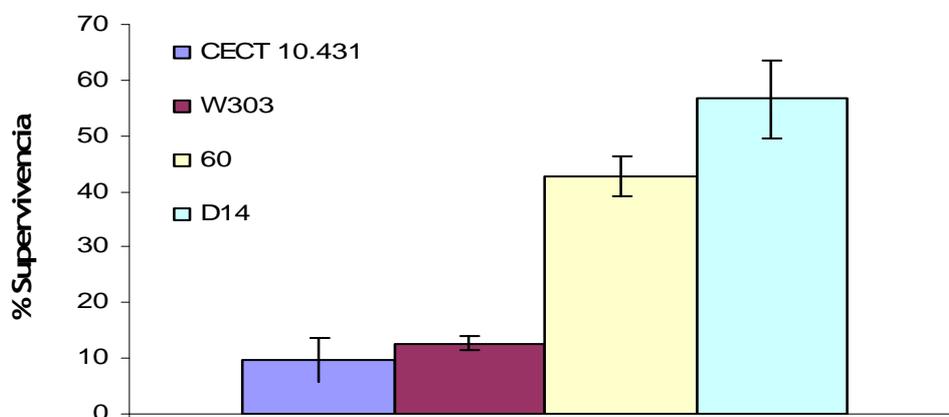


Figura 37. Porcentajes de supervivencia mostrados por las cepas virulentas y no virulentas después de someterlas a un estrés oxidativo. Los porcentajes se calcularon respecto a las células no tratadas. Las medias y desviaciones estándar pertenecen a tres ensayos independientes.

Tabla 32. Comparaciones estadísticas de la Figura 37

	CECT 10.431	W303	60	D14
CECT 10.431		ns	*	*
W303			**	**
60				ns
D14				

ns: no significativo; * $P < 0.0005$; ** $P < 0.00005$

5. Discusión

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos que median el proceso infeccioso en el caso de especies de levadura consideradas de baja patogenicidad como *S. cerevisiae*. Los escasos estudios llevados a cabo en esta levadura se han centrado en un número limitado de genes relacionados con funciones y rutas conservadas para la mayoría de las levaduras consideradas patógenas como *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*. En esos trabajos, se ha evaluado la habilidad de distintos mutantes de *S. cerevisiae* para sobrevivir en modelos murinos (Goldstein y McCusker, 2001; Wheeler y col., 2003; Kingsbury y col., 2006). Además, Lorenz y Fink (2001) usaron una cepa de *S. cerevisiae* como control en una aproximación genómica para estudiar el comportamiento de *C. albicans* durante su internalización en los macrófagos; se hizo así porque por aquel entonces no estaban disponibles las micromatrices para *C. albicans*. A partir de todos estos estudios, se pudo conocer que algunos de los genes y procesos identificados para *C. albicans* eran también importantes para la supervivencia *in vivo* de *S. cerevisiae*; es el caso de los genes *ADE2*, *LEU2*, *URA3*, *SSD1* (Goldstein y McCusker, 2001; Wheeler y col., 2003), procesos como respiración, genes de biosíntesis de aminoácidos, de transporte de carbono y metabolismo (Kingsbury y col., 2006) o componentes celulares como el genoma mitocondrial (Goldstein y McCusker, 2001). Sin embargo, por el momento no se ha aclarado si las cepas de *S. cerevisiae* con mejores aptitudes en los modelos murinos poseen mecanismos moleculares no presentes en las cepas con poca o ninguna habilidad para sobrevivir y proliferar en los mismos. Por todo ello, hemos considerado interesante plantear la investigación recogida en el presente capítulo. Puesto que es esperable que durante la infección

tengan lugar múltiples cambios, para la comparación entre cepas virulentas y avirulentas se ha propuesto un estudio de expresión global.

5.1. La sangre como modelo para mimetizar las infecciones sistémicas por *S. cerevisiae*

Se han usado aproximaciones muy interesantes para determinar el perfil de expresión de levaduras patógenas durante la infección a partir de órganos de ratones infectados por vía intravenosa o peritoneal (Andes y col., 2005; Thewes y col., 2007; Kruppa, 2009). Aunque esto es posible en el caso de *C. albicans*, no es factible en *S. cerevisiae*, ya que la carga fúngica esperada no es suficiente para asegurar unos niveles de RNA adecuados para el análisis transcriptómico. Por tanto, el uso de sistemas que imiten el ambiente del huésped supone una buena opción en el caso de levaduras de baja virulencia. En este sentido, existen distintas alternativas, muchas de las cuales se han aplicado en el caso de *C. albicans* (Rubin-Bejerano y col., 2003; Bensen y col., 2004; Lorenz y col., 2004; Hromatka y col., 2005; Enjalbert y col., 2006).

Entre estas aproximaciones, el uso de sangre humana es bastante interesante, ya que la capacidad para sobrevivir y escapar de ese ambiente hostil constituye una etapa esencial en las infecciones sistémicas (Fradin y col., 2003). Estos autores mostraron que los resultados obtenidos usando sangre son consistentes con los obtenidos en un modelo murino de infección sistémica, por lo que parece un buen sistema. Otra ventaja a la hora de usar este sistema es que la sangre incluye células inmunes, por lo que se puede llegar a conclusiones en cuanto a los mecanismos que median en la interacción entre el patógeno y el hospedador; este aspecto es muy importante en el caso de levaduras

oportunistas, donde la influencia del sistema inmune del hospedador es considerable.

En el presente trabajo, hemos visto que las cepas virulentas (60 y D14) muestran una capacidad de supervivencia en sangre similar a la de una cepa de *C. albicans*, y por otra parte, claramente superior a la de la cepa de laboratorio avirulenta W303. En general, la mayor supervivencia de estas cepas se observó en la fracción sanguínea MNC, mientras que la fracción PMN tuvo un efecto más fuerte en la supervivencia de la levadura, causando su disminución. Por tanto, la fracción de PMN es el principal responsable de la disminución de la supervivencia de la levadura en la sangre. Sin embargo, la tasa de supervivencia de las cepas en sangre fue significativamente mayor en comparación con las células de levadura expuestas a la fracción PMN después de 1 hora de incubación. A este mismo tiempo, un comportamiento similar se encontró al comparar la sangre total frente a la fracción MNC. Esto puede ser debido a que el papel de los monocitos (MNC) en el ataque de las levaduras no sea tan esencial como el que ejerce las células sanguíneas de la fracción PMN (neutrófilos). Esto puede explicarse por el hecho de que las células de la levadura en la sangre también están en contacto con eritrocitos, monocitos y linfocitos, los cuales reducen el encuentro de las levaduras por los neutrófilos. Fradin y colaboradores (2005), demostraron que los neutrófilos desempeñan un papel clave en el curso de infecciones sanguíneas por *C. albicans*. Esta observación concuerda con la alta susceptibilidad que muestran los pacientes con neutropenia (deficiencia de estas células inmunes) en una candidiasis diseminada (Bodey y col., 1992; Wright y Wenzel, 1997). Es interesante observar que la supervivencia de la sangre se correlaciona con los niveles de infección, ya que la cepa W303 muestra baja tasa de supervivencia en sangre y mostró muy bajos niveles de infección.

Estos resultados son indicativos de la idoneidad del uso de sangre para el estudio transcriptómico del presente capítulo. Cabe resaltar que esta es la primera vez que se estudia la capacidad de *S. cerevisiae* para sobrevivir en este medio.

5.2. Expresión diferencial de genes y grupos funcionales durante la incubación en sangre en cada una de las cepas

Hemos observado en estudios previos (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011) y en el presente trabajo que tanto el aislado clínico 60 como el aislado dietético D14, en el transcurso de una infección sistémica en sistema murino, fueron capaces de alcanzar distintos órganos, lo cual quiere decir que pudieron sobrevivir en el torrente sanguíneo y escapar de él. Para entender mejor la respuesta de *S. cerevisiae* durante su permanencia en el entorno complejo de la sangre y para llevar a cabo una búsqueda de qué rasgos especiales poseen las cepas virulentas, se analizó el transcriptoma de ambos aislados después de su incubación en sangre humana y se comparó con los obtenidos para dos cepas avirulentas.

Los resultados obtenidos muestran que estas cepas virulentas expresan varios grupos de genes con la finalidad de adaptarse rápidamente a este nuevo entorno. Como era de esperar, se detectaron altos niveles de expresión de genes que codifican factores que intervienen en la síntesis de proteínas en todas las cepas a los 15 min. de inoculación en sangre, a excepción de la cepa de laboratorio W303. La fuerte inducción de este conjunto de genes es probablemente debida como consecuencia de la transferencia de las células de levadura de un medio pobre en nutrientes (PBS) a un medio rico en nutrientes (sangre). La represión génica de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato

carboxiquinasa (*PCK1*) apoya la idea de que las células de levadura están expuestas a un ambiente rico en carbohidratos, incluso en las últimas etapas de incubación en la sangre, cuando la mayoría de las células de levadura se encuentran fagocitadas. En *C. albicans*, también se detectó en la etapa inicial de incubación en sangre un alto nivel de diferentes transcritos que participan en la síntesis de proteínas; sin embargo, en esta levadura la expresión de estos genes disminuyó a lo largo del tiempo de incubación (Fradin y col., 2003), indicando que el inicio del crecimiento se produjo sólo en las primeras etapas. Esto sugiere que *C. albicans* tiene una respuesta más rápida para adaptarse al entorno de la sangre que *S. cerevisiae*. Además, en *C. albicans* se observó una represión de la traducción debida a la fagocitosis en las últimas etapas de incubación (Lorenz y col., 2004). Por el contrario, el ratio de expresión de genes de proteínas ribosomales no cambió en las células fagocitadas de *S. cerevisiae*.

Hemos observado que la inducción de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos estuvo presente a los 15, 30 y 60 min. de incubación en el aislado 60 y a los 30 y 60 min. en el aislado D14 y la cepa vínica CECT 10.431, mientras que en la cepa no virulenta W303 no aparecieron. Poblaciones de *C. albicans* también mostraron inducción de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos tras la exposición a neutrófilos humanos o macrófagos cultivados (Rubin-Bejerano y col, 2003; Fradin y col., 2005). Rubin-Bejerano y colaboradores (2003) observaron una inducción de estas rutas después de que las células de levadura fueran ingeridas por neutrófilos, pero éstas no estaban presentes cuando las levaduras eran ingeridas por monocitos humanos. Esto podría sugerir que el microambiente del fagosoma dentro de los neutrófilos sea deficiente en aminoácidos generando una respuesta rápida en las cepas virulentas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, las cepas no virulentas son más

lentas o menos eficientes en la adaptación a este microambiente, disminuyendo sus posibilidades de supervivencia. Además, los genes de biosíntesis de metionina y arginina no se inducen cuando las células de *S. cerevisiae* se encuentran fagocitadas por la línea celular de macrófagos murinos J774A (Lorenz y Fink, 2001). A pesar de que los aminoácidos son relativamente abundantes en el suero murino en niveles comparables a los utilizados en medios sintéticos (10 a 60 mg/l) (Crispens, 1975), se prevé que cepas auxótrofas en aminoácidos aromáticos muestren una virulencia disminuida *in vivo*, como resultado de un crecimiento pobre debido a la biodisponibilidad subóptima de aminoácidos (Goldstein y McCusker, 2001). Este efecto puede explicar el retraso de adaptación observado en la cepa de laboratorio auxótrofa W303. Además, Kingsbury y colaboradores (2006), revelaron la importancia de la biosíntesis de aminoácidos en la supervivencia de la levadura en un hospedador murino. Sin embargo, procesos importantes en la detección y respuesta a la calidad y concentración de compuestos nitrogenados no son necesarios para la supervivencia de la levadura *in vivo*, lo que indica que la levadura puede usar una gran variedad de fuentes adicionales de nitrógeno *in vivo*. El único grupo funcional reprimido en las cepas virulentas a los 30 min. fue el que incluye los genes del metabolismo de piridoxina. Padilla y colaboradores (1998), observaron que estos genes se expresan cuando existe limitación de nutrientes, por lo que puede reflejar que las cepas 60 y D14 no fueron expuestas a una limitación de nutrientes específicos, tales como el nitrógeno.

La fuente de carbono de preferencia utilizada por la levadura es la glucosa, y se trata también del azúcar predominante presente en sangre humana. Por tanto, la glucosa debe ser la fuente de carbono más importante para la supervivencia de la levadura *in vivo* y la capacidad de detectar y responder a bajas concentraciones de glucosa también se

considera una característica importante para la supervivencia (Kingsbury y col., 2006). De hecho, observamos en la etapa inicial de incubación que genes que codifican enzimas glicolíticos se encontraban en su mayoría inducidos (*PGI1*, *PFK2* y *FBA1*), lo que demuestra una obtención de energía a partir de glucosa. En *C. albicans*, los enzimas glicolíticos están, en su mayoría, reprimidos a los 15 min. de incubación, pero los transcriptos aumentan considerablemente en las últimas etapas de la incubación (Fradin y col., 2003). En *S. cerevisiae*, los genes del ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis son sensibles a la glucosa (Yin y col., 2003). Estos genes se reprimen por glucosa a concentraciones tan bajas como 0.01%, la cual es mucho más baja de la que está presente en la sangre (0.06-0.1% de glucosa), por tanto, esto explicaría la inactivación de estas dos rutas en *S. cerevisiae* y la activación de la glicolisis. Sin embargo, en la cepa 60 se observó que algunos enzimas glicolíticos tales como *TDH3*, *PGK1* y *ENO1*, tuvieron el mismo comportamiento que *C. albicans* y por tanto, este resultado podría explicar en parte, el carácter más virulento de esta cepa.

El ciclo del glioxilato se induce en bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*) (McKinney y col., 2000) y hongos como *C. neoformans* (Rude y col., 2002), *C. albicans* (Lorenz y Fink, 2001), *Leptosphaeria maculans* (Idnurm y Howlett, 2002) y *S. cerevisiae* (Lorenz y Fink, 2001) tras su ingestión por fagocitos. Este cambio en el metabolismo se ha interpretado como una respuesta al ambiente pobre en glucosa de los macrófagos, y la capacidad de conseguir ese cambio parece contribuir al carácter virulento de algunos patógenos. Sin embargo, en nuestro estudio, utilizando un medio complejo como es la sangre, los genes que codifican para las enzimas principales del ciclo del glioxilato, isocitrato liasa (*ICL1*) y malato sintasa (*MLS1*) estuvieron reprimidas durante todo el ensayo, aunque esta represión fue menor en la última etapa del ensayo en las cepas D14 y 60.

Esto sugiere que las células de levadura tienen acceso a la glucosa durante casi todo el experimento. El hecho de que los mutantes de levadura en el gen *icl1Δ* fueran ligeramente deficientes *in vivo* (Goldstein y McCusker, 2001) sugiere que el ciclo del glioxilato contribuye poco en el mantenimiento y adaptación de *S. cerevisiae in vivo*. Se ha demostrado recientemente que el gen *ICL1* en *S. cerevisiae* y *C. albicans* se induce sustancialmente tras la exposición a macrófagos *in vitro* y que un mutante *icl1Δ/icl1Δ* en *C. albicans* mostró una reducción en virulencia (Lorenz y Fink, 2001; Lorenz y col., 2004), pero este ensayo se realizó en macrófagos murinos, donde la concentración de glucosa es diferente a la de sangre. De hecho, recientemente se ha demostrado que la posición de *URA3* en el plásmido puede influir en el resultado de las pruebas de virulencia (Sundstrom y col, 2002; Brand y col, 2004; Sharkey y col, 2005). Cuando el marcador *URA3* se utilizó para generar el mutante *icl1/icl1*, posiblemente la virulencia de este mutante fue atenuada por la posición de *URA3* en el locus *ICL1*, en lugar de la interrupción del gen *ICL1* en sí mismo. Sin embargo, en *C. albicans* (Fradin y col., 2005), esta ruta se indujo cuando fue expuesta a neutrófilos, lo que sugiere un papel general de estos genes necesarios para la supervivencia después de la fagocitosis en *C. albicans*, pero no en *S. cerevisiae*.

En trabajos previos de nuestro grupo y en el Capítulo 2 de esta tesis, se estudiaron diferentes características relacionadas con la virulencia (secreción de las fosfolipasas o proteasas, crecimiento invasivo y crecimiento pseudohifal), que son considerados necesarios para iniciar una invasión y una diseminación en los diferentes órganos, una vez que la levadura escapa del torrente sanguíneo. Sin embargo, no se observó la expresión de genes relacionados con estos rasgos de virulencia. Además, se observó que las células de *S. cerevisiae* no formaron pseudohifas en ningún momento de la incubación en sangre o plasma (datos no

mostrados). Este dato concuerda con estudios previos que muestran que la formación de pseudohifas no parece ser un rasgo crítico para la virulencia de *S. cerevisiae* (Goldstein y McCusker, 2001); e incluso se ha sugerido que *S. cerevisiae* no forma pseudohifas *in vivo* (Clemons y col., 1994). La incapacidad de *S. cerevisiae* para pseudofilamentar *in vivo* se podría atribuir a la ausencia en el hospedador de los factores desencadenantes de esta capacidad (concentraciones limitantes de nitrógeno y fuentes de carbono no fácilmente utilizables) (Kingsbury y col., 2006). Otro rasgo importante relacionado con la virulencia es la secreción de proteasas. En este estudio no se ve incrementada la expresión de estas proteínas en *S. cerevisiae* cuando es incubada en sangre, pero sí se ha visto que *C. albicans* expresa proteasas tras una hora de incubación en sangre (Fradin y col., 2003); esto podría explicar el mayor poder de virulencia observado en esta levadura. Puede ser que *S. cerevisiae* no necesite expresar estos genes relacionados con rasgos fenotípicos de virulencia hasta que no vaya a iniciar una invasión o diseminación. Para poder dilucidar sobre esta hipótesis, sería necesario un estudio similar en los órganos (cerebro o riñón) infectados por dichas levaduras.

5.2.1. Diferencias de expresión específicas entre cepas virulentas y no virulentas

Cuando se comparó el transcriptoma de las cepas virulentas y las cepas control, observamos varios grupos específicos de genes que podían estar relacionados con su carácter patógeno. Un grupo funcional interesante fue la “Actividad fosfatasa”, que incluía genes como *PHO3*, *PHO5* y *PHO12* pudiendo indicar una respuesta frente a una limitación de fosfato durante la incubación en sangre. De hecho, se ha encontrado una

asociación entre la actividad fosfatasa *in vitro* y la virulencia de aislados de *C. albicans*; además, la absorción de fosfato fue asociada con la virulencia de *C. albicans* en ratón (MacCallum y col., 2009).

Otro grupo funcional interesante específico de cepas virulentas fue la “Organización vacuolar”. La vacuola de hongos realiza funciones de resistencia al estrés y de homeostasis celular (Klionsky y col., 1990). La vacuola fúngica también participa en la resistencia a múltiples fármacos (Kumar y col., 2000; Parsons y col., 2004) y se ha visto que el gen *VPS3* se requiere para resistencia a múltiples fármacos, interactuando con *PDR5* (Rutledge y col., 2008). Curiosamente, el gen *PDR5* también está incluido dentro de otro grupo funcional inducido (“Transporte de xenobióticos”). Esta proteína codifica para un transportador ABC (“ATP-binding cassette”), que participa en la respuesta pleiotrópica a drogas y media la resistencia a fungicidas y otros compuestos xenobióticos (Ernst y col., 2005). Además, podría estar concebido para desempeñar un papel en el control de la composición de la membrana y la detoxificación celular en respuesta a un choque de exposición repentina a una alta concentración de 3ME-BuOH (Dickinson, 2008). Recientemente, se ha visto que polimorfismos en éste y otros genes se relacionan con el origen clínico de *S. cerevisiae* (Muller y col., 2011).

Por otro lado, se observó también que el grupo funcional “Reparación de bases” se encontraba inducido. Este grupo funcional podría jugar un papel en el desarrollo de candidiasis sistémica, que requiere la supervivencia de las células de *C. albicans* tras la ingestión por los macrófagos (Legrand y col., 2008). Sin embargo, mutantes de *C. albicans* y *S. cerevisiae* defectuosos en la vía de reparación de bases no son sensibles a agentes oxidantes, ni son alterados en respuesta a los macrófagos (Legrand y col., 2008). Esto podría indicar que estos genes no sean esenciales en los aislados virulentos de *S. cerevisiae* para defenderse

frente a un estrés oxidativo, ya que las levaduras activan la expresión de otros genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo durante la infección, como son los que están implicados en el grupo funcional “Homeostasis celular redox”. Macrófagos, neutrófilos y otras células fagocíticas generan potentes especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), las cuales son tóxicas para la mayoría de los patógenos fúngicos, causando daños en el DNA, proteínas y lípidos (Bogdan y col., 2000). Patógenos fúngicos muestran diferentes grados de resistencia a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno utilizadas por las células del hospedador para contrarrestar la infección (Brown y col., 2009). Una resistencia fúngica a ROS ofrece protección contra este tipo de defensas del hospedador y ofrece, sin duda, una ventaja a los patógenos.

5.3. Resistencia al estrés oxidativo

Se ha visto que la resistencia al estrés oxidativo es un rasgo cuantitativo que varía entre las diferentes cepas de *S. cerevisiae* (Perlstein y col., 2006; Witten y col., 2007; Diezmann y Dietrich, 2011). Diezmann y Dietrich (2009) demostraron que los aislados clínicos de *S. cerevisiae* son más resistentes al estrés oxidativo, lo que sugiere una correlación entre la supervivencia al estrés oxidativo y la patogenicidad de la levadura. Esta propuesta fue confirmada con nuestros resultados a nivel de expresión génica cuando observamos una respuesta específica frente al estrés oxidativo de las cepas virulentas en sangre. Más tarde, estos mismos autores, descubrieron que el gen *RDS2*, que codifica un factor de transcripción de zinc implicado en la resistencia a drogas, desempeña también un papel en la resistencia al estrés oxidativo en *S. cerevisiae* (Diezmann y Dietrich, 2011). En nuestros datos, este gen se observó reprimido significativamente en todas las cepas; sin embargo,

este gen está relacionado con el desarrollo de resistencia pleiotrópica a drogas (*PDR*). De hecho, los genes *PDR* codifican factores transcripcionales que inician la transcripción de genes con función detoxificadora, como transportadores de drogas (Moye-Rowley, 2003). En nuestro estudio, sí hemos observado expresión de genes de la familia *PDR*, como *PDR5* y *PDR12*; por tanto, este conjunto de genes podría estar realizando una función similar a la que desempeña *RDS2*.

Cabe mencionar que varios genes que pertenecen al sistema de la tiorredoxina fueron inducidos, lo cual apunta a su importancia en la defensa de la levadura en contra de las defensas de la sangre. De hecho, se ha demostrado que el sistema de la tiorredoxina de *C. albicans* se expresa durante su crecimiento en sangre humana o tejido de las mucosas (Fradin y col., 2003 y 2005; Zakikhany y col., 2007), lo que indica que el estrés oxidativo podría ser crucial en la primeras etapas de una infección sistémica por *C. albicans*. Además, *TRX1* es necesario para la supervivencia de *C. neoformans* en el ambiente oxidativo de macrófagos e importante para la virulencia de este patógeno fúngico (Missall y Logde, 2005). Se ha demostrado que los genes *TSA2* y *TTR1* se inducen por la presencia de neutrófilos en cepas de *S. cerevisiae* (Rubin-Bejerano y col., 2003), y se observa una clara respuesta antioxidante frente a estas células humanas. Otros autores también admiten que la resistencia al estrés oxidativo es útil para sobrevivir a los neutrófilos (Rubin-Bejerano y col., 2003) y macrófagos (Lorenz y col., 2004).

Por último, confirmamos que esta respuesta incrementada frente al estrés oxidativo en las cepas virulentas ofrece una ventaja fenotípica *in vivo* e *in vitro*. Las cepas virulentas tienen un rendimiento significativamente mucho mayor en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 .

En resumen, este trabajo apoya la idea de que la respuesta a estrés oxidativo presentada por las cepas virulentas de *S. cerevisiae* (60 y D14) puede ser de especial importancia para la supervivencia en infecciones sanguíneas. Esta característica puede ayudar a estas levaduras a prevalecer en los pacientes inmunodeprimidos y causar infecciones sistémicas. Por tanto, esta característica puede ser otro parámetro a tener en cuenta a la hora de elegir cepas de levadura para la elaboración de productos dietéticos comerciales. Una caracterización de las rutas que intervienen en la defensa frente al estrés oxidativo en los aislados patógenos de *S. cerevisiae*, como por ejemplo, mediante el uso de mutantes, será necesaria para conocer mejor el mecanismo de infección de esta levadura. Esto ayudará a descifrar cómo la levadura puede infectar y colonizar en el hospedador.

Por otra parte, los cambios observados en el capítulo anterior respecto a la variación en el número de copias génicas de determinados genes no parecen ser la clave de la buena adaptación de estos aislados en su crecimiento en sangre. En este capítulo, se ha observado una mayor expresión de grupos funcionales, tales como homeostasis celular redox o biosíntesis de aminoácidos. En el capítulo anterior, se observó que el cromosoma III del aislado clínico 60, que se encontraba en mayor número de copias, contenía genes que se enmarcan dentro de estos grupos funcionales. Sin embargo, no todos los genes que se vieron dentro de estos grupos funcionales se localizaban en este cromosoma, y además, la expresión de estos grupos funcionales también se vio en el aislado D14, el cual no presentaba el cromosoma III en mayor número de copias. Con todo esto, se podría concluir que una mayor expresión de un determinado gen no se debe a que esté presente en un mayor número de copias, sino más bien a una expresión diferencial de determinados genes presentes en todas las levaduras cuya expresión se dispara cuando se encuentra dentro

de un hospedador. Podría existir algún mecanismo de compensación génica para controlar la expresión de los genes en mayor número de copias en estas cepas (Bond y col., 2004). Sin embargo, tampoco se descarta que la variabilidad en el número de copias de determinados genes entre diferentes cepas pueda conferir ventaja en otro tipo de ambiente, como por ejemplo, en la invasión de un tejido u órgano, una vez superada la barrera del torrente sanguíneo.

Conclusiones

1. Se han aislado células vivas de levadura a partir de 8 productos dietéticos comerciales de un total de 22 analizados. La aplicación de técnicas moleculares ha mostrado que 6 de los aislados pertenecen a la especie *S. cerevisiae* y 2 son híbridos interespecíficos (*S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* x *S. bayanus*).
2. El estudio de rasgos fenotípicos asociados con la virulencia en los aislados que resultaron ser diferentes tras la caracterización molecular, ha permitido agrupar, por una parte, los dos aislados híbridos (D6 y D23) por presentar negatividad para la mayoría de los rasgos, y por otra parte, los aislados D2, D4 y D14 por presentar rasgos fenotípicos de nivel moderado o alto. Estos datos indican que algunos de los aislados de productos dietéticos poseen características propias que les podrían conferir una capacidad infectiva independientemente del sistema inmune del hospedador.
3. El estudio *in vivo*, utilizando un modelo de infección sistémica con ratones inmunocompetentes, ha mostrado que el mayor potencial patógeno corresponde al aislado D14, ya que fue el único que causó mortalidad. En base a los valores de alojamiento encontrados en cerebro y riñones y a la capacidad de persistir en los mismos, los aislados D2 y D4 mostraron un nivel de virulencia intermedio. En cuanto a los aislados híbridos, sólo se estudió D23 observándose su incapacidad para colonizar.
4. En la levadura *S. cerevisiae* existen dudas acerca de la asociación entre los rasgos fenotípicos de virulencia y la virulencia *in vivo*. En nuestro estudio, se observó correlación ya que sólo los aislados establecidos como potencialmente patógenos *in vitro* (D2, D4 y D14) fueron capaces de alojar y persistir un cierto tiempo en los órganos analizados y, además, produjeron en los ratones claros signos de infección.

5. Se ha podido establecer un sistema murino de infección gastrointestinal imitando condiciones clínicas habituales de trauma e inmunosupresión para valorar la capacidad de translocación intestinal y diseminación de cepas de *S. cerevisiae* cuando éstas son adquiridas por la ruta intestinal.
6. El estudio comparativo del aislado caracterizado como más virulento (D14) y de un aislado avirulento (D23), utilizando el modelo de infección gastrointestinal establecido, ha mostrado que ambos aislados son capaces de atravesar la barrera intestinal, mientras que sólo se detectó diseminación consistente a órganos distantes en el caso del aislado virulento. Por tanto, ante condiciones que promueven la translocación intestinal, la diseminación hacia órganos internos es muy dependiente de la cepa y sólo parece tener lugar cuando ésta posee atributos virulentos propios.
7. Los estudios de virulencia *in vivo* del presente trabajo han mostrado por primera vez que existen cepas con habilidades virulentas en algunos preparados dietéticos comerciales. Por tanto, ante determinadas condiciones clínicas y para determinados grupos de riesgo, estas cepas no serían seguras.
8. El estudio comparativo de la supervivencia en sangre humana de cepas virulentas (D14 y D60) y una cepa avirulenta (W303) de *S. cerevisiae* ha mostrado que dicho modelo es adecuado para mimetizar una infección sistémica por *S. cerevisiae*.
9. El análisis transcriptómico de 4 cepas de *S. cerevisiae* (D14, 60, CECT 10.431 y W303) utilizando el modelo de sangre humana ha mostrado una respuesta transcripcional específica por parte de los aislados virulentos (D14 y 60) de genes implicados en la biosíntesis y metabolismo de aminoácidos y en genes de respuesta al estrés oxidativo. Es destacable que ante la aplicación de un estrés oxidativo con H₂O₂, las cepas virulentas (D14 y 60)

mostraron mayor resistencia que las cepas avirulentas (CECT 10.431 y W303). Estos datos sugieren una correlación entre la resistencia al estrés oxidativo y la patogenicidad.

10. El análisis genómico de 4 cepas de *S. cerevisiae* (D14, 60, 102 y W303) mostró variabilidad en la composición genómica entre las zonas subteloméricas de estos aislados, siendo ésta mayor en los aislados virulentos (D14, 60 y 102). Además, la mayoría de los genes que presentaban variación en el número de copias se situaban también en estas regiones. Estas características, junto con la aneuploidía observada en el aislado clínico 60, podrían proporcionar una ventaja selectiva sobre ciertas condiciones ambientales.
11. El estudio genómico ha mostrado en las cepas virulentas, cambios en el número de copias de genes relacionados con la reparación de bases causada por daño oxidativo o de genes del metabolismo de glutatión. Estos cambios no se han podido correlacionar con el nivel de expresión de dichos genes. Por tanto, cabe pensar que una expresión diferencial entre cepas virulentas y avirulentas sea resultado de la adaptación de las primeras al medio sanguíneo.

Listado de Figuras y Tablas

Figura 1. Sección de una micromatriz de DNA	45
Figura 2. Cálculo del parámetro Pz, según el halo de opacidad y el crecimiento de la colonia	62
Figura 3. Sistema de extracción S-Monovette	64
Figura 4. Sistema HISTOPAQUE® de obtención de fracciones sanguíneas	66
Figura 5. Amplificación de cRNA mediante el kit Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification (Agilent).	83
Figura 6. Técnica de inoculación intravenosa	98
Figura 7. Técnica de inoculación gástrica	100
Figura 8. Análisis de restricción del DNA mitocondrial	113
Figura 9. Amplificación de elementos delta	115
Figura 10. Crecimiento observado a 37, 39 y 42°C	127
Figura 11. Ejemplos del crecimiento observado de los aislados en placas para la determinación de la actividad proteasa (A) y fosfolipasa (B)	130
Figura 12. Grados de pseudofilamentación observados	133
Figura 13. Ejemplos de crecimiento invasivo en los aislados de productos dietéticos	134
Figura 14. Representación del porcentaje de supervivencia frente a los días postinfección para los aislados estudiados	140
Figura 15. Alojamiento observado en cerebro (A) y riñones (B) de los ratones BALB/c para los diferentes aislados de <i>S. cerevisiae</i> ensayados	145
Figura 16. Análisis histopatológico de cortes de cerebro y riñón de ratones infectados con la cepa de <i>S. cerevisiae</i> D14	147
Figura 17. Esquema del modelo murino 1	150

Figura 18. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D14 los días 1, 3, 5 y 7	152
Figura 19. Alojamiento de D14 observado en órganos diana de ratones sacrificados los días 5, 6 y 7 en el modelo murino 1	155
Figura 20. Esquema del modelo murino 2	156
Figura 21. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D14 los días 1, 3, 5 y 7	158
Figura 22. Alojamiento de D14 observado en órganos diana de ratones sacrificados los días 5, 6 y 7 en el modelo murino 2	160
Figura 23. Esquema del modelo murino 3	161
Figura 24. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D14 a los días 5, 8, 11, 13 y 14	163
Figura 25. Alojamiento de D14 observado en órganos diana de ratones sacrificados los días 11, 13 y 14 postinoculación oral en el modelo murino 3	164
Figura 26. Esquema de trabajo seguido para el estudio del comportamiento del aislado D23	167
Figura 27. Niveles de colonización gastrointestinal mostrados por el aislado D23 a los días 1, 3, 5 y 7	168
Figura 28. Alojamiento de D23 observado en órganos diana de ratones sacrificados los días 5, 6 y 7 postinoculación oral	170
Figura 29. Comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de ratón tras infección sistémica en el caso del aislado D14	171
Figura 30. Comprobación de la identidad de las colonias recuperadas de ratón tras administración oral con el aislado D23	172
Figura 31. Citometría de flujo de los aislados D14, 60 y 102	199

Figura 32. Mapa cromosómico correspondiente al aislado D14, aislado 60, aislado 102 y la cepa W303	201
Figura 33. Distribución de las ORFs significativas con cambio en el número de copias dentro del cromosoma en cada una de las cepas estudiadas	203
Figura 34. Determinación del número de copias génicas de los genes <i>IMD2</i> , <i>IMD3</i> , <i>SAM3</i> y <i>CUP1</i> en las cepas no virulentas (W303 y S288c) y en los aislados virulentos (60, 102 y D14)	213
Figura 35. Determinación del crecimiento de la cepa W303 y los aislados 60, 102 y D14 en un medio con diferentes concentraciones de cobre	214
Figura 36. Niveles de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo obtenidos al comparar cepas virulentas frente a no virulentas a los 60 min. de incubación en sangre humana	241
Figura 37. Porcentajes de supervivencia mostrados por las cepas virulentas y no virulentas después de someterlas a un estrés oxidativo	243
Tabla 1. Factores que contribuyen al establecimiento de una infección causada por patógenos oportunistas en humanos	8
Tabla 2. Síndromes causados por <i>S. cerevisiae</i>	12
Tabla 3. Lista de los productos a partir de los cuales se abordó el aislamiento de levaduras	54
Tabla 4. Cepas usadas en este estudio	56
Tabla 5. Medios de cultivo	57
Tabla 6. Diluciones sembradas en las placas de GPYA para cada temperatura	60
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	74
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la qRT-PCR	93

Tabla 9. Relación del número de ratones usados en total para cada cepa en el ensayo de infección sistémica	97
Tabla 10. Lista de productos dietéticos donde se especifica el tipo de crecimiento observado (levadura, bacteria o ninguno)	107
Tabla 11. Patrones de restricción correspondientes a los aislados de productos dietéticos para los genes utilizados en la caracterización de híbridos	111
Tabla 12. Patrones obtenidos al aplicar las técnicas de análisis de restricción del DNA mitocondrial y la amplificación por PCR de secuencias δ , así como los patrones compuestos obtenidos como resultado de la combinación de ambas técnicas	116
Tabla 13. Resultados observados para las actividades proteasa y fosfolipasa	129
Tabla 14. Comparación de los rasgos fenotípicos de virulencia obtenidos para los aislados procedentes de productos dietéticos	136
Tabla 15. Relación del número de ratones muertos y día de la muerte en el aislado D14	139
Tabla 16. Relación del número de ratones sacrificados para cada aislado y tiempo	141
Tabla 17. Valores de alojamiento obtenidos en cerebro y riñón a distintos tiempos	142
Tabla 18. Translocación y diseminación intestinal del aislado D14 en el modelo murino 1 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana	154
Tabla 19. Translocación y diseminación intestinal del aislado D14 en el modelo murino 2 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana	159
Tabla 20. Translocación y diseminación intestinal del aislado D14 en el modelo murino 3 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana	166

Tabla 21. Translocación y diseminación intestinal del aislado D23 en base al número de ratones que mostraron alojamientos en órganos diana	169
Tabla 22. Valores de ploidía para los aislados D14, 60 y 102	197
Tabla 23. Relación de los valores del Log_2 (R/V) de los genes con mayor número de copias en el cromosoma III del aislado clínico 60	205
Tabla 24. Genes con mayor número de copias en los aislados clínicos 60 y 102 y en el aislado D14	208
Tabla 25. Genes con menor número de copias en los aislados clínicos 60 y 102 y en el aislado D14	209
Tabla 26. Supervivencia de las diferentes cepas de levadura en sangre y sus fracciones sanguíneas	228
Tabla 27. Validación de los datos transcriptómicos mediante qRT-PCR	232
Tabla 28. Grupos funcionales inducidos significativamente a los 15, 30 y 60 min. de incubación en sangre para las cepas virulentas (60 y D14) y no virulentas (CECT 10.431 y W303).	234
Tabla 29. Grupos funcionales reprimidos significativamente a los 15, 30 y 60 min. de incubación en sangre para las cepas virulentas (60 y D14) y no virulentas (CECT 10.431 y W303)	235
Tabla 30. Grupos funcionales inducidos significativamente sólo en las cepas virulentas (60 y D14) tras 15, 30 y 60 min. de incubación en sangre	238
Tabla 31. Grupos funcionales reprimidos significativamente sólo en las cepas virulentas (60 y D14) tras 30 min. de incubación en sangre	241
Tabla 32. Comparaciones estadísticas de la Figura 37	243

ANEXO I

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

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencia	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos 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, RV	Favorable
Jensen y Smith, 1976	68 años, H	Médula espinal	Ingestión Levadura 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, hemodiálisis	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
Anaissie y col., 1989	26 años, H	Sangre	AML	Si	NE	No	NE	Si	Favorable
Anaissie 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

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencia	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia			
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	Cáncer epidérmico	NE	Si	No	Anfotericina B, 5-FC	NE	Muerte
Morrison y col., 1993	30 años, M	Sangre	Quimioterapia TM	NE	NE		Anfotericina B	NE	Favorable
Oriol y col., 1993	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	Válvula protética	NE	Si	NE	Anfotericina B	NE	Favorable

Infecciones causadas por *S. cerevisiae*

Referencia	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia			
Fung y col., 1996	32 años, M	Sangre	Choque 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 quística	Si	Si	NE	Anfotericina B	Si	Muerte
Fiore y col., 1998	10 semanas, NE	Sangre	Nacimiento prematuro Enfermedad crónica respiratoria	NE	Si	No	Anfotericina B	Si	Favorable
Fiore y col., 1998	7 años, H	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

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencia	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia			
Heath y col., 2000	59 años, M	Sangre	Diabetes, alcoholismo	NE	Si	No	FLU, Anfotericina B	NE	Muerte
Ramírez Moreno 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 prematuro	NE	Si	No	Anfotericina B	NE	Favorable
Ubeda y col., 2001	57 años, M	Sangre	Válvula protética	No	Si	No	KET	No, RV	Muerte
Smith y col., 2002	56 años, M	Sangre	Fístula aórtica	NE	Si	No	Anfotericina B	NE	Muerte
Ruiz-Esqvide y col., 2002	9 días, H	Endocarditis	Nacimiento prematuro	Si	Si	No	Anfotericina B, 5-FC	NE	Favorable
Belet y col., 2005	2 días, H	Sangre	Atresia esofágica	Si	Si	No	Anfotericina B,	Si	Favorable
de Llanos y col., 2006a	66 años, H	Sangre	SM, quimioterapia	Si	NE	Si	Fungizona	NE	Favorable
de Llanos y col., 2006a	12 años, H	Sangre	Trauma cerebral	Si	Si	NE	FLU	NE	Favorable

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencia	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia			
de Llanos y col., 2006a	77 años, M	Sangre	Neumonía	Si	Si	Si	NE	NE	Muerte
Graf y Gavazzi, 2007	66 años, M	Sangre	Adenocarcinoma gástrico	Si	NE	Si	FLU, VRZ	No	Muerte
Williams y col., 2007	51 años, M	Piel, sangre	AML	Si	Si	Si	Anfotericina B, VRZ	No	NE
Montineri y col., 2008	54 años, H	Sangre	Neumonía, Cirrosis	Si	Si	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Hamoud y col., 2011	34 años, M	Sangre, médula espinal	Ninguna, paciente sano	No	No	No	FLU, Anfotericina B, VRZ, 5-FC	NE	Favorable
<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 periuretral	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

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencia	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia			
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, Anfotericina B	NE	Favorable
Senneville y col., 1996	67 años, H	Uréter (bolas mitóticas)	Cirugía de uréter por carcinoma	NE	Si	NE	ITR/5-FC, Anfotericina B	NE	Favorable
Hovi y col., 1996	4 años, H	Osteomielitis	ALL, quimioterapia	NE	Si	Si	Anfotericina B	NE	Muerte
Kirsch y col., 1999	71 años, M	Absceso endoftálmico	Trauma, queratitis	NE	NE	No	Anfotericina B, FLU		Favorable

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i>									
Referencia	Edad y sexo	Aislamiento	Condición subyacente	Factores de predisposición			Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
				Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia			
Konecny y col., 1999	59 años, H	Esofagitis	SIDA	NE	No	No	FLU		Favorable
Ren y col., 2004	40 años, H	Pulmón	Exposición a levadura	No	No	No	Cirugía		Favorable
Kliemann y col., 2011	47 años, H	Esófago	Cáncer de esófago	NE	NE	NE	FLU		Muerte

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>									
Referencia	Edad y sexo	Condición subyacente	Factores de predisposición				Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
			Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia	Terapia con <i>S. boulardii</i>			
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 año, 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

Infecciones causadas por *S. cerevisiae* var. *bouardii*

Referencia	Edad y sexo	Condición subyacente	Factores de predisposición			Terapia con <i>S. bouardii</i>	Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
			Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia				
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 mielóide aguda	Si	NE	Si	Si	Anfotericina B	Si	Favorable
Hennequin y col., 2000	30 meses, H	Cirugía gasogástrica	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

Infecciones causadas por *S. cerevisiae* var. *boulardii*

Referencia	Edad y sexo	Condición subyacente	Factores de predisposición			Terapia con <i>S. boulardii</i>	Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
			Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia				
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, H	Cirugía de atresia intestinal	Si	Si	NE	No	Anfotericina B	Si	Favorable
Rijnders y col., 2000	74 años, H	Cirugía cerebral	Si	No	No	Si	FLU	Si	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

Infecciones causadas por *S. cerevisiae* var. *boulardii*

Referencia	Edad y sexo	Condición subyacente	Factores de predisposición			Terapia con <i>S. boulardii</i>	Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
			Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia				
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
Lestin 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-páncreas	NE	Si	NE	Si	FLU	NE	Favorable
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

Infecciones causadas por <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>									
Referencia	Edad y sexo	Condición subyacente	Factores de predisposición			Terapia con <i>S. boulardii</i>	Tratamiento	Retirada del catéter IV	Resultado
			Catéter intravenoso	Terapia antibióticos previa	Neutropenia				
Henry y col., 2004	65 años, H	Cáncer orofaríngeo	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 col., 2005	76 años, M	Diabetes; cirugía de corazón	Si	Si	No	Si	FLU	NE	Muerte
Muñoz y col., 2005	72 años, M	Cirugía de corazón	Si	Si	No	Si	Ninguno	NE	Muerte
Muñoz y col., 2005	74 años, M	Artritis reumatoide	No	Si	NE	Si	FLU	NE	Muerte
de Llanos y col., 2006a	1 año, M	Trauma craneoencefálico; contusión pulmonar	Si	Si	NE	NE	Cefotaxima	NE	Favorable
Lolis y col., 2008	56 años, H	Neumonía, choque séptico	Si	Si	Si	Si	Caspofungina	NE	Favorable

M: Mujer; **H:** hombre; **ALL:** Leucemia Aguda Linfoide; **AML:** Leucemia Aguda Mieloide; **TM:** Transplante medular; **DPC:** Diálisis peritoneal crónica; **EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; **AER:** Anemia Eritroblástica refractoria; **SM:** Síndrome Mielodisplástico; **TIS:** Terapia inmunosupresora; **SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida; **SIRA:** Síndrome de Insuficiencia Respiratoria Aguda; **FLU:** fluconazol; **ITR:** itraconazol; **KET:** ketoconazol; **MCZ:** miconazol; **VRZ:** voriconazol; **NE:** no especificado; **5-FC:** 5- flucitosina; **RV:** reemplazamiento valvular

ANEXO II

**Tamaños de los fragmentos de restricción
de cada una de las cepas de referencia de
*S. cerevisiae***

Tabla 1. Tamaños de los fragmentos de restricción de los productos de PCR deducidos a partir de las secuencias génicas de cada una de las cepas de referencia de *S. uvarum* MCYC 623, *S. bayanus* (conjunto de cepas: *S. bayanus* NBRC 1948, CECT 11186, CBS 424 o *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70), *S. cerevisiae* S288c y *S. kudriavzevii* NBRC 1802 (González y col., 2008; Lopes y col., 2010; Pérez-Través y col., manuscrito en preparación) para 3 genes nucleares analizados.

Cr.	Gen	Enzima restricción	<i>S. uvarum</i> MCYC 623	Patrón	Cepas referencia <i>S. bayanus</i>	Patrón	<i>S. cerevisiae</i> S288c	Patrón	<i>S. kudriavzevii</i> NBRC 1802	Patrón
II	<i>APM3</i>	<i>MspI</i>	960, 70	U1	680, 340	B1	750, 280	C1	830, 200	K1
X	<i>PEX2</i>	<i>HaeIII</i>	330, 210, 120, 40	U1	270, 180, 150, 100	B1	345, 260, 110	C1	590, 130	K1
XIV	<i>BRE5</i>	<i>HinfI</i>	335, 300, 145	U1	396, 235, 95, 50	B1	290, 230, 100, 65, 60, 40	C1	170, 165, 150, 135, 95, 65	K1

Los patrones de restricción se nombraron con la inicial del nombre específico de la especie seguido del número 1, por ser el alelo encontrado en la cepa de referencia. Abreviaciones: Cr, cromosoma.

Tabla 2. Patrones de restricción “raros” mostrados por *S. cerevisiae* o *S. kudriavzevii* a causa de uno o dos pérdidas/ganancias de sitios de restricción (indicados en negrita) respecto de los encontrados en las cepas de referencia para los genes *APM3* y *PEX2* (González y col., 2008).

Cr.	Gen	Enzima restricción	Patrones de referencia	Patrón	“Patrones raros”	Patrón
II	<i>APM3</i>	<i>MspI</i>	830, 200	K1	520, 310, 200	K2
X	<i>PEX2</i>	<i>HaeIII</i>	345, 260, 110	C1	370, 345	C2

Los patrones de restricción de referencia se nombraron con la inicial del nombre específico de la especie seguido del número 1, por ser el alelo encontrado en la cepa de referencia. Los patrones de restricción “raros” se nombraron con la inicial del nombre específico de la especie seguido del número 2, por ser un alelo diferente al encontrado en la cepa de referencia. Abreviaciones: Cr, cromosoma.

ANEXO III

**Relación de los niveles de expresión de los
grupos funcionales**

Tabla S1. Relación de los niveles de expresión observados en los diferentes grupos funcionales significativos en las cepas avirulentas CECT10.431 y W303

Grupo funcional	Actividad	Gen	CECT10.431			W303		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Metabolismo de carbohidratos	Glucosa-6-fosfato isomerasa	<i>PGI1</i>	+1.769	+3.405	+3.223	-0.491	+0.332	-0.039
	Fosfofructoquinasa	<i>PFK2</i>	+0.875	+1.835	+2.117	-0.378	-0.400	+0.304
	Aldolasa	<i>FBA1</i>	+1.253	+3.288	+3.800	-1.226	-0.345	-0.606
	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	<i>TDH3</i>	+0.341	+2.128	+3.257	-0.765	-0.242	-0.415
	Fosfoglicerato quinasa	<i>PGK1</i>	+0.313	+2.765	+3.250	-1.493	-1.739	-1.915
	Enolasa	<i>ENO1</i>	+1.177	+3.123	+3.557	-1.795	-1.074	-0.473
	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>PCK1</i>	-2.272	-5.872	-5.509	+1.235	+0.876	+0.885
Ciclo glioxilato	Isociatrato liasa	<i>ICL1</i>	-3.252	-3.563	-2.102	+1.055	+0.580	+1.272
	Malato sintasa	<i>MLS1</i>	-3.860	-4.713	-3.887	+0.743	+0.667	+1.200
Traducción Biogénesis de ribosomas Expresión génica	Componente estructural del ribosoma	<i>RPL19B</i>	+2.833	+3.565	+3.338	-0.006	-0.172	+0.588
	Componente estructural del ribosoma	<i>RPL23A</i>	+2.624	+3.668	+3.802	-0.687	+0.250	+0.228
	Componente estructural del ribosoma	<i>RPL32</i>	+3.498	+4.018	+4.082	-0.587	+0.309	+0.589
	Componente estructural del ribosoma	<i>RPS11B</i>	+3.489	+4.096	+3.788	-0.476	+0.246	+0.662
	Componente estructural	<i>RPS10A</i>	+2.511	+3.985	+3.993	-0.855	-0.033	+0.607

Grupo funcional	Actividad	Gen	CECT10.431			W303		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Traducción Biogénesis de ribosomas Expresión génica	Componente estructural del ribosoma	<i>RPS10B</i>	+2.741	+3.904	+3.531	-0.620	-0.025	+0.371
	Factor elongación de la traducción	<i>EFB1</i>	+0.948	+0.790	+1.341	-0.669	-0.202	-0.223
	Factor elongación de la traducción	<i>TEF2</i>	+0.984	+1.722	+1.118	-0.785	-0.201	+0.043
	Treonil-tRNA sintetasa	<i>THS1</i>	+3.034	+3.263	+2.921	+0.227	+0.317	+0.614
	Unión al rRNA	<i>RPF2</i>	+3.683	+4.019	+2.519	+0.584	+0.842	+1.578
	Componente estructural del ribosoma	<i>RLP24</i>	+3.272	+3.615	+2.445	+0.574	+1.120	+1.774
	Componente estructural del ribosoma	<i>RLP7</i>	+2.034	+2.272	+1.567	+0.742	+1.222	+1.822
	Componente estructural del ribosoma	<i>NOP15</i>	+2.859	+3.085	+1.775	+0.915	+0.283	+2.019
	Componente estructural del ribosoma	<i>NIP7</i>	+4.233	+4.667	+3.841	+0.668	+0.895	+1.897
Factor de iniciación de la traducción	<i>TIF3</i>	+2.675	+2.997	+2.508	+0.205	+0.538	+1.276	
Biosíntesis y metabolismo de aminácidos	3-isopropilmalato deshidrogenasa	<i>LEU2</i>	+0.529	+1.885	+1.677	+0.067	+0.599	+0.284
	2-isopropolmalato sintasa	<i>LEU9</i>	+0.288	+0.701	-0.242	+0.144	+0.591	+0.924
	3-fosfoglicerato deshidrogenasa	<i>SER3</i>	+0.311	+0.110	+0.332	+0.010	+0.006	+0.026
	Fosfoglicerato deshidrogenasa	<i>SER33</i>	+3.396	+1.871	+2.920	-0.155	+0.081	+0.048
	Treonina desaminasa	<i>ILV1</i>	+1.023	+1.332	+1.267	+0.347	+0.411	+0.385

Grupo funcional	Actividad	Gen	CECT10.431			W303		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Biosíntesis y metabolismo de aminoácidos	Sacaropina deshidrogenasa	<i>LYS1</i>	+2.308	+1.665	+1.658	+1.136	-0.166	-0.189
	Homoaconitato hidratasa	<i>LYS4</i>	+0.949	+1.093	+0.783	-0.005	-0.267	-0.372
	3-desoxi-7-Fosfoheptulonato sintasa	<i>ARO3</i>	+0.417	+0.337	+0.159	+0.322	+0.221	+0.344
	3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa	<i>ARO4</i>	+0.781	+0.942	+0.899	-1.174	-0.830	-0.164
	Transportador de L-ornitina	<i>ORT1</i>	+1.027	+1.068	+1.663	+0.187	-0.157	-0.438
	Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH5</i>	-1.376	-0.558	-0.182	-1.187	-1.366	-1.295
	ATP fosforibosil transferasa	<i>HIS1</i>	-1.360	-0.521	-0.130	-0.485	-0.278	+0.080
	Histidinol deshidrogenasa	<i>HIS4</i>	+0.943	+0.752	+1.539	+0.135	-0.473	-0.828
	Histidinol-fosfato aminotransferasa	<i>HIS5</i>	+0.782	+0.919	+0.875	-0.265	-0.560	-0.201
	Acetilglutamato quinasa	<i>ARG5,6</i>	+0.576	+0.625	+0.503	-0.104	+0.207	+0.228
	Arginina succinato sintasa	<i>ARG1</i>	-0.674	-0.867	-0.873	+1.376	+1.208	+0.075
	Acetilornitina transaminasa	<i>ARG8</i>	+0.180	+0.514	+0.111	+0.272	+0.861	+0.589
	Homocisteína S-metiltransferasa	<i>SAM4</i>	+2.526	+2.440	+2.156	-0.586	-0.300	-0.073
	Aspartato carbamoil transferasa	<i>URA2</i>	+0.485	+0.736	+0.687	-0.183	-0.212	-0.067
	Indol-3-glicerol-fosfato sintasa	<i>TRP3</i>	+0.942	+1.069	+0.913	+0.015	+0.367	+0.294

Grupo funcional	Actividad	Gen	CECT10.431			W303		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Plegamiento de proteínas	Proteína de choque térmico	<i>SSA1</i>	-2.906	-1.772	-1.470	-0.937	-1.204	-1.185
	Proteína de choque térmico	<i>SSA2</i>	-2.973	-1.571	-1.370	-1.530	-1.529	-1.385
	Co-chaperona	<i>SSE1</i>	-0.911	-1.155	-1.391	-1.734	-1.916	-1.425
	Proteína de choque térmico	<i>HSP60</i>	-1.587	-1.210	-1.336	-1.737	-2.452	-1.796
	Chaperona	<i>HSP10</i>	-0.993	-0.561	-0.467	-2.331	-2.050	-1.077
	Chaperona	<i>CPR6</i>	-0.929	-1.150	-0.922	-1.197	-2.331	-1.886
	Chaperona	<i>STI1</i>	-1.790	-1.574	-1.582	-1.069	-2.637	-1.816
Fosforilación oxidativa	ATP sintasa	<i>ATP1</i>	-1.953	-2.844	-2.850	+1.028	+0.680	+0.257
	ATP sintasa	<i>ATP2</i>	-1.455	-2.142	-2.567	-0.555	-1.174	-0.431
	ATP sintasa	<i>ATP4</i>	-1.437	-2.141	-1.961	+0.220	+0.529	+0.426
	ATP sintasa	<i>ATP16</i>	-1.483	-2.101	-1.764	+0.073	+0.291	-0.507
	Transportador de electrones	<i>CYC7</i>	-1.195	-2.023	-2.361	+0.188	-0.678	-1.194
	Citocromo-c oxidasa	<i>COX4</i>	-1.529	-2.062	-2.283	-0.032	-0.223	-0.010
	Succinato deshidrogenasa	<i>SDH1</i>	-1.863	-2.726	-2.868	-0.077	-0.066	-0.453
Reparación de bases	Factor de procesividad de DNA polimerasa	<i>POL30</i>	+1.026	+0.482	+1.098	+0.496	+0.145	+0.816
	5' endonucleasa	<i>RAD27</i>	-0.319	+0.080	+0.627	-0.255	-0.132	-0.200
	DNA liasa	<i>APN1</i>	+0.751	+1.149	+0.937	+0.672	+0.666	+0.910
	Glicosilasa específica de bases dañadas	<i>OGG1</i>	+0.658	+0.733	+0.705	+0.061	+0.354	+0.534

Grupo funcional	Actividad	Gen	CECT10.431			W303		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Organización vacuolar	Calmodulina	<i>CMD1</i>	-0.150	+0.104	+0.499	-0.026	+0.753	-0.309
	Componente del complejo CORVET	<i>VPS3</i>	+0.115	+0.158	-0.160	-0.135	-0.086	+0.374
	Transportador de ion hidrógeno	<i>CUP5</i>	+0.437	+1.068	+0.720	+0.236	+0.099	+0.515
	Subunidad del transportador vacuolar VTC	<i>VTC1</i>	-0.496	+0.523	+1.037	-0.086	-0.041	+1.095
	Proteína de la membrana plasmática	<i>SFK1</i>	-0.278	-0.066	-0.229	+0.391	+0.092	-0.014
	Proteína estructural de vacuola	<i>VID24</i>	-1.345	-1.116	-1.240	-1.137	-0.935	-1.007
	Enzima regulador	<i>VAC7</i>	-0.310	-0.499	-0.596	-0.578	-0.383	-0.261
	Subunidad del transportador vacuolar VTC	<i>VTC3</i>	+0.262	+0.226	+0.882	-0.323	+0.043	+0.661
Transporte de xenobióticos	Transportador ABC	<i>PDR5</i>	+0.335	+0.566	+1.379	+0.508	+0.922	+0.329
	Transportador ABC	<i>SNQ2</i>	-0.550	-0.393	-0.295	-0.019	-0.067	+0.311
	Transportador ABC	<i>PDR12</i>	-1.081	-0.772	-0.864	-0.655	-0.240	-0.126
Actividad fosfatasa	Ácido fosfatasa	<i>PHO3</i>	+0.269	+0.616	+0.725	-0.640	-0.077	-0.577
	Ácido fosfatasa	<i>PHO5</i>	-0.344	-0.180	-0.136	-0.244	-0.763	-0.535
	Fosfatidato fosfatasa	<i>LPP1</i>	+0.367	+0.229	+0.407	+0.308	+0.321	+0.244
	Ácido fosfatasa	<i>PHO12</i>	+0.052	+0.181	+0.480	+0.473	+0.456	+0.011
	Nucleotidasa	<i>SDT1</i>	+0.651	+0.289	+0.644	+0.192	+0.332	+0.429

Grupo funcional	Actividad	Gen	CECT10431			W303		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Actividad fosfatasa	Serina/treonina fosfatasa	<i>SAP185</i>	+0.374	-0.023	+0.137	+0.026	-0.358	-0.387
	Inositol-polifosfato 5-fosfatasa	<i>INP51</i>	+0.616	+0.194	+0.543	-0.317	-0.084	-0.216
	Inositol/fosfatidilinositol fosfatasa	<i>SAC1</i>	-0.033	+0.141	+0.174	-0.181	-0.042	+0.373
	Serina/treonina fosfatasa	<i>PPZ1</i>	+0.312	-0.065	+0.182	+0.108	+0.052	+0.515
	Fosfoproteína fosfatasa	<i>FCP1</i>	+0.512	+0.255	+0.070	+0.008	+0.025	-0.147
	Proteína de función desconocida	<i>YNL217W</i>	-0.520	-0.643	-0.330	+0.363	+0.304	+0.417
Transporte transmembrana	Transportador tricarboxílico	<i>CTP1</i>	+1.008	+0.645	+0.887	-0.335	-0.293	+0.335
	ATP sintasa	<i>ATP17</i>	-0.992	-1.494	-1.689	-1.386	-1.621	-1.328
	Transportador de azúcares	<i>HXT10</i>	-0.216	-0.070	-0.154	+0.450	+0.542	+1.130
	Transportador de zinc	<i>ZRT1</i>	+0.539	+0.901	-0.877	-1.442	-1.519	-0.857
	Transportador de zinc	<i>ZRT2</i>	+0.802	+0.346	-0.433	-0.720	-0.844	-0.342
	Transportador de espermina	<i>TPO2</i>	-0.485	+0.698	+1.076	-0.062	-0.319	-0.070
	Permeasa nicotinamida mononucleótido	<i>TNA1</i>	+0.826	+0.766	+0.490	+0.158	+0.163	+0.577
	Transportador de hidrógeno	<i>VMA5</i>	+1.073	+1.610	+1.714	-1.315	-1.371	-0.700
	Transportador de ácido biliar	<i>YBT1</i>	+0.026	+0.135	-0.106	-0.110	-0.324	-0.096
	Bomba multidroga	<i>ATR1</i>	-0.758	-0.414	-0.422	-0.223	-0.725	-0.381
Transportador de hierro	<i>SMF3</i>	+0.356	+0.105	-0.082	+0.097	-0.541	+0.131	

Grupo funcional	Actividad	Gen	CECT 10.431			W303		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Transporte transmembrana	Transportador	<i>YHM1</i>	-0.251	-0.279	+0.278	+0.652	+0.548	+0.640
	Transportador de ácidos orgánicos	<i>ODC2</i>	+0.109	+0.662	+0.176	-0.425	-0.089	+0.306
	Transportador de adenina	<i>ANT1</i>	+0.652	+0.549	+0.247	+0.110	-0.604	-0.499
	Transportador de espermina	<i>TPO3</i>	-0.645	+0.852	+0.981	-0.007	-0.524	+0.037
	Transportador de aminoácidos	<i>GNP1</i>	-1.433	-1.585	-2.164	+0.748	+0.455	+1.064
Homeostasis redox celular	Reductasa tiorredoxina-disulfuro	<i>TTR1</i>	-0.752	-0.730	-0.099	+0.253	+0.081	-0.064
	Tiorredoxina 1	<i>TRX1</i>	+0.520	+1.025	+0.842	+0.267	+0.541	+0.536
	Tiorredoxina 2	<i>TRX2</i>	-0.484	+0.091	+0.872	-0.434	-0.495	-0.732
	Tiorredoxina peroxidasa	<i>TSA1</i>	-0.675	+0.002	+1.200	+0.802	+0.792	-0.654
	Tiorredoxina peroxidasa	<i>TSA2</i>	-0.165	+0.521	+1.761	+0.562	+0.007	-0.921
	Homocitrato sintasa	<i>LYS20</i>	+1.432	+0.909	+0.581	+0.111	+0.295	+0.050
	Transaldolasa	<i>TAL1</i>	+0.835	+1.083	+0.887	+0.286	+0.941	+0.576
	Fosfoglucomutasa	<i>PGM2</i>	-1.345	-1.943	-1.858	-0.068	-0.345	-0.916
	Trehalosa-6-fosfato sintasa	<i>TPS1</i>	-1.518	-1.222	-1.686	-0.103	-0.827	-1.071
Transcetolasa	<i>TKL1</i>	+1.838	+2.135	+1.895	+0.044	-0.369	-1.041	
Metabolismo de la piridoxina	Proteína de unión	<i>SNZ3</i>	-0.097	+0.608	+0.050	+0.318	+0.199	-0.066
	Proteína de unión	<i>SNZ2</i>	+0.421	+1.171	+0.849	+0.118	-0.009	-0.424
	Prot. función desconocida	<i>SNO2</i>	-0.168	+0.128	+0.238	+0.297	+0.163	+0.533

Todos los datos indicados son significativos y corresponden a la media del Log₂ Cy3/Cy5 de tres réplicas biológicas.

Tabla S2. Relación de los niveles de expresión observados en los diferentes grupos funcionales significativos en las cepas virulentas D14 y 60

Grupo funcional	Actividad	Gen	D14			60		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Metabolismo de carbohidratos	Glucosa-6-fosfato isomerasa	<i>PGI1</i>	+1.394	+2.750	+2.207	+1.575	+2.050	+2.799
	Fosfofructoquinasa	<i>PFK2</i>	+0.541	+1.230	+0.508	+0.984	+1.622	+1.774
	Aldolasa	<i>FBA1</i>	+1.450	+1.802	+1.467	+0.624	+0.807	+2.289
	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	<i>TDH3</i>	+0.364	+1.649	+1.564	-1.150	+0.059	+2.067
	Fosfoglicerato quinasa	<i>PGK1</i>	+0.248	+1.800	+1.800	-0.752	+1.532	+3.526
	Enolasa	<i>ENO1</i>	+0.637	+2.099	+2.553	-1.771	+0.521	+3.146
	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>PCK1</i>	-2.636	-3.431	-2.825	-2.836	-2.201	-1.326
Ciclo glioxilato	Isociatrato liasa	<i>ICL1</i>	-3.109	-1.454	-0.411	-1.723	-0.708	-0.083
	Malato sintasa	<i>MLS1</i>	-3.399	-1.947	-2.038	-2.793	-1.163	-0.965
Traducción Biogénesis de ribosomas Expresión génica	Componente estructural del ribosoma	<i>RPL19B</i>	+2.895	+3.041	+3.346	+2.456	+2.617	+3.017
	Componente estructural del ribosoma	<i>RPL23A</i>	+3.532	+3.270	+3.134	+3.742	+3.046	+3.242
	Componente estructural del ribosoma	<i>RPL32</i>	+2.972	+3.309	+3.370	+2.923	+3.300	+2.967
	Componente estructural	<i>RPS11B</i>	+2.943	+3.397	+2.363	+3.368	+3.259	+3.907
	Componente estructural del ribosoma	<i>RPS10A</i>	+2.634	+2.723	+3.558	+2.724	+2.970	+3.591

Grupo funcional	Actividad	Gen	D14			60		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Traducción Biogénesis de ribosomas Expresión génica	Componente estructural del ribosoma	<i>RPS10B</i>	+2.275	+1.956	+3.462	+3.003	+2.952	+3.420
	Factor elongación de la traducción	<i>EFB1</i>	+1.352	+1.616	+0.941	+2.349	+2.673	+2.359
	Factor elongación de la traducción	<i>TEF2</i>	+0.848	+1.718	+0.698	+1.455	+1.388	+0.989
	Treonil-tRNA sintetasa	<i>THS1</i>	+1.208	+1.616	+1.270	+2.330	+1.873	+1.638
	Unión al rRNA	<i>RPF2</i>	+2.894	+1.795	+1.396	+3.467	+2.245	-0.068
	Componente estructural del ribosoma	<i>RLP24</i>	+2.433	+2.490	+1.509	+2.285	+1.105	-0.688
	Componente estructural del ribosoma	<i>RLP7</i>	+1.565	+1.201	+0.901	+2.423	+1.628	+0.213
	Componente estructural del ribosoma	<i>NOP15</i>	+1.989	+0.868	+0.613	+3.548	+1.333	-0.372
	Componente estructural del ribosoma	<i>NIP7</i>	+3.304	+3.534	+2.684	+3.524	+1.949	+1.976
Factor de iniciación de la traducción	<i>TIF3</i>	+1.723	+1.320	+1.199	+3.117	+2.127	+1.489	
Biosíntesis y metabolismo de aminoácidos	3-isopropilmalato deshidrogenasa	<i>LEU2</i>	+3.013	+2.326	+1.335	+1.107	+1.358	+1.813
	2-isopropilmalato sintasa	<i>LEU9</i>	+2.010	+2.349	+1.156	+2.619	+1.760	+2.644
	3-fosfoglicerato deshidrogenasa	<i>SER3</i>	+2.475	+3.574	+2.188	+4.497	+2.822	+3.521
	Fosfoglicerato deshidrogenasa	<i>SER33</i>	+2.253	+2.998	+2.030	+3.065	+3.075	+2.728
	Treonina desaminasa	<i>ILV1</i>	+1.479	+1.670	+1.348	+2.214	+2.184	+2.183

Grupo funcional	Actividad	Gen	D14			60		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Biosíntesis y metabolismo de aminoácidos	Sacaropina deshidrogenasa	<i>LYS1</i>	+3.318	+2.348	+2.179	+2.305	+3.089	+3.363
	Homoaconitato hidratasa	<i>LYS4</i>	+1.489	+1.192	+1.121	+0.956	+1.590	+1.672
	3-desoxi-7-Fosfoheptulonato sintasa	<i>ARO3</i>	+0.465	+1.050	+0.322	+1.655	+1.972	+2.472
	3-desoxi-7-Fosfoheptulonato sintasa	<i>ARO4</i>	+0.962	+2.289	+1.526	+1.009	+1.177	+1.821
	Transportador de L-ornitina	<i>ORT1</i>	+1.455	+1.732	+1.228	+1.909	+2.782	+2.625
	Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH5</i>	+0.057	+0.366	+0.523	-0.431	+0.328	+0.759
	ATP fosforibosil transferasa	<i>HIS1</i>	+1.474	+1.859	+0.786	+2.745	+2.478	+2.825
	Histidinol deshidrogenasa	<i>HIS4</i>	+1.045	+2.419	+1.555	+2.732	+2.474	+2.764
	Histidinol-fosfato aminotransferasa	<i>HIS5</i>	+1.807	+1.848	+1.281	+1.902	+3.146	+2.422
	Acetilglutamato quinasa	<i>ARG5,6</i>	+0.966	+1.236	+0.857	+2.117	+1.930	+2.363
	Arginina succinato sintasa	<i>ARG1</i>	+2.549	+1.646	+0.727	+3.242	+3.180	+2.751
	Acetilornitina transaminasa	<i>ARG8</i>	+1.866	+1.960	+1.311	+3.101	+3.026	+3.102
	Homocisteína S-metiltransferasa	<i>SAM4</i>	+2.012	+2.350	+1.972	+2.941	+3.397	+3.233
	Aspartato carbamoil transferasa	<i>URA2</i>	+0.536	+1.241	+0.985	+1.139	+1.796	+2.082
	Indol-3-glicerol-fosfato sintasa	<i>TRP3</i>	+0.506	+1.252	+0.635	+2.157	+2.395	+1.793

Grupo funcional	Actividad	Gen	D14			60		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Plegamiento de proteínas	Proteína de choque térmico	<i>SSA1</i>	-2.259	-0.576	-0.895	-0.112	-0.410	-0.323
	Proteína de choque térmico	<i>SSA2</i>	-2.187	-0.339	-1.063	+0.468	-0.037	-0.139
	Co-chaperona	<i>SSE1</i>	+0.668	+0.006	-0.873	+3.281	+2.052	+1.539
	Proteína de choque térmico	<i>HSP60</i>	-1.221	-0.103	-1.183	-1.082	-0.715	-0.774
	Chaperona	<i>HSP10</i>	-1.208	-0.467	-0.524	-0.462	+0.368	+1.260
	Chaperona	<i>CPR6</i>	-1.670	-0.012	-1.184	+1.894	+0.762	+2.291
	Chaperona	<i>STI1</i>	-1.561	+0.313	-2.217	+1.227	+0.984	+0.602
Fosforilación oxidativa	ATP sintasa	<i>ATP1</i>	-1.664	-1.208	-1.180	+0.184	-0.435	-0.522
	ATP sintasa	<i>ATP2</i>	-1.765	-1.510	-1.341	-1.250	-1.400	-0.862
	ATP sintasa	<i>ATP4</i>	-1.737	-1.856	-1.332	+0.250	+0.457	+0.928
	ATP sintasa	<i>ATP16</i>	-1.518	-1.714	-0.762	+0.034	+0.029	+0.166
	Transportador de electrones	<i>CYC7</i>	-1.153	-0.876	-0.758	-0.644	-1.141	-0.971
	Citocromo-c oxidasa	<i>COX4</i>	-1.512	-1.045	-0.755	-0.193	-0.271	-0.181
	Succinato deshidrogenasa	<i>SDH1</i>	-1.663	-1.453	-0.489	-3.187	-2.597	-1.304
Reparación de bases	Factor de procesividad de DNA polimerasa	<i>POL30</i>	+1.348	+0.670	+1.320	+2.015	+0.038	+1.099
	5' endonucleasa	<i>RAD27</i>	+1.505	+0.280	+1.163	+1.363	+0.814	+0.599
	DNA liasa	<i>APN1</i>	+1.135	+0.641	+0.713	+1.243	+1.985	+0.531
	Glicosilasa específica de bases dañadas	<i>OGG1</i>	+1.624	+0.954	+1.319	+1.018	+1.253	+0.518

Grupo funcional	Actividad	Gen	D14			60		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Organización vacuolar	Calmodulina	<i>CMD1</i>	+0.248	+0.610	+0.121	+1.453	+1.110	+1.732
	Componente del complejo CORVET	<i>VPS3</i>	+0.287	-0.140	-0.269	+1.617	+1.282	-0.526
	Transportador de ion hidrógeno	<i>CUP5</i>	+0.774	+1.145	+0.291	+1.756	+1.496	+1.608
	Subunidad del transportador vacuolar VTC	<i>VTC1</i>	+1.601	+1.556	+0.750	+1.712	+1.443	+2.020
	Proteína de la membrana plasmática	<i>SFK1</i>	+1.174	+1.370	+0.669	+1.264	+0.649	+1.742
	Proteína estructural de vacuola	<i>VID24</i>	+0.016	+0.201	-0.174	+0.894	-0.084	-0.159
	Enzima regulador	<i>VAC7</i>	-0.092	-0.173	-0.505	-0.052	-0.046	-1.188
	Subunidad del transportador vacuolar VTC	<i>VTC3</i>	+1.989	+1.978	+1.381	+2.395	+2.237	+2.594
Transporte de xenobióticos	Transportador ABC	<i>PDR5</i>	+1.588	+1.563	+1.596	+1.192	+1.171	+1.767
	Transportador ABC	<i>SNQ2</i>	-0.044	-0.271	-0.395	+0.213	+0.489	+0.555
	Transportador ABC	<i>PDR12</i>	-0.385	-0.035	+0.116	+0.038	+0.418	+0.062
Actividad fosfatasa	Ácido fosfatasa	<i>PHO3</i>	+1.794	+1.199	+0.646	+1.425	+2.993	+2.300
	Ácido fosfatasa	<i>PHO5</i>	+0.530	+0.157	+0.296	+1.024	+2.262	+2.850
	Fosfatidato fosfatasa	<i>LPP1</i>	+0.886	+0.864	+0.565	+1.413	+1.700	+2.517
	Ácido fosfatasa	<i>PHO12</i>	+1.608	+0.561	+0.230	+1.273	+2.922	+3.180
	Nucleotidasa	<i>SDT1</i>	+2.412	+1.553	+1.619	+2.388	+2.481	+2.519

Grupo funcional	Actividad	Gen	D14			60		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Actividad fosfatasa	Inositol-polifosfato 5-fosfatasa	<i>INP51</i>	+0.686	+0.630	+1.326	-0.103	+1.149	+0.977
	Serina/treonina fosfatasa	<i>SAP185</i>	+0.646	+0.751	+0.620	+0.889	+0.449	-0.186
	Inositol/fosfatidilinositol fosfatasa	<i>SAC1</i>	+0.365	+0.422	+0.122	+0.792	+0.767	+0.820
	Serina/treonina fosfatasa	<i>PPZ1</i>	+0.177	+0.388	+1.151	+0.932	+0.184	+0.525
	Fosfoproteína fosfatasa	<i>FCP1</i>	+0.773	+0.806	+0.847	+1.303	+0.727	-0.035
	Proteína de función desconocida	<i>YNL217W</i>	+1.291	+2.433	+1.160	+0.267	+1.876	+1.640
Transporte transmembrana	Transportador tricarboxílico	<i>CTP1</i>	+1.807	+1.564	+1.101	+2.058	+2.157	+2.792
	ATP sintasa	<i>ATP17</i>	-0.893	-0.641	-0.861	+0.932	+0.533	+0.647
	Transportador de azúcares	<i>HXT10</i>	+0.198	+1.026	+0.353	+2.856	+0.364	+1.684
	Transportador de zinc	<i>ZRT1</i>	+1.908	+1.704	-0.199	+1.315	+1.957	+2.425
	Transportador de zinc	<i>ZRT2</i>	+1.605	+1.807	+0.835	+0.854	+0.560	+1.825
	Transportador de espermina	<i>TPO2</i>	-0.195	+2.174	+2.521	+0.176	+2.180	+2.819
	Permeasa nicotinamida mononucleótido	<i>TNA1</i>	+1.132	+1.431	+0.593	+0.738	+0.734	+0.942
	Transportador de hidrógeno	<i>VMA5</i>	+1.236	+1.296	+1.204	+1.833	+2.610	+2.242
	Transportador de ácido biliar	<i>YBT1</i>	-0.277	+0.297	-0.144	+1.038	+0.379	+0.865
	Transportador de hierro	<i>SMF3</i>	+0.518	+0.421	-0.227	+0.468	+0.514	+1.164
	Bomba multidroga	<i>ATR1</i>	-0.380	+0.156	-0.551	-0.421	+0.045	+0.043
	Transportador	<i>YHM1</i>	+1.537	+1.890	+1.634	+1.324	+2.560	+2.480

Grupo funcional	Actividad	Gen	D14			60		
			15'	30'	60'	15'	30'	60'
Transporte transmembrana	Transportador de ácidos orgánicos	<i>ODC2</i>	+2.360	+2.230	+1.738	+2.294	+3.051	+2.455
	Transportador de adenina	<i>ANT1</i>	+0.518	+1.388	+1.018	+1.233	+0.657	+1.408
	Transportador de espermina	<i>TPO3</i>	-0.402	+1.740	+1.703	+1.163	+2.623	+3.263
	Transportador de aminoácidos	<i>GNP1</i>	-0.448	+0.367	-0.426	+0.325	+1.174	+0.748
Homeostasis redox celular	Reductasa tiorredoxina-disulfuro	<i>TTR1</i>	+0.220	+0.545	+0.287	+0.696	+1.461	+1.376
	Tiorredoxina 1	<i>TRX1</i>	+0.846	+1.216	+1.155	+0.593	+1.160	+1.730
	Tiorredoxina 2	<i>TRX2</i>	+0.730	+1.531	+1.508	+0.011	+1.538	+2.233
	Tiorredoxina peroxidasa	<i>TSA1</i>	+0.843	+1.965	+2.000	-0.470	+2.355	+2.893
	Tiorredoxina peroxidasa	<i>TSA2</i>	+0.916	+1.267	+2.363	-0.986	+2.647	+2.378
	Homocitrato sintasa	<i>LYS20</i>	+0.928	+1.742	+1.503	+1.909	+1.397	+2.163
	Transaldolasa	<i>TAL1</i>	+1.046	+1.026	+1.874	+0.993	+1.058	+2.732
	Fosfoglucomutasa	<i>PGM2</i>	-0.883	+0.069	-0.297	-1.403	-0.409	+0.471
	Trehalosa-6-fosfato sintasa	<i>TPS1</i>	-1.206	-0.641	-0.597	-1.422	-1.445	-0.615
Transcetolasa	<i>TKL1</i>	+1.898	+2.732	+1.875	+1.849	+1.785	+1.505	
Metabolismo de la piridoxina	Proteína de unión	<i>SNZ3</i>	-0.858	-0.943	-0.629	-0.624	-1.090	-0.657
	Proteína de unión	<i>SNZ2</i>	-0.697	-1.370	+0.265	-1.508	-1.026	-0.606
	Proteína de función desconocida	<i>SNO2</i>	-0.659	-0.612	+0.581	-1.358	-1.231	-0.390

Todos los datos indicados son significativos y corresponden a la media del Log₂ Cy3/Cy5 de tres réplicas biológicas.

Bibliografía

- Abshire, K.Z. y Neidhardt, F.C. (1993). Analysis of proteins synthesized by *Salmonella thyphimurium* during growth within a host macrophage. J. Bacteriol. 175: 3734-3743.
- Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J. y Wilke, C.M. (1992). Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 22: 13-19.
- Agatensi, L., Franchi, F., Mondello, F., Bevilacqua, R.L., Ceddia, T., De Bernardis, F. y Cassone, A. (1991). Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. J. Clin. Pathol. 44: 826-830.
- Aigle, M., Erbs, D. y Moll, M. (1984). Some molecular structure in the genome of lager brewing yeast. Am. Soc. Brew. Chem. 42: 1-7.
- Albertson, D.G. (2003). Profiling breast cancer by array CGH. Breast Cancer Res. Treat. 78: 289-298.
- Almanza, L., Debien, B., Fontaine, B. y Brinquin, L. (1998). Four hours for a record, or a severe fuming cellulitis: can *Saccharomyces cerevisiae* be the causal agent? Ann. Fr. Anesth. Reanim. 17: 130-132.
- Anaissie, E., Bodey, G.P., Kantarjian, H., Ro, J., Vartivarian, S.E., Hopfer, R., Hoy, J. y Rolston, K. (1989). New spectrum of fungal infections in patients with cancer. Rev. Infect. Dis. 11: 369-378.
- Andes, D., Lepak, A., Pitula, A., Marchillo, K. y Clark, J. (2005). A simple approach for estimating gene expression in *Candida albicans* directly from a systemic infection site. The J. Infect. Dis. 192: 893-900.
- Andrulis, K.A., Riggle, P.J., Kumamoto, C.A. y Tzipori, S. (2000). Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. J. Clin. Microbiol. 38: 2317-2323.
- 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.
- Aref, H. y Cruess, W.V. (1934). An investigation of the thermal death point of *Saccharomyces ellipsoideus*. J. Bacteriol. 27: 443-452.

- Arendrup, M.C., Sulim, S., Holm, A., Nielsen, L., Nielsen, S.D., Knudsen, J.D., Drenck, N.E., Christensen, J.J. y Johansen, H.K. (2011). Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3300-3308.
- Aucott, J.N., Fayen, J., Grossnicklas, H., Morrissey, A., Lederman, M.M. y Salata, R.A. (1990). Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*: report of three cases and review. *Rev. Infect. Dis.* 12: 406-411.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H. y van der Vossen, J.M. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 41-46.
- Barker, K.S., Pearson, M.M. y Rogers, P.D. (2003). Identification of genes differentially expressed in association with reduced azole susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1131-1140.
- Barnes, R.M., Allan, S., Taylor-Robinson, C.H., Finn, R. y Johnson, P.M. (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, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (2000). *Yeast: Characteristics and Identification*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, London.
- Barrio, E., González, S.S., Arias, A., Belloch, C. y Querol, A. (2006). Molecular mechanisms involved in the adaptive evolution of industrial yeasts. En: *Yeast in Food and Beverages*, (eds) Querol, A. y Fleet, G.H. *The Yeast Handbook* Springer, Germany. pp 153-174.
- Barta, Z., Csípő, I., Szabó, G.G. y Szegedi, G. (2003). Seroreactivity against *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 9: 308-2312.

- Bassetti, S., Frei, R. y Zimmerli, W. (1998). Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. *Am. J. Med.* 105: 71-72.
- Becker, J. y Craig, E.A. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* 219: 11-23.
- Belchi-Hernández, J., Mora-González, A. y Iniesta-Pérez, J. (1996). Baker's asthma caused by *Saccharomyces cerevisiae* in dry powder form. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 131-134.
- Belet, N., Dalgıç, N., Oncel, S., Ciftçi, E., Ince, E., Güriz, H., Barlas, M. y Dođru, U. (2005). Catheter-related fungemia caused by *Saccharomyces cerevisiae* in a newborn. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24: 1125.
- Belloch, C., Pérez-Torrado, R., González, S.S., Pérez-Ortín, J.E., García-Martínez, J., Querol, A. y Barrio, E. (2008). Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2534-2544
- Ben-Ari, G., Zenvirth, D., Sherman, A., Simchen, G., Lavi, U. y Hillel, J. (2005). Application of SNPs for assessing biodiversity and phylogeny among yeast strains. *Heredity.* 95: 493-501.
- Bendel, C.M, Wiesner, S.M., Garni, R.M., Cebelinski, E. y Wells, C.L. (2002). Cecal colonization and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and dexamethasone. *Pediatr. Res.* 51: 290-295.
- Bensen, E.S., Martin, S.J., Li, M., Berman, J., y Davis, D.A. (2004). Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol.* 54: 1335-1351.
- Berg, R.D. (1999). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473: 11-30.
- Berg, R.D. y Garlington, A.W. (1979). Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes

- and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.* 23: 403-411.
- Bernstein, C.N., Orr, K., Blanchard, J.F., Sargent, M. y Workman, D.** (2001). Development of an assay for antibodies to *Saccharomyces cerevisiae*: Easy, cheap and specific for Crohn's disease. *Can J. Gastroenterol.* 15: 499-504.
- Bodey, G., Buelmann, B., Duguid, W., Gibbs, D., Hanak, H., Hotchi, M., Mall, G., Martino, P., Meunier, F., Milliken, S. y col.** (1992). Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 99-109.
- Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J.W., Hop, W.C., Abeln, E.C., Dromer, F. y Meyer, W.** (2001). Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 147: 891-907.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M. y Diefenbach, A.** (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 64-76.
- Bon, E.P., Carvajal, E., Stanbrough, M., Rowen, D. y Magasanik, B.** (1997). Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. GLN3/URE2 regulation of a periplasmic enzyme. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 203-212.
- Bond, U., Neal, C., Donnelly, D. y James, T.C.** (2004). Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridisation. *Curr. Genet.* 45: 360-370.
- Bonnay, S., Darchis, J.P. y Veyssier, P.** (1991). *Saccharomyces cerevisiae* septicaemia in a cancer patient. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 21: 32-34.
- Bouakline, A., Lacroix, C., Roux, N., Gangneux, J.P. 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. Quimioter.* 17: 227-231.

- Bradbury, J., Richards, K., Niederer, H., Lee, S., Rod Dunbar, P. y Gardner, R. (2006). A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 89: 27-37.
- Brand, A., Maccallum, D.M., Brown, A.J., Gow, N.A. y Odds, F.C. (2004). Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eukaryot. Cell*. 3: 900-909.
- Braus, G.H., Grundmann, O., Brückner, S. y Mösch, H.U. (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. 14: 4272-4284.
- Brown, A.J., Haynes, K. y Quinn, J. (2009). Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Curr. Opin. Microbiol*. 12: 384-391.
- Brückner, S. y Mösch, H.U. (2011). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev*. 36: 25-58.
- Bukau, B. y Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92: 351-366.
- Burkhardt, O., Köhnlein, 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.
- Byron, J.K., Clemons, K.V., McCusker, J.H., Davis, R.W. y Stevens, D.A. (1995). Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. *Infect. Immun*. 63: 478-485.
- Cairolì, R., Marenco, P., Perego, R. y de Cataldo, F. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia with granulomas in the bone marrow in a patient undergoing BMT. *Bone Marrow Transpl*. 15: 785-786.
- Candelli, M., Papa, A., Nista, E.C., Danese, S., Armuzzi, A., Bartolozzi, F., Tondi, P., Ojetti, V., Gasbarrini, G. y Gasbarrini, A. (2003). Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae*: are they useful in clinical practice? *Hepatogastroenterology*. 50: 718-20.

- Carreto, L., Eiriz, M.F., Domingues, I., Schuller, D., Moura, G.R. y Santos, M.A. (2011). Expression variability of co-regulated genes differentiates *Saccharomyces cerevisiae* strains. *BMC Genomics*. 12: 201.
- Carreto, L., Eiriz, M.F., Gomes, A.C., Pereira, P.M., Schuller, D. y Santos, M.A. (2008). Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics*. 9: 524.
- Carrillo-Muñoz, A.J., Giusiano, G., Ezkurra, P.A. y Quindós, G. (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter.* 19: 130-139.
- Cartwright-Shamoon, J., Dickson, G.R., Dodge, J. y Carr, K.E. (1995). Morphological aspects of particle translocation in vivo following ingestion of the yeast *Saccharomyces boulardii*. *J. Drug Target*. 3: 61-63.
- Cartwright-Shamoon, J., Dickson, G.R., Dodge, J. y Carr, K.E. (1996). Uptake of yeast (*Saccharomyces boulardii*) in normal and rotavirus treated intestine. *Gut*. 39: 204-209.
- Casadevall, A. y Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184: 337-344.
- Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lapathitis, G., Kotyk, A. y Gaillardin, C. (2001). Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1607-1618.
- 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.
- 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: 504-505.

- Chen, S.C., Muller, M., Zhou, J.Z., Wright, L.C. y Sorrell, T.C. (1997). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J. Infect. Dis.* 175: 414-420.
- 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., Marcantonio, E.R. y Wells, R.G. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* empyema in a patient with esophago-pleural fistula complicating variceal sclerotherapy. *Chest.* 99: 1518-1519.
- Chitasombat, M.N., Kofteridis, D.P., Jiang, Y., Tarrand, J., Lewis, R.E. y Kontoyiannis, D.P. (2012). Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J. Infect.* 64: 68-75.
- Cimolai, N., Gill, M.J. y Church, D. (1987). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: case report and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 113-117.
- Clemons, K.V., González, G.M., Singh, G., Imai, J., Espíritu, M., Parmar, R. y Stevens, D.A. (2006). Development of an orogastrointestinal mucosal model of candidiasis with dissemination to visceral organs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2650-2657.
- Clemons, K.V., Hanson, L.C. y Stevens, D.A. (1996). Colony phenotype switching in clinical and non-clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Med. Vet. Mycol.* 34: 259-264.
- Clemons, K.V., McCusker, J.H., Davis, R.W. y Stevens, D.A. (1994). Comparative pathogenesis of clinical and non-clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Infect. Dis.* 169: 859-867.
- Clemons, K.V., Park, P., McCusker, J.H., McCullough, M.J., Davis, R.W. y Stevens, D.A. (1997). Application of DNA typing methods and genetic analysis to epidemiology and taxonomy of *Saccharomyces* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1822-1828.

- Clemons, K.V., Salonen, J.H., Issakainen, J., Nikoskelainen, J., McCullough, M.J., Jorge, J.J. y Stevens, D.A. (2010). Molecular epidemiology of *Saccharomyces cerevisiae* in an immunocompromised host unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68: 220-227.
- Cole, G.T., Halawa, A.A. y Anaissie, E.J. (1996). The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin. Infect. Dis.* 22: S73-88.
- Coluccio, A.E., Rodriguez, R.K., Kernan, M.J. y Neiman, A.M. (2008). The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. *PLoS One.* 3: e2873.
- Crispens, C.G. (1975). Section IV: Blood, pp. 93-123 en *Handbook of the Laboratory Mouse*. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- Csank, C. y Haynes, K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 115-120.
- Cullen, P.J. y Sprague, G.F. Jr. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13619-13624.
- Czaja, A.J., Shums, Z., Donaldson, P.T. y Norman, G.L. (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 Infect.* 4: 733-739.
- Daran-Lapujade, P., Daran, J.M., Kötter, P., Petit, T., Piper, M.D.W. y Pronk, J.T. (2003). Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays. *FEMS Yeast Research.* 4: 259-269.
- Darroch, C.J., Barnes, R.M. y Dawson, J. (1999). Circulating antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers'/brewers' yeast) in gastrointestinal disease. *J. Clin. Pathol.* 52: 47-53.
- Deák, T. y Beuchat, L.R. (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, pp. 61-95. Boca Raton: CRC Press, Inc.

- de Barros Lopes, M., Bellon, J.R., Shirley, N.J. y Ganter, P.F. (2002). Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res.* 1: 323-331.
- Debelian, G.J., Olsen, I. y Tronstad, L. (1997). Observation of *Saccharomyces cerevisiae* in blood of patient undergoing root canal treatment. *Int. Endod. J.* 30: 313-317.
- de Llanos, R., Fernández-Espinar, M.T y Querol, A. (2006b). A comparison between clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie van Leeuwenhoek.* 90: 221-231.
- de Llanos, R., Llopis, S., Molero, G., Querol, A., Gil, C. y Fernández-Espinar, M.T. (2011). *In vivo* virulence of commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains with pathogenicity-associated phenotypical traits. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 393-399.
- de Llanos, R., Querol, A., Pemán, J., Gobernado, M. y Fernández-Espinar, M.T. (2006a). 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, A.M. y Fernández-Espinar, M.T. (2004). Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 427- 435.
- Dequin, S., Salmon, J.M., Nguyen, H.V. 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.
- de Virgilio, C., Hottiger, T., Domínguez, J., Boller, T. y Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* 219: 179-186.
- Dickinson, J.R. (1996). 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology.* 142: 1391-1397.

- Dickinson, J.R. (2008). Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* 53: 3-14.
- Diezmann, S. y Dietrich, F.S. (2009). *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. *PLoSOne.* 4: e5317.
- Diezmann, S. y Dietrich, F.S. (2011). Oxidative stress survival in a clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolate is influenced by a major QTN. *Genetics.* 188: 709-722.
- Díez-Orejas, R., Molero, G., Ríos-Serrano, I., Gil, C., Nombela, C. y Sánchez-Pérez, M. (1999). Low virulence of a morphological *Candida albicans* mutant. *FEMS Microbiol Lett.* 176: 311-319.
- Dougherty, S.H. y Simmons, R.L. (1982). Postoperative peritonitis caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Surg.* 117: 248.
- Doyle, M.G., Pickering, L.K., O'Brien, N., Hoots, K. y Benson, J.E. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 850-851.
- Dujon, B. (2006). Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends Genet.* 22: 375-387.
- Dunham, M.J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P.O., Rosenzweig, F. y Botstein, D. (2002). Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16144-16149.
- Dunn, B., Levine, R.P. y Sherlock, G. (2005). Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics.* 6: 53.
- Echeverría-Irigoyen, M.J., Eraso, E., Cano, J., Gomáriz, M., Guarro, J. y Quindós, G. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: microbiology and in vitro antifungal susceptibility. *Mycopathologia.* 172: 201-205.
- Edwards-Ingram, L.C., Gent M.E., Hoyle, D.C., Hayes, A., Stateva, L.I. y Oliver S.G. (2004). Comparative genomic hybridization provides new

- insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Res.* 14: 1043-1051.
- Edwards-Ingram, L.C., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D.C., Oliver S.G. y Stateva, L.I. (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2458-2467.
- Eholie, S.P., N'gbocho, L., Bissagnene, E., Coulibaly, M., Ehui, E., Kra, O., Assoumou, A., Aoussi, E. y Kadio, A. (1997). Profound mycoses in AIDS in Abidjan (Côte d'Ivoire). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 90: 307-311.
- Eisen, M.B. y Brown, P.O. (1999). DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 303: 179-205.
- Ekenna, O. y Sherertz, R.J. (1987). Factors affecting colonization and dissemination of *Candida albicans* from the gastrointestinal tract of mice. *Infect. Immun.* 55: 1558-1563.
- Eleuterio, E.C., Araujo, P.S. y Panek, A.D. (1993). Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology.* 30: 591-596.
- Enache-Angoulvant, A. y Hennequin, C. (2005). Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin. Infect. Dis.* 41: 1559-1568.
- Eng, R.H.K., Drehmel, R., Smith, S.M. y Goldstein, E.J.C. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* infections in man. *J. Med. Vet. Mycol.* 22: 403-407.
- Enjalbert, B., Smith, D.A., Cornell, M.J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A.J. y Quinn, J. (2006). Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 17: 1018-1032.
- Erdem, H., Cetin, M., Timuroglu, T., Cetin, A., Yanar, O. y Pahsa, A. (2003). Identification of yeasts in public hospital primary care patients with or without clinical vaginitis. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 43: 312-316.

- Ernst, R., Klemm, R., Schmitt, L. y Kuchler, K. (2005). Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps. *Methods Enzimol.* 400: 460-484.
- Eschete, M.L. y West, B.C. (1980). *Saccharomyces cerevisiae* septicemia. *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.
- Ezov, T.K., Boger-Nadjar, E., Frenkel, Z., Katsperovski, I., Kemeny, S., Nevo, E., Korol, A. y Kashi, Y. (2006). Molecular-genetic biodiversity in a natural population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from 'Evolution Canyon': microsatellite polymorphism, ploidy and controversial sexual status. *Genetics.* 174: 1455-1468.
- Feld, R., Fornasier, V.L., Bombardier, C. y Hastings, D.E. (1982). Septic arthritis due to *Saccharomyces* species in a patient with chronic rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 9: 637-640.
- Feng, Q.H., Summers, E., Guo, B. y Fink, G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181: 6339-6346.
- Fernández, E., Moreno, F. y Rodicio, R. (1992). The *ICL1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 204: 983-990.
- Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. y Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78: 87-97.
- Fernández-Espinar, M.T., 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, P.L. Jr., Vázquez, J.A. y Sobel, J.D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 12: 80-96.
- Fiore, N.F., Conway, J.H., West, K.W. y Kleiman, M.B. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* infections in children. Pediatr. Infect. Dis. J. 17: 1177-1179.
- Fleet, G.H. (2006). The commercial and Community Significance of yeast in food and beverage production. En: Yeast in Food and Beverages, (eds) Querol, A. y Fleet, G.H. The Yeast Handbook Springer, Germany. pp 1-12.
- Fleet, G.H. 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, G.H. The Yeast Handbook Springer, Germany. pp 381-397.
- Forche, A., Magee, P.T., Selmecki, A., Berman, J. y May, G. (2009). Evolution in *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. Genetics. 182: 799-811.
- Forche, A., May, G. y Magee, P.T. (2005). Demonstration of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in *Candida albicans* strains during infection. Eukaryot. Cell. 4: 156-165.
- Fradin, C., de Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C. y Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. Mol. Microbiol. 56: 397-415.
- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C. y Hube, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. Mol. Microbiol. 47: 1523-1543.
- Fredenucci, I., Chomarar, M., Boucaud, C. y Flandrois, J.P. (1998). *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient receiving Ultra-levure therapy. Clin. Infect. Dis. 27: 222-223.

- Fröhlich-Wyder, M.T. (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.
- Fu, Y., Filler, S.G., Spellberg, B.J., Fonzi, W., Ibrahim, A.S., Kanbe, T., Ghannoum, M.A. y Edwards, J.E. Jr. (1998). Cloning and characterization of *CAD1/AAF1*, a gene from *Candida albicans* that induces adherence to endothelial cells after expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Infect. Immun. 66: 2078-2084.
- Fukiya, S., Mizoguchi, H., Tobe, T. y Mori, H. (2004). Extensive genomic diversity in pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains revealed by comparative genomic hybridization microarray. J. Bacteriol. 186: 3911-3921.
- Fung, K.S., Scheel, O., Lyon, D.J., Cheng, A.F. y Bendeck, J. (1996). Self-inflicted bacteraemia and fungaemia in Vietnamese migrants. Scand. J. Infect. Dis. 28: 83-85.
- Gagliano, M., Bauer, F.F. y Pretorius, I.S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 2: 433-70.
- Gancedo, J.M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 25: 107-123.
- García-Martos, P., Hernández-Molina, J.M., Galán, F., Ruiz-Henestrosa, J.R., García-Agudo, R., Palomo, M.J. y Mira, J. (1998). Isolation of *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) in humans. Mycopathologia. 144: 73-75.
- Garza, S., Teixidó, J.A., Sanchis, V., Viñas, I. y Condón, S. (1994). Heat resistance of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spoiled peach puree. Int. J. Food Microbiol. 23: 209-213.
- Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 13: 122-143.

- 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: 1077-1090.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M. 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.
- González, S.S., Barrio, E., Gafner, J. y Querol, A. (2006a). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 6: 1221-1234.
- González, S.S., Barrio, E. y Querol, A. (2006b). Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J. Appl. Microbiol.* 102: 1018-1025.
- González, S.S., Barrio, E. y Querol, A. (2008). Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2314-2320.
- Goto, K., Iwatuki, Y., Kitano, K., Obata, T. y Hara, S. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agr. Biol. Chem.* 54: 979-984.
- Graf, C. y Gavazzi, G. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an immunocompromised patient not treated with *Saccharomyces boulardii* preparation. *J. Infect.* 54: 310-311.
- 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: 212-224.

- Guillamón, J.M., Barrio, E. y Querol, A. (1996). Characterization 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.
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q. y Fink, G.R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 12158-12163.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M. y Testoni, P.A. (2000) *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 45: 1462-1464.
- Halfvarson, J., Standaert-Vitse, A., Järnerot, G., Sendid, B., Jouault, T., Bodin, L., Duhamel, A., Colombel, J.F., Tysk, C. y Poulain, D. (2005). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in twins with inflammatory bowel disease. *Gut.* 54: 1237-1243.
- Hamoud, S., Keidar, Z. y Hayek, T. (2011). Recurrent *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an otherwise healthy patient. *Isr. Med. Assoc. J.* 13: 575-576.
- Hauser, N.C., Fellenberg, K., Gil, R., Bastuck, S., Hoheisel, J.D. y Pérez-Ortín, J.E. (2001). Whole genome analysis of a wine yeast strain. *Comp. Funct. Genomics.* 2: 69-79.
- Hazen, K.C. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 462-478.
- Hazen, K.C. y Glee, P.M. (1995). Cell surface hydrophobicity and medically important fungi. *Curr. Top Med. Mycol.* 6: 1-31.
- Heath, C.H., Jaksic, A., McKerracher, D. y Clarke, G.M. (2000). Disseminated *Saccharomyces cerevisiae* infection following polymicrobial hepatobiliary sepsis. *Aust. N. Z. J. Med.* 30: 521-522.
- 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, V. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39: 551-559.
- Henry, S., D'Hondt, L., André, 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: 220-222.
- 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. Morrisey, G., Mitsutake, K., Piper, P. y Burnie, J. (1996). Over-expression of *Saccharomyces cerevisiae* hsp90 enhances the virulence of this yeast in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 229-234.
- Holloway, A.J., van Laar, R.K., Tothill, R.W. y Bowtell, D.D. (2002). Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat. Genet.* 32: 481-489.
- 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, U.M., Donner, U. y Lindqvist, C. (1996). Opportunistic osteomyelitis in the jaws of children on immunosuppressive chemotherapy. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 18: 90-94.
- Hromatka, B.S., Noble, S.M. y Johnson, A.D. (2005) Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence. *Mol. Biol. Cell.* 16: 4814-4826.
- Hughes, T.R., Roberts, C.J., Dai, H., Jones, A.R., Meyer, M.R., Slade, D., Burchard, J., Dow, S., Ward, T.R., Kidd, M.J., Friend, S.H. y Marton, M.J. (2000). Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat. Genet.* 25: 333-337.

- Hurtrel, B., Lagrange, P.H. y Michel, J.C. (1980). Systemic candidiasis in mice. Correlation between kidney infection and mortality rate. *Ann. Immunol.* 1: 93-104.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F. y Jiménez, J. (1997). Dynamics of flor yeast population during the biological aging of Sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 75-79.
- Idnurm, A. y Howlett, B.J. (2002). Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukaryot. Cell.* 1: 719-24.
- Infante, J.J., Dombek, K.M., Rebordinos, L., Cantoral, J.M. y Young, E.T. (2003). Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics.* 165: 1745-1759.
- Ipson, M.A. y Blanco, C.L. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* sepsis in a 35-week-old premature infant. A case report. *J. Perinatol.* 21: 459-460.
- Iyer, G.Y.N., Islam, M.F. y Quastel, J.H. (1961). Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature.* 192: 535-541.
- Jacques, N. y Casaregola, S. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 321-326.
- Janbon, G., Sherman, F. y Rustchenko, E. (1998). Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5150-5155.
- Janbon, G., Sherman, F. y Rustchenko, E. (1999). Appearance and properties of L-sorbose-utilizing mutants of *Candida albicans* obtained on a selective plate. *Genetics.* 153: 653-664.
- Jensen, D.P. y Smith, D.L. (1976). Fever of unknown origin secondary to brewer's yeast ingestion. *Arch. Intern. Med.* 136: 332-333.

- Kantarcioğlu, A.S. y Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 45: 160-165.
- Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J. y Fogel, S. (1984). Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the *CUP1* locus of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 337-341.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. y Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim. Pol.* 56: 211-224.
- Kato-Maeda, M., Gao, Q. y Small, P.M. (2001). Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol.* 3: 713-719.
- Kennedy, M.J. y Volz, P.A. (1983). Dissemination of yeasts after gastrointestinal inoculation in antibiotic-treated mice. *Sabouraudia*. 21: 27-33.
- Kennedy, M.J. y Volz, P.A. (1985). Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect. Immun.* 49: 654-663.
- Kennedy, M.J., Volz, P.A., Edwards, C.A. y Yancey, R.J. (1987). Mechanisms of association of *Candida albicans* with intestinal mucosa. *J. Med. Microbiol.* 24: 333-341.
- Kim, K.W., Kamerud, J.Q., Livingston, D.M. y Roon, R.J. (1988). Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. *J. Biol. Chem.* 263: 11948-11953.
- Kingsbury, J.M., Goldstein, A.L. y McCusker, J.H. (2006). Role of nitrogen and carbon transport, regulation, and metabolism genes for *Saccharomyces cerevisiae* survival in vivo. *Eukaryot. Cell.* 5: 816-824.
- Kingsbury, J.M., Yang, Z., Ganous, T.M., Cox, G.M. y McCusker, J.H. (2004a). A novel chimeric spermidine synthase-saccharopine

- dehydrogenase (*SPE3-LYS9*) gene in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot. Cell. 3: 752-763.
- Kingsbury, J.M., Yang, Z., Ganous, T.M., Cox, G.M. y McCusker, J.H. (2004b). *Cryptococcus neoformans* Ilv2p confers resistance to sulfometuron methyl and is required for survival at 37°C and *in vivo*. Microbiology. 150: 1547-1558.
- Kirchhelle, A., Frühwein, N. y Tobüren, D. (1996). Treatment of persistent diarrhea with *S. boulardii* in returning travelers. Results of a prospective study. Fortschr. Med. 114: 136-140.
- Kirsch, L.S., Brownstein, S., Deschênes, J., Sorgini, C. y Jackson, W.B. (1999). *Saccharomyces* keratitis and endophthalmitis. Can. J. Ophthalmol. 34 : 229-232.
- Kirsch, D.R. y Whitney, R.R. (1991). Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. Infect. Immun. 59: 3297-3300.
- Kleinschmidt, M., Grundmann, O., Blüthgen, N., Mösch, H.U. y Braus, G.H. (2005). Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* cells under adhesion-inducing conditions. Mol. Genet. Genomics. 273: 382-393.
- Kliemann, D.A., Antonello, V.S., Severo, L.C. y Pasqualotto, A.C. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* oesophagitis in a patient with oesophageal carcinoma. J. Infect. Dev. Ctries. 5: 493-495.
- Klingberg, T.D., Lesnik, U., Arneborg, N., Raspor, P. y Jespersen, L. (2008). Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. FEMS Yeast Res. 8: 631-640.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K. y Emr, S.D. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. Microbiol. Rev. 54: 266-292.
- Koh, A.Y., Köhler, J.R., Coggshall, K.T., Van Rooijen, N. y Pier G.B. (2008). Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. PLoS Pathogens. 4: e35.

- Kojic, E.M. y Darouiche, R.O. (2004). *Candida* infections of medical devices. Clin. Microbiol. Rev. 17: 255-267.
- Konecny, P., Drummond, F.M., Tish, K.N. y Tapsall, J.W. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* oesophagitis in an HIV-infected patient. Int. J. STD. AIDS. 10: 821-822.
- Krause, I., Monselise, Y., Milo, G. y Weinberger, A. (2003). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies. A novel serologic marker for Behçet's disease. Adv. Exp. Med. Biol. 528: 201-204.
- Kruppa, M.D. (2009). *Candida albicans* gene expression in an *in vivo* infection model. Methods Mol. Biol. 499: 77-83.
- Kumar, A., Cheung, K.H., Ross-Macdonald, P., Coelho, P.S., Miller, P. y Snyder, M. (2000). TRIPLES: a database of gene function in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 28: 81-84.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. y Boekhout, T. (2011). Definition, classification and nomenclature of the yeasts. En: The yeasts: a taxonomic study, (eds) Kurtzman, C.P., Fell, J.W. y Boekhout, T. 5ª Edición. Elsevier. U.S.A. pp 3-9.
- Kwon-Chung, K.J., Polachek, I. y Popking, T.J. (1982). Melanin lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. J. Bacteriol. 150: 1414-1421.
- Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J. y Pretorius, I.S. (1996). *Muc1*, a mucin-like protein that is regulated by *Mss10*, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 8419-8424.
- Larriba, G. y Calderone, R.A. (2008). Heterozygosity and loss of heterozygosity in *Candida albicans*. p. 35-68. En G. San-Blas and R. A. Calderone (ed.), Pathogenic fungi: insights in molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Lashkari, D.A., DeRisi, J.L., McCusker, J.H., Namath, A.F., Gentile, C., Hwang, S.Y., Brown, P.O. y Davis, R.W. (1997). Yeast microarrays for

- genome wide parallel genetic and gene expression analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 13057-13062.
- Lawrence, D.R. (1988). Spoilage organisms in beer. En: Developments in Food Microbiology (R.K. Robinson, Ed.), Elsevier Applied Science, London. pp. 1-14.
- Lee, K.S., Patton, J.L., Fido, M., Hines, L.K., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., Henry, S.A. y Levin, D.E. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* *PLB1* gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. J. Biol. Chem. 269: 19725-19730.
- Lee, S.Y. y Knudsen, F.B. (1985). Differentiation of brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA. J. Inst. Brew. 91: 169-173.
- Legrand, M., Chan, C.L, Jauert, P.A y Kirkpatrick, D.T. (2008). Analysis of base excision and nucleotide excision repair in *Candida albicans*. Microbiology. 154: 2446-2456.
- 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: 2531-2533.
- 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, L., Redding, S. y Dongari-Bagtzoglou, A. (2007). *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. J. Dent. Res. 86: 204-215.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P. y Sampaio, J.P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108: 14539-14544.
- Lillie, S.H. y Pringle, J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. J. Bacteriol. 143: 1348-1349.

- Lindberg, E., Magnusson, K.E., Tysk, C. y Järnerot, 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.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J., van Oudenaarden, A., Barton, D.B., Bailes, E., Nguyen, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R. y Louis, E.J. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. 458: 337-341
- Liti, G., Peruffo, A., James, S.A., Roberts, I.N. y Louis, E.J. (2005). Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*. 22: 177-192.
- Liu, H., Styles, C.A. y Fink, G.R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics*. 144: 967-978.
- Liu, Y. y Filler, S.G. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot. Cell*. 10: 168-173.
- Lo, W.S. y Dranginis, A.M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. 9: 161-71.
- Lolis, N., Veldekis, D., Moraitou, H., Kanavaki, S., Velegraki, A., Triandafyllidis, C., Tasioudis, C., Pefanis, A. y Pneumatikos, I. (2008). *Saccharomyces boulardii* fungaemia in an intensive care unit patient treated with caspofungin. *Crit. Care*. 12: 414.
- Lopandić, K., Gangl, H., Wallner, E., Tscheik, G., Leitner, G., Querol, A., Borth, N., Breitenbach, M., Prillinger, H. y Tiefenbrunner, W. (2007). Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative

- hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. FEMS Yeast Res. 7: 953-965.
- Lopes, C.A., Barrio, E. y Querol, A. (2010). Natural hybrids of *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* share alleles with European wild populations of *Saccharomyces kudriavzevii*. FEMS Yeast Res. 10: 412-421.
- Lorenz, M.C., Bender, J.A. y Fink, G.R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. Eukaryot. Cell. 3: 1076-1087.
- Lorenz, M.C., Cutler, N.S. y Heitman, J. (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell. 11: 183-199.
- Lorenz, M.C. y Fink, G.R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. Nature. 412: 83-86.
- Loureiro, V. y Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 86: 23-50.
- Loureiro, V. y Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. Trends Food Sci. Technol. 10: 356-365.
- Lungarotti, M.S., Mezzetti, D. y Radicioni, M. (2003). Methaemoglobinaemia with concurrent blood isolation of *Saccharomyces* and *Candida*. Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed. 88: F446.
- Maccallum, D.M., Castillo, L., Nather, K., Munro, C.A, Brown A.J, Gow, N.A. y Odds, F.C. (2009). Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. Eukaryot. Cell. 8: 373-387.
- MacCallum, D.M. y Odds, F.C. (2005). Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. Mycoses. 48: 141-161.
- MacKenzie, D.A., Defernez, M., Dunn, W.B., Brown, M., Fuller, L.J, de Herrera, S.R., Günther, A., James, S.A., Eagles, J., Philo, M., Goodacre, R. y Roberts, I.N. (2008). Relatedness of medically important strains of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by phylogenetics and metabolomics. Yeast. 25: 501-512.

- Maejima, K., Shimoda, K., Morita, C., Fujiwara, T. y 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, P.T. (2007). Genome structure and dynamics in *Candida albicans*. p.7-26. En C. d'Enfert and B. Hube (ed.), *Candida: comparative and functional genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G.R., Kerr, M.A., Robson, D., Pennington, C.R. y Parratt, D. (1988). Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ.* 297: 1105-1106.
- Malakar, D., Dey, A., Basu, A. y Ghosh, A.K. (2008). Antiapoptotic role of S-adenosyl-L-methionine against hydrochloric acid induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780: 937-947.
- Malgoire, J.Y., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, J.M. y Mallie, M. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 43: 1133-1137.
- Mansour, M.K. y Levitz, S.M. (2002). Interactions of fungi with phagocytes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 359-365.
- Manzella, J.P., Shaffer, S., Agarwal, I.N., Kellogg, J.A. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a multiply traumatized patient. *J. Trauma.* 29: 129-130.
- Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L., Aguirre, J.M. y Quindós, G. (2011). Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses.* 54: e10-16.
- 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.
- Martins, F.S., Nardi, R.M., Arantes, R.M., Rosa, C.A., Neves, M.J. y Nicolí, J.R. (2005). Screening of yeasts as probiotic based on capacities

- to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 83-92.
- Martins, F.S., Rodrigues, A.C., Tiago, F.C., Penna, F.J., Rosa, C.A., Arantes, R.M., Nardi, R.M., Neves, M.J. y Nicoli, J.R. (2007).** *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J. Med. Microbiol.* 56: 352-359.
- Martins, F.S., Veloso, L.C., Arantes, R.M. y Nicoli, J.R. (2009).** Effects of yeast probiotic formulation on viability, revival and protection against infection with *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *Typhimurium* in mice. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 738-744.
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J. y Dubourdieu, D. (1998).** New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3887-3892.
- Matthews, R.C., 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.
- McCullough, M.J., Clemons, K.V., Farina, C., McCusker, J.H. y Stevens, D.A. (1998a).** Epidemiological investigation of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates by a genotypic method. *J. Clin. Microbiol.* 36: 557-562.
- McCullough, M.J., Clemons, K.V., McCusker, J.H. y Stevens, D.A. (1998b).** Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom inval). *J. Clin. Microbiol.* 36: 2613-2617.
- McCullough, M.J., Clemons, K.V., McCusker, J.H. y Stevens, D.A. (1998c).** Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1035-1038.

- McCusker, J.H., Clemons, K.V., Stevens, D.A. y Davis, R.W. (1994a). Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics*. 136: 1261-1269.
- McCusker, J.H., Clemons, K.V., Stevens, D.A. 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. *Infect. Immun.* 62: 5447-5455.
- McFarland, L.V. y Bernasconi, P. (1993). *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microb. Ecol. Health Dis.* 6: 157-171.
- McKenzie, H., Main, J., Pennington, C.R. 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.
- McKinney, J.D., Höner zu Bentrup, K., Muñoz-Elías, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.T., Swenson, D., Sacchettini, J.C., Jacobs, W.R. Jr. y Russell, D.G. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*. 406: 735-738.
- McPhillips, C.C., Hyle, J.W. y Reines, D. (2004). Detection of the mycophenolate-inhibited form of *IMP* dehydrogenase *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 12171-12176.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Regadera, J., González, M., Díaz-Guerra, T.M. y Rodríguez-Tudela, J.L. (2000). Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 38: 21-28.
- Memisoglu, A. y Samson, L. (2000). Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.* 451: 39-51.
- Missall, T.A. y Lodge, J.K. (2005). Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators. *Mol. Microbiol.* 57: 847-858.

- Montineri, A., Iacobello, C., Larocca, L., La Rosa, R., Nigro, L. y Fatuzzo, F. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia associated with multifocal pneumonia in a patient with alcohol-related hepatic cirrhosis. *Infez. Med.* 16: 227-229.
- Moran, G., Stokes, C., Thewes, S., Hube, B., Coleman, D.C. y Sullivan, D. (2004). Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology.* 150: 3363-3382.
- Morrison, V.A., Haake, R.J. y Weisdorf, D.J. (1993). The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore).* 72: 78-89.
- Mortensen, H.D., Dupont, K., Jespersen, L. y Arneborg, N. (2007). The Flo11p-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain background S288c can adhere to plastic surfaces. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 60: 131-134.
- Mortimer, R.K. (2000). Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* 10: 403-409.
- Mortimer, R.K. y Johnston, J.R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics.* 113: 35-43.
- Moye-Rowley, W.S. (2003). Transcriptional control of multidrug resistance in the yeast *Saccharomyces*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 73: 251-279.
- Muehrcke, D.D., Lytle, B.W. y Cosgrove, D.M. 3rd. (1995). Surgical and long-term antifungal therapy for fungal prosthetic valve endocarditis. *Ann. Thorac. Surg.* 60: 538-543.
- Muller, L.A.H., Lucas, J.E., Georgianna, D.R. y McCusker, J.H. (2011). Genome-wide association analysis of clinical vs. nonclinical origin provides insights into *Saccharomyces cerevisiae* pathogenesis. *Mol. Ecol.* 20: 4085-4097.
- Muller, L.A.H. y McCusker, J.H. (2009a). A multispecies-based taxonomic microarray reveals interspecies hybridization and introgression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9: 143-152.

- Muller, L.A.H. y McCusker, J.H. (2009b). Microsatellite analysis of genetic diversity among clinical and nonclinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates suggests heterozygote advantage in clinical environments. *Mol. Ecol.* 18: 2779-2786.
- Muñoz, P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, J.M., Pérez, M.J., 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.R. y Kavanagh, K.A. (1999). Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen. Implications for biotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 551-557.
- Murphy, A.R. y Kavanagh, K.A. (2001). Adherence of clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* to buccal epithelial cells. *Med. Mycol.* 39: 123-127.
- Mydlik, M., Tkacova, E., Szovenyiova, K., Mizla, P. y Derzsiova, K. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* peritonitis complicating CAPD. *Perit. Dial Int.* 16: 188.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J. y Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 400-428.
- Naglik, J.R., Fidel Jr., P.L. y Odds, F.C. (2008). Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 283: 129-139.
- Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., y Roberts, I.N. (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1931-1942.
- 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: 84-94.
- Nguyen, H.V., Lepingle, A. y Gaillardin, C.A. (2000). Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals

- the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 71-85.
- Niault, M., Thomas, F., Prost, J., Ansari, F.H. 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.
- Nyirjesy, P., Vázquez, J.A., Ufberg, D.D., Sobel, J.D., Boikov, D.A. y Buckley, H.R. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: transmission from yeast used in baking. *Obstet. Gynecol.* 86: 326-329.
- Odds, F.C. (1988). Candidiosis of the gastrointestinal tract. En *Candida and Candidosis*. Bailliére Tindall (ed). London, United Kingdom. pp. 156-163.
- 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, W.J., James, S.A., Lennard, A., Galloway, A., Roberts, I.N., Boswell, T.C. y Russell, N.H. (2002). Nosocomial transmission of *Saccharomyces cerevisiae* in bone marrow transplant patients. *J. Hosp. Infect.* 52: 268-272.
- Oriol, A., Ribera, J.M., Arnal, J., Milla, F., Batlle, M. y Feliu, E. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* septicemia in a patient with myelodysplastic syndrome. *Am. J. Hematol.* 43: 325-326.
- Padilla, P.A., Fuge, E.K., Crawford, M.E, Errett, A. y Werner-Washburne, M. (1998). The highly conserved, coregulated *SNO* and *SNZ* gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* 180: 5718-5726.
- Palecek, S.P., Parikh, A.S. y Kron, S.J. (2002). Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology.* 148: 893-907.

- Pan, X., Harashima, T. y Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 567-572.
- Pan, X. y Heitman, J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19: 4874-4887.
- Papaemmanouil, V., Georgogiannis, N., Plega, M., Lalaki, J., Lydakis, D., Dimitriou, M. y Papadimitriou, A. (2011). Prevalence and susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* causing vaginitis in Greek women. *Anaerobe.* 17: 298-299.
- Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, H.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.H. y Edwards, J.E. (2004). Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 38: 161-189.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., González, B. y François, J. (1999). Dynamic responses of reserves carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15: 191-203.
- Parrou, J.L., Teste, M.A. y François, 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.
- Parsons, A.B., Brost, R.L., Ding, H., Li, Z., Zhang, C., Sheikh, B., Brown, G.W, Kane P.M., Hughes, T.R. y Boone, C. (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* 22: 62-69.
- Pavese, P., Brion, J.P., Lebeau, B., Grillot, R. y Ambroise-Thomas, P. (1999). Epidemiology of fungemia in a university hospital; therapeutic incidence. *Pathol. Biol. (Paris).* 47: 579-583.
- Pecquet, S., Guillaumin, D., Tancrede, C. y Andremont, A. (1991). Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial

- colonization in gnotobiotic mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3049-3051.
- 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.
- Peret Filho, L.A., Penna, F.J., Bambilra, E.A. y Nicoli, J.R. (1998). Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosupressed mice. *J. Med. Microbiol.* 47: 111-116.
- Pérez-Ortín, J.E., García-Martínez, J. y Alberola, T.M. (2002a). DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J. Biotechnol.* 98: 227-241.
- Pérez-Ortín, J.E., Querol, A., Puig, S. y Barrio, E. (2002b). Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res.* 12: 1533-1539.
- Perfect, J.R., Toffaletti, D.L. y Rude, T.H. (1993). The gene encoding phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (*ADE2*) is essential for growth of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *Infect. Immun.* 61: 4446-4451.
- Perlstein, E.O., Ruderfer, D.M., Ramachandran, G., Haggarty, S.J., Kruglyak, L. y Schreiber, S.L. (2006). Revealing complex traits with small molecules and naturally recombinant yeast strains. *Chem. Biol.* 13: 319-327.
- Piarroux, R., Millon, L., Bardonnnet, K., Vagner, O. y Koenig H. (1999). Are live *saccharomyces* yeasts harmful to patients? *Lancet.* 353: 1851-1852.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J. y Gray, J. (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and

- translocations of chromosome 4. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 9138-9142.
- 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: 113-115.
- Pollack, J.R., Perou, C.M., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Jeffrey, S.S., Botstein, D. y Brown, P.O. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. Nat. Genet. 23: 41-46.
- Pontón, J., Rùchel, R., Clemons, K.V., Coleman, D.C., Grillot, R., Guarro, J., Aldebert, D., Ambroise-Thomas, P., Cano, J., Carrillo-Muñoz, A.J., Gené, J., Pinel, C., Stevens, D.A. y Sullivan, D.J. (2000). Emerging pathogens. Med. Mycol. 38: 225-236.
- Pope, L.M. y Cole, G.T. (1982). Comparative studies of gastrointestinal colonization and systemic spread by *Candida albicans* and nonlethal yeast in the infant mouse. Scan. Electron. Microsc. 4: 1667-1676.
- Pope, L.M., Cole, G.T., Guentzel, M.N. y Berry, L.J. (1979). Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastric challenge. Infect. Immun. 25: 702-707.
- 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.
- Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L. y Fadda, G. (2005). Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol. 103: 295-304.
- Price, M.F., Wilkinson, I.D. y Gentry, L.O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 20: 7-14.

- Primig, M., Williams, R.M., Winzeler, E.A., Tevzadze, G.G., Conway, A.R., Hwang, S.Y., Davis, R.W. y Esposito, R.E. (2000). The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat. Genet.* 26: 415-423.
- Pultz, N.J., Stiefel, U., Ghannoum, M., Helfand, M.S. y Donskey, C.J. (2005). Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization by *Candida glabrata* in adult mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 438-440.
- 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 characterization. *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.
- Querol, A. y Bond, U. (2009). The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 293: 1-10.
- Ramírez-Moreno, A., Anguita-Sánchez, M., Castillo-Domínguez, J.C., Siles-Rubio, J.R., Torres-Calvo, F. y Vallés-Belsué, F. (2000). Fungal endocarditis in non drug-addict patients. 10-year experience. *Rev. Esp. Cardiol.* 53: 507-510.
- Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F.J., Castellote, C., Franch, A. y Castell, M. (2008). The bowel: a key component of the immune system. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 100: 29-34.
- Rea, R.B., Gahan, C.G. y Hill, C. (2004). Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for *Fur* and *PerR* in virulence. *Infect. Immun.* 72: 717-727.
- 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: 2840-2842.
- Reuter, M., Bell, G. y Greig, D. (2007). Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. *Curr. Biol.* 17: R81-R83.
- Reynolds, T.B. y Fink, G.R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science.* 291: 878-881.
- Riboulet, E., Verneuil, N., La Carbona, S., Sauvageot, N., Auffray, Y., Hartke, A. y Giard, J.C. (2007). Relationships between oxidative stress response and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 140-146.
- Rijnders, B.J., Van Wijngaerden, E., Verwaest, C. y Peetermans, W.E. (2000). *Saccharomyces* fungemia complicating *Saccharomyces boulardii* treatment in a non-immunocompromised host. *Intensive Care Med.* 26: 825.
- Rippon, J.W. (1988). *Medical Mycology: Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Saunders (W.B.) Co Ltd; 3rd edition.
- Riquelme, A.J., Calvo, M.A., Guzmán, A.M., Depix, M.S., García, P., Pérez, C., Arrese, M. y Labarca, J.A. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J. Clin. Gastroenterol.* 36: 41-43.
- Roberts, R.L. y Fink, G.R. (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.
- Rodrigues, A.C., Cara, D.C., Fretez, S.H., Cunha, F.Q., Vieira, E.C., Nicoli, J.R. y Vieira, L.Q. (2000). *Saccharomyces boulardii* stimulates slgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 89: 404-414.
- Roetzer, A., Gabaldón, T. y Schüller, C. (2011). From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important

- adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 314: 1-9.
- 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.
- Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P. y Fink, G.R. (2003). Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 11007-11012.
- Rubinstein, E., Noriega, E.R., Simberkoff, M.S., Holzman, R. y Rahal, J.J. Jr. (1975). Fungal endocarditis: analysis of 24 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 54: 331-334.
- Rude, T.H., Toffaletti, D.L., Cox, G.M. y Perfect, J.R. (2002). Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 70: 5684-5694.
- Ruiz-Esquide, F., Díaz, M.C., Wu, E. y Silva, V. (2002). Verrucous endocarditis secondary to *Saccharomyces cerevisiae*. A case report. *Rev. Med. Chil.* 130: 1165-1169.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.J., Madhani, H. y Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* 18: 1257-1269.
- Rustchenko, E. (2007). Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 7: 2-11.
- Rutledge, R.M., Ghislain, M., Mullins, J.M, de Thozee, C.P. y Golin, J. (2008). Pdr5-mediated multidrug resistance requires the CPY-vacuolar sorting protein Vps3: are xenobiotic compounds routed from the vacuole to plasma membrane transporters for efflux? *Mol. Genet. Genomics.* 279: 573-583.

- Rypien, K.L., Andras, J.P. y Harvell, C.D. (2008). Globally panmictic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii*. *Molecular Ecology*. 17: 4068-4078.
- Sabino, R., Veríssimo, C., Brandão, J., Alves, C., Parada, H., Rosado, L., Paixão, E., Videira, Z., Tendeiro, T., Sampaio, P. y Pais, C. (2010). Epidemiology of candidemia in oncology patients: a 6-year survey in a Portuguese central hospital. *Med. Mycol.* 48: 346-354.
- Saccharomyces* Genome Database: (<http://www.yeastgenome.org/>)
- Saibeni, S., Folli, C., de Franchis, R., Borsi, G. y Vecchi, M. (2003). Diagnostic role and clinical correlates of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Dig. Liver Dis.* 35: 862-868.
- Salonen, J.H., Richardson, M.D., Gallacher, K., Issakainen, J., Helenius, H., Lehtonen, O.P. y Nikoskelainen, J. (2000). Fungal colonization of haematological patients receiving cytotoxic chemotherapy: emergence of azole-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Hosp. Infect.* 45: 293-301.
- Samonis, G., Anaissie, E.J., Rosenbaum, B. y Bodey, G.P. (1990). A model of sustained gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in healthy adult mice. *Infect. Immun.* 58: 1514-1517.
- Samonis, G., Falagas, M.E., Lionakis, S., Ntaoukakis, M., Kofteridis, D.P., Ntalas, I. y Maraki, S. (2011). *Saccharomyces boulardii* and *Candida albicans* experimental colonization of the murine gut. *Med. Mycol.* 49: 395-399.
- Samonis, G., Margioris, A.N., Toloudis, P., Dassiou, M., Maraki, S. y Tselentis, Y. (1994). Murine yeast gut flora affected by tetracycline, metronidazole and norfloxacin. *J. Chemother.* 6: 408-411.
- Sampaio, J.P. y Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and

- sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. Appl. Environ. Microbiol. 74: 2144-2152.
- Sarachek, A., Brecher, C.A. y Rhoads, D.D. (1981). Differentiation of *Candida stellatoidea* from *C. albicans* and *C. tropicalis* by temperature dependent growth responses on defined media. Mycopathologia. 75: 179-189.
- Sbarra, A. J. y Karnovsky, M. L. (1959). The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 234: 1355-1362.
- Schacherer, J., Shapiro, J.A., Ruderfer, D.M. y Kruglyak, L. (2009). Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. Nature. 458: 342-345.
- Schatz, P.J., Solomon, F. y Botstein, D. (1986). Genetically essential and nonessential alpha-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. Mol. Cell Biol. 6: 3722-3733.
- Schreuder, M.P., Mooren, A.T., Toschka, H.Y., Verrips, C.T. y Klis, F.M. (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. Trends Biotechnol. 14: 115-120.
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Röllinghoff, M. y Schröppel, K. (2000). The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 38: 435-445.
- Selmecki, A., Forche, A. y Berman, J. (2010). Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot. Cell. 9: 991-1008.
- Senneville, E., Ajana, F., Gérard, Y., Bourez, J.M., Alfandari, S., Chidiac, C. y Mouton, Y. (1996). Bilateral ureteral obstruction due to *Saccharomyces cerevisiae* fungus balls. Clin. Infect. Dis. 23: 636-637.
- Sethi, N. y Mandell, W. (1988). *Saccharomyces* fungemia in a patient with AIDS. N. Y. State J. Med. 88: 278-279.

- Sharkey, L.L., Liao, W.L., Ghosh, A.K. y Fonzi, W.A. (2005). Flanking direct repeats of hisG alter *URA3* marker expression at the *HWP1* locus of *Candida albicans*. *Microbiology*. 151: 1061-1071.
- Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B. (1986). En "Methods in yeast genetics". Cold Spring Harbord Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Shoham, S. y Levitz, S.M. (2005). The immune response to fungal infections. *Br. J. Haematol.* 129: 569-582.
- Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998). Multiple effects of trehalose on protein holding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell.* 1: 639-648.
- Slutsky, B., Buffo, J. y Soll, D.R. (1985). High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*. 230: 666-669.
- Smith, D., Metzgar, D., Wills, C. y Fierer, J. (2002). Fatal *Saccharomyces cerevisiae* aortic graft infection. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2691-2692.
- Smith, D.L. (1996). Brewer's yeast as a cause of infection. *Clin. Infect. Dis.* 22: 201.
- Snyder, S. (1992). Peritonitis due to *Saccharomyces cerevisiae* in a patient on CAPD. *Perit. Dial. Int.* 12: 77-78.
- Sobel, J.D., Vázquez, J., Lynch, M., Meriwether, C. y Zervos, M.J. (1993). Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: epidemiology, clinical aspects and therapy. *Clin. Infect. Dis.* 16: 93-99.
- Sparrelid, E., Hägglund, H., Remberger, M., Ringdén, O., Lönnqvist, B., Ljungman, P. y Andersson, J. (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.
- Stanhill, A., Schick, N. y Engelberg, D. (1999). The yeast ras/cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress response. *Mol. Cell Biol.* 19: 7529-7538.
- Stein, P.D., Folkens, A.T. y Hruska, K.A. (1970). *Saccharomyces* fungemia. *Chest.* 58: 173-175.

- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. y Ernst, J.F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* 16: 1982-1991.
- Stone, H.H., Geheber, C.E., Kolb, L.D. y Kitchens, W.R. (1973). Alimentary tract colonization by *Candida albicans*. *J. Surg. Res.* 14: 273-276.
- Sundstrom, P., Cutler, J.E. y Staab, J.F. (2002). Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus. *Infect. Immun.* 70: 3281-3283.
- Swinne, D., Nolard, N., Van Rooij, P. y Detandt, M. (2009). Bloodstream yeast infections: a 15-month survey. *Epidemiol. Infect.* 137: 1037-1040.
- Takahashi, K., Kita, E., Konishi, M., Yoshimoto, E., Mikasa, K., Narita, N. y Kimura, H. (2003). Translocation model of *Candida albicans* in DBA-2/J mice with protein calorie malnutrition mimics hematogenous candidiasis in humans. *Microb. Pathog.* 35: 179-187.
- Tawfik, O.W., Papasian, C.J., Dixon, A.Y. y Potter, L.M. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1689-1691.
- Teml, A., Kratzer, V., Schneider, B., Lochs, H., Norman, G.L., Gangl, A., Vogelsang, H. y Reinisch, W. (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.
- Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S.G. y Hube, B. (2007). *In vivo* and *ex vivo* comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol. Microbiol.* 63: 1606-1628.
- Thewes, S., Moran, G.P., Magee, B.B., Schaller, M., Sullivan, D.J. y Hube, B. (2008). Phenotypic screening, transcriptional profiling, and

- comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiology*. 8: 187.
- Thomas, B.J. y Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*. 56: 619-630.
- Tiballi, R.N., Spiegel, J.E., Zarins, L.T. y Kauffman, C.A. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* infections and antifungal susceptibility studies by colorimetric and broth macrodilution methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 135-140.
- Török, T., Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G. y Polsinelli, M. (1996). Quest for wine yeasts. An old story revisited. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17: 303-313.
- Tudor, E. y Board, R. (1993). Food spoilage yeasts. En: *The Yeast*, (ed) Rose, A.H. y Harrison, J.S. volume 5, second edition, Academic Press, London. pp 435-516.
- Úbeda, P., Pérez-Bellés, C., Blanes, M., Viudes, A., Pemán, J. y Gobernado, M. (2001). Endocarditis infecciosa por levadura. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 19: 500-502.
- Úbeda, P., Viudes, A., Pérez Bellés, C., Marqués, J.L., Pemán, J. y Gobernado, M. (2000). Endocarditis caused by *Saccharomyces cerevisiae* on the prosthetic valve. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 18: 142.
- van Burik, J.H. y Magee, P. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 743-772.
- van der Aa Kühle, A. y Jespersen, L. (1998). Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 205-213.
- van Doorn, H.C. y Coelingh Bennink, F. (1995). Vaginal infection caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *Ned. Tijdschr Geneesk.* 139: 1093-1095.
- Vargas, S.L., Patrick, C.C., Ayers, G.D. y Hughes, W.T. (1993). Modulating effect of dietary carbohydrate supplementation on *Candida albicans* colonization and invasion in a neutropenic mouse model. *Infect. Immun.* 61: 619-626.

- Varma, A., Edman, J.C. y Kwon-Chung, K.J. (1992). Molecular and genetic analysis of *URA5* transformants of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 60: 1101-1108.
- Vaughan-Martini, A. y Martin, 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., Derdelinckx, G., Verachtert, H. y Delvaux, F.R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biot.* 61: 197-205.
- Verstrepen, K.J., Jansen, A., Lewitter, F. y Fink, G.R. (2005). Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat. Genet.* 37: 986-990.
- Vidotto, V., Koga-Ito, C., Canella, D., Sinicco, A., Di Perri, G., Auki, S. y Itokuwa, S. (2000). Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. *Rev. Iberoam. Mycol.* 17: 14-19.
- 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: 356-358.
- Waghmare, S.K. y Bruschi, C.V. (2005). Differential chromosome control of ploidy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 22: 625-639.
- Walker, L.A., Maccallum, D.M., Bertram, G., Gow, N.A., Odds F. C. y Brown, A.J. (2009). Genome-wide analysis of *Candida albicans* gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. *Fungal Genet. Biol.* 46: 210-219.
- Walker, L.J., Aldhous, M.C., Drummond, H.E., Smith, B.R., Nimmo, E.R., Arnott, I.D. y Satsangi, J. (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, S.D., Ganiji, A., Clemons, K.V., Byron, J.K., Minn, Y. y Stevens, D.A. (2002). Correlation of the frequency of petite formation by isolates of *Saccharomyces cerevisiae* with virulence. *Med. Micol.* 40: 161-168.
- Wei, W., McCusker, J.H., Human, R.W., Jones, T., Ning, Y., Cao, Z, Gu, Z., Bruno, D., Miranda, M., Nguyen, M., Wilhelmy, J., Komp, C., Tamse, R., Wang, X., Jia, P., Luedi, P., Oefner, P.J., David, L., Dietrich, F.S., Li, Y., Davis, R.W. y Steinmetz, L.M. (2007). Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 12825-12830.
- Wells, C.L., Johnson, M., Henry-Stanley, M.J. y Bendel, C.M. (2007). *Candida glabrata* colonizes but does not often disseminate from the mouse caecum. *J. Med. Microbiol.* 56: 688-693.
- Wells, C.L., Maddaus, M.A. y Simmons, R.L. (1988). Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 10: 958-979.
- Wheeler, R.T., Kupiec, M., Magnelli, P., Abeijon, C. y Fink, G.R. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with increased virulence. *Proc. Nat. Acad. Sci. N.Y.* 100: 2786-2770.
- Whelan, K. y Myers, C.E. (2010). Safety of probiotics in patients receiving nutritional support: a systematic review of case reports, randomized controlled trials, and nonrandomized trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 91: 687-703.
- White, T.J., Bruns, T, Lee, E. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M.A., Gelfand D.H, Sninsky J.J., White T.J. (Eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322), Academic Press, San Diego.
- Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H. y Rudolph, H.K. (1995). The PRM2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* 14: 3870-3882.

- Williams, J.S., Mufti, G.J., Powell, S., Salisbury, J.R. y Higgins, E.M. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* emboli in an immunocompromised patient with relapsed acute myeloid leukaemia. Clin. Exp. Dermatol. 32: 395-397.
- Wilson, J.D., Jones, B.M. y Kinghorn, G.R. (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.
- Winge, D.R., Nielson, K.B., Gray, W.R. y Hamer, D.H. (1985). Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. J. Biol. Chem. 260: 14464-14470.
- Winzeler, E.A., Castillo-Davis, C.I., Oshiro, G., Liang, D., Richards, D.R., Zhou, Y. y Hartl, D.L. (2003). Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. Genetics. 163: 79-89.
- Winzeler, E.A., Lee, B., McCusker, J.H. y Davis, R.W. (1999). Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. Parasitology. 118: S73-80.
- Witt, W., Brüller, H.J., Falker, G. y Fuhrmann, G.F. (1982). Purification and properties of a phospholipid acyl hydrolase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 711: 403-410.
- Witt, W., Mertsching, A. y König, E. (1984a). Secretion of phospholipase B from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 795: 117-124.
- Witt, W., Schweingruber, M.E. y Mertsching, A. (1984b). Phospholipase B from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Separation of two forms with different carbohydrate content. Biochim. Biophys. Acta. 795: 108-116.
- Witten, J.T., Chen, C.T. y Cohen, B.A. (2007). Complex genetic changes in strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived by selection in the laboratory. Genetics. 177: 449-456.
- Wright, W.L. y Wenzel, R.P. (1997). Nosocomial *Candida*. Epidemiology, transmission, and prevention. Infect. Dis. Clin. North Am. 11: 411-425.

- Yamaguchi, N., Sonoyama, K., Kikuchi, H., Nagura, T., Aritsuka, T. y Kawabata, J. (2005). Gastric colonization of *Candida albicans* differs in mice fed commercial and purified diets. *J. Nutr.* 135: 109-115.
- Yang, Y.L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36: 223-228.
- Yang, Z., Pascon, R.C., Alspaugh, A., Cox, G.M. y McCusker, J.H. (2002). Molecular and genetic analysis of the *Cryptococcus neoformans* MET3 gene and a *met3* mutant. *Microbiology.* 148: 2617-2625.
- Yáñez, A., Murciano, C., Llopis, S., Fernández-Espinar, M.T. Gil, M.L. y Gozalbo, D. (2009). *In vivo* and *in vitro* studies on virulence and host responses to *Saccharomyces cerevisiae* clinical and non-clinical isolates. *Open Mycol. J.* 3: 37-47.
- Yin, Z., Wilson, S., Hauser, N.C., Tournu, H., Hoheisel, J.D. y Brown, A.J. (2003). Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol. Microbiol.* 48: 713-724.
- Yoshida, M., Obayashi, T., Iwama, A., Ito, M., Tsunoda, S., Suzuki, T., Muroi, K., Ohta, M., Sakamoto, S. y Miura, Y. (1997). Detection of plasma (1 → 3)-beta-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 371-374.
- Zakikhany, K., Naglik, J.R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M. y Hube, B. (2007). *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol.* 9: 2938-2954.
- Zaragoza, O. y Gancedo, J.M. (2000). Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78: 187-194.
- 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.

Bibliografía

- Zunic, P., Lacotte, J., Pegoix, M., Buteux, G., Leroy, G., Mosquet, B. y Moulin, M. (1991). *Saccharomyces boulardii* fungemia. Apropos of a case. *Thérapie*. 46: 498-499.
- Zupan, J. y Raspor, P. (2008). Quantitative agar-invasion assay. *J. Microbiol. Methods*. 73: 100-104.
- Zupan, J. y Raspor, P. (2010). Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: a quantitative model. *Yeast*. 27: 217-228.