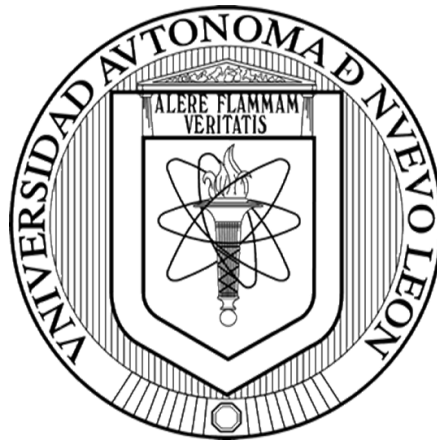


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO *KILLER* EN LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida* DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES**

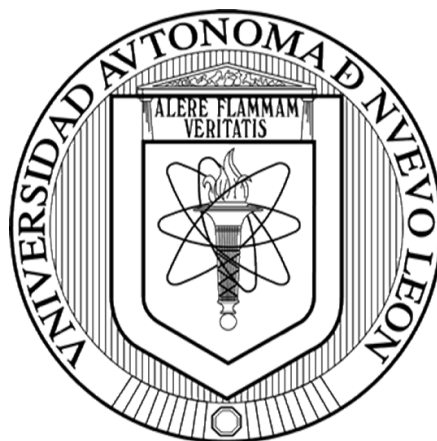
Por:

M.C. EFRÉN RICARDO ROBLEDO LEAL

Como requisito parcial para obtener el grado de
Doctorado en Ciencias con Especialidad
en Microbiología

NOVIEMBRE, 2013

EFFECTO *KILLER* EN LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida* DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES



Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Director
(Asesor Interno)

Dra. Gloria María González González
Director
(Asesor Externo)

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Secretario

Dr. José Santos García Alvarado
Vocal

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa, Mariana Elizondo Zertuche, quien alienta mis pasos y amortigua mis resbalos. Gracias por arriesgarte a compartir esta vida conmigo.

A mis padres y hermanos, por su respaldo permanente.

A la Dra. Gloria González, por guiar con el ejemplo. Por usted es que soy micólogo.

A la Dra. Licet Villarreal, por asesorar y dirigir este trabajo. Sólo mis acciones podrán demostrar cuánto agradezco la confianza que depositó en mí.

Al M.C. Juan Adame: la gente que se acerca a usted siempre se transforma en una mejor versión de sí mismos.

A la Dra. Marcela Sangorrín, por recibirme, enseñarme y adoptarme durante mi estancia.

A la Dra. Diana Reséndez y el Dr. Santos García, por sus palabras de aliento y su apoyo, que permitió mi salida al extranjero.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer y al Dr. José Ignacio González, quienes hicieron más llevadero el cumplir con mis responsabilidades.

A la Q.C.B. Lidia Oviedo, el M.C. Antonio Fuentes Garibay, el Dr. Carlos Hernández, el Dr. Arturo Espinoza, la Dra. Irma Martínez, Dora Medellín, el Dr. Jeremy Bruenn, y el M.C. Rogelio Treviño. A Lety Villalba, Ceci Lutz, Christian Lopes, Maru Rodríguez, Silvana de Monaco y Guille.

A Carmen Vázquez.

A mis alumnos, becarios y prestadores de servicio social.

Al M.C. Raúl Aguirre y el Q.B.P. Edye Hernández.

A Samantha Henderson y Mathew Bathke.

Al CONACYT, por el apoyo económico durante la realización de este posgrado.

Al PAICYT (proyecto No. CN986-11).

Entonces dijo un maestro, "Háblanos de la Enseñanza."

Y él dijo: Nadie puede revelarte lo que yace ya medio dormido al amanecer de tu conocimiento. El maestro que camina a la sombra del templo, entre sus seguidores, no les da de su sabiduría sino de su fe y de su afecto. Si él es en efecto sabio, no pedirá que entres en la casa de su sabiduría, sino que te guiará al umbral de tu propia mente. El astrónomo puede hablarte de su entendimiento del espacio, pero no puede darte su entendimiento. El músico puede cantarte el ritmo que existe en todo el espacio, pero no puede darte el oído que detiene el ritmo, ni la voz con la que hace eco. Y el que sabe de la ciencia de los números puede hablarte de las regiones de peso y medida, pero no puede conducirte a ellas.

Porque la visión de un hombre no presta sus alas a otro hombre.

Y así como cada uno de ustedes se encuentra sólo ante el conocimiento de Dios, así debe cada uno de ustedes estar sólo en su propia comprensión de Dios y su entendimiento de la tierra.

-Khalil Gibran, El Profeta.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
ANTECEDENTES.....	10
1.1 Las levaduras <i>killer</i>	10
1.2. El rol ecológico de las toxinas <i>killer</i>	16
1.3. Levaduras <i>killer</i> de importancia clínica.....	18
1.4. Aplicaciones de las levaduras <i>killer</i>	19
MÉTODOS.....	25
2.1 Sitio de Estudio.....	25
2.2 Criterios de Inclusión.....	25
2.3 Microorganismos	25
2.4 Aislamiento de levaduras a partir muestras ambientales (insectos)	26
2.5 Evaluación de la presencia de actividad <i>killer</i>	28
2.5.1 Análisis cualitativo.....	28
2.5.2 Caracterización fisicoquímica.....	30
2.5.3 Identificación de levaduras <i>killer</i>	30
2.5.4 Determinación de la naturaleza genética de la toxina <i>killer</i>	31
2.5.5 Actividad antifúngica de levaduras <i>killer</i>	32
2.5.5.1 Biotipificación del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	32
2.5.5.2 Inhibición de <i>Trichosporon</i> spp. y <i>Cryptococcus</i> spp.....	33
2.5.5.3 Inhibición de hongos contaminantes en poscosecha.....	33

2.5.6 Ensayos de inmunidad cruzada a toxinas <i>killer</i>	34
2.5.7 Extracción de la toxina <i>killer</i>	35
2.5.8 Exclusión molecular y electroforesis	36
RESULTADOS	38
3.1 Ocurrencia de actividad <i>killer</i>	38
3.1.1 Cepas <i>killer</i> de origen clínico.....	38
3.2 Caracterización fisicoquímica	39
3.3 Identificación de levaduras <i>killer</i>	44
3.4 Determinación de la naturaleza genética de la toxina <i>killer</i>	44
3.4 Interacciones <i>killer</i> – susceptible del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	45
3.5 Inhibición de <i>Trichosporon</i> spp. y <i>Cryptococcus</i> spp.	46
3.6 Inmunidad cruzada a toxinas <i>killer</i>	48
3.7 Inhibición de hongos contaminantes en poscosecha	52
3.8 Extracción de la toxina cruda	54
3.9 Determinación del peso molecular de la toxina <i>killer</i>	59
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIÓN	71
LIERATURA CITADA	722

ÍNDICE DE TABLAS

Página

TABLA 1. Interacción entre levaduras killer reportada por Young y Yagiu (1978)	13
TABLA 2. Condiciones del gel de poliacrilamida empleado para determinar el peso molecular de la toxina <i>killer</i>	37
TABLA 3 Cantidad y origen de las cepas de origen clínico examinadas para actividad <i>killer</i>	40
TABLA 4. Influencia de condiciones fisicoquímicas sobre la actividad.	41
TABLA 5. Susceptibilidad de aislamientos del complejo <i>Candida parapsilosis</i> frente a un panel de levaduras <i>killer</i>	47
TABLA 6. Distribución de las frecuencias de fenotipos <i>killer</i> -susceptible-neutro en aislamientos del complejo <i>C. parapsilosis</i>	48
TABLA 7. Inhibición de aislamientos de <i>Cryptococcus</i> spp. empleando levaduras killer del género <i>Candida</i>	50
TABLA 8. Antagonismo de levaduras frente a hongos de poscosecha.	53
TABLA 9. Porcentaje de reducción de crecimiento en cepas de <i>Aspergillus</i> spp. causado por levaduras aisladas de hormigas.	55
TABLA 10 Porcentaje de reducción de crecimiento en cepas de <i>Penicillium</i> spp. causado por levaduras aisladas de hormigas.	56
TABLA 11. Condiciones del ensayo de actividad antifúngica en placa de 96 pocillos.	57
TABLA 12. Resultados del ensayo de actividad antifúngica de la toxina <i>killer</i> en placa de 96 pocillos.	59
TABLA 13. Tamaño molecular de las toxinas <i>killer</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Modo de acción mediada por receptores de las toxinas K1 y K28. La eliminación de una levadura susceptible involucra un proceso de dos pasos, uniéndose a receptores de la pared celular (R1) y después en la membrana plasmática (R2). Después de la interacción, K1 altera la membrana (A) mientras que K28 actúa en el núcleo (B).	15
FIGURA 2. Actividad <i>killer</i> positiva (flechas) y negativa frente a la cepa ATCC 26609.	29
FIGURA 3. Retención/pérdida del fenotipo <i>killer</i> posterior a la incubación a temperaturas superóptimas.	45
FIGURA 4. Ocurrencia del fenotipo killer en el complejo C. parapsilosis. La estría central es la cepa <i>S. cerevisiae</i> K1 (Lalvin). (B) Acercamiento a la inhibición producida por <i>C. metapsilosis</i>	49
FIGURA 5. Inhibición de <i>Cryptococcus</i> sp. por cepas <i>killer</i> del género <i>Candida</i>	50
FIGURA 6. Sensibilidad de la levadura Lalvin a levaduras <i>killer</i> del género <i>Candida</i>	50
FIGURA 7. Actividad antagónica de cepas de <i>Candida guilliermondii</i> frente a hongos contaminantes en poscosecha.	54
FIGURA 8. Actividad killer de la toxina cruda (cepa K4).	56
FIGURA 9. Perfil espectrofotométrico de las fracciones colectadas tras la separación de la toxina <i>killer</i> en la columna de sefrosa.	58
FIGURA 10. Gel de poliacrilamida. M: marcador de peso molecular; K4: toxina killer (fracciones activas).	60
FIGURA 11 Actividad inhibitoria de M1 (<i>C. guilliermondii</i>).	67
FIGURA 12. Ausencia de inhibición por el extracto proteico (flecha) de M1 (<i>C. guilliermondii</i>).	68
FIGURA 13. Ausencia de inhibición por la levadura M1 (Bruenn, 2013; comunicación personal).	68

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Centígrados
μl	Microlitros
μm	Micras
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Pares de bases
cms	Centímetros
h	Horas
kDa	Kilodaltones
M	Molar
mins.	Minutos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
PDA	Agar papa y dextrosa
rpm	Revoluciones por minuto
sp.	Especie
spp.	Especies
V	Voltios

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos con una diversidad muy abundante y que tienen un comportamiento y organización celular particulares. En uno de los reportes más citados sobre su biodiversidad, Hawksworth (2001) estimó mediante la proporción de la asociación de hongos con otros organismos, 1.5 millones de especies diferentes de hongos, aunque sólo alrededor de 100,000 especies han sido descritas, representando el 6% del total estimado. Incluidas en el reino de los hongos se encuentran las levaduras, hongos unicelulares, los cuales interactúan en formas muy diversas con otros organismos así como con su ambiente pues pueden interactuar como comensales, participar en la fermentación de bebidas alcohólicas y alimentos, producir deterioros vegetales o hasta causar enfermedades potencialmente mortales en el hombre. El reporte más reciente indica que se encuentran descritas alrededor de 1,500 especies de levaduras actualmente (Kurtzman & Fell, 2006) lo cual representa un aceleramiento considerable en la identificación de estos organismos comparado con las 500 y 700 especies descritas en 1980 y 1998 respectivamente (Kurtzman & Fell, 1998).

Al igual que el resto de los hongos y en general de los organismos vivos, las levaduras se encuentran constantemente compitiendo por nutrientes y por espacio. A lo largo de su existencia, la evolución ha conferido a ellas características y habilidades especiales para competir eficientemente por dichos recursos, ya sea frente a otras levaduras u otro tipo de microorganismos. En 1963 Bevan y Makower descubrieron que algunas cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inhibían el crecimiento de otras cepas de la misma especie. Los investigadores entonces

determinaron que algunas cepas podían clasificarse en alguno de los tres fenotipos que ellos denominaron como *killer*, sensible y neutral. En sus experimentos encontraron que cuando levaduras *killer* y levaduras sensibles crecen en el mismo medio, una gran cantidad de estas últimas mueren mientras que las levaduras neutrales, no eliminan a levaduras sensibles ni son eliminadas por levaduras *killer* y que el agente *killer* liberado por las levaduras puede eliminar a las levaduras sensibles sin que haya contacto celular de por medio (Bevan & Makower, 1963). Las levaduras *killer* son inmunes a la acción de su propia proteína *killer*, también denominada “micocina”, pero pueden permanecer susceptibles a la acción de toxinas secretadas por otras levaduras. Este descubrimiento generó una relativamente modesta curiosidad de parte otros investigadores al respecto, quienes durante los siguientes años reportaron que en *S. cerevisiae* existe más de una proteína *killer* y que en la secreción de la misma tiene su origen en la asociación con partículas virales que coincidentemente codificaban para dicha toxina. De este modo, la interesante relación evolutiva de las levaduras con agentes infecciosos para ellas, dio lugar a un mecanismo de gran relevancia en la conservación de las comunidades microbianas en nichos determinados y con ello, abrió la posibilidad de estudiar nuevos metabolitos secundarios con potencial importancia para el ser humano.

La producción de toxinas por levaduras *killer* no se encuentra de forma exclusiva en el género *Saccharomyces* sino que también puede ocurrir en levaduras de otros géneros tales como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* y *Zygosaccharomyces*, incluyendo cepas de interés ambiental, clínico e industrial. Las aplicaciones del fenotipo *killer* son muy variadas: selección de levaduras *killer* con propiedades fermentativas adecuadas para su empleo como cultivos iniciadores en la producción de bebidas alcohólicas y alimentos, aplicación como agentes de biocontrol en la preservación de alimentos o en la protección vegetal, biotipificación de microorganismos en base a los patrones de resistencia/susceptibilidad a levaduras *killer*, desarrollo de nuevas terapias antifúngicas para el tratamiento de micosis

humanas y en la producción de tecnologías del DNA recombinante mediante el aprovechamiento de su capacidad de secreción proteica, lo que en sí mismo reúne potencialmente una enorme gama de posibilidades.

Fenómenos como la actividad *killer* en las levaduras, no son exclusivos de los hongos. La producción de proteínas con efecto tóxico hacia otros organismos, relacionados y no, se ha descubierto en plantas, hongos ustilaginales y deslizantes, paramecios y bacterias. Resulta muy interesante concebir que la capacidad de estos organismos para secretar proteínas tóxicas surgiera por convergencia evolutiva, indicativo de la gran interacción y competencia de los organismos vivos en general.

En las primeras levaduras estudiadas, se demostró que las toxinas killer estaban codificadas por componentes citoplásmicos, heredados durante la gemación hacia las células hijas. En algunas otras levaduras, las toxinas killer están codificadas en genes cromosomales. En muchos casos, incluso en la actualidad, la actividad killer de las levaduras no se encuentra identificada y en consecuencia, las características de sus toxinas así como los potenciales para su aplicación, se desconocen.

En ese trabajo, se analizó una cantidad de cepas de levaduras del género *Candida* más alta que cualquier reporte que se ha podido encontrar, con la finalidad de conocer la ocurrencia, rango de acción, características fisicoquímicas y perspectivas de aplicación de las toxinas killer producidas por levaduras en este grupo taxonómico.

HIPÓTESIS

Cepas del género *Candida* de origen clínico y ambiental exhibirán antagonismo mediado por toxinas killer con potencial de aplicación en el biocontrol y la identificación microbiana.

OBJETIVO GENERAL

1. Caracterizar el fenotipo *killer* en levaduras del género *Candida*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Instalar y estandarizar la metodología para el análisis del efecto *killer* mediante el uso de cepas de referencia como control.
2. Evaluar la presencia de fenotipos *killer* en las cepas contenidas en el centro regional de control y prevención de enfermedades infecciosas.
3. Evaluar la presencia de fenotipos *killer* en las cepas de origen ambiental.
4. Establecer la distribución, propiedades fisicoquímicas y aplicaciones potenciales de las levaduras *killer*.
5. Conocer el tamaño molecular de las toxinas *killer* encontradas.

ANTECEDENTES

1.1 Las levaduras *killer*

El fenómeno *killer* en levaduras fue observado por primera vez en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Bevan & Makower, 1963) y fue entonces que se estableció la denominación de micocinas para describir las toxinas secretadas. Con este descubrimiento y su asociación fenotípica con la presencia de virus de doble cadena de RNA, se marcó el inicio de la virología de las levaduras a principios de 1970 (Bevan *et al*, 1973; Herring & Bevan, 1974). Este fenómeno no está restringido a cepas de *S. cerevisiae* sino que frecuentemente se encuentra presente en otras especies y géneros, teniendo en la actualidad el conocimiento de más de 100 especies diferentes de levaduras que exhiben este fenotipo (Golubev, 1998). En un gran número de casos, la base genética no ha sido caracterizada y sólo la presencia cualitativa del fenotipo *killer* se ha reportado.

En *S. cerevisiae*, el fenotipo *killer* es causado por la presencia de partículas virales de doble cadena de RNA citoplásmicos de la familia Totiviridae, miembros de la constantemente creciente clase de los micovirus, distribuidos ampliamente entre levaduras y otros hongos (Buck, 1986; Bruenn, 1980). Poco después del descubrimiento del fenotipo *killer* en *S. cerevisiae*, se encontraron tres principales

virus en *S. cerevisiae* (ScV-M1, ScV-M2 y ScV-M28), con cada virus codificando una toxina *killer* específica (K1, K2 y K28, respectivamente) y un componente de inmunidad auto-protector (Hanes *et al*, 1986; Dignard *et al*, 1991; Schmitt y Tipper, 1990; Schmitt, 1995; Wickner, 1992). Recientemente, Rodríguez-Cousiño *et al.*, (2011) reportaron una nueva toxina *killer* producida por cepas de *S. cerevisiae* capaz de inhibir el crecimiento de todas los tipos *killer* previamente conocidos de esta especie además de algunas cepas de *Kluyveromyces lactis* y *Candida albicans*. A esta toxina le denominaron Klus y es conferida por la presencia de un virus de doble cadena de ARN, denominado Mlus. En otras levaduras, que resultan ser la mayoría, la base genética de la actividad *killer* no radica en la presencia de partículas virales sino a nivel cromosomal.

Una década posterior al descubrimiento del fenómeno *killer* en levaduras, Young y Yagiu (1978) realizaron una de las primeras comparaciones que incluía una amplia biodiversidad de cepas para evaluar su interacción. Con el conocimiento previo de cada una de las cepas como levadura *killer*, realizaron ensayos para conocer las relaciones antagónicas entre ellas y obtuvieron 10 patrones distintos de inhibición (tabla 1). Este sistema de clasificación permanece a la fecha y ha servido como referente para la incorporación de nuevas toxinas descubiertas. En este mismo reporte, los autores demostraron la posibilidad de dilucidar el origen de la toxina mediante la incubación de las cepas con cicloheximida o a temperaturas super-óptimas, lo cual elimina la posible presencia de plásmidos y otras entidades extranucleares con la consecuente eliminación del fenotipo *killer* en las levaduras. Tal y como se había demostrado previamente, las cepas *killer* de *S. cerevisiae* dejaron de

presentar actividad inhibitoria posterior a ser sometidas a alguno de estos tratamientos, en concordancia con el conocimiento de la codificación de las toxinas en material viral extra cromosomal en dichas cepas.

El fenómeno *killer* también fue reportado en *Kluyveromyces lactis* (Gunge *et al*, 1981) mientras se realizaba un tamizaje en busca de nuevos plásmidos en varias especies de levaduras. Estas cepas contienen de 50 a 100 copias por célula de cada uno de los dos plásmidos lineales citoplásmicos heredados, designados pGKL1 y pGKL2, los cuales tienen un tamaño de 8,874 y 13,447 bp respectivamente. Ambos plásmidos han sido completamente secuenciados y su organización, replicación y expresión ya han sido revisados (Fukuhara, 1995; Gunge y Kitada, 1988; Schründer y Meinhardt, 1995; Stark *et al*, 1990).

Se han encontrado cepas con un amplio espectro de efecto *killer* intergenérico en especies de ascomicetos formadores de esporas, del género *Pichia* y *Hansenula* (ahora *Williopsis*) (Polonelli *et al*, 1991). Estas levaduras expresan un amplio rango de actividad en contra de *S. cerevisiae*, así como otras especies, incluyendo al hongo dimórfico *Candida albicans*. Se ha manifestado la posibilidad de que múltiples toxinas, activas contra diferentes cepas susceptibles, sean secretadas por un mismo hongo (Walker *et al*, 1995). El fenotipo *killer* en estas levaduras es heterogéneo y se pensaba que era heredada cromosomalmente, hasta el descubrimiento de plásmidos de doble cadena de DNA similares a los de *K. lactis*, en *Pichia inositovora* y *P. acaciae*.

TABLA 1. Interacción entre levaduras *killer* reportada por Young y Yagiu (1978)

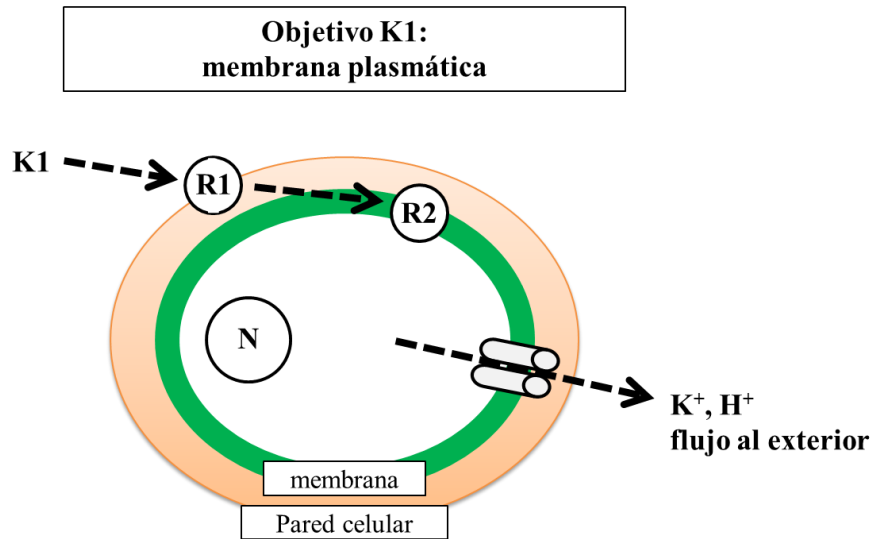
			Cepa susceptible										
			190	235	232	738	761	388	587	16	327	500	
	Cepa killer			663	631	1001					434	333	575
						713					435	577	
<i>S. uvarum</i>	190												
<i>S. cerevisiae</i>	A8209B	K1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	232, 235												
<i>S. hybrids</i>	631, 663												
<i>S. cerevisiae</i>	738, 1001	K2	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. diastaticus</i>	713												
<i>S. capensis</i>	761	K3	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>T. glabrata</i>	388	K4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. vanriji</i>	577												
<i>H. anomala</i>	434	K5	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>H. subpelliculosa</i>	16												
<i>K. fragilis</i>	587	K6	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. valida</i>	327	K7	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. membranifaciens</i>	333												
<i>H. anomala</i>	435	K8	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>H. mrakii</i>	500	K9	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>K. drosophilorum</i>	575	K10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ Inhibición; - No inhibición.

Las toxinas *killer* presentan diversos mecanismos de acción. Las toxinas virales K1 y K2, encontradas por primera vez en *S. cerevisiae*, inician su acción a través de la unión al receptor de pared β -(1 \rightarrow 6)-D-glucano, proceso que es dependiente de pH e independiente de energía (Santos *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2000) Posteriormente, la toxina interactúa con un receptor en membrana plasmática resultando en el aumento de permeabilidad de ésta y provocando la muerte celular. La toxina K28 difiere de las toxinas K1 y K2 en que inicialmente ésta se une a la fracción manoprotéica de la pared celular, sin provocar después un efecto ionofórico sino que es introducida en el núcleo para inhibir la síntesis del ADN. La toxina detiene la proliferación celular previo a la gemación, lo que sugiere que bloquea la fase G1 del ciclo celular. A pesar de tener mecanismos de acción distintos, las toxinas *killer* de origen viral coinciden en ser procesos de dos pasos mediados por receptores, el primero independiente de energía y el segundo involucrando el paso hacia la membrana y la interacción con un segundo receptor en ella (Hutchins & Bussey, 1983; Schmitt & Radler, 1988; figura 1).

Además de los mecanismos de las toxinas de origen viral en *S. cerevisiae*, se han reportado en levaduras de géneros y especies diversas actividades de glucanasa, permeabilización de membrana, inhibición de de β -1,3-glucano sintasa y la inhibición del ARNt (Comitini *et al.*, 2009; Izgü & Altinbay, 2004; Jablonowski & Schaffrath, 2007).

A



B

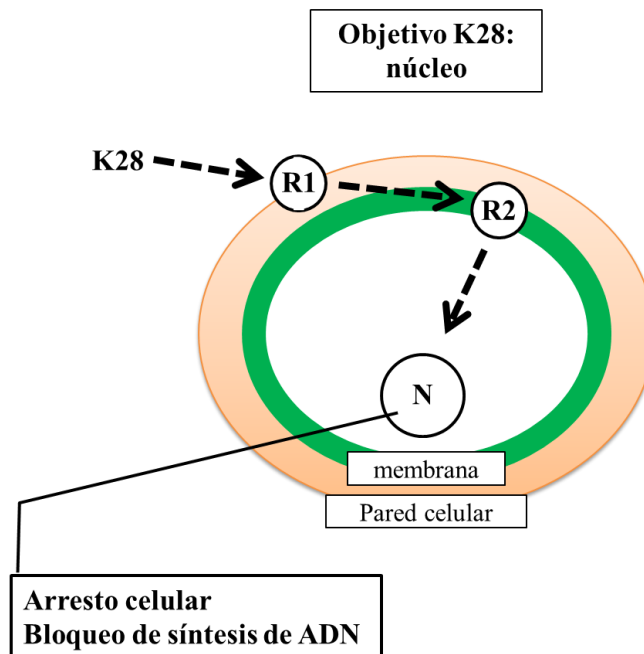


FIGURA 1. Modo de acción mediada por receptores de las toxinas K1 y K28. La eliminación de una levadura susceptible involucra un proceso de dos pasos, uniéndose a receptores de la pared celular (R1) y después en la membrana plasmática (R2). Después de la interacción, K1 altera la membrana (A) mientras que K28 actúa en el núcleo (B).

Al igual que *S. cerevisiae*, otras especies exhiben diferentes toxinas *killer* entre sus cepas. De entre estas levaduras, la ha sido ampliamente estudiada por su espectro de inhibición y la estabilidad de su toxina, es *Pichia anomala*. Una de sus toxinas tiene un tamaño de 83 kDa y ha sido empleada para el control de hongos filamentosos en madera, la inhibición de levaduras contaminantes de procesos fermentativos, la inhibición de cepas del género *Pneumocystis* y el diseño de anticuerpos anti-idiotipo basados en la imagen interna activa de la toxina de *P. anomala* para su aplicación en la terapia antifúngica sistémica y posible vacuna antifúngica. (Polonelli *et al.*, 1991). Izgü y Altinbay (2004) caracterizaron una proteína *killer* tipo K5 en la cepa de *P. anomala* NCYC 434, la cual mostró homología con una exo- β -1,3-glucanasa y de un tamaño de 49 kDa.

1.2. El rol ecológico de las toxinas *killer*

Las levaduras juegan un papel muy importante en la estabilidad de muchos ecosistemas (Gadanho *et al.*, 2006). Debido a su presencia ubicua y a su abundancia en la naturaleza, las levaduras constantemente interactúan con otros organismos, microbianos y no, tal como la asociación entre insectos y levaduras habitantes de su tracto digestivo (Nguyen *et al.*, 2006; Suh *et al.*, 2008). Además, los insectos pueden albergar levaduras en otras partes de sus cuerpos, incluyendo el exoesqueleto, patas y mandíbulas (Ganter, 2006), siendo un ejemplo notable de esto las hormigas

cortadoras de hojas (*Atta* spp.), las cuales han sido reportadas como portadoras de una gran diversidad de levaduras tanto del phylum ascomycota como basidiomycota (Middelhoven *et al.*, 2003; Carreiro *et al.*, 2004; Mueller & Rabeling, 2008; Pagnocca *et al.*, 2008; Schultz & Brady, 2008).

Una hipótesis que busca explicar la presencia de levaduras *killer* en insectos, es la capacidad de inhibir levaduras susceptibles con las cuales puede entrar en contacto, manteniendo la estabilidad en las comunidades microbianas por medio de competencia por interferencia (Carreriro *et al.*, 2002). Además, en el caso de las hormigas, existe una amenaza constante por dos diferentes tipos de microorganismos: 1) hongos antagonistas no-especializados como *Cunninghamella elegans*, *Syncephalastrum racemosum* y *Trichoderma harzianum* (Rodrigues *et al.*, 2005, 2008), y 2) patógenos especializados como *Escovopsis* spp., los cuales son transmitidos horizontalmente (Curie *et al.*, 1999).

Para evaluar dicha hipótesis, Rodrigues *et al.*, (2009) investigaron la capacidad de inhibición de las levaduras hacia hongos filamentosos obtenidos de nidos fúngicos en hormigueros, de peligrosidad conocida para las hormigas. Los resultados de sus investigaciones demostraron que las levaduras aisladas de las hormigas cortadoras de hojas, inhibían fuertemente a *Beauveria bassiana*, *S. racemosum* y *Escovopsis* spp., en concordancia con la hipótesis planteada. Aunque el estudio no involucró una mayor biodiversidad de insectos, no es equivocado suponer que los resultados son extrapolables a otras comunidades de estos organismos.

Por otro lado, rol ecológico del fenómeno *killer* ha sido estudiado en comunidades de levaduras, particularmente en tallos en descomposición y en el crecimiento de hongos en árboles (Starmer *et al*, 1987). En particular, las frutas parecen ser un hábitat muy importante para el fenómeno *killer* dentro de las comunidades de levaduras, pues una cuarta parte de las levaduras aisladas de ellas presentaron el fenotipo. De manera significativa, por lo general se encuentran cepas resistentes en lugar de susceptibles. Estudios basados en las interacciones de *killer*-susceptible mostraron que bajo condiciones apropiadas de evaluación, el fenómeno ocurría más frecuentemente entre levaduras de diferentes localidades que entre levaduras del mismo hábitat. Una posible interpretación de este fenómeno es que un cierto nivel de adaptación a la resistencia es de esperarse bajo una limitada presión selectiva en un tiempo y espacio determinados (Ganter & Starmer, 1992).

1.3. Levaduras *killer* de importancia clínica

Uno de los primeros reportes sobre la presencia del fenotipo *killer* en levaduras de importancia clínica, fue realizado por Kandel y Stern (1979); ellos investigaron la actividad *killer* en 236 aislamientos de levaduras, empleando como cepas susceptibles a *S. cerevisiae* 5 x 47 (ahora ATCC 38527) y a *T. glabrata* T-1. De 154 cepas del género *Candida*, de diversas especies, sus resultados arrojaron que ninguna de ellas mostró actividad *killer* bajo ninguna de las condiciones probadas, incluyendo el pH

de 4.7 para el medio. Su investigación concluyó en que sólo el 3% de las levaduras de importancia clínica exhibían actividad *killer*.

Mucho más recientemente, Baeza *et al.*, (2008), reportaron la ocurrencia de levaduras *killer* en aislamientos industriales y clínicos, aunque su trabajo se centró en cepas de *S. cerevisiae* y *P. anomala*, siendo estas últimas las obtenidas de pacientes, aspecto que presenta una muy baja frecuencia, generando un sesgo y limitando los alcances del estudio con respecto al título de su trabajo.

Estudiando la ocurrencia de actividad *killer* en 64 aislamientos clínicos de *Candida glabrata* bajo diferentes condiciones, se encontró que el 6.25% de los aislamientos resultaron positivos para actividad *killer*, empleando la cepa *S. cerevisiae* W303. La caracterización genética de la toxina no evidenció ningún elemento extracromosomal, sugiriendo que la toxina se encuentra codificada en el genoma nuclear de la levadura (Arroyo-Helguera *et al.*, 2012).

1.4. Aplicaciones de las levaduras *killer*

La primera aplicación para el sistema de levaduras con fenotipo *killer* para la diferenciación intraespecífica de cepas patógenas fue reportada para aislamientos de *C. albicans* (Polonelli *et al.*, 1984), concluyendo que el potencial para la discriminación de cepas podría estar mejorada enormemente con el empleo de un número más grande de cepas *killer* o sus toxinas purificadas. El uso de este sistema

ha demostrado ser una herramienta muy útil en la identificación de casos presuntivos de infecciones fúngicas adquiridas nosocomialmente (Polonelli y Morace, 1985). La evidencia de que una buena selección de levaduras *killer* exhiben su efecto inhibitorio en diferentes especies de hongos filamentosos sugirió la evaluación del potencial de este sistema para diferenciar cepas de *Pseudallescheria boydii*, *Aspergillus niger* y *Sporothrix schenkii*. La demostración de diferentes biotipos en hongos filamentosos demostró que el sistema representa un método factible y simple para estudios epidemiológicos de microorganismos que son difíciles de manejar por otras vías (Polonelli *et al.*, 1987). Otros organismos que han sido discriminados empleando el sistema *killer*, incluyen a *Nocardia asteroides* (Provost *et al.*, 1995), *Malassezia pachydermatis* (Dall'Acqua & Rodrigues, 1998), *Cryptococcus* spp. (Fuentefria *et al.*, 2007) y *Staphylococcus epidermidis* (Fuentefria *et al.*, 2008).

En la industria vinícola, el empleo de los patrones de susceptibilidad generados a través de los ensayos con levaduras *killer* ha sido reportado de forma abundante como una medida para reconocer y/o discriminar la diversidad de levaduras asociadas a las fermentaciones o a las contaminantes de las mismas (Pérez *et al.*, 2001; Sangorrín *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2006; Csoma *et al.*, 2010; Fernandez *et al.*, 2011; Maqueda *et al.*, 2012).

En la misma rama, las levaduras *killer* han sido evaluadas por su potencial preservador de los procesos de fermentación. Sangorrín *et al.* (2008) estudiaron la posibilidad de emplear levaduras *killer* como una medida de biocontrol en bodegas de producción vinícola en la Patagonia Argentina en base a sus perfiles de interacción

killer, obteniendo cepas indígenas con una amplia actividad antagónica hacia cepas que ocasionan el deterioro de vinos y alimentos.

Las aplicaciones de estas levaduras como agentes de biocontrol, también fueron reportadas en áreas ajenas a los vinos, tal como lo reportado por Wang *et al.* (2007), quienes aislaron y purificaron la toxina *killer* de una levadura marina de *Pichia anomala* la cual mantuvo sus propiedades antagonistas contra una levadura patógena de cangrejo que producía pérdidas económicas, además de producir la hidrólisis de laminarina. En 2009, Peng *et al* descubrieron que una cepa de la levadura marina *Williopsis saturnus* producía una alta concentración de toxina *killer* activa contra la levadura patógena de cangrejos *Metschnikowia bicuspidata*, sin embargo, concluyeron que para una alta producción de toxina *killer* efectiva contra *M. bicuspidata* era necesario eliminar el gen de la β -1,3-glucanasa.

En el área de la fitopatología, las levaduras *killer* también han sido estudiadas con éxito. El hongo *Botrytis cinerea*, uno de los patógenos más dañinos en el cultivo de uvas y fresas, logró ser inhibido empleando las toxinas parcialmente purificadas de la cepa *P. membranifaciens* CYC 1106 (Santos & Marquina, 2004). Este mismo hongo fue posteriormente inhibido con cepas de *P. anomala* y *Debaryomyces hansenii*, aumentando el arsenal biológico con potencial biocontrolador frente a este patógeno (Santos *et al.*, 2004). Bleve *et al.* (2006) encontraron que aislamientos de *Issatchenkia orientalis* mostraron capacidad antagonista hacia *Aspergillus carbonarius* y *A. niger* en uvas. Coelho *et al.*, (2009) emplearon cepas de *C. guilliermondii* y *P. ohmeri* para el biocontrol exitoso de *Penicillium expansum* durante la poscosecha, en manzanas y peras. Rosa *et al.* (2010) evaluaron y aplicaron exitosamente la levadura

Torulaspota globosa como agente de biocontrol contra el fitopatógeno del sorgo *Colletotrichum sublineolum* previa evaluación del efecto *killer* de *T. globosa* *in vivo* e *in vitro*.

En menor cantidad pero con resultados favorables, el fenotipo *killer* ha sido empleado para controlar bacterias y levaduras que ocasionan el deterioro de alimentos. Cepas de *Williopsis saturnus* mostraron actividad antagónica frente a levaduras de *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, causantes de alteraciones en la producción de queso (Liu & Tsao, 2009). En 2012, Bajaj *et al.* demostraron la inhibición de bacterias de relevancia para la salud humana y de transmisión alimentaria, tales como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp. y *Staphylococcus aureus*, empleando la toxina *killer* de la levadura *P. kudriavzevii* RY55. Este trabajo además de demostrar el potencial de estas levaduras en su aplicación a los alimentos, comprobó que la actividad de las toxinas *killer* no está limitada al reino de los hongos.

En el área de la salud humana, las investigaciones lideradas principalmente por Luciano Polonelli han generado resultados muy prometedores para el área de las levaduras *killer*. En uno de sus primeros reportes empleando el sistema *killer* en la terapia antifúngica en el humano, Polonelli y sus colaboradores demostraron el efecto terapéutico del uso de una toxina *killer* de *Pichia anomala* (PaKT) en el tratamiento tópico inducido experimentalmente de la pitiriasis versicolor, sugiriendo el empleo de las toxinas *killer* como nuevos antifúngicos (Polonelli *et al.*, 1986). Dos años

después, reportó la obtención de anticuerpos anti-idiotipos que mimetizaban el péptido activo de PaKT y que lograban inhibir el crecimiento de *Candida albicans in vitro* (Polonelli & Morace, 1988). Estos anticuerpos mostraron una actividad fungicida directa, sin necesidad de la intervención de ningún otro factor o célula inmune y los denominó “antibiocuerpos” (Polonelli *et al.*, 1991).

La posibilidad de generar antibiocuerpos en cantidades ilimitadas y virtualmente libres de efectos secundarios nocivos, sugirió la factibilidad de nuevas alternativas para la terapia inmúnológica de la candidiasis. Mientras que la principal limitante de las toxinas *killer*, es la pérdida de actividad a valores de pH alejados de 4.5 y temperatura de 25 °C, los antibiocuerpos mostraron actividad en condiciones fisiológicas. Además, el uso de anticuerpos monoclonales idiotipo (los cuales generaban los antibiocuerpos activos) podrían ser empleados como vacunas antifúngicas (Magliani *et al.*, 2002). Dado que PaKT tiene un rango de acción muy amplio, la lógica indicaría que sus antibiocuerpos mostrarían la misma propiedad, así que se probó un modelo murino de aspergilosis pulmonar invasiva. Los resultados mostraron que en efecto, el tratamiento con antibiocuerpos protegió a los animales de la infección y más aún, se demostró *in vitro* que el desarrollo de hifas era inhibido por dichos anticuerpos (Cenci *et al.*, 2002).

Dadas las múltiples aplicaciones potenciales del fenómeno *killer* de las levaduras, la investigación sobre su ocurrencia y distribución en levaduras de importancia clínica, de lo cual existe poca información a la fecha, se presenta como

una oportunidad de generación de conocimientos cuya aplicación se encuentra ya definida, esperando a ser explotada.

MÉTODOS

2.1 Sitio de Estudio

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología General, de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, de la Facultad de Medicina, ambas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2 Criterios de Inclusión

Se incluyeron aislamientos clínicos y ambientales de levaduras del género *Candida*.

2.3 Microorganismos

Se analizaron aislamientos de levaduras de origen clínico, obtenidas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina,

UANL. Los aislamientos se obtuvieron de hemocultivos, cavidad cerrada, orina, piel y mucosas, exudado vaginal, entre otros. Aunque contenidas en las muestras se encontraban algunas cepas de géneros distintos a *Candida*, representaron menor del 2% del total de las muestras. Los aislamientos de origen ambiental se obtuvieron de insectos colectados en parques ecológicos y jardines de la zona metropolitana de Monterrey, N. L.

Como cepas susceptibles, se adquirieron las cepas ATCC 26609 y ATCC 38527 (antes 5 x 47), ambas correspondientes a *S. cerevisiae*, elegidas a partir de consulta bibliográfica por su amplio rango de susceptibilidad ante las levaduras *killer*. Para el control positivo de actividad *killer*, se empleó la cepa cervecera de *S. cerevisiae* Lalvin ICV-K1, proporcionada amablemente por el Q.B.P. Edye Ulisses Hernández Nava.

2.4 Aislamiento de levaduras a partir muestras ambientales (insectos)

Se realizaron colectas en distintas áreas con el fin de obtener variedad de insectos de los cuales se aislaron posibles levaduras *killer*. Los insectos fueron colectados con pinzas limpias evitando contaminarlos con el ambiente y colocándolos en bolsas de plástico estériles por separado dependiendo del área y del tipo de insecto. Las muestras fueron rotuladas en base al área de donde se obtuvieron y se les asignó un código para facilitar su identificación.

Los insectos colectados se llevaron inmediatamente al laboratorio, transportándolos en una caja de plástico en refrigeración para evitar su deterioro. Posteriormente, las muestras se procesaron durante las siguientes 24 h para obtener resultados más confiables. Para el procesado de las muestras, se esterilizó el material necesario para la siembra de las mismas (medio PDA, medio Sabouraud, solución salina 0.85%, varilla de vidrio en forma de L, pinzas, mortero, pistilo, tubos cónicos de 50ml, puntillas, etc.). Frente al mechero, los insectos fueron tomados de sus bolsas con pinzas estériles y colocados en un mortero con 1 ml de solución salina estéril donde se maceraron hasta obtener una suspensión homogénea. En seguida, se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de las cuales se tomó 1 ml de y se depositó sobre una caja Petri con medio PDA o Sabouraud, realizando una inoculación por extensión con ayuda de una varilla en forma de “L”. Las placas inoculadas se incubaron a 25°C hasta obtener el crecimiento de colonias con características de levadura. La confirmación de las levaduras se realizó mediante la observación microscópica empleando azul de lactoglicerol como medio de montaje y observando las células a 40×. La presencia de células distinguibles a este aumento así como la ausencia de motilidad, agrupación, entre otras características, fueron las variables a considerar para distinguirlas de las bacterias.

Una vez confirmadas, las levaduras fueron aisladas en medio PDA o Sabouraud hasta obtener colonias puras. Una vez aisladas, las levaduras se almacenaron en viales con agua destilada estéril como resguardo. A cada levadura

encontrada, dependiendo de la muestra a la que perteneciera, se le asignó un código para su fácil identificación.

2.5 Evaluación de la presencia de actividad *killer*

2.5.1 Análisis cualitativo

La presencia del fenotipo *killer* en las levaduras analizadas, se evaluó de forma cualitativa empleando el método descrito por Pérez-Nevado et al. (2006 *en determination of *killer* activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned frozen table olives, carpeta poblaciones-aislamiento*). Se vaciaron placas con agar YEPD-MB (0.5% extracto de levadura, 1% peptone, 2% glucose, 2% agar, 0.003%) ajustado a pH 4.5 con una solución amortiguadora de citratos-fosfatos (0.1 M), las cuales inoculadas uniformemente en su superficie con la levadura susceptible, proveniente de un cultivo de 24 – 48 h. La inoculación se realizó a partir de una suspensión de 10^6 células/ml, utilizando hisopos estériles y realizando estrías en 4 diferentes direcciones para asegurar el cubrimiento total de la superficie. Una vez inoculadas, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 20 mins. para permitir la evaporación del exceso de líquido. Posteriormente, los inóculos de levadura a evaluar para actividad *killer* (provenientes de cultivos de 24 – 48 h) se sembraron a manera de frotis sobre la superficie de la placa previamente inoculada con la levadura

susceptible. Las placas se incubaron a 25°C y el crecimiento fue observado hasta por 72 h. La presencia de halos de inhibición y un borde de un color azul intenso, fueron considerados como indicativo de actividad *killer* (figura 2). La sola presencia de halos de inhibición se interpretó como antagonismo mediado por un mecanismo distinto a *killer* y no se consideró para el resto del estudio.



FIGURA 2. Actividad *killer* positiva (flechas) y negativa frente a la cepa ATCC 26609.

2.5.2 Efecto fisicoquímico sobre la actividad *killer*

Las levaduras que exhibieron actividad *killer*, fueron posteriormente ensayadas en condiciones estándar para evaluar la influencia de diferentes valores de pH, temperatura y concentración de NaCl sobre la actividad *killer*, de acuerdo a lo reportado por Hernández *et al.* (2008). Para esto, se empleó el medio YEPD-MB bajo las mismas condiciones del análisis cualitativo, con la diferencia de que las levaduras *killer* fueron depositadas en alícuotas de 30 μ l ajustadas a una concentración de 1×10^6 células/ml. Los valores de pH analizados fueron 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7; las temperaturas fueron 20, 25, 30, 37 y 42°C; y las concentraciones de NaCl fueron 2, 4 y 6%. Los resultados fueron utilizados para seleccionar las cepas de cada especie con la actividad *killer* más estable/intensa en las diferentes condiciones. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

2.5.3 Identificación de levaduras *killer*

Para identificar las levaduras asociadas a insectos, se empleó la prueba API 20C AUX (Biomeriéux, México) siguiendo las instrucciones del fabricante, además de la prueba de filamentación. A partir de una suspensión de células equivalente al No. 2 de McFarland, se transfieren 100 μ l al ampulla de medio API C. Después de

homogeneizar el medio, se llenan con éste cada una de las 20 cúpulas contenidas en la tirilla, la cual es incubada posteriormente a 30°C, registrando los resultados a los 48 y 72 h. Después de la incubación, se comparan las cúpulas con el control negativo (cúpula 0) para determinar si el crecimiento es positivo o negativo. Reuniendo los resultados, se genera el perfil numérico que se ingresa en la base de datos apiweb para obtener el resultado.

La prueba de filamentación se realizó empleando placas Dalmau con agar harina de maíz suplementado con tween 80. Las cepas fueron inoculadas en estría cruzada y se colocaron cubreobjetos estériles en los trazos finales de cada cuadrante. Después de 48 h de incubación a 30 °C, se observa directamente al microscopio para conocer la posible formación de hifas o pseudohifas. Este resultado constituye la prueba 21 del sistema.

2.5.4 Determinación de la naturaleza genética de la toxina killer

En base a lo reportado por Young y Yagiu (1978), la naturaleza genética fue evaluada mediante la incubación de las levaduras killer (1×10^6) a 40°C, en medio YEPD-MB ajustado a pH 4.5. Después de 48 h, las levaduras fueron sometidas a ensayo de actividad killer para verificar la actividad. La pérdida de la misma indicaría la codificación de la toxina en material extra-nuclear. Como referencia de los ensayos se utilizó la cepa Lalvin (*S. cerevisiae*), la cual posee la toxina killer codificada en plásmidos.

2.5.5 Actividad antifúngica de levaduras *killer*

Con la finalidad de conocer los potenciales de aplicación del sistema *killer* en las levaduras con fenotipo positivo detectadas en el tamizaje inicial, se evaluó su capacidad inhibitoria frente a otras levaduras y hongos filamentosos. Las pruebas realizadas sirvieron para conocer la capacidad inhibitoria de las cepas aisladas así como la posibilidad de establecer patrones de biotipificación que discriminaran entre especies de interés.

2.5.5.1 Biotipificación del complejo *Candida parapsilosis*.

Un grupo de 29 aislamientos de *C. parapsilosis*, 29 de *C. orthopsilosis* y 4 de *C. metapsilosis*, fueron empleados como cepas susceptibles frente a levaduras *killer* previamente identificadas. En esta prueba se incluyeron las cepas ATCC 22019 (*C. parapsilosis sensu stricto*), ATCC 96139 (*C. orthopsilosis*) y ATCC 96144 (*C. metapsilosis*) como referencia. Posteriormente, la ocurrencia del fenotipo *killer* en estos aislamientos se analizó empleando la cepa ATCC 26609 como cepa susceptible, con la finalidad de conocer las posibles diferencias en la distribución de este fenómeno en las especies de este recién caracterizado complejo de especies. Las pruebas fueron realizadas por duplicado, empleando temperaturas de incubación de 20, 25 y 30°C.

2.5.5.2 Inhibición de *Trichosporon* spp. y *Cryptococcus* spp.

La capacidad inhibitoria del conjunto de levaduras *killer* seleccionadas en base a su actividad en diferentes condiciones fisicoquímicas, se analizó frente a 30 cepas de *Trichosporon* spp. y 30 de *Cryptococcus* spp. aisladas de muestras clínicas. Con referencia a los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica, se emplearon las condiciones de pH 4.5 e incubación a 25°C en el medio anteriormente descrito. Las cepas de *Trichosporon* spp. y *Cryptococcus* spp. fueron ajustadas a 10^6 células/ml e inoculadas en la superficie del agar. Una vez eliminado el exceso de humedad, se inocularon las cepas *killer* sobre el mismo y se observó el crecimiento durante las siguientes 72 h. Además de conocer la inhibición de estos patógeno de gran importancia clínica, esta prueba permitió conocer la inhibición de una levadura del phylum basidiomycota (*Trichosporon* y *Cryptococcus*), por una del phylum ascomycota (*Candida* sp.), lo cual se ha reportado como imposible (Golubev, 1998).

2.5.5.3 Inhibición de hongos contaminantes en poscosecha

Un total de 17 hongos fueron aislados a partir de vegetales en poscosecha que presentaron lesiones características de crecimiento fúngico. Los aislamientos fueron sembrados en placas de PDA e incubados a 30°C, de forma sucesiva, hasta obtener un

crecimiento puro. Los hongos filamentosos fueron identificados en base a su morfología macro y microscópica, empleando claves de identificación (Watanabe, 2010). Los aislamientos se almacenaron en tubos con PDA a 4°C hasta su empleo.

Para el análisis del biocontrol de las levaduras *killer* sobre estos hongos, se vaciaron placas de Petri con PDA ajustado a una concentración de 1×10^6 conidias/ml. Una vez solidificado el medio, se depositaron alícuotas de 30 µl de cada levadura *killer*, empleando únicamente las levaduras obtenidas de insectos, bajo la consideración de que una levadura de origen clínico no podría ser aplicada como agente de biocontrol debido al riesgo que representa hacia el hombre. La actividad biocontroladora fue identificada con la presencia de halos de inhibición alrededor de la levadura.

2.5.6 Ensayos de inmunidad cruzada a toxinas *killer*

Las levaduras *killer* cuyas toxinas pertenecen al mismo tipo, o son lo suficientemente similares, provocan un fenómeno de inmunidad cruzada que impide que se inhiban entre sí (Golubev, 1988). Este concepto fue aplicado a las levaduras obtenidas para determinar la similitud de sus toxinas. Para llevarlo a cabo, todas las levaduras *killer* seleccionadas fueron enfrentadas con el resto, incluyendo la cepa Lalvin. Con el conocimiento previo de que esta levadura produce la toxina K1 y ésta

se origina de material extranuclear, la levadura *Lalvin* sirvió como referencia también de una toxina distinta. Todas las condiciones empleadas fueron las mismas para los ensayos *killer* previamente descritos.

2.5.7 Extracción de la toxina *killer*

Para corroborar que la actividad inhibitoria está dada de forma independiente al contacto célula-célula, y para la determinación del peso molecular de la toxina, ésta fue aislada mediante precipitación con sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Las levaduras fueron inoculadas en 500 ml de caldo YEPD adicionado con 1% de glicerol y ajustado a un pH de 4.5 (citrato-fosfato 0.1 M). Después de incubadas por 72h a 25°C, el volumen fue centrifugado para concentrar las células y recuperar el sobrenadante, donde la toxina debía encontrarse. Una vez separado el sobrenadante, se adicionó sulfato de amonio hasta obtener una saturación del 80%, a 0°C. Esta solución se agitó durante 1 h a 0°C y después se centrifugó a 3,500 rpm por 45 mins. a la misma temperatura. El precipitado formado se resuspendió en 5ml de buffer citrato-fosfato (pH 4.5) y se dializó contra el mismo buffer por 24 h a 4°C, empleando una membrana de diálisis Spectra Pore con un tamaño de poro de 3.5 kDa (Spectrum). Una vez concluido el tiempo de diálisis, la membrana fue colocada sobre azúcar durante 2 h para concentrar el volumen y posteriormente se adicionó glicerol a una concentración final de 20%. El volumen obtenido se esterilizó con filtros de 0.22 μm y almacenó a -20°C en alícuotas de 1 ml. Para determinar la presencia de la

toxina *killer*, se colocaron 200 µl de la toxina en pocillos realizados en agar YEPD-MB a pH 4.5, inoculado previamente con la cepa susceptible, e incubados por 72 h a 25°C.

2.5.8 Exclusión molecular y electroforesis

La fracción proteica obtenida en el paso anterior fue aplicada a una columna de exclusión molecular (Sefacryl S-200 HR, GE Healthcare) para separar las distintas fracciones de acuerdo a su tamaño molecular y obtener aquellas que exhibieran la actividad inhibitoria. Se empleó una columna de 1 × 71 cms (~55 ml), pre-equilibrada con buffer citrato-fosfato (pH 4.5). La elución se llevó a cabo usando el mismo buffer, colectando fracciones de 4 ml durante 48 h. La presencia de proteínas en cada fracción fue obtenida a través de lecturas espectrofotométricas usando una longitud de onda de 280 nm. La actividad antifúngica de las fracciones fue evaluada, y aquellas que exhibieron actividad fueron concentradas y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para conocer su peso molecular. Las condiciones del gel empleado se enlistan en la tabla 2. La electroforesis se realizó durante 1 h a 70 V para la fase concentradora, y 150 V por 3 h para la fase separadora. Posteriormente, el gel fue teñido con azul de Coomassie por 30 minutos y desteñido durante 24 h.

TABLA 2. Condiciones del gel de poliacrilamida empleado para determinar el peso molecular de la toxina *killer*.

Fase Concentradora		Fase Separadora	
Reactivo	Volumen (μ l)	Reactivo	Volumen (μ l)
Agua	1220	Agua	2790
Acrilamida/Bis-	260	Acrilamida/Bis-	3120
Acrilamida		Acrilamida	
Tris/HCl pH 6.8	500	Tris/HCl pH 8.8	1990
PSA 10%	10	PSA 10%	80
TEMED	2	TEMED	5

Tris: tris (hidroximetil) aminometano; PSA: Persulfato de amonio;
 TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina.

RESULTADOS

3.1 Ocurrencia de actividad *killer*

Se analizaron un total de 1,216 cepas de levaduras cuya distribución se presenta en la tabla 3.

3.1.1 Cepas *killer* de origen clínico

Un total de 52 aislamientos (4.3%) del género *Candida* exhibieron actividad *killer* frente a ambas cepas susceptibles de *Saccharomyces*, aunque la cepa ATCC 26609 mostró ligeramente mayor susceptibilidad (*i.e.* halos de inhibición más grandes, datos no mostrados). Aunque la mayoría de las cepas *killer* provinieron de hemocultivos, el número de levaduras *killer* aisladas de cavidad cerrada fue proporcionalmente la mayor. Los hemocultivos representaron el número más amplio de especies con actividad *killer*. *Candida glabrata* fue la especie con la mayor ocurrencia de actividad *killer*, aunque la proporción neta más alta se observó en *C. utilis* (1 positiva de 4 analizadas).

Debido a que la mayor cantidad de aislamientos provino de hemocultivos, se compararon las proporciones de actividad *killer* en cada una de las cuatro especies más abundantes obtenidas de sangre (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*) entre sí como grupos independientes empleando una prueba Z (nivel de confianza de 95%). La frecuencia de *Candida glabrata* resultó ser significativamente distinta a cualquier otro grupo, mientras que ninguno de los otros grupos probó ser estadísticamente distinto.

Dado que las cepas de *S. cerevisiae* susceptibles a *killer*, fueron inhibidas por las mismas levaduras, en los procedimientos posteriores se empleó únicamente la cepa ATCC 26609. Las cepas *killer* obtenidas de estos aislamientos, fueron asignadas con un código secuencial precedido por la letra “K” (*e.g.* K1, K2, K3, etc.).

3.2 Efecto de factores fisicoquímicos

Los resultados de los ensayos para evaluar la influencia del pH, temperatura y concentración de sal sobre la actividad *killer*, se ilustran en la tabla 4. De acuerdo a estos resultados, las condiciones más adecuadas para detección de la actividad *killer*, fueron el pH entre 4.5 y 5, la temperatura de 25°C y una concentración de NaCl de 2%. Sólo la cepa Lalvin, empleada como levadura *killer* de referencia, mostró mejor actividad a pH 4.

TABLA 3 Cantidad y origen de las cepas de origen clínico examinadas para actividad *killer*

Especies	Origen de los aislamientos (cantidad de cepas)						Total	No. de cepas con actividad <i>killer</i>
	Hemocultivo	Cavidad cerrada	Orina	Piel y mucosas	Exudado vaginal	Otros		
<i>Candida albicans</i>	172	48	53	63	22	22	380	7
<i>Candida parapsilosis</i>	202	18	2	37	0	7	266	7
<i>Candida glabrata</i>	44	22	62	2	21	10	161	28
<i>Candida tropicalis</i>	94	22	20	1	2	9	148	6
<i>Candida krusei</i>	12	3	1	2	0	1	19	
<i>Candida zeylanoides</i>	2	1	0	2	0	1	6	
<i>Candida utilis</i>	3	0	0	1	0	0	4	1
<i>Candida guilliermondii</i>	7	0	1	5	0	0	13	2
<i>Candida boidinii</i>	1	0	0	0	0	0	1	
<i>Candida famata</i>	4	1	2	0	0	1	8	1
<i>Candida rugosa</i>	2	0	0	0	0	0	2	
<i>Candida lusitaniae</i>	2	0	1	0	0	0	3	
<i>Candida mangoliae</i>	0	0	0	1	0	0	1	
<i>Candida sp.</i>	0	0	7	6	0	1	14	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	1	0	0	0	0	6	
<i>Geotrichum capitatum</i>	0	0	1	1	0	0	2	
<i>Geotrichum sp.</i>	0	0	0	0	0	1	1	
<i>Kodamea (Pichia) ohmeri</i>	0	0	0	0	0	1	1	
<i>Rhodotorula minuta</i>	0	0	0	0	0	2	2	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	1	0	0	1	
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0	0	0	0	0	1	
<i>Trichosporon mucoides</i>	5	2	0	0	0	0	7	
No ID	0	0	3	0	0	1	4	
TOTAL	556	118	153	122	45	57	1051	52

TABLA 4. Influencia de condiciones fisicoquímicas sobre la actividad *killer* (no se muestra el total de las cepas)*.

id	No.	pH4	pH4.5	pH5	2% NaCl	4% NaCl	30°C	37°C
<i>C. glabrata</i>	K1							
<i>C. glabrata</i>	K2							
<i>C. glabrata</i>	K3							
<i>C. glabrata</i>	K4							
<i>C. glabrata</i>	K5							
<i>C. glabrata</i>	K10							
<i>C. glabrata</i>	K12							
<i>C. glabrata</i>	K13							

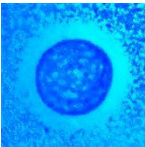
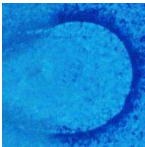
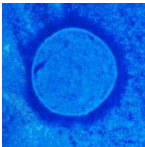
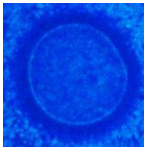
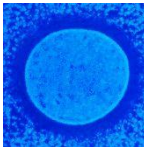
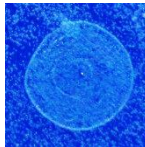
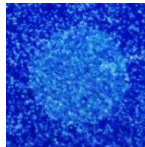
TABLA 4. Continuación...

id	No.	pH4	pH4.5	pH5	2% NaCl	4% NaCl	30°C	37°C
<i>C. glabrata</i>	K15							
<i>C. parapsilosis</i>	K18							
<i>C. tropicalis</i>	K20							
<i>C. parapsilosis</i>	K22							
<i>C. glabrata</i>	K26							
<i>C. albicans</i>	K28							
<i>C. glabrata</i>	K30							
<i>C. glabrata</i>	K33							
<i>C. glabrata</i>	K35							

TABLA 4. Continuación...

id	No.	pH4	pH4.5	pH5	2% NaCl	4% NaCl	30°C	37°C
<i>C. parapsilosis</i>	K36							
<i>C. parapsilosis</i>	K37							
<i>C. tropicalis</i>	K50							
<i>C. utilis</i>	K52							
<i>C. parapsilosis</i>	VG0 08							
<i>C. krusei</i>	VG0 31							
<i>C. lusitaniae</i>	VG0 39							
<i>C. guilliermondii</i>	M1							

TABLA 4. Continuación...

id	No.	pH4	pH4.5	pH5	2% NaCl	4% NaCl	30°C	37°C
<i>S. cerevisiae</i> (Lalvin)	n/a							

*Las condiciones no mostradas no permitieron el crecimiento de las levaduras o no aportaron información adicional.

En base a los resultados obtenidos de este ensayo, los procedimientos realizados posteriormente emplearon la adición de NaCl al 2% en el medio YEPD-MB.

3.3 Identificación de levaduras *killer*

Los resultados de la identificación de levaduras *killer* aisladas de insectos ($n = 7$), indicó que la totalidad de levaduras *killer* fueron identificadas como *Candida guilliermondii*, dato que no se ha reportado en la literatura. En las levaduras de origen clínico analizadas, sólo 2 de 13 levaduras pertenecientes a esta especie mostraron el fenotipo positivo. Aunque los aislamientos de insectos que se identificaron fueron únicamente aquellos que exhibieron actividad *killer*, lo que hace imposible comparar la proporción, es notoria la exclusividad de la capacidad inhibitoria en esta especie.

3.4 Determinación de la naturaleza genética de la toxina *killer*

La actividad de las levaduras *killer* del género *Candida* incubadas por 48h a 40°C, siguió manifestándose posteriormente. Por el contrario, la cepa Lalvin, productora de la toxina K1 codificada en plásmidos, perdió el fenotipo (figura 3). Este resultado demuestra que las toxinas

killer de las levaduras aisladas del género *Candida*, se encuentran codificadas en el genoma nuclear, característica que vuelve más estable su producción.



FIGURA 3. Retención/pérdida del fenotipo killer posterior a la incubación a temperaturas superóptimas.

3.4 Interacciones *killer* – susceptible del complejo *Candida parapsilosis*

Los resultados de las interacciones entre el panel de levaduras *killer* y el cepario del complejo de *C. parapsilosis*, no arrojó ningún patrón que agrupara la totalidad de alguna de las especies (tabla 5). Ninguna cepa de *C. metapsilosis* ($n = 4$) fue inhibida. La cepa *C. parapsilosis* sensu stricto ATCC 22019 fue inhibida por todas las levaduras *killer*, con excepción de las cepas de *C. parapsilosis* y *C. utilis*, del panel. Esto muestra concordancia con el hecho de que si bien la sensibilidad a *killer* se ve influenciada de forma positiva por una cercana relación filogenética entre las cepas, es aun así una propiedad particular de cepa (Vaughan-Martini *et al.*, 1996).

Proporcionalmente, *C. orthopsilosis* mostró ser más sensible, considerando la susceptibilidad cuando menos a una cepa.

De manera inversa, se evaluó la ocurrencia del fenotipo *killer* en las levaduras del complejo de *C. parapsilosis*, para conocer las posibles diferencias entre las especies y, en su caso, su posible aprovechamiento para establecer un sistema de diferenciación basado en el sistema *killer*.

Ninguno de los aislamientos de *C. parapsilosis sensu stricto* o *C. orthopsilosis* mostraron actividad *killer* a ninguna de las temperaturas probadas. Por otro lado, todos los aislamientos de *C. metapsilosis*, incluyendo la cepa de referencia, mostraron una zona de inhibición a su alrededor incluyendo un borde ligeramente más oscuro, pero únicamente a la temperatura de 25°C (figura 4). El resultado global de las interacciones *killer*-susceptible del complejo *C. parapsilosis*, indica que cuando se emplea la toxina K2 de *S. cerevisiae*, y la cepa ATCC 26609 de la misma especie, como susceptible, *C. orthopsilosis* exhibe la mayor ocurrencia del fenotipo *killer* y la menor susceptibilidad, mientras que *C. orthopsilosis* exhibe la mayor susceptibilidad (30%, tabla 6).

3.5 Inhibición de *Trichosporon* spp. y *Cryptococcus* spp.

Ningún aislamiento de *Trichosporon* spp. mostró susceptibilidad al panel de cepas *killer* al que fue expuesto, en ninguna condición de temperatura empleada. Por otro lado, un total de 6 cepas de *Cryptococcus* spp. mostró susceptibilidad cuando fueron enfrentadas al panel de levaduras *killer* del género *Candida* (tabla 7, figura 5). El patrón de inhibición no permitió diferenciar entre las cepas (*gattii* y *neoformans*), y en todas las cepas inhibidas, siempre fue el mismo conjunto de levaduras *killer* el que mostró el antagonismo (k14, k18, k28 y k52).

TABLA 5. Susceptibilidad de aislamientos del complejo *Candida parapsilosis* frente a un panel de levaduras *killer*

Cepas evaluadas para susceptibilidad	Levaduras <i>killer</i>																					
	<i>Candida glabrata</i>								<i>C. tropicalis</i>				<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. guilliermondii</i>		<i>C. famata</i>		<i>C. utilis</i>
	05	06	12	26	35	40	41	48	07	14	20	50	04	16	22	23	39	34	53	38	39	52
H409				+		+	+		+	+				+	+	+			+	+	+	
C64													+	+	+	+						
D3																		+				
Co D5											+										+	
HP179					+		+								+				+		+	
H353			+																			
CC26							+	+	+	+	+	+										
M18							+									+					+	
Cp C124																+						
CC105															+							
ATCC 22019	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	

^a Sólo se muestran resultados de aislamientos susceptibles al menos a una cepa *killer*. Co = *Candida orthopsilosis*. Cp = *Candida parapsilosis sensu stricto*. + = indica inhibición.

TABLA 6. Distribución de las frecuencias de fenotipos *killer*-susceptible-neutro en aislamientos del complejo *C. parapsilosis*.*

Espece	Fenotipo <i>killer</i> (%)	Fenotipo susceptible (%)	Fenotipo neutro (%)
<i>C. orthopsilosis</i>	0	30	70
<i>C. metapsilosis</i>	100	0	0
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0	20	80

* Resultados empleando la toxina K2 de *S. cerevisiae* y la cepa ATCC 26609 de esta misma especie, como susceptible.

3.6 Inmunidad cruzada a toxinas *killer*

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de inmunidad cruzada a las toxinas *killer*, todos los aislamientos del género *Candida* seleccionados, secretan una toxina igual o muy similar *i.e.* las levaduras no son inhibidas entre sí. Como era esperado, la levadura Lalvin (*S. cerevisiae*) fue la única que mostró ser inhibida por el resto del panel, lo que indica que su toxina *killer* no le confiere inmunidad durante el proceso de producción/secreción (figura 6). Sin embargo, la levadura Lalvin no fue capaz de inhibir a las levaduras del género *Candida*, cuya interpretación unilateral sería que sus toxinas son iguales, sin embargo el escenario inverso permite demostrar que esto no es así. Lo anterior demuestra que las toxinas del género *Candida* seleccionadas, pertenecen a un mismo tipo entre sí pero distinto a K1 (Lalvin), resaltando la importancia de probar el antagonismo de forma bidireccional cuando se evalúa la inmunidad cruzada.

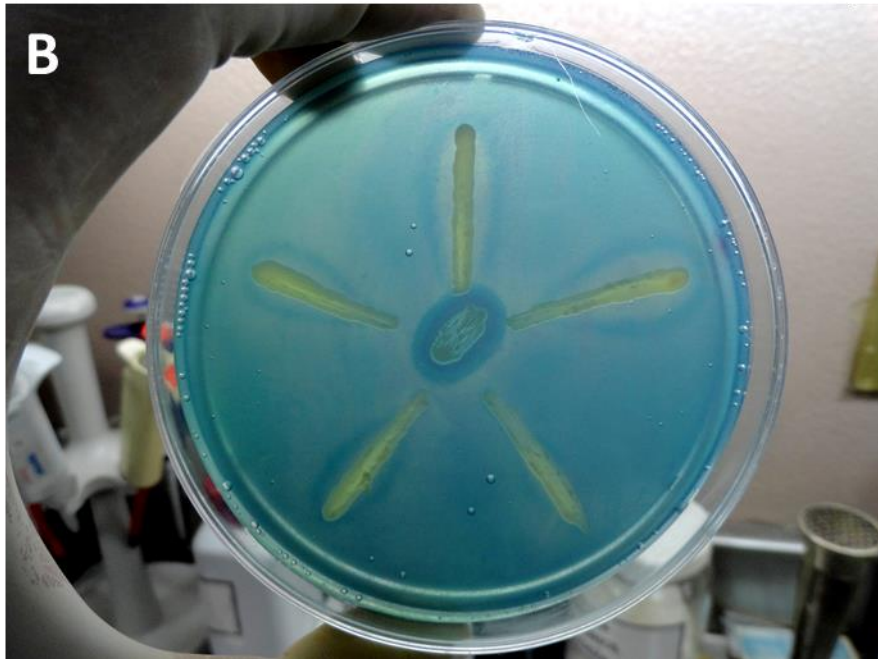
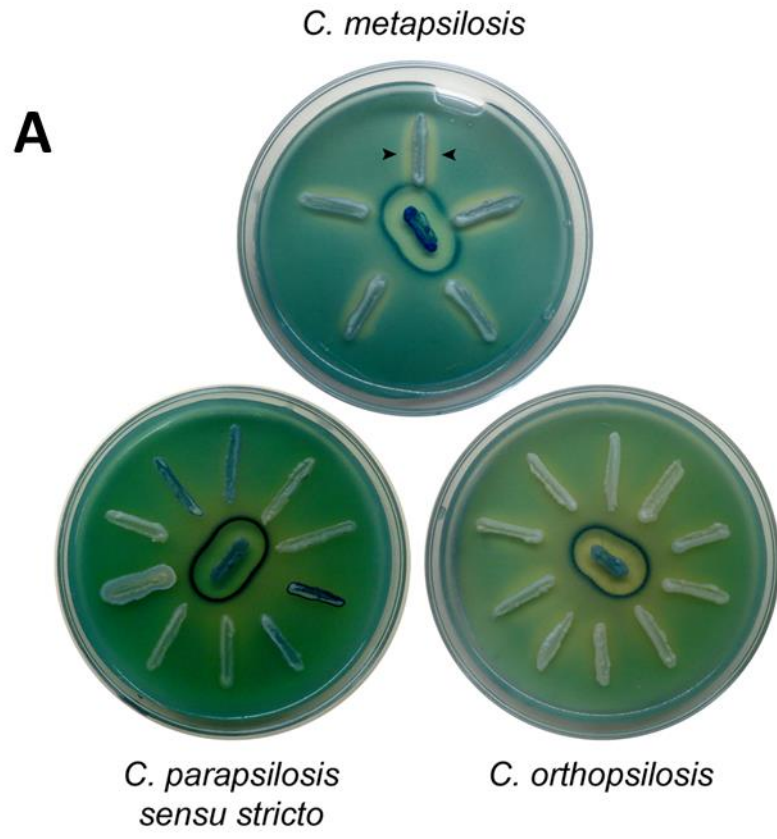


FIGURA 4. Ocurrencia del fenotipo *killer* en el complejo *C. parapsilosis*. La estria central es la cepa *S. cerevisiae* K1 (Lalvin).
 (B) Acercamiento a la inhibición producida por *C. metapsilosis*.

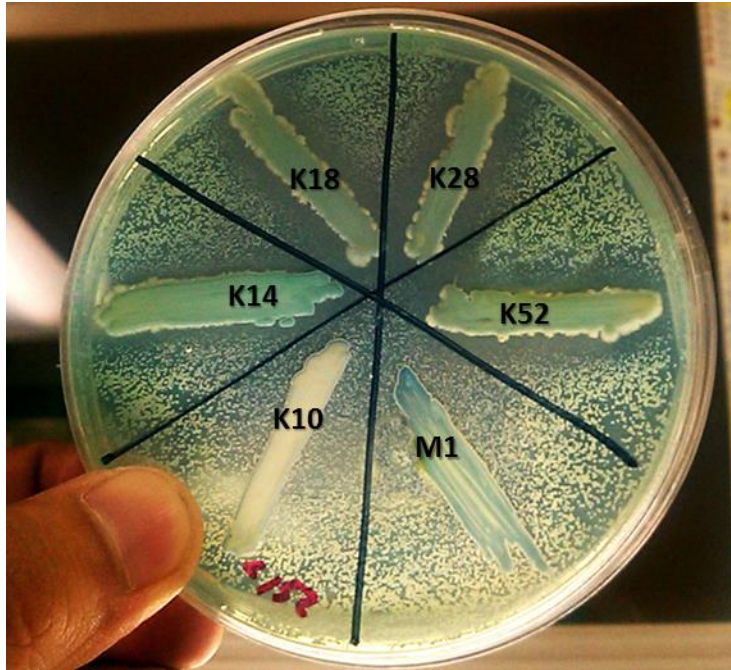


FIGURA 5. Inhibición de *Cryptococcus* sp. por cepas *killer* del género *Candida*.

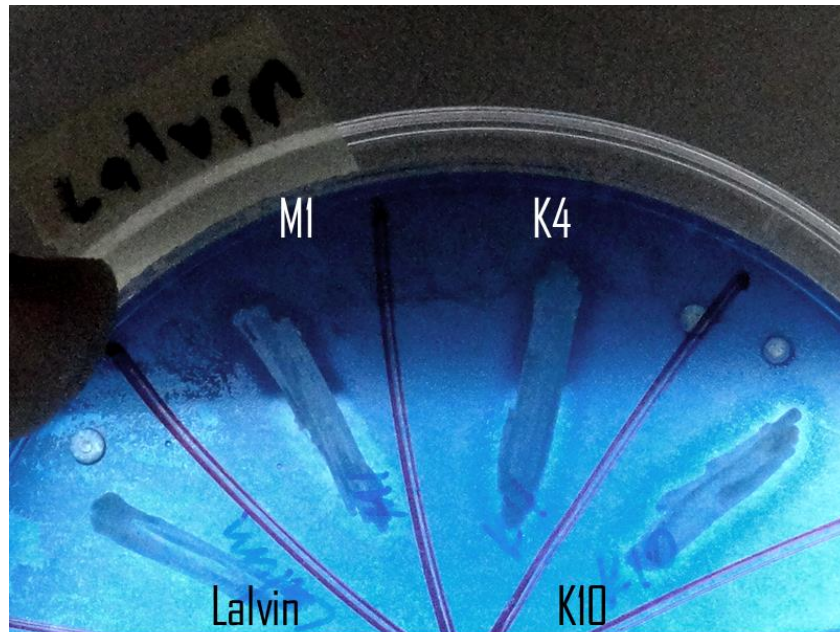


FIGURA 6. Sensibilidad de la levadura Lalvin a levaduras *killer* del género *Candida*.

TABLA 7. Inhibición de aislamientos de *Cryptococcus* spp. empleando levaduras *killer* del género *Candida*.

Clave	Especie de <i>Cryptococcus</i>	Cepas <i>Killer</i>					
		K10	K14	K18	K28	K52	M1
146	<i>gattii</i>						
147	<i>neoformans</i>						
148	<i>neoformans</i>		+	+	+	+	
149	<i>neoformans</i>						
150	<i>neoformans</i>						
151	<i>neoformans</i>						
152	<i>gattii</i>		+	+	+	+	
153	<i>neoformans</i>						
154	<i>neoformans</i>						
155	<i>neoformans</i>		+	+	+	+	
156	<i>neoformans</i>						
157	<i>neoformans</i>						
158	<i>neoformans</i>						
159	<i>neoformans</i>						
160	<i>neoformans</i>						
161	<i>neoformans</i>		+	+	+	+	
162	<i>neoformans</i>						
163	<i>neoformans</i>						
164	<i>neoformans</i>						
165	<i>neoformans</i>						
166	<i>neoformans</i>						
167	<i>neoformans</i>						
168	<i>neoformans</i>						
169	<i>neoformans</i>						
170	<i>neoformans</i>						
171	<i>neoformans</i>						
172	<i>neoformans</i>		+	+	+	+	
173	<i>neoformans</i>						
174	<i>neoformans</i>						
175	<i>neoformans</i>		+	+	+	+	

+ inhibición.

3.7 Inhibición de hongos contaminantes en poscosecha

El grupo de 17 cepas de hongos aislados como contaminantes de vegetales en poscosecha, no mostró susceptibilidad frente a cepas de *C. guilliermondii* obtenidas de aislamientos clínicos, pero mostró diversos patrones de inhibición frente a las cepas *killer* de *C. guilliermondii* aisladas de insectos, con diferente intensidad en su actividad antagonista (tabla 8 y figura 7). Las levaduras M1, Y1 y Y4 exhibieron antagonismo frente a la mayor cantidad de hongos filamentosos (n = 15), mientras que la levadura Y3 inhibió a la menor cantidad de ellos (n = 7). Resulta notable que todas las cepas del género *Penicillium* incluidas en este ensayo fueron inhibidas en algún grado, por todas las levaduras.

Para conocer de forma cuantitativa el potencial biocontrolador de estas levaduras, se evaluó el porcentaje de reducción de crecimiento en cepas de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Esto se realizó mediante la inoculación de los hongos filamentosos en placas con medio PDA al cual se le incorporaron las levaduras en concentraciones finales de 10^5 y 10^6 células/ml. Como control positivo de crecimiento, se inocularon placas de PDA que no contenían levaduras. Los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron a 30°C. El porcentaje de reducción se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ reducción} = \frac{\text{diámetro colonial en medio con levadura}}{\text{diámetro colonial en medio sin levadura}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 9 y 10. Empleando la prueba *t* de Student, no se encontraron diferencias significativas en los valores de reducción obtenidos entre levaduras, aunque los valores globales de reducción de crecimiento colonial fueron significativamente menores al emplear concentraciones de levaduras de 10^6 células/ml ($p < 0.05$). Las diferencias en los valores de reducción colonial entre las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* también fueron significativamente distintas, siendo estos mayores en el género *Penicillium*, donde con excepción de la cepa P02, se observaron valores de reducción superiores al 80% y en varios casos reducción del 100% en la concentración más alta de levaduras.

TABLA 8. Antagonismo de levaduras frente a hongos de poscosecha

CONTAMINANTE	FUENTE	ANTAGONISMO POR LEVADURA						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<i>Absidia</i> sp.	Fresa	+	+			+	+	
<i>Absidia</i> sp.	Jícama	+	+		+		+	
<i>Acremonium</i> sp.	Cebolla		+		+			
<i>Aspergillus</i> sp.	Cebolla	+		+		+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp.	Uva	+		+		+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp.	Jícama	+	+	+	+		+	+
<i>Aspergillus</i> sp.	Mango	+	+		+	+	+	-
<i>Aspergillus</i> sp.	Jícama	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium</i> sp.	Tomate	+	+		+		+	
<i>Geotrichum</i> sp.	Melón	+	+				+	+
<i>Geotrichum</i> sp.	Tomate	+	+		+			
<i>Geotrichum</i> sp.	Tomate	+	+		+		+	+
<i>Geotrichum</i> sp.	Naranja	+	+		+		+	-
<i>Geotrichum</i> sp.	Tomate	-	+		+		+	
<i>Penicillium</i> sp.	Cebolla	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	Naranja	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	Pera	+	+	+	+	+	+	+



FIGURA 7. Actividad antagónica de cepas de *Candida guilliermondii* frente a hongos contaminantes en poscosecha.

3.8 Extracción de la toxina cruda

Dado que los ensayos de inmunidad cruzada indicaron que las toxinas de las diferentes especies de *Candida* probadas pertenecen al mismo tipo, las pruebas de extracción y determinación del peso molecular se realizaron empleando la cepa K4 (*C. glabrata*) debido a su estabilidad y a la elevada ocurrencia del fenotipo *killer* en esta especie. Siguiendo el protocolo establecido, se logró obtener un promedio de 7 ml de toxina, previo a la diálisis y adición de glicerol. El

volumen final puede variar según los tiempos y condiciones de la diálisis, así como de los procedimientos (en su caso) empleados para su concentración posterior.

TABLA 9. Porcentaje de reducción de crecimiento en cepas de *Aspergillus* spp. causado por levaduras aisladas de hormigas

Cepas de levaduras		Cepas de <i>Aspergillus</i> spp.						
		A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07
10 ⁵ cels/ml	M1	74	67	91	70	85	69	70
	M2	76	62	80	62	86	70	79
	M3	68	73	87	55	89	71	73
	M4	81	75	88	55	90	73	82
	M5	75	69	96	59	85	76	72
	M6	71	73	91	64	86	71	74
	M7	72	72	96	60	81	73	74
10 ⁶ cels/ml	M1	84	82	91	66	88	79	85
	M2	88	78	86	66	90	76	78
	M3	73	78	92	72	89	76	81
	M4	86	85	96	70	92	83	81
	M5	84	82	100	70	89	84	85
	M6	81	84	93	70	99	76	81
	M7	84	81	97	63	95	76	87

La difusión de la toxina en las condiciones empleadas para los ensayos *killer*, mostró las mismas características de la inhibición en presencia de células *i.e.* halos de inhibición rodeadas de un borde de un color más oscuro (figura 8).

TABLA 10 Porcentaje de reducción de crecimiento en cepas de *Penicillium* spp. causado por levaduras aisladas de hormigas

Cepas de levaduras		Cepas de <i>Penicillium</i> spp.									
		P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10
10 ⁵ cels/ml	M1	87	36	87	91	93	85	100	91	85	86
	M2	85	50	88	87	90	79	100	93	82	84
	M3	87	48	92	90	91	87	75	90	86	85
	M4	82	54	92	86	89	89	74	93	82	84
	M5	84	45	89	86	89	78	87	93	86	85
	M6	84	50	91	91	94	78	79	92	87	88
	M7	87	50	87	91	90	84	90	91	87	84
10 ⁶ cels/ml	M1	85	54	91	94	94	87	100	93	91	87
	M2	85	42	88	86	100	89	100	93	86	89
	M3	89	53	90	86	100	90	100	96	89	92
	M4	91	55	93	89	100	100	100	94	85	89
	M5	92	47	88	87	95	100	99	91	91	89
	M6	85	48	90	94	97	96	98	93	90	88
	M7	84	55	91	92	96	90	100	91	91	86

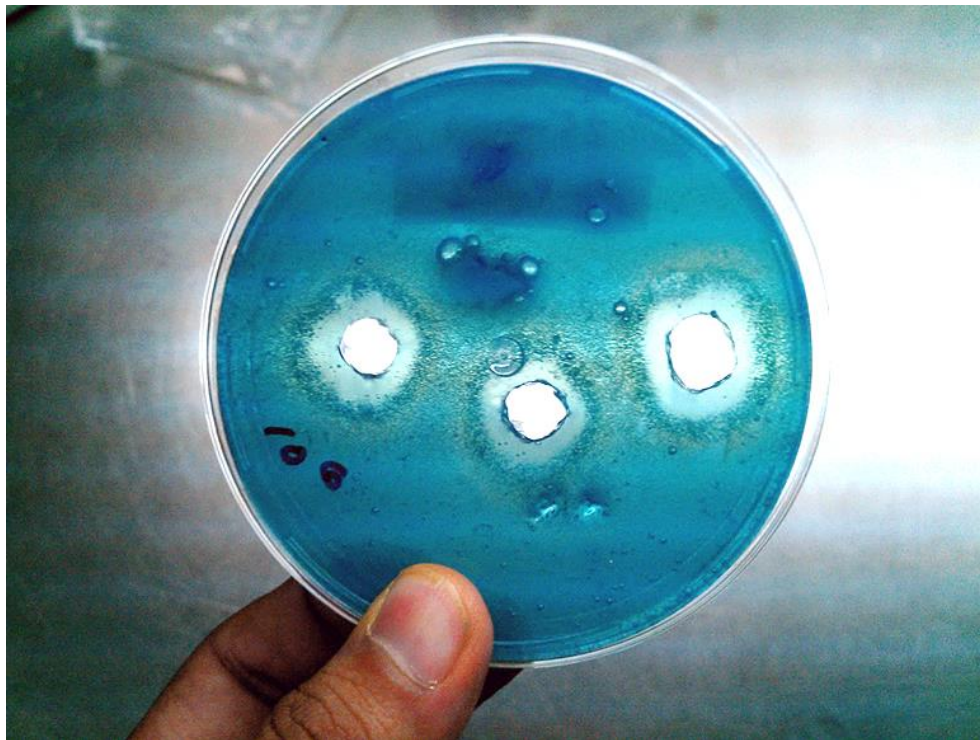


FIGURA 8. Actividad *killer* de la toxina cruda (cepa K4).

Tras someter la toxina a la separación mediante una columna de sefarosa, se identificaron las fracciones colectadas con la mayor concentración proteica, mediante lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 280 nm (figura 9). A partir de los datos obtenidos, se realizó un ensayo de actividad antifúngica en placa de 96 pocillos, empleando las fracciones con la mayor concentración proteica de acuerdo a las lecturas obtenidas. En el ensayo, se incluyó un pocillo sin toxina como control de crecimiento de la levadura susceptible y otro pocillo con la toxina cruda sin separar, como control positivo de la toxina, realizando todos los ensayos por triplicado. Las condiciones del ensayo se muestran en la tabla 11.

TABLA 11. Condiciones del ensayo de actividad antifúngica en placa de 96 pocillos.

Componente	Control sin toxina (μL)	Control con toxina cruda (μL)	Fracción a evaluar (μL)
Caldo YEPD	124	124	124
Inóculo de levadura susceptible (1×10^5)	20	20	20
Toxina cruda		56	
Toxina fraccionada			56
Agua destilada	56		
Volumen total	200	200	200

Posterior a la incubación por 48 h a 25°C, el crecimiento de la levadura susceptible fue registrado por medio de la turbidez, obtenida a través de la absorbancia a 650 nm en un lector de placas de ELISA. Las lecturas indicaron que las fracciones 9, 10 y 17, exhibieron el mismo

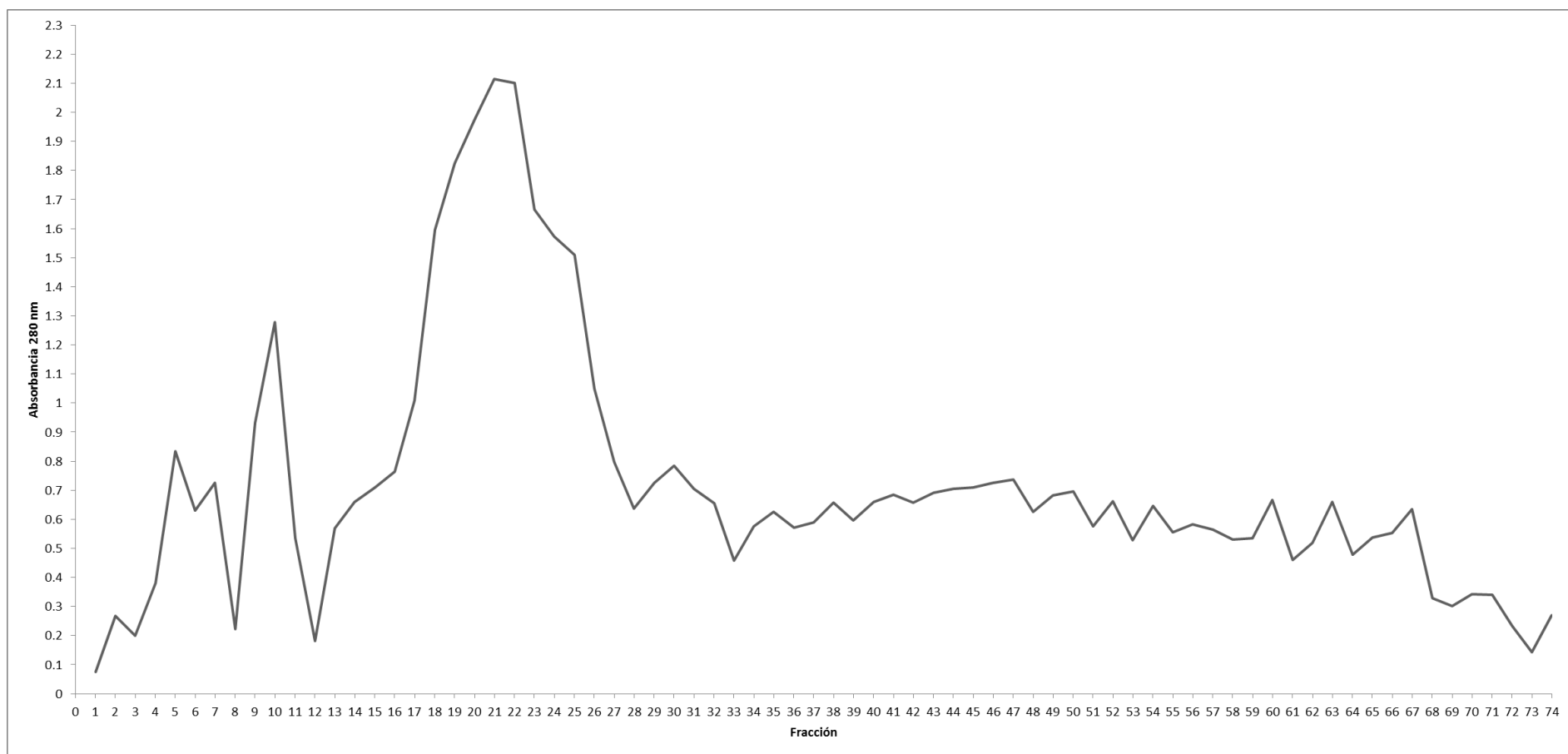


FIGURA 9. Perfil espectrofotométrico de las fracciones colectadas tras la separación de la toxina *killer* en la columna de sefarosa.

porcentaje de inhibición que el control con la toxina cruda, sugiriendo que en dichas fracciones se encontraba la toxina *killer* (tabla 12).

TABLA 12. Resultados del ensayo de actividad antifúngica de la toxina *killer* en placa de 96 pocillos.

Pocillo	ABS 650nm Promedio	Inhibición (%)
Inóculo sin toxina	0.220	0
Toxina cruda	0.088	60.061
Fracción 9	0.089	59.304
Fracción 10	0.089	59.304
Fracción 17	0.087	60.363
Fracción 18	0.265	-20.424
Fracción 19	0.301	-36.611
Fracción 20	0.308	-39.788
Fracción 21	0.180	18.306
Fracción 22	0.188	14.523
Fracción 23	*	*
Fracción 24	1.458	-561.725
Fracción 25	*	*
Fracción 26	*	*

* Turbidez superior al rango detectable

3.9 Determinación del peso molecular de la toxina *killer*

El gel revelado mostró una única banda de un peso aproximado de 20 kDa (figura 10). La ausencia de otras bandas en el gel, indica que las tres fracciones que mostraron inhibición de la levadura susceptible, contenían la misma proteína correspondiente a la toxina *killer*.

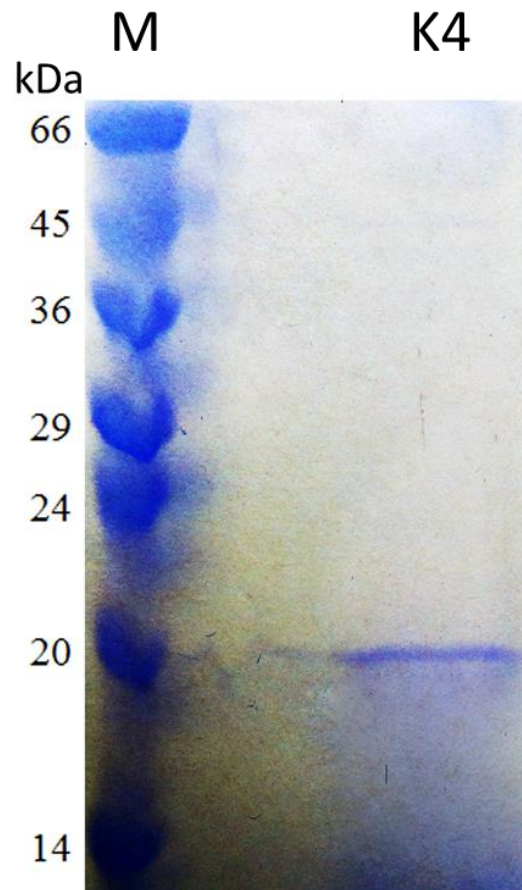


FIGURA 10. Gel de poliacrilamida. M: marcador de peso molecular; K4: toxina *killer* (fracciones activas).

DISCUSIÓN

Poco después del descubrimiento de las levaduras *killer* en *Saccharomyces cerevisiae*, se reportó la presencia de esta misma actividad en cepas de otros géneros diversos, tales como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, etc. (Schmitt & Breinig, 2002). Sin embargo, aunque ya se conocía que en el género *Candida* existía también el fenotipo *killer*, los datos sobre su ocurrencia y su distribución entre algunas de sus especies más prominentes, habían sido reportados inadecuadamente. A diferencia de Kandel y Stern (1979), quienes investigaron la actividad *killer* en 154 aislamientos de levaduras del género *Candida*, reportando una ocurrencia nula del fenómeno *killer*, los resultados generados en la presente investigación demuestran la presencia del fenómeno *killer* en el género, pues empleando la misma cepa susceptible (*S. cerevisiae* 5x47 = ATCC 38527) se encontraron 52 cepas *killer*, entre un total de 1,026 cepas de este género (5%), provenientes también de muestras clínicas. La principal diferencia entre ambos estudios, es el número de muestras (154 Vs. 1,026), lo que podría atribuir a la probabilidad, el hecho de la nula actividad encontrada. Sin embargo, en este estudio, la primera cepa *killer* correspondió al 80vo aislamiento analizado, lo que sugiere que en un panel de 154 cepas, sería probable encontrar al menos una cepa *killer*.

De acuerdo a los datos generados por el tamizaje realizado al inicio de esta investigación, las cepas de interés clínico más frecuentes: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, exhiben una ocurrencia del fenotipo *killer* del 2, 3, 17 y 4% respectivamente, cuando se agrupa a cada especie por separado. Se han publicado reportes sobre tamizajes realizados entre cepas de especies relacionadas entre sí, que exhiben la importancia de la relación entre las cepas analizadas, en la detección de la actividad *killer*. En uno de estos reportes, se encontró que el 98% de 63 cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* mostró actividad *killer* (Golubev & Churkina, 1990). En otro reporte, 35% de 62 cepas de *Pichia mebranifaciens* exhibió el fenotipo (Golubev & Blagodatskaya, 1993). Estos datos demuestran que las cepas *killer* son más activas frente a levaduras relacionadas a ellas, por lo que la marcada predominancia de cepas *killer* en *C. glabrata*, generó la posibilidad de un sesgo en la detección de levaduras *killer* debido a la mayor similitud genética de *S. cerevisiae* con *C. glabrata* que con el resto de las especies analizadas (Diezman *et al.*, 2004). Esta hipótesis fue puesta a prueba elaborando un panel compuesto por 35 cepas de diversas especies de *Candida*, seleccionadas del mismo cepario analizado originalmente, las cuales fueron evaluadas como posibles cepas susceptibles. Frente a este panel, se analizaron 500 cepas como posibles *killer*, generando de este modo un total de 17,500 combinaciones. Los resultados de este extensivo análisis no arrojó nuevas relaciones *killer*-susceptible, descartando de este modo algún sesgo y confirmando que *C. glabrata* exhibe la frecuencia más alta de actividad *killer*, en cepas de interés clínico, del *phylum* ascomycota.

De forma general, las toxinas *killer* son estables y actúan en un rango de pH limitado y ácido, con valores entre 2 y 5. Esto ha sido demostrado en *Cryptococcus humicola* (Golubev & Shabalin, 1994), *Pichia kluyveri* (Santos *et al.*, 2000), *Pichia inositovora*, *S. cerevisiae* (Bussey *et al.*, 1979), *Williopsis saturnus* (Guyard *et al.*, 2002), entre otras. Los ensayos para determinar la actividad de las toxinas *killer* secretadas por cepas del género *Candida*, demostró que estas se encuentran en la misma condición, con una actividad óptima en un pH de 4.5. El efecto de la adición de NaCl en la presencia de la actividad *killer*, fue demostrada a detalle por Llorente *et al.* (1997), quienes reportaron que la adición de sal favorecía y, en algunos casos, permitía identificar el fenotipo *killer* en levaduras que de otro modo se habrían reportado como no productoras de la toxina. Los autores reportan que la adición de hasta el 6% de sal intensifica el efecto de la toxina, mientras que los resultados de la presente investigación mostraron que la concentración óptima de sal corresponde al 2%. A pesar de estas diferencias, la importancia de la adición de NaCl en el medio en que se evaluará la actividad *killer*, fue corroborada en este estudio. Con respecto a la temperatura, se demostró una ligera discrepancia con respecto al rango de temperaturas recomendado para la acción de las toxinas *killer*, reportado de 15 – 20°C (Golubev, 1998), y el cual en el presente estudio fue de 25°C.

La identificación de las levaduras *killer* obtenidas de insectos, arrojó que la totalidad de los aislamientos correspondió a *C. guilliermondii*. Aunque el resto de las levaduras no fue identificado debido a no exhibir el fenotipo *killer*, la alta cantidad de cepas de esta especie contrasta con reportes del aislamiento de levaduras de insectos, en los cuales la mayoría de las

cepas corresponde a levaduras del *phylum* basidiomycota. En uno de estos reportes, se obtuvieron 64 aislamientos de levaduras recuperadas de hormigas cortadoras de hojas (*Atta* spp.), y de las cuales el número de levaduras del *phylum* basidiomycota fue casi cuatro veces mayor al de las del *phylum* ascomycota, de las cuales ninguna se identificó como *Candida guilliermondii* (Rodrigues *et al.*, 2009). La misma predominancia del *phylum* basidiomycota en levaduras obtenidas de insectos, fue reportada por Pagnocca *et al.* (2008), quienes las aislaron también de hormigas. Sin embargo, en 2009, Pimenta *et al.* reportaron comunidades de levaduras obtenidas en regiones boscosas en el sureste brasileño. De un total de 608 aislamientos colectados, más del 90% pertenecieron al *phylum* ascomycota y 68 cepas fueron identificadas como *Pichia guilliermondii*, estadio teleomorfo de *Candida guilliermondii*. Esto sugiere que no existe un consenso establecido entre la predominancia de levaduras en los nichos ecológicos y que naturalmente, la fuente del aislamiento es un factor de gran importancia en el resultado de la identificación, así como la metodología realizada para ello.

El empleo de los patrones de inhibición (biotipos) generados por levaduras *killer*, ha sido reportado en varias ocasiones como una herramienta reproducible para la identificación de cepas, principalmente dentro de complejos de especies (Coutinho & Paula, 1998; Provost *et al.*, 1995; Polonelli *et al.*, 1983; Fuentesfría *et al.*, 2007). Su aplicación en el análisis de la diversidad de levaduras de interés enológico ha sido empleado de forma independiente o en combinación con otras metodologías para aumentar su poder de resolución (Sangorrín *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2006). En el presente estudio, la evaluación de las relaciones *killer*-susceptible entre cepas del complejo *C. parapsilosis* no estableció ningún patrón que permitiera distinguir entre las especies que integran ese complejo (*C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. parapsilosis sensu*

stricto). Esto se debe a que, como se conoció en fases posteriores de la investigación, las toxinas producidas por estas cepas pertenecen al mismo tipo, de acuerdo a sus características y a las pruebas de inmunidad cruzada realizadas. Para superar este obstáculo, es necesario un panel de levaduras *killer* con una mayor diversidad de tipos de toxinas, que garanticen una mayor diversidad de toxinas. Las diferencias observadas en la ocurrencia del fenotipo *killer* así como en la susceptibilidad a *killer* en el complejo *C. parapsilosis* sugirió, sin embargo, que existe variación en la fisiología y en la composición de la pared celular de estas levaduras, lo cual puede ser explotado para el establecimiento de una diferenciación por biotipos mediante el sistema *killer*. El panel de levaduras *killer*, más que diverso, debe contener la combinación adecuada de levaduras, pues conjuntos diversos de especies de levaduras han sido evaluados previamente para la diferenciación de especies sin éxito (Ottonelli *et al.*, 2013; Scheid *et al.*, 2010). Adicionalmente, es importante considerar las diferencias fundamentales entre los conceptos de resistencia e inmunidad, pues pasadas por alto, podrían volver poco reproducible un esquema de biotipificación. Dado su mecanismo de acción, el fenómeno de insensibilidad a las toxinas *killer* generalmente ocurre al nivel de la pared celular. De este modo, las levaduras resistentes carecen de los receptores necesarios para la formación del enlace con la toxina y por lo tanto para la acción misma de ésta (Marquina *et al.*, 2002; Golubev, 2006). Como resultado, si la composición química de la pared de las levaduras responde a una relación taxonómica, la resistencia causante de la insensibilidad a *killer* respondería a una relación taxonómica también (Golubev, 1998; Golubev, 2006). De acuerdo con esto, algunos cuantos estudios han mostrado que la efectividad de la toxina está relacionada de forma inversa a la afiliación filogenética, lo que sugiere que levaduras del *phylum* ascomycota serán insensibles a levaduras del *phylum* basidiomycota, y viceversa. Esto, si bien representa una lógica taxonómica coherente, no

representa una regla obligada, tal como lo muestra la inhibición de algunas levaduras del género *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, mostradas en este trabajo.

Las cepas que producen toxinas del mismo tipo, o lo suficientemente similares, exhiben un fenómeno de inmunidad cruzada (Golubev, 2006). Bajo esta premisa, todas las levaduras identificadas como *killer* en este estudio, producen una toxina del mismo tipo, como lo demuestra la insensibilidad entre ellas pero la capacidad de inhibir a la levadura *Lalvin*, usada como cepa *killer* de referencia. De este modo, es evidente que una levadura *killer* puede ser también susceptible, en un contexto distinto.

Entre sus potenciales aplicaciones, el empleo de las levaduras *killer* como herramientas de biocontrol en vegetales de importancia para el hombre, ha sido investigado ampliamente (Rosa *et al.*, 2010; de Souza *et al.*, 2009; Bleve *et al.*, 2006; Druvefors & Schnürer, 2005; Coelho *et al.*, 2009). Las cepas de *Candida guilliermondii* (anamorfo de *Pichia guilliermondii*) aisladas de insectos en el curso de esta investigación, inhibieron a la cepa de *S. cerevisiae* ATCC 26609 susceptible a *killer*, mostrando los signos característicos *i.e.* halo de inhibición y borde azul (figura 11). Al evaluar su antagonismo frente a hongos filamentosos, lograron inhibir un grupo diverso de contaminantes de vegetales en poscosecha. Las levaduras mostraron patrones irregulares de inhibición, lo que sugiere que el efecto antagonista no depende de forma exclusiva del factor *killer*. Para confirmar la presencia del factor antagonista secretado por la levadura, se probó el efecto de su toxina cruda frente a la levadura susceptible a *killer*, mediante difusión en pocillo. Como controles se empleó la misma cepa inoculada y la cepa K4 (*C.*

glabrata) también inoculada (figura 12). Los resultados muestran que a pesar de que la levadura muestre los signos de inhibición relacionados con la actividad *killer* el extracto proteico no presentó ninguna inhibición. Esto sugiere que el antagonismo puede estar mediado por otros factores, tales como la competencia por espacio y nutrientes o la depredación (Golubev, 2006). La ausencia de actividad *killer* en esta cepa, fue posteriormente confirmada por el Dr. Jeremy Bruenn (Universidad de Buffalo, NY, comunicación personal) en una prueba independiente sin el conocimiento previo de nuestros resultados (figura 13). Estos resultados ilustran la existencia de estrategias de antagonismo adicionales a la secreción de toxinas *killer*, así como la necesidad de confirmar la actividad *killer* en extractos libres de células, con la finalidad de evitar categorizar como *killer* cualquier otra actividad antagonista.

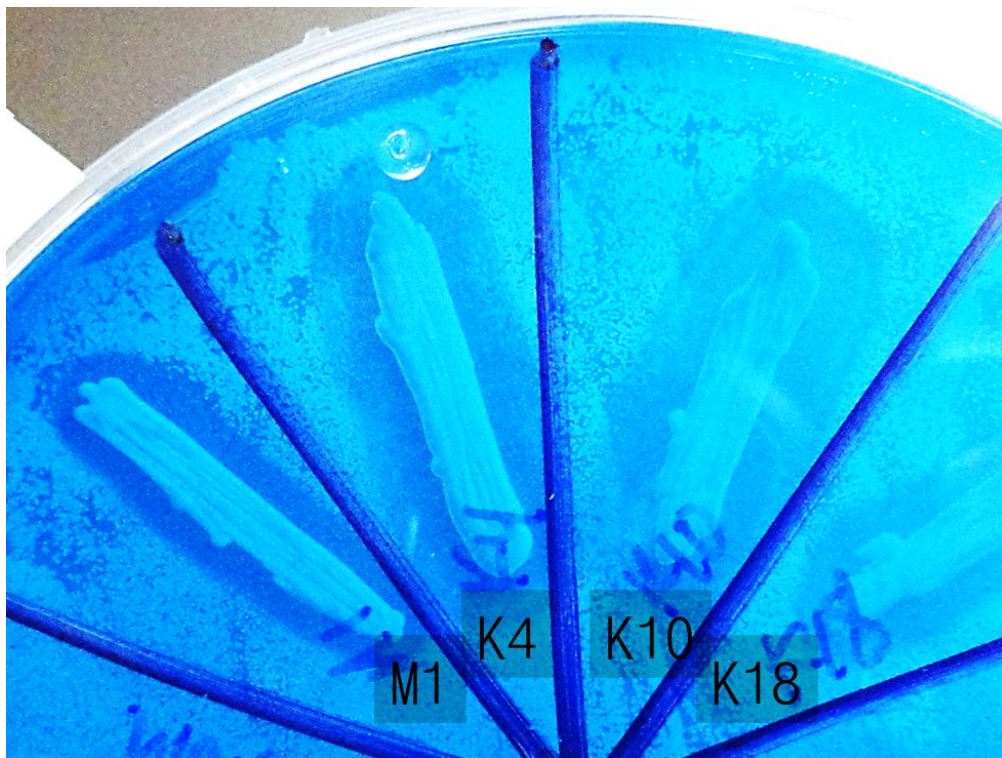


FIGURA 11 Actividad inhibitoria de M1 (*C. guilliermondii*).

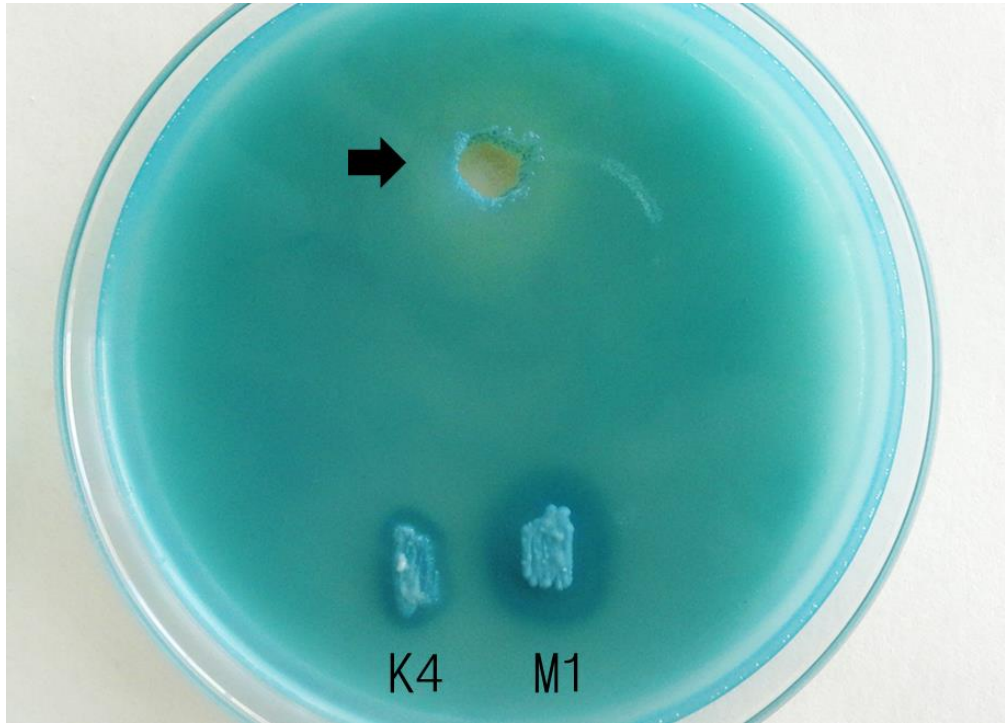


FIGURA 12. Ausencia de inhibición por el extracto proteico (flecha) de M1 (*C. guilliermondii*).

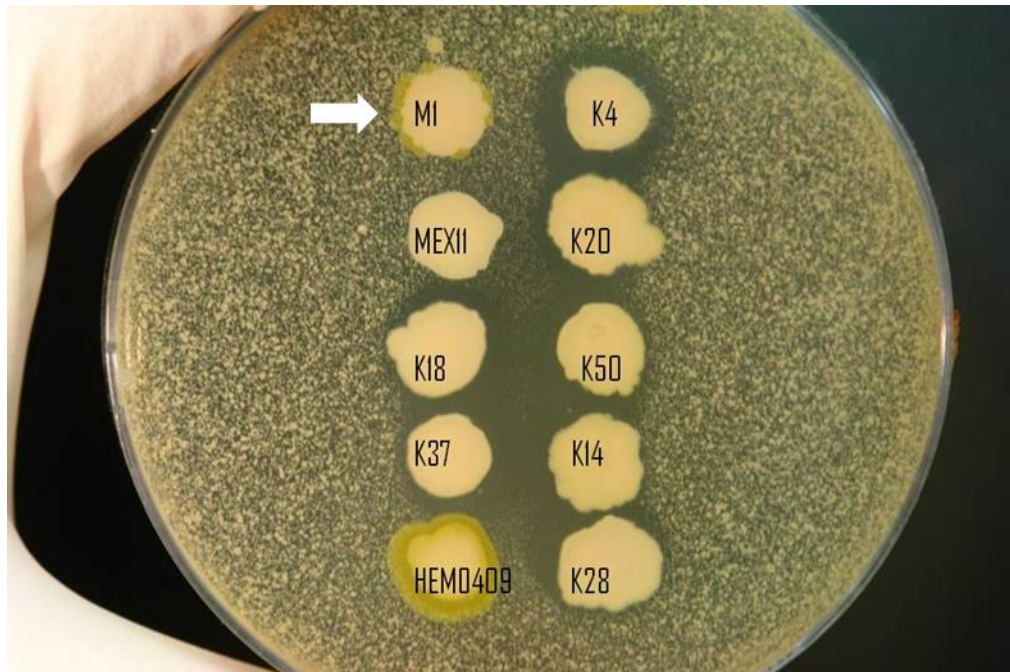


FIGURA 13. Ausencia de inhibición por la levadura M1 (Bruenn, 2013; comunicación personal).

El tamaño molecular de las toxinas *killer* ha sido reportado en un rango variable (tabla 13). Sin embargo, la mayoría de las toxinas se encuentran en el rango de 10 – 20 kDa (Young, 1987; Magliani *et al.*, 1997, Golubev *et al.*, 2002; Golubev *et al.*, 2003; Marquina *et al.*, 2002; Schmitt & Breinig, 2002; Buzzini *et al.*, 2004; Golubev, 2006)

TABLA 13. Tamaño molecular de las toxinas *killer**

Especie	Cepa	Tamaño (kDa)
<i>Cryptococcus humicola</i>		<1
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	VKM Y-2897	>15
<i>Debaryomyces robertsiae</i>	CBS6693	>100
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CYC 1021	23
<i>Debaryomyces hansenii</i>		23
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	470	18
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		18
<i>Kluyveromyces phaffii</i>	DBVPG 6076	33
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		42
<i>Kluyveromyces lactis</i>	AWJ137	156
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NCYC 587	42
<i>Kluyveromyces waltii</i>	IFO 16667	>10
<i>Pichia acaciae</i>	NRRL Y-18665	187
<i>Pichia anomala</i>	QC 65	83
<i>Pichia farinosa</i>	KK1	14
<i>Pichia inositovora</i>	NRRL Y-18709	>100
<i>Pichia kluyveri</i>	1002	19
<i>Pichia membranifaciens</i>	CYC 1106	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KL88	19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCYC 713	21.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 8112	21
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	111	20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	115	75
<i>Schwannyomyces occidentalis</i>	ATCC 44252	12.3
<i>Tilletiopsis albenscens</i>		10
<i>Trichosporon pullulans</i>	VKM Y-2303	>15
<i>Williopsis californica</i>	DSM 12865	34
<i>Williopsis mrakii</i>	IFO 0895	10.7
<i>Williopsis mrakii</i>	NCYC 500	1.8 – 5.0
<i>Williopsis saturnus</i>	DBVPG 4561	62
<i>Williopsis saturnus</i>	IFO 0117	9.5
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	412	10

* Sólo se muestran levaduras para las cuales se ha evaluado el tamaño molecular de su toxina *killer*.

Los resultados obtenidos para la determinación del tamaño molecular de las toxinas *killer* de las cepas de *Candida* spp. analizadas en esta investigación, confirman que éste género no es la excepción en relación a esta variable. Aunque la presencia de la actividad *killer* en este género ya se conocía previamente (Rogers & Bevan, 1978), su ocurrencia entre las especies así como las características fisicoquímicas y su tamaño molecular no habían sido confirmadas. Estas características no son estáticas para el género *Candida*, tal como lo demostró Arroyo-Helguera *et al.* (2012), sin embargo la dimensión de este estudio permitió generar información estadística importante que sirva de referencia para estudios posteriores en el tema de la fisiología de las levaduras.

CONCLUSIÓN

Los resultados de la presente investigación confirman la presencia del fenotipo killer en levaduras de origen clínico, del género *Candida*, con una incidencia del 5%. La incapacidad de las cepas killer de diversas especies del género, de inhibirse entre sí, sugiere que sus toxinas pertenecen al mismo tipo, sin embargo, la especie donde este fenotipo se exhibe con mayor frecuencia es *C. glabrata*, la cual representa el 54% del total de cepas killer obtenidas y cuya frecuencia es estadísticamente mayor al resto de las especies identificadas. La distribución del fenotipo killer varía en cepas del complejo *C. parapsilosis*, las cuales presentaron el fenotipo en frecuencias del 10, 0 y 100%, para *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* respectivamente. Debido a la similitud de sus toxinas, no fue posible generar un panel de levaduras killer de este género, capaz de discriminar entre las especies de este complejo.

Las toxinas killer producidas por estas cepas, actúa de manera óptima a un pH de 4.5 y una temperatura de 20°C; su actividad se ve favorecida por la presencia de NaCl al 2%, pero disminuye si esta concentración aumenta. La proteína activa mostró tener un tamaño aproximado de 20 kDa.

LIERATURA CITADA

Arroyo-Helguera O, de las Penas A, Castaño I. 2012. Occurrence of killer *Candida glabrata* clinical isolates. Braz J Microbiol. 880:887.

Baeza ME, Sanhueza MA, Cifuentes VH. 2008. Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. Biol Res. 41: 173-182.

Bajaj BK, Raina S, Singh S. 2012. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY 55 with idiosyncratic antibacterial activity. J Basic Microbiol. 52: 1-11.

Bevan EA, Makower M. 1963. The physiological basis of the *killer*-character in yeast. In Genetics Today, XIth International Congress of Genetics Vol. 1 ed. Geerts, S. J. 202-203 Pergamon Press, Oxford.

Bevan EA, Herring AJ, Mitchell DJ. 1973. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the “*killer*” character. Nature (London) 245:81-86.

Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A, Visconti A. 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. Food Microbiol. 108: 204-209.

Bruenn, J. A. 1980. Virus-like particles of yeast. Annu Rev Microbiol. 34, 49-68.

Buck, K. W. 1986. Fungal Virology CRC Press, Boca Ratón.

Bussey H, Saville D, Hutchins K, Palfree RGE. 1979. Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 140: 888-892.

Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, Buratta M & Martini A. 2004. Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG4561 against emerging pathogenic yeasts. FEMS Microbiol Lett. 238:359–365.

Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci M Jr, Bueno OC, Hebling MJA, Middelhoven WJ. 2002. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. Folia Microbiol. 47:259–262.

Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci M Jr, Lachance MA, Bueno OC, Hebling MJA, Ruivo CCC, Rosa CA. 2004. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. Int J Syst Evol Microbiol. 54: 1891–1894.

Cenci E, Mencacci A, Spreca A, Montagnoli C, Bacci A, Perruccio K, Velardi A, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Romani L. 2002. Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. Infection and Immunity. 70(5): 2375-2382.

Coelho AR, Tachi M, Pagnocca FC, Andrade GM, Hoffmann FL, Harada K, Hirooka EY. 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 26(1): 73-81.

Comitini F, Mannazzu I, Ciani M. 2009. *Tetrapisispora phaffi* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. Microb Cell Fact. 8:55.

Coutinho SD, Paula CR. 1998. Biotyping of *Malassezia pachydermatis* strains using the killer system. Rev Iberoam Micol. 15:85-87.

Csoma H, Zakany N, Capece A, Romano P, Sipiczki M. 2010. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. Int J Food Microbiol. 140: 239-248.

Currie CR, Mueller UG, Malloch D. 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. Proc Natl Acad Sci USA. 96:7998–8002.

Diezmann S, Coz CJ, Schönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG. 2004. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. J Clin Microbiol. 42(12): 5624-5635.

Dignard D, Witeway M, Germain D, Tessier D, Thomas DY. 1991. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. Mol. Gen. Genet. 227, 127-136.

Druvefors UA, Schnürer J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. FEMS Yeast Res. 373-378.

Fernández M, Mendoza LM, Raya RR, Farías ME. 2011. Killer phenotype of indigenous yeasts isolated from Argentinian wine cellars and their potential starter cultures for winemaking. Biotechnol Lett. 33: 2177-2183.

Fuentefria AM, Faganello J, Pazzini F, Schrank A, Valente P, Vainstein M. 2007. Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts. Med Mycol. 45: 503-512.

Fuentefria AM, Perez LRR, d'Azevedo PA, Pazzini F, Schrank A, Vainstein MH, Valente P. 2008. Typing of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains by a selected panel of Brazilian killer yeasts. J Basic Microbiol. 48: 25-30.

Fukuhara H. 1995. Linear plasmids of yeasts. FEMS Microbiol. Lett. 131(1):1-9.

Gadanho M, Libkind D, Sampaio JP. 2006. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian pyrite belt. Microb Ecol. 52:552–563.

Ganter PF, Starmer WT. 1992. Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. Ecology. 73(1) 54-67.

Ganter PF. 2006. Yeasts and invertebrates associations. In: Rosa CA, Peter G (eds) The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer Verlag, Berlin, pp 263–301.

Golubev W, Shabalina Y. 1994. Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. FEMS Microbiol Lett. 119:105-110.

Golubev WI, Blagodatskaya VM. 1993. Taxonomic heterogeneity of *Pichia membranaefaciens* Hansen revealed by killer-sensitive reactions. Mikrobiologiya 62, 291-299.

Golubev WI, Pfeifer I, Golubeva E. 2002. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. FEMS Microbiol Ecol. 40:151–157

Golubev WI, Pfeiffer I, Churkina LG, Golubeva EW. 2003. Double-stranded RNA viruses in a mycocinogenic strain of *Cystofilobasidium infirmominiatum*. FEMS Yeast Res. 3:63–68

Golubev WI. 1998. Mycocins (killer toxins). The Yeasts. A Taxonomic Study (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 55-62. Academic Press, London, UK.

Golubev WI. 2006. Antagonistic interactions among yeasts. The yeast handbook. Biodiversity and Ecophysiology of yeasts (Rosa CA & Peter G, eds), pp. 197-219. Springer, Berlin, Germany.

Golubev WI, Churkina LG. 1990. High incidence of killer strains in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorgensen) Harrison. Izv. Akad. Nauk. 6: 854-861.

Gunge N, Kitada K. 1988. Replication and maintenance of the *Kluyveromyces* linear pGKL plasmids. Eur J Epidemiol. 4(4):409-414.

Gunge N, Tamaru A, Ozawa F, Sakaguchi K. 1981. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated *killer* character. J Bacteriol. 145 (1): 382-390.

Guyard C, Séguy N, Cailliez JC, Drobecq H, Polonelli L, Dei-Cas E, Mercenier A, Menozzi FD. 2002. Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad spectrum antimicrobial activity. J Antimicrob Chemother. 49: 961-971.

Hanes SD, Burn VE, Sturley SL, Tipper DJ, Bostian KA. 1986. Expression of a cDNA derived from the yeast *killer* preprotoxin gene: implications for processing and immunity. Proc Natl Acad Sci USA. 83, 1675-1679.

Hawksworth DL. 2001. The Magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycol Res. 105:1422-1432.

Hernández A, Martín A, Córdoba MG, Benito MJ, Aranda E, Pérez-Nevado F. 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. Int J Food Microbiol. 121: 178-188.

Herring AJ, Bevan EA. 1974. Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in *killer* and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Virol. 22:387-394.

Hutchins K, Bussey H. 1983. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 → 6) β-d-Glucan. J Bacteriol. 154: 161-169.

Izgü F, Altinbay D. 2004. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo-β-1,3-glucanase. Biosci Biotechnol Biochem. 68:685–693.

Jablonowski D, Schaffrath R. 2007. Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. Biochemical Society Transactions. 35(6): 1533-1537.

Kandel JS, Stern TA. 1979. Killer phenomenon in pathogenic yeast. Antimicrob. Agents Chemother. 15(4): 568-571.

Kurtzman CP, Fell JW. 1998. The yeasts: a taxonomic study, 4th edn. Elsevier Science.

Kurtzman CP, Fell JW. 2006. The yeasts: a taxonomic study, 5th edn. Elsevier Science.

Liu S, Tsao M. 2009. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. Int J Food Microbiol. 131: 280-282.

Llorente P, Marquina D, Santos A, Peinado JM, Spencer-Martinis I. 1997. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. App Env Microbiol. 63(3): 1165-1167.

Lopes CA, Lavallo TL, Querol A, Caballero AC. 2006. Combined use of *killer* biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. Antonie van Leeuwenhoek. 89:147-156.

Magliani W, Conti S, Salati A, Arseni S, Frazzi R, Ravaneetti L, Polonelli L. 2002. New strategies for treatment of *Candida* vaginal infections.

Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. 1997. Yeast *killer* systems. Clin. Microbiol. Rev. 10: 369-400.

Maqueda M, Zamora E, Álvarez ML, Ramírez M. 2011. Characterization, ecological distribution and population dynamics of *Saccharomyces sensu stricto* killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of southwest Spain. Appl Environ Microbiol. 78(3): 735-743.

Marquina S, Santos A, Peinado JM. 2002. Biology of killer yeasts. Int Microbiol. 5: 65-71.

Middelhoven WJ, Fonseca A, Carreiro SC, Pagnocca FC, Bueno OC. 2003. *Cryptococcus hagerorum*, sp. nov., ananamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. Antonie Van Leeuwenhoek. 83: 167–174.

Mueller UG, Rabeling C. 2008. A breakthrough innovation in animal evolution. Proc Natl Acad Sci USA. 105:5287–5288.

Nguyen NH, Suh SO, Marshall CJ, Blackwell M. 2006. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. Mycol Res. 110:1232–1241.

Otonelli CD, Heidrich D, Medeiros J, Jamono F, Fontes M, Valente P, Scroferneker ML. 2013. Susceptibility of species within the *Sporothrix schenckii* complex to a panel of killer yeasts. J Basic Microbiol. 00: 1-7.

Pagnocca FC, Rodriguez AR, Nagamoto NS, Bacci Jr M. 2008. Yeast and filamentous fungi carried in the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 94: 517-526.

Peng Y, Chi Z, Wang X, Li J. 2009. B-1,3-Glucanase inhibits activity of the *killer* toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Mar. Biotechnol*.

Pérez F, Ramírez M, Regodón JA. 2001. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 79: 393-399.

Pimenta RS, Alver PDD, Almeida GMF, Silva JFM, Morais PB, Correa Jr A, Rosa CA. 2009. Yeast communities in two atlantic rain forest fragments in southeast brazil. *Braz J Microbiol*. 40:90-95.

Polonelli L, Castagnola M, Rossetti DV, Morace G. 1985. Use of killer toxins for computer-aided differentiation of *Candida albicans* strains. *Mycopathologia* 91: 175–179.

Polonelli L, Lorenzini R, De Bernardis F, Morace G. 1986. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia*. 96(2): 103-107.

Polonelli L, Morace G, 1988. Yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Clin Microbiol*. 26(3): 602-604.

Polonelli L, Conti S, Campani L, Gerloni M, Morace G, Chezzi C. 1991. Differential toxinogenesis in the genus *Pichia* detected by an anti-yeast *killer* toxin monoclonal antibody. *Antonie van Leeuwenhoek*. 59(3):139-145.

Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. 1983. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J. Clin. Microbiol*. 17:774-780.

Polonelli, L, Dettori G, Cattell C, Morace G. 1987. Biotyping of mycelial fungus cultures by the killer system. *Eur. J. Epidemiol.* 3:237-242.

Polonelli, L, Morace G. 1983. Yeast nosocomial infections. *Ig. Mod.* 79:315-334.

Provost F, Polonelli L, Conti S, Fisicaro P, Gerloni M, Boiron P. 1995. Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol.* 33(1): 8-10.

Rodrigues A, Bacci M Jr, Muller UG, Ortiz A, Pagnocca FC. 2008. Microfungal “weeds” in the leaf cutter ant symbiosis. *Microb Ecol.* 56:604–614.

Rodrigues A, Pagnocca FC, Bacci M Jr, Hebling MJA, Bueno OC, Pfenning LH. 2005. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens* rubropilosa nests. *Folia Microbiol.* 50:421–425.

Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci Jr M, Pagnocca FC. 2009. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek.* 96:331-342.

Rodríguez-Cousiño N, Maqueda M, Ambrona J, Zamora E, Esteban R, Ramírez M. 2011. A new wine *saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *App Environ Microbiol.* 77(5): 1822-1832.

Rogers D, Bevan EA. 1978. Group classification of killer yeasts based on cross-reactions between strains of different species and origin. *J. Gen. Microbiol.* 105, 199-202.

Rosa MM, Tauk-Tornisielo SM, Rampazzo PE, Ceccato-Antonini SR. 2010. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 1491-1502.

Sangorrin M, Zajonskovsky I, van Brook M, Caballero A. 2002. The use of killer biotyping in an ecological survey of yeast in an old Patagonian winery. World J Microbiol Biotechnol. 18:115-120.

Sangorrín M, Lopez CA, Jofré V, Querol A, Caballero AC. 2008. Spoilage yeasts from Patagonian cellars: characterization and potential biocontrol based on *killer* interactions. World J. Microbiol. Biotechnol. 24:945-953.

Santos A, Marquina D, Leal JA, Peinado JM. 2000. (1→6) β-d-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. Appl Environ Microbiol. 66: 1809-1813.

Santos A, Marquina D, Leal JA, Peinado JM. 2000. (1-6)-β-d-Glucan as cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. Lett Appl Microbiol. 34: 95-99.

Santos A, Marquina D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. Microbiology. 150: 2527-2534.

Santos A, Sánchez A, Marquina D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. Microbiol Res. 159: 331-338.

Scheid L, Nunes DA, Heins-Vaccari EM, Santurio JM, Alves SH. 2010. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* with the use of killer toxins. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 52(3): 161-162.

Schmitt M, Radler F. 1988. Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 170: 2192-2196.

Schmitt MJ. 1995. Cloning and expression of a cDNA copy of the viral k28 *killer* toxin gene in yeast. Mol. Gen. Genet. 246, 236-246.

Schmitt MJ, Tipper DJ. 1990. K28, a unique double-stranded RNA *killer* virus of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10, 4807-4815.

Schmitt MJ, Breinig F. 2002. The viral *killer* system in yeast: from molecular biology to application. FEMS Microbiol. Rev. 26, 257-276.

Schründer J, Meinhardt F. 1995. An extranuclear expression system for analysis of cytoplasmic promoters of yeast linear *killer* plasmids. Plasmid. 33(2):139-151.

Schultz TR, Brady SG. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. Proc Natl Acad Sci USA. 105:5435–5440.

Stark MJ, Boyd A, Mileham AJ, Romanos MA. 1990. The plasmid-encoded *killer* system of *Kluyveromyces lactis*: a review. Yeast. 6(1):1-29.

Starmer WT, Ganter PF, Aberdeen V, Lachance MA, Phaff HJ. 1987. The ecological role of *killer* yeasts in natural communities of yeasts. Can. J. Microbiol. 33:783-796.

Suh S-O, Nguyen NH, Blackwell M. 2008. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 8: 88–102.

Vaughan-Martini A, Cardinali G, Martini A. 1996. Differential killer sensitivity as a tool for fingerprinting wine-yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J Industrial Microbiol. 17:124–127.

Walker GM, McLeod AH, Hodgson VJ. 1995. Interactions between *killer* yeasts and pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 127(3):213-222.

Wang X, Chi Z, Yue L, Li J. 2007. Purification and characterization of *killer* toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. Curr. Microbiol. 55:396-401.

Watanabe, T. 2010. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Taylor & Francis.

Wickner RB. 1992. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. Annu. Rev. Microbiol. 46, 347-375.

Young TW, Yagiu M. 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonie Van Leeuwenhoek. 44: 59-77.

Young TW. 1987. Killer yeasts. The Yeasts (Rose AH & Harrison JS, eds), pp. 131–164. Academic Press, London, UK.

RESUMEN CURRICULAR

Candidato para el Grado de:

Doctorado en Ciencias con Especialidad en Microbiología

EFECTO KILLER EN LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida* DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS Y AMBIENTALES

Campo de Estudio: Micología (Levaduras)

Lugar y Fecha de Nacimiento: Linares, N.L. el 23 de Enero de 1982.

Padres: José Alfonso Robledo Aguilar y Emma del Carmen Leal del Bosque.

Licenciatura: Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Maestría: Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología, Facultad de Ciencias
Biológicas, UANL.

Experiencia Profesional: Profesor Investigador, Facultad de Ciencias Biológicas. 2009 -

Organizaciones Profesionales: International Society for Human and Animal Mycoses; American
Society for Microbiology.

Publicaciones: 6