

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO EN MEDICINA



Título del Trabajo de Fin de Grado:

EL PULMÓN COMO HÁBITAT DE LEVADURAS LIPOFÍLICAS.

AUTOR: GILABERT NÚÑEZ, PABLO.

TUTORA: COLOM VALIENTE, M^a FRANCISCA

COTUTORA: FERRER RODRÍGUEZ, CONSUELO

Departamento y Área: Producción Vegetal y Microbiología. Microbiología.

Curso académico: 2021 - 2022.

Convocatoria: 25 de mayo de 2022.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN / ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
1. Diseño	9
2. Asilamientos de levaduras utilizados	9
3. Medios de cultivo empleados.....	10
4. Recuperación de cepas de levaduras.....	11
4.1 Levaduras del género <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> y miscelánea	11
4.2 Levaduras del género <i>Malassezia</i>	12
5. Técnicas de valoración de la lipofilia o lipodependencia en aislados de levaduras .	12
5.1. Medios lipídicos convencionales:	14
5.2. Medios lipídicos convencionales modificados:	14
5.3. Ensayo Nuevos Medios Lipídicos	15
RESULTADOS.....	18
1. Recuperación de cepas de levaduras.....	18
1.1. Levaduras de géneros no dependientes de lípidos (<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Naganishia</i> , <i>Rhodotrula</i> , <i>Trichosporon</i> y <i>Wickerhamomyces</i>).	18
1.2. Levaduras del género <i>Malassezia</i> .	18
2. Medios con Lípidos Convencionales Modificados.....	19
2.1 Nuevos Medios	19
2.2 Medio con y sin DPPC (NM2 y NM2').	20
3. Ensayo Nuevos Medios Lipídicos	21
3.1: Cultivo en placas multipocillo	21
3.2: Cultivo en medio sólido en profundidad y en superficie	22
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA.....	25
ANEXO	28

RESUMEN

Introducción. Hace más de una década se descubrió que la vía respiratoria baja tiene una microbiota propia que incluye numerosas especies de levaduras. En un estudio anterior del grupo con muestras de lavado broncoalveolar de pacientes no infecciosos, se detectó mediante secuenciación de alto rendimiento, una mayor proporción de levaduras del género *Malassezia*, especialmente *M. restricta* en el pulmón de pacientes con cáncer de pulmón, respecto a los que no presentaban esta patología. Sin embargo, no se pudo comprobar su viabilidad mediante cultivo, probablemente porque los medios utilizados no eran adecuados para su crecimiento.

Hipótesis y objetivo. Para el desarrollo *in vitro* de levaduras descritas como comensales y patógenos de la vía aérea baja, es necesario aportar lípidos similares a los presentes en el surfactante pulmonar.

Métodos. Para comprobar este hecho y conocer los factores que favorecen la presencia de *Malassezia restricta* en las vías respiratorias bajas, se han diseñado 17 nuevos medios de cultivo de diferente composición lipídica para el crecimiento de levaduras de especies lipofílicas y lipodependientes, algunos de los cuales contienen surfactante pulmonar o los lípidos presentes en este. Se evaluó el crecimiento en estos medios de 21 especies de levaduras descritas como microbiota y/o patógenos relacionados con la vía respiratoria.

Los resultados se compararon con los medios de cultivo convencionales concluyendo que los lípidos del surfactante pulmonar y en concreto el DPPC, favorecen el crecimiento *in vitro* de *Malassezia restricta* y otras especies de interés en patología humana.

Conclusión. Los lípidos del surfactante pulmonar condicionan la presencia y diversidad de la microbiota de las vías respiratorias bajas, especialmente de las especies del género *Malassezia*.

Palabras clave: levaduras lipofílicas, *Malassezia*, surfactante pulmonar, dipalmitoil-fosfatidilcolina, microbioma, cultivo.

ABSTRACT

More than a decade ago, it was discovered that the lower respiratory tract has its own microbiote, which includes several yeast species. In a previous study, bronchoalveolar lavage from non-infectious patients' samples were studied with high-throughput sequencing, and the results showed that there were more yeasts of the genus *Malassezia*, especially *Malassezia restricta*, in patients with lung cancer than in patients with other pathologies. Nevertheless, no *Malassezia* yeasts were isolated in culture media. This could be due to the fact that those culture media were not as specific as needed.

Hypothesis and objective. For the *in vitro* growth of commensal and pathogen yeasts of the lower respiratory tract, it is necessary to put similar lipids to pulmonary surfactant.

Methods: to check this and to know the factors that increase the presence of *Malassezia restricta* on the lower respiratory tract, 17 new culture media with different lipid composition were designed for the growth of lipophilic and lipodependent yeast species. Some of them have pulmonary surfactant or lipids from it in their composition. The growth of 21 commensal or pathogen yeast species from the respiratory tract was evaluated.

The results were compared with conventional culture media, concluding that the lipids of the pulmonary surfactant, and, specifically DPPC, are superior in terms of *Malassezia restricta* and other species growth.

Conclusion. The presence and diversity of the lower respiratory tract microbiote is due to the pulmonary surfactant lipids, especially, the species of the genus *Malassezia*.

Key words: lipophilic yeasts, *Malassezia*, pulmonary surfactant, dipalmitoylphosphatidylcholine, mycobiome, culture.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace una década, se creía que las vías respiratorias bajas eran un lugar estéril y por lo tanto, la presencia de cualquier microorganismo era signo de infección (1). Sin embargo, ahora sabemos que la vía aérea inferior es un ámbito con una microbiota propia y su estudio presenta un interés creciente. El cuerpo humano tiene un microbioma muy diverso que juega un papel relevante en la salud, realizando múltiples funciones para el mantenimiento de la homeostasis e inmunomodulación (2-5).

En un estudio publicado en 2020 por el grupo de investigación de micología médica de la UMH se estudiaron por secuenciación de alto rendimiento (HTS) y cultivo, muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de 79 sujetos adultos con cáncer y otras patologías del pulmón no infecciosas ni inflamatorias. Se trató de una aproximación al estudio del micobioma pulmonar (6). La secuenciación masiva mostró que, de las 6 unidades taxonómicas operacionales que constituyen el micobioma nuclear de las muestras (presente en más del 80% de los individuos), dos corresponden con levaduras lipofílicas como *Candida parapsilosis*, *Wickerhamomyces anomalus* y uno con levaduras lipodependientes como *Malassezia restricta*, que fue la más abundante y prevalente (6). La presencia de estas levaduras lipofílicas era además ligeramente más importante en el LBA de pacientes con cáncer que en el resto.

Para las dos primeras especies, se pudo demostrar que las células eran viables en las muestras pulmonares de LBA ya que se aislaron en el medio de Dixon modificado (medio rico en lípidos y estandarizado para el cultivo de levaduras lipofílicas). En el caso de *Malassezia restricta*, aun siendo la más prevalente en el estudio molecular, no se consiguió aislar en cultivo. Esto generó una discordancia entre los resultados del micobioma molecular y el micobioma cultivable que era importante clarificar como veremos más adelante.

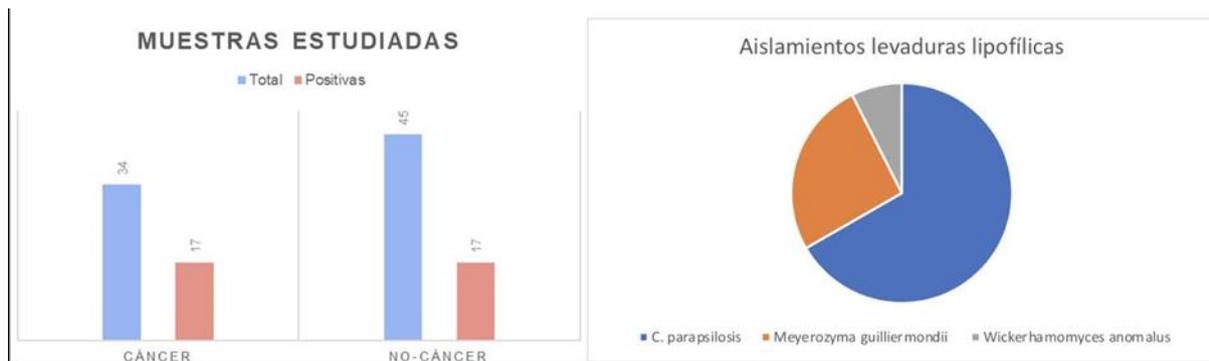


FIGURA 1: Izquierda: Comparación del número de aislamientos de levaduras lipofílicas entre pacientes con cáncer y pacientes con otras patologías. Derecha: especies lipofílicas aisladas

El género *Malassezia* pertenece a la clase Malasseziomycetes, que se ubica en el subfilo Ustilaginomycotina (filo Basidiomycota). Está compuesto por 17 especies de levaduras lipofílicas, que comúnmente se encuentran como comensales en la microbiota cutánea de mamíferos. Destacamos *Malassezia furfur*, *M. restricta*, *M. globosa*, *M. pachydermatis* y *M. sympodialis* por su presencia en el ser humano. *M. pachydermatis* suele estar más presente en animales y en el ser humano es transitoria (7). Un estudio del genoma de este género de levaduras demostró que presentan una pérdida de los genes que codifican para el complejo ácido graso sintasa, mientras que presentan un aumento de los genes relacionados con la degradación de lípidos y el metabolismo de hidratos de carbono como adaptación a vivir en la piel. Esta reorganización genómica impide que puedan sintetizar sus propios lípidos, limitándolas a depender de fuentes externas (7).

El medio de cultivo diseñado por Sabouraud (Caldo o Agar de Sabouraud), es un medio general para hongos en el cual las especies lipodependientes de *Malassezia* no son capaces de crecer, ya que solo contiene glucosa y peptona. Únicamente la especie *M. pachydermatis* es capaz de desarrollarse, utilizando la pequeña porción lipídica de la peptona, que no es suficiente para el desarrollo del resto de especies que consideramos lipodependientes (8). Además de la característica dependencia de los lípidos, las levaduras del género *Malassezia* son capaces de consumir L-DOPA y producir melanina a partir de ella (9-10), lo que se considera un importante mecanismo de virulencia para algunos hongos como *Cryptococcus* spp.

Pese a que *Malassezia* se comporta normalmente como comensal, también se ha descrito como patógeno en diversas enfermedades cutáneas y sistémicas, como la pitiriasis versicolor, la dermatitis atópica, la dermatitis seborreica, foliculitis, fungemia asociada a catéter, peritonitis y meningitis (11). Una revisión de los últimos años muestra que diversos estudios han demostrado que *Malassezia* tiene la capacidad de modular la respuesta inmunitaria, pudiendo ser este un papel clave en su transición de comensal a patógeno (11). Distintos grupos han puesto de manifiesto que esta levadura es capaz de activar la cascada del complemento, tanto por la vía clásica como por la alternativa (11).

Aunque la piel sea el nicho por excelencia de *Malassezia*, este hongo también se ha encontrado en otras partes del cuerpo, como son el sistema digestivo o el pulmón. La relación entre las levaduras de este género con el desarrollo de carcinomas está suponiendo una nueva línea de investigación en el ámbito de la oncogénesis. Actualmente existen estudios que relacionan la presencia de levaduras del género *Malassezia* con el desarrollo de carcinomas del sistema digestivo, con especial mención del cáncer de páncreas (12-13). Además, este hongo parece también estar involucrado en el desarrollo de carcinoma de cérvix uterino (14), e incluso se propone su relación con la carcinogénesis cutánea (15).

El cáncer de pulmón es el segundo cáncer más común y la primera causa de muerte oncológica en el mundo, registrándose 2,1 millones de nuevos casos y 1,8 millones de muertes en 2018 (16). Se asocia en un 80% de los casos a la exposición al tabaco. Otros agentes físicos y químicos se relacionan con su presencia. Sin embargo, existe un 15% de casos donde no se ha podido demostrar ninguna causalidad y se postula que el microbioma sea el inductor de estos procesos. La relación entre la presencia de *Malassezia restricta* y el cáncer de pulmón todavía no está descrita. La mayor parte de la superficie pulmonar está compuesta por alveolos, cuya pared está revestida por el surfactante pulmonar. El surfactante pulmonar es un líquido cuya función es disminuir la tensión superficial a nivel de la interfase líquido-aire que hay en el interior de los alveolos, evitando su colapso. Es producido por los neumocitos tipo II del epitelio alveolar, y comienza a producirse en el período embrionario

tardío, a partir de la semana 26 de gestación. Es por esto que en recién nacidos prematuros puede existir un déficit del mismo, produciéndose la patología llamada enfermedad de Membranas Hialinas o Síndrome de distrés respiratorio agudo tipo I, que consiste en colapso alveolar por aumento de la tensión superficial secundaria al déficit de surfactante pulmonar. (17-18)

El surfactante pulmonar está compuesto en más de un 70% por lípidos. El más abundante es: dipalmitoil-fosfatidil-colina (DPPC), que es un fosfolípido exclusivo del surfactante pulmonar.

Existe una patología en la que hay acúmulo de surfactante pulmonar en el espacio alveolar, la proteinosis alveolar. En esta patología existe una modificación de las condiciones del medio habitual de la microbiota pulmonar, y se asocia a un aumento en el riesgo de infecciones oportunistas por *Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium avium*, *Nocardia* y hongos mucorales. (19-21)

El hecho de que el medio en el que se desarrolla la microbiota pulmonar sea rico en lípidos que son exclusivos del pulmón, podría tener implicaciones en el desarrollo y selección de la microbiota de la vía aérea baja.

Este trabajo forma parte de la línea de investigación: "Microbioma respiratorio y su relación con el ambiente", en desarrollo en el laboratorio de Micología Médica de la UMH, en el que se ha realizado este TFG.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de mi trabajo es que los lípidos presentes en el surfactante de la vía aérea inferior condicionan la microbiota presente en este entorno en favor de la presencia de levaduras lipofílicas y lipodependientes, especialmente las del género *Malassezia*, que pueden tener relación con la oncogénesis en este órgano.

OBJETIVO PRIMARIO

Demostrar que los lípidos específicos del surfactante pulmonar favorecen más el crecimiento de las especies del género *Malassezia* que los lípidos de otros entornos, que son los utilizados en los medios de cultivo convencionales.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

Determinar la afinidad de las levaduras descritas como integrantes del microbioma pulmonar por los lípidos del surfactante, en contraste con otros lípidos de uso convencional en cultivo.

Diseñar nuevos medios de cultivo basados en los lípidos del surfactante pulmonar, para el aislamiento efectivo de levaduras lipofílicas comensales de pulmón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño

Este es un estudio de tipo experimental y prospectivo que se ha realizado en su totalidad en el laboratorio de Micología Médica de la UMH.

2. Aislamientos de levaduras

En la realización del estudio se han empleado 21 aislamientos de distintas especies de levaduras. Todas ellas procedentes de la Colección de Levaduras de Alicante (CLA) que se mantiene en el laboratorio de Micología Médica de la UMH, excepto *Malassezia restricta* (CBS 7877), que fue adquirida de la colección de cultivos tipo del CBS-KNAW (*Centraalbureau voor Schimmelcultures, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*. Utrecht. Países Bajos). Las cepas y el origen de los aislamientos se detallan en la tabla 1.

3. Medios de cultivo empleados.

En el desarrollo del trabajo se han utilizado 17 medios de cultivo diferentes. Su composición detallada se facilita en el anexo 1. Se emplearon medios comunes para el desarrollo de hongos y levaduras como el de Sabouraud con dextrosa en formulación sólida (Agar Dextrosa de Sabouraud -SDA) y líquida (Caldo Dextrosa de Sabouraud -SDB). El medio modificado de Dixon (DX) y el medio agar modificado de Leeming y Notman (MLNA), ambos para levaduras lipofílicas. Se diseñó un nuevo medio con L-Dopa y lípidos para facilitar la visualización de las colonias por la melanización de las mismas (DOPAME). Además, se modificó el MLNA con adición de DPPC (MNLA2) junto con el diseño de otros dos medios simples con DPPC (NM1 y NM2). Por último, se diseñó una serie de 11 medios más, que consistieron en una base común de nutrientes (Medio Base -MB) a la que se le adicionaron por separado 10 lípidos diferentes. Los lípidos testados fueron los componentes descritos para los medios de Dixon y MLNA, además de extracto de surfactante de cerdo (Curosurf® Laboratorios Chiesi) y fosfolípido dipalmitoil-fosfatidil-colina (DPPC) purificado (Sigma-Aldrich).

TABLA 1: Cepas de levaduras utilizadas en los estudios. Número que corresponde en los experimentos con la especie, código de identificación y origen del aislamiento.

Número	Especie	ID CEPA	ORIGEN
1	<i>Candida lusitaniae</i>	CLA19	Heces de cacatúa
2	<i>Candida glabrata</i>	PE001PS	Prótesis dental
3	<i>Candida albicans</i>	PE003B	Cavidad bucal
4	<i>Candida auris</i>	CLA40	Aislamiento Nosocomial
5	<i>Candida parapsilosis</i>	20LM2	LBA humano
6	<i>Candida krusei</i>	CLA14	Raíz de ficus
7	<i>Candida guilliermondii</i>	10LM1	LBA humano
8	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CCA494	LCR humano
9	<i>Cryptococcus deneoformans</i>	CCA420	hemocultivo humano
10	<i>Cryptococcus gattii</i>	CCA321	hisopado corteza árbol
11	<i>Cryptococcus tetragatti</i>	CCA436	hisopado corteza árbol
12	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	CCA512	LCR humano
13	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	CCA524	lesión pico loro gris
14	<i>Naganishia albida</i>	CCA391	hisopado corteza árbol
15	<i>Trichosporon cutaneum</i>	CLA31	Clínica humana
16	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	56MAL12	polvo doméstico
17	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	24MALM2	polvo doméstico
18	<i>Malassezia restricta 1</i>	CBS7877 (1)	colección CBS
19	<i>Malassezia restricta 2</i>	CBS7877 (2)	
20	<i>Malassezia anuralokei</i>	CLA42	CAE humano
21	<i>Malassezia pachydermatis</i>	CLA43	Otitis perro

4. Recuperación de cepas de levaduras

4.1 Levaduras de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y miscelánea

Las cepas conservadas en agua a 4°C y/o en leche desnatada a -80°C se recuperaron mediante su siembra en el medio de cultivo estándar para levaduras, agar Sabouraud (SDA). Una vez que se obtenía crecimiento, se comprobó que la morfología macroscópica de las colonias coincide con la morfología típica de cada microorganismo, y que las características microscópicas corresponden con el microorganismo a estudiar, mediante la visualización al microscopio óptico con azul de lactofenol, verificando también la ausencia de posibles

contaminantes. Tras esto, se guardan una o dos colonias en agua destilada estéril en un microtubo y se almacenan a 4°C.

4.2 Cepas de *Malassezia*

Las cepas de *Malassezia spp.* se sembraron en MLNA en tubo inclinado en la campana de bioseguridad 2 con flujo de aire laminar para minimizar el riesgo de contaminación. Tras esto, se conservaron a 30°C. Periódicamente se comprobó su viabilidad y se realizaron nuevos aislamientos para mantener los cultivos activos, especialmente el de *M. restricta*, que es la más compleja de mantener viva.

5. Técnicas de valoración de la lipofilia o lipodependencia en aislados de levaduras

Para comprobar la lipofilia o lipodependencia de las especies utilizadas, se han sembrado en medios con lípidos convencionales (Dixon y MLNA), medios lipídicos convencionales modificados y nuevos medios de cultivo con diferentes lípidos.

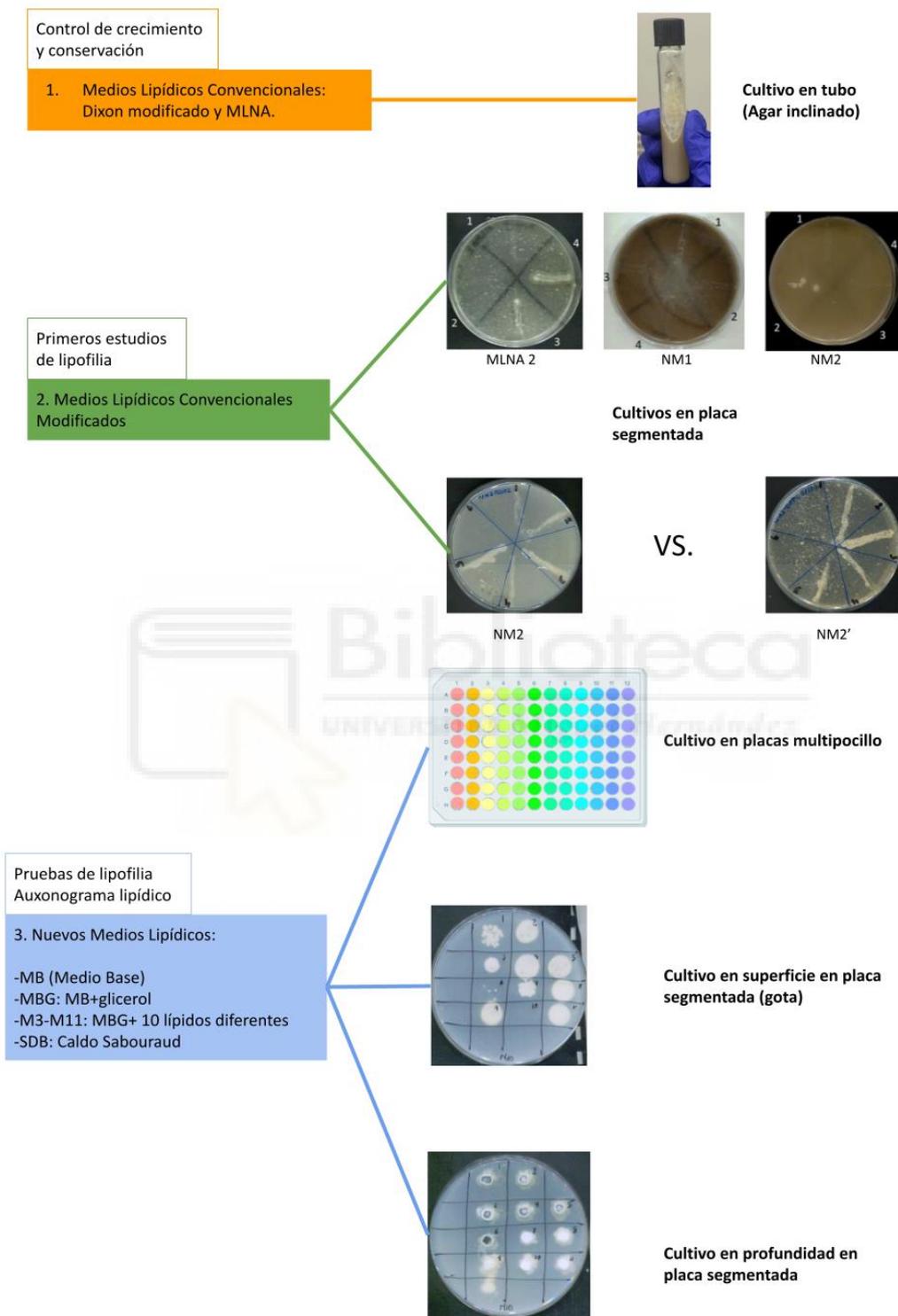


FIGURA 2: Esquema de los 3 tipos de ensayo realizados con diferentes medios de cultivo con lípidos.

5.1. Medios lipídicos convencionales:

Todas las levaduras seleccionadas para estudio se cultivaron en los medios de Agar de Dixon modificado (Dixon) y Agar Modificado de Leeming y Notman (MLNA).

5.2. Medios lipídicos convencionales modificados:

5.2.1. Medios suplementados con DPPC: MNLA2, NM1 y NM2.

En este experimento se utilizaron las 3 especies de *Malassezia*: 2 cepas de *Malassezia restricta*, *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia arunalokei*. Se crearon 2 nuevos medios de cultivo a partir de un medio base con componentes de MLNA, sustituyendo en cada uno un lípido diferente por DPPC (ver anexo 1). Fueron: Nuevo Medio 1 (NM1), donde el glicerol monoesterarato se sustituyó por DPPC, y Nuevo medio 2 (NM2) donde el Tween 60 se sustituyó por DPPC. Se creó un tercer medio, MLNA2, añadiendo DPPC al MLNA sin sustituir componentes.

Para la realización, se preparó una placa de cultivo con cada uno de los medios y se dividió en 4 partes, inoculando en cada sección una cepa de *Malassezia*. Se incubaron a 30°C y se realizaron lecturas diarias del crecimiento de las placas hasta completar 21 días.

5.2.2. Crecimiento con y sin DPPC.

Se utilizó también el medio de cultivo NM2 sin DPPC ni Tween 60 (NM2') y se comparó el crecimiento de las levaduras en dicho medio y NM2. En este experimento, se utilizaron las 17 cepas del apartado 2 y las 4 cepas del género *Malassezia* del experimento anterior. El procedimiento fue similar al anterior dividiendo las placas de cultivo en 6-7 partes inoculando en cada sección una cepa. Se sembraron las 21 especies en cada uno de los medios. Se revisaron diariamente (Figura 3).

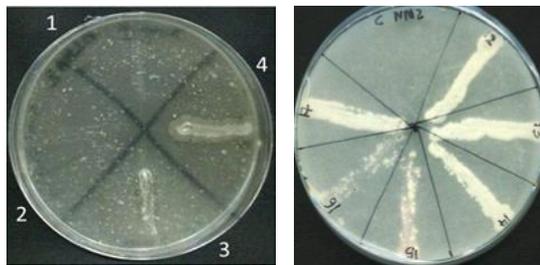


Figura 3. Modelo de inoculación de las cepas de levaduras en los medios de cultivo ensayados

5.3. Ensayo Nuevos Medios Lipídicos

En este experimento se utilizaron las 21 cepas del experimento anterior. Se prepararon inóculos equivalentes en carga microbiana a partir de las 21 especies, ajustándolo mediante recuento en cámara de Neubauer, y según la escala McFarland, basada en turbidez. El inóculo fue de aproximadamente 100 células/mL del cultivo.

Se crearon 11 nuevos medios de cultivo con una base común de nutrientes (MBG) a la que se le adicionaron por separado 10 lípidos diferentes (anexo 1) y se testaron todas las cepas mediante tres modelos experimentales: en medio líquido en placa multipocillo, en medio sólido inoculado en superficie y en medio sólido inoculado en profundidad.

5.3.1. Ensayo en placa multipocillo,

Se utilizaron placas de 96 pocillos con 150 μ L de un medio distinto en cada una de las 12 columnas de la placa. Se inocularon con 50 μ L de suspensión de células, siendo una cepa distinta en cada fila (figura 4). Se utilizaron 3 placas par testar todas las cepas: la placa 1 contiene levaduras del género *Candida* y especies próximas, la placa 2 levaduras del género *Cryptococcus* y *Naganishia*, y la placa 3 contiene cuatro levaduras del género *Malassezia*, *Wickerhamomyces* y *Candida parapsilosis*. Se valoró el crecimiento de cada una de las 21 cepas mediante lecturas seriadas, comenzando por un día (24 horas) para placa 1, 48 horas para placa 2 y 21 días para placa 3, ya que los tiempos de generación de cada una de las especies es variable. La lectura se realizó añadiendo 2,5 μ L de solución de azul alamar (Resazurine. Sigma-Aldrich®) a cada uno de los pocillos. Se trata de una prueba colorimétrica

que es sensible a modificaciones del pH (22). Cuanto más crecimiento, más actividad metabólica y más se acidifica el medio. La acidificación se manifiesta con viraje de color de azul a rojo-rosa.

5.3.2. Ensayo en medio sólido inoculado en superficie.

Se prepararon placas con cada uno de los 12 medios de cultivo y se dividieron en secciones numeradas (Figura 4). Se inoculó cada especie en su sección correspondiente depositando en la superficie del medio una gota de 5 μ L con la suspensión de células. Se dejan en reposo a 30°C para incubación y se leen los resultados a las 24 horas, 5 y 21 días.

5.3.3. Ensayo en medio sólido inoculado en profundidad.

Se procede como en el anterior, pero en cada sección de la placa se perfora el medio haciendo un pocillo de 0,6 mm de diámetro. El inóculo de 50 μ L se deposita en los pocillos.



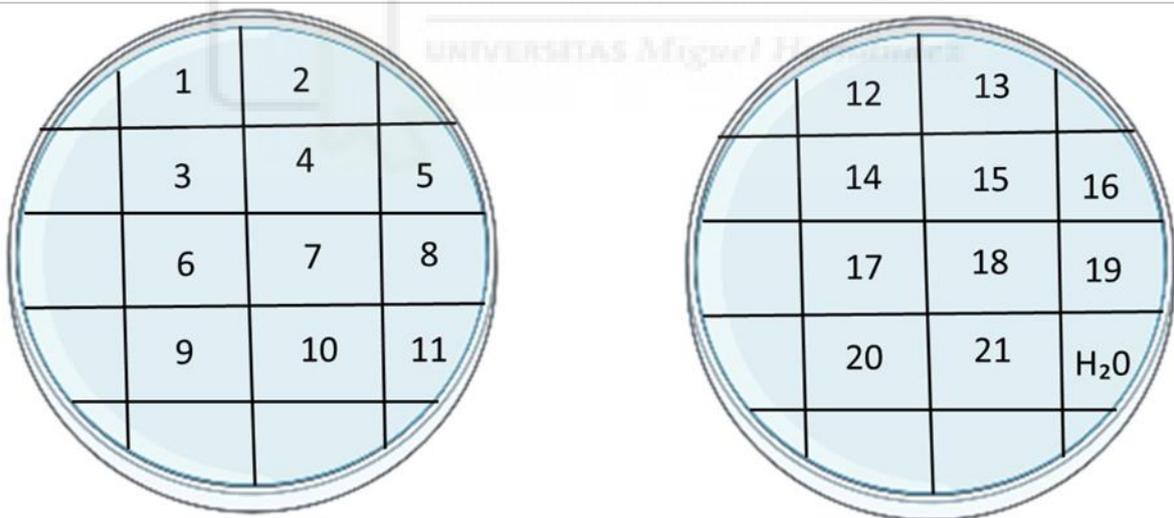
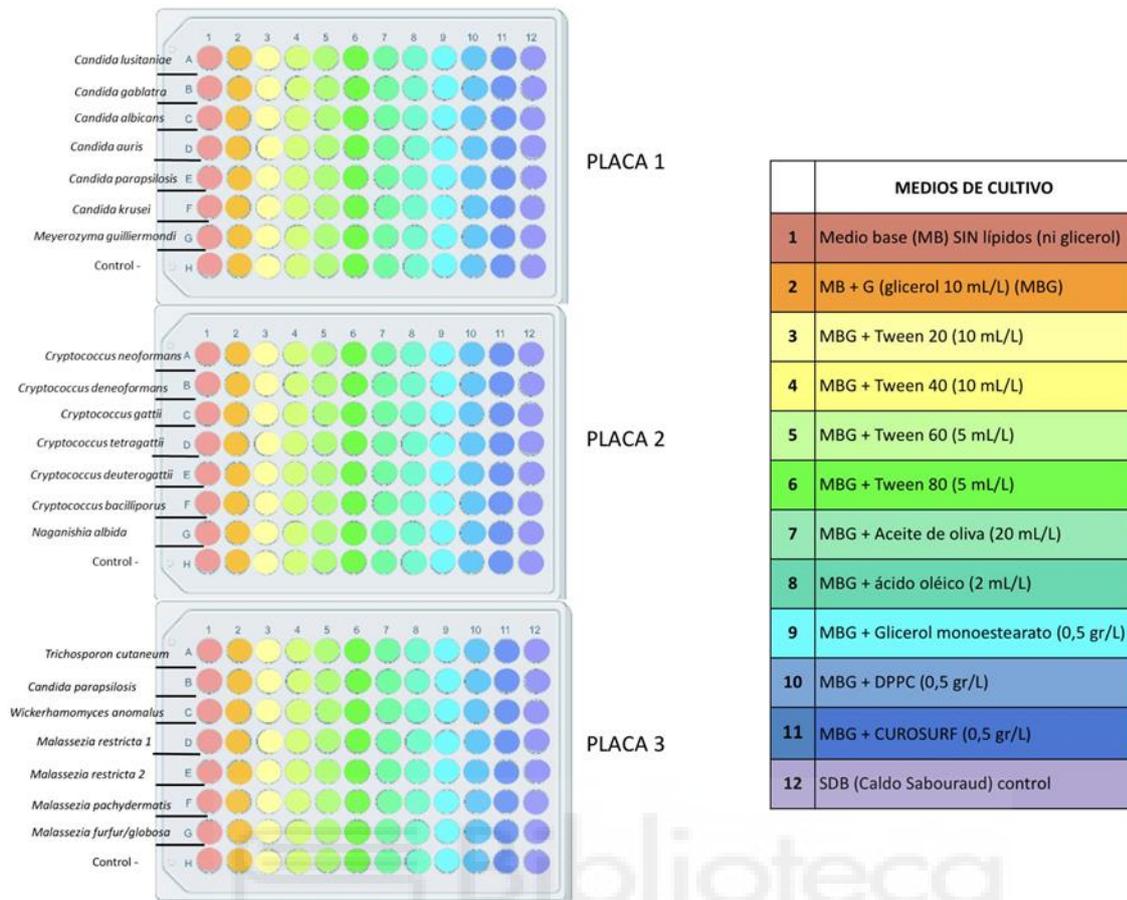


FIGURA 4: Arriba: distribución de las cepas (filas) y medios de cultivo (columna y colores) en placa multipocillo y composición de cada medio de cultivo. Abajo: distribución en placas de las cepas en medios sólidos, donde cada número corresponde a la cepa de la tabla 1.

RESULTADOS

1. Recuperación de cepas de levaduras

1.1. Levaduras de géneros no dependientes de lípidos

Las 17 cepas seleccionadas de las especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Meyerozyma*, *Naganishia*, *Rhodotrula*, *Trichosporon* y *Wickerhamomyces* y cultivadas en SDA, crecieron adecuadamente.

1.2. Levaduras del género *Malassezia*.

Se cultivaron las tres especies de *Malassezia* en MLNA y Dixon. *Malassezia restricta* se dejó incubar 21 días, observando cada semana el crecimiento en MLNA y DIXON. En el medio de Dixon no creció *M. restricta* y *M. arunalokei* y *M. pachydermatis* crecieron moderadamente (Figura 5) por lo que no se continuó utilizando este medio de cultivo en futuros experimentos.

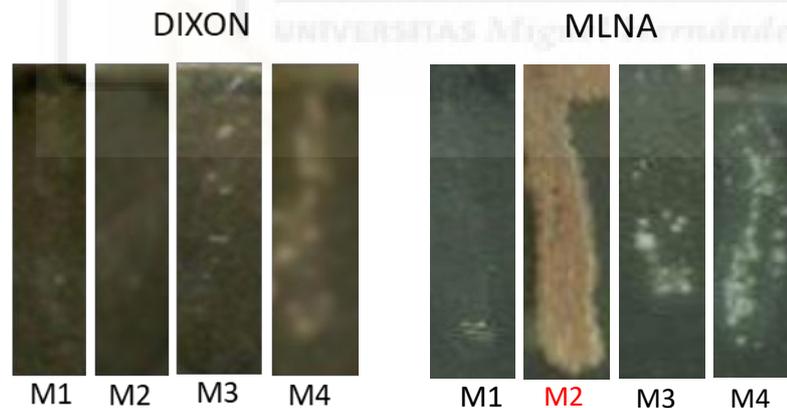


Figura 5. Cultivo de las cuatro cepas de *Malassezia* en agar de Dixon modificado y MLNA. Crecimiento tras 4 días de incubación a 30°C. M1 *M. restricta* (original CBS), M2 *M. restricta* (reaislada), M3 *M. arunalokei* y M4 *M. pachydermatis*. La cepa M2 en MLNA se contaminó con *Rhodotorula* spp.

Todas las levaduras que mostraron lipofilia crecieron en MLNA, pero las especies de *Malassezia* fueron las que tuvieron un desarrollo más lento y menos abundante. Especialmente las dos cepas de *M. restricta* que a los 4 días apenas mostraban crecimiento, mientras que si lo hacían las otras dos especies (Figura 5).

A las 3 semanas había colonias visibles en la mayoría de resiembras de *M. restricta*. Dichas colonias fueron pequeñas, blanco-amarillentas y rugosas. Al microscopio, se observaron pequeñas levaduras redondeadas de 3 micrometros bien teñidas con azul de lactofenol (Figura 6).

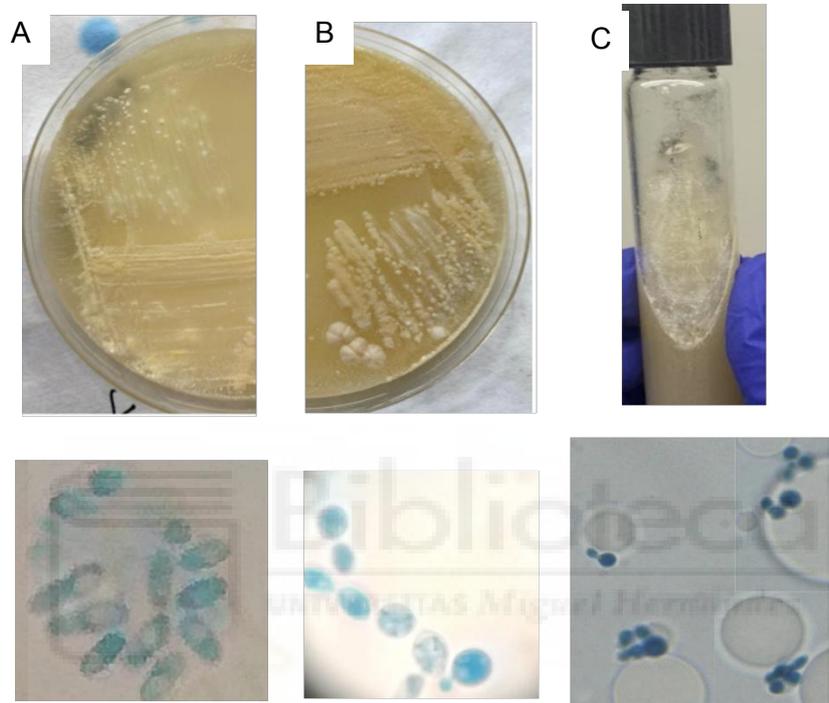


FIGURA 6: Arriba: Cultivo en MLNA de las tres especies de *Malassezia*: A. *M. arunalokei*; B. *M. pachydermatis*; C. *M. restricta*. Abajo: Visualización microscópica con azul de lactofenol de las células de las tres especies (en el mismo orden) A: levaduras redondeadas pequeñas. B: levaduras pequeñas y alargadas. C: levaduras pequeñas y redondeadas. Microscopía con objetivo de 100X.

2. Medios con Lípidos Convencionales Modificados

2.1 Nuevos Medios

En cada uno de los medios utilizados, se valoró el crecimiento a los 4 días. Se obtiene mejor un crecimiento en los medios suplementados con DPPC, como se muestra en la figura 7. No hay cambios en la lectura del día 6 y se desechan las placas por contaminación de medios a los 21 días.

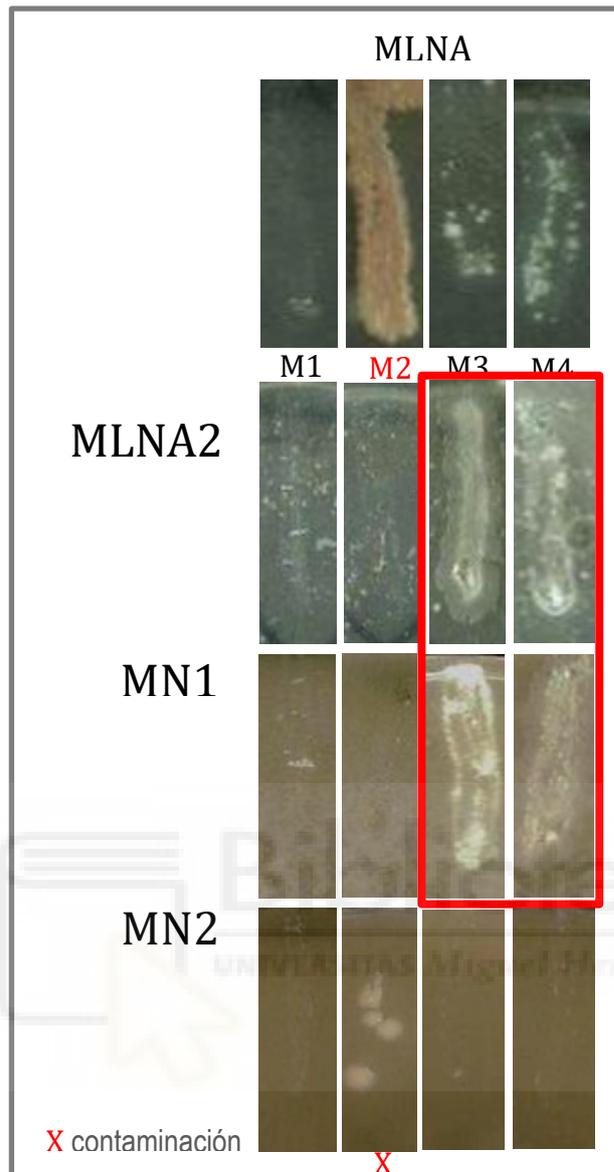


FIGURA 7: Valoración comparativa del crecimiento de las especies del género *Malassezia* en medios de cultivo con lípidos convencionales y con DPPC. M1 *M. restricta* (original CBS), M2 *M. restricta* (reaislada), M3 *M. arunalokei* y M4 *M. pachydermatis*. La cepa M2 en MLNA se contaminó con *Rhodotorula* spp. Los cultivos que mostraron mejor crecimiento se enmarcan en rojo.

2.2 Medio con y sin DPPC (NM2 y NM2').

En las placas con cepas de *Malassezia*, el crecimiento de *Malassezia restricta* es solo ligeramente detectable en NM2, incluso a 21 días. Sin embargo, *Malassezia arunalokei* creció bien y sin diferencias entre los dos medios. También *Malassezia pachydermatis* crece en ambos con moderación.

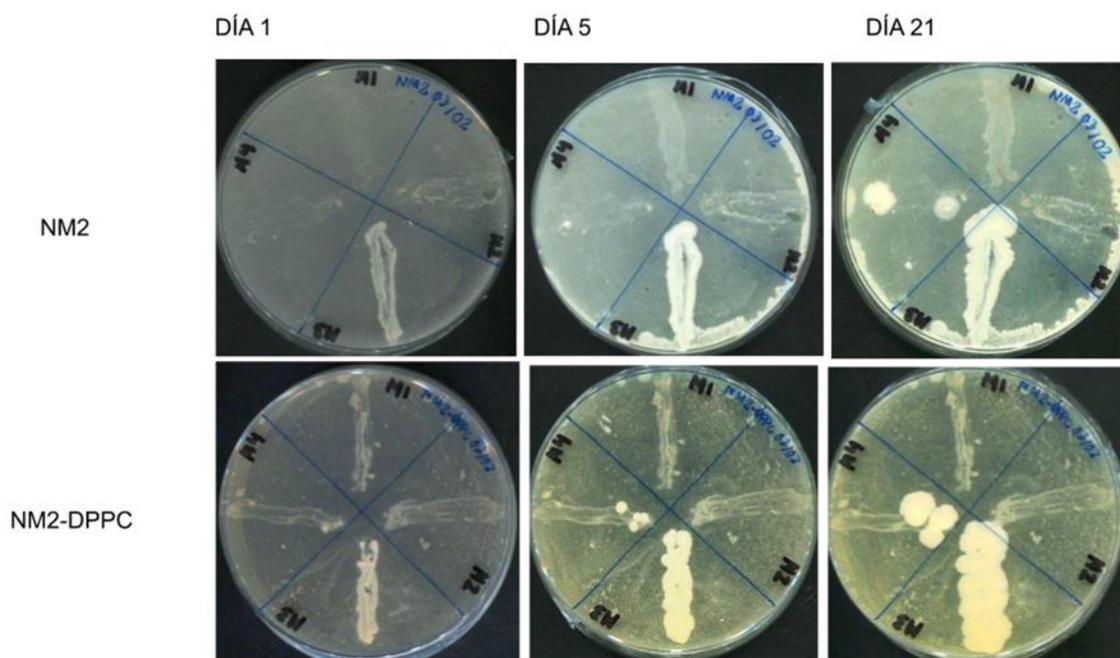


FIGURA 8: Imágenes de crecimiento de las cepas de *Malassezia spp* en los medios NM2 y NM2-DPPC en 1, 5 y 21 días. M1 *M. restricta* (original CBS), M2 *M. restricta* (reaislada), M3 *M. arunalokei* y M4 *M. pachydermatis*.

En cuanto al resto de cepas, todas crecieron en ambos medios de cultivo sin diferencias excepto *C. tetragattii*, *T. cutaneum*, *R. mucilaginoso* y *N. albida* que crecieron en NM2 y no en NM2'.

3. Ensayo Nuevos Medios Lipídicos

3.1. Cultivo en placas multipocillo

3.1.1. Crecimiento de levaduras de géneros no lipodependientes

Candida glabrata y *Candida albicans* no crecen en el medio base y crecen mejor en los medios con lípidos del surfactante pulmonar. *Candida krusei* y *Candida auris* no han crecido en los medios con lípidos ni en el medio base con inhibidor del crecimiento. El resto de las levaduras crecen en medios lipídicos sin predominio específico de ningún medio de cultivo.

Hay crecimiento de todas las levaduras en medios con lípidos pulmonares, no siendo los medios que más favorecen el crecimiento. Todas las levaduras presentan un crecimiento superior en el medio base añadiendo lípidos que sin añadirlos. *Cryptococcus deneoformans* y *Cryptococcus gattii* son los que mejor crecen en medios con lípidos.

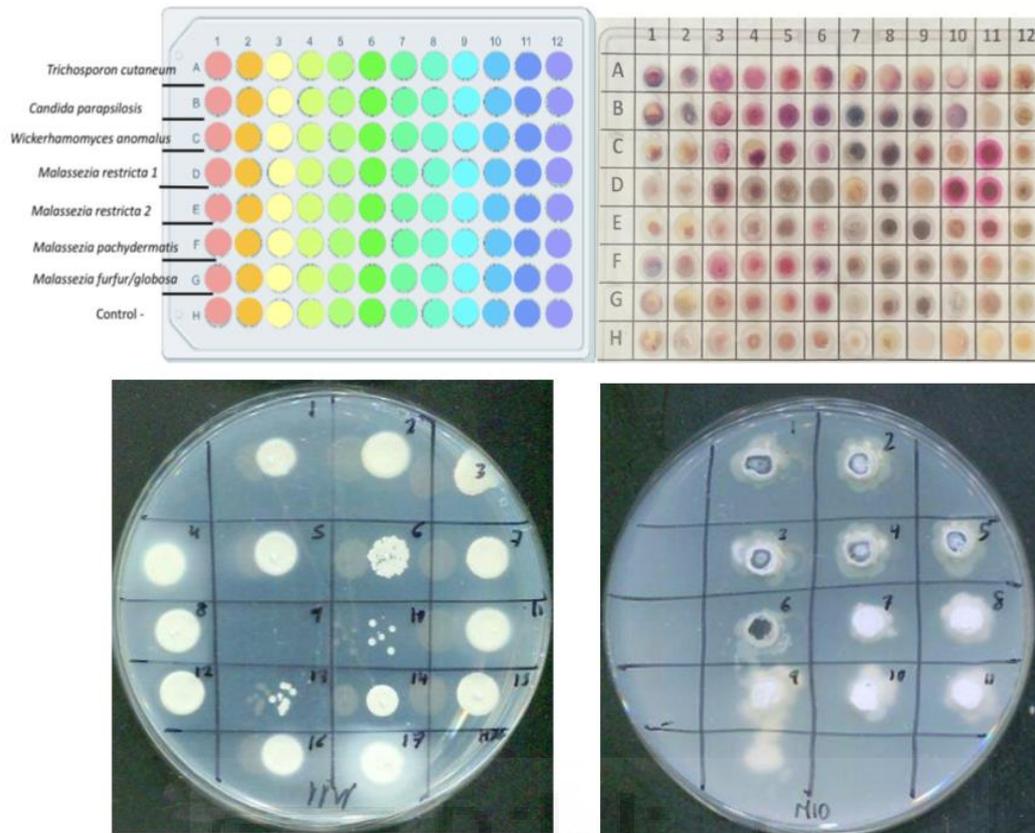


Figura 9: Arriba: a la izquierda un esquema del contenido de la placa multipocillo que contiene, entre otras, las levaduras del género *Malassezia*, y a la derecha los resultados tras añadir resazurina. Abajo: a la izquierda un ejemplo de los resultados de cultivos en extensión y a la derecha un ejemplo de los resultados de cultivos en profundidad.

3.1.2: Crecimiento de levaduras del género *Malassezia*

Se observa que los medios de cultivo que más favorecen el crecimiento de *Malassezia restricta* son los que contienen lípidos pulmonares (Figuras 9 y 10).

3.2: Cultivo en medio sólido en profundidad y en superficie

3.2.1: Crecimiento de levaduras no lipodependientes:

Todas crecen en medio base, excepto *Cryptococcus deneoformans*.

3.2.2 Crecimiento de levaduras del género *Malassezia*

Todas crecen en medio base, aunque *Malassezia restricta* y *Malassezia arunalokei* tienen un crecimiento superior en los medios con lípidos. Los medios con lípidos pulmonares no muestran diferencias de crecimiento en estas dos especies. *Malassezia pachydermatis* es la que mejor crece en el medio base, siendo su crecimiento mayor en medios con lípidos, excepto los medios con lípidos pulmonares, donde su crecimiento es inferior a que en los medios con lípidos convencionales.

ENSAYOS LIPOFILIA																																																				
nº ID	Especies	MBG	T20	T40	T60	T80	AOV	AOL	GME	DPP	C	CUR	NºID	Especies	MBG	T20	T40	T60	T80	AOV	AOL	GME	DPP	C	CUR	NºID	Especies	MBG	T20	T40	T60	T80	AOV	AOL	GME	DPP	C	CUR														
1	<i>Candida lusitanae</i>	Red	Blue	8	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Red	Blue	15	<i>Trichosporon cutaneum</i>	Red	Blue																																									
2	<i>Candida glabrata</i>	Red	Blue	9	<i>Cryptococcus deneoformans</i>	Red	Blue	16	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Red	Blue																																									
3	<i>Candida albicans</i>	Red	Blue	10	<i>Cryptococcus gattii</i>	Red	Blue	17	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Red	Blue																																									
4	<i>Candida auris</i>	Red	Blue	11	<i>Cryptococcus tetragatti</i>	Red	Blue	18	<i>Malassezia restricta 1</i>	Red	Blue																																									
5	<i>Candida parapsilosis</i>	Red	Blue	12	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	Red	Blue	19	<i>Malassezia restricta 2</i>	Red	Blue																																									
6	<i>Candida krusei</i>	Red	Blue	13	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	Red	Blue	20	<i>Malassezia arunalokei</i>	Red	Blue																																									
7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Red	Blue	14	<i>Naganishia albida</i>	Red	Blue	21	<i>Malassezia pachydermatis</i>	Red	Blue																																									

Figura 10: Esquema del resultado obtenido en los ensayos de crecimiento en superficie (casillas azules), profundidad (casillas rojas) y medio líquido (casillas verdes). La intensidad del color está en relación con el grado de desarrollo de cada cepa en cada medio. Las casillas en blanco corresponden con ausencia de crecimiento.

DISCUSIÓN

Según los resultados mostrados, los lípidos del surfactante pulmonar tienen una gran influencia en el desarrollo *in vitro*, no solo de *Malassezia restricta* (Figura 10), sino también de otras levaduras del género *Malassezia* (Figura 7) y de otras levaduras consideradas no lipodependientes, que sabemos que forman parte importante del microbioma pulmonar y que, tras estos ensayos, podemos explicar su afinidad a los lípidos pulmonares.

Podríamos decir, por tanto, que las levaduras estudiadas son mayoritariamente lipofílicas. Sin embargo, ninguna de las incluidas en el estudio, aparte de las del género *Malassezia*, están

consideradas en la actualidad como tal. De hecho, no hay estudios sobre lipofilia con ninguna de estas levaduras en las bases de datos más importantes. Este nuevo hallazgo podría tener implicaciones importantes en futuros estudios sobre el microbioma, además de tener implicaciones en la posible implicación patogénica de estas levaduras en procesos respiratorios y en la forma en que algunas utilizan el pulmón como puerta de entrada para producir procesos a distancia. Por ejemplo, las levaduras del género *Cryptococcus*, provocan infecciones pulmonares, pero fundamentalmente invaden el SNC, otro órgano rico en lípidos.

A pesar de que los resultados apuntan en la dirección de una gran trascendencia de los lípidos del surfactante en el desarrollo de muchas de las especies estudiadas, existen algunas contradicciones en los resultados que precisan mayor estudio. En todos los experimentos realizados existen diferencias entre los medios de cultivo con lípidos pulmonares y medios de cultivo que no los contienen, pero estas diferencias no son consistentes en todos los ensayos. Utilizando los mismos medios de cultivo, el crecimiento de las levaduras es variable en función de la técnica utilizada. Además, las diferencias encontradas entre el medio de cultivo con DPPC y sin DPPC no son consistentes con los resultados mostrados en la Figura 10. Si tenemos en cuenta que en los resultados de esta figura se utilizan los mismos medios de cultivo, únicamente variando la técnica con la que se cultiva, hay diferencias importantes. Esto puede explicarse con que, además de los componentes lipídicos de los medios de cultivo, influyen otras variables y condiciones que sería necesario valorar en futuros estudios para la optimización del crecimiento de estas levaduras. En definitiva, los ensayos más complejos que se han llevado a cabo deben repetirse un número suficiente de veces para conseguir resultados sólidos y contrastables. En el tiempo de realización de este trabajo, no se han podido realizar las suficientes réplicas de los ensayos, por lo que es una importante limitación en las conclusiones.

CONCLUSIONES

El estudio muestra que los lípidos específicos del surfactante pulmonar permiten el desarrollo óptimo de *Malassezia restricta*, que es una de las levaduras más prevalentes en la vía aérea baja según estudios previos de microbioma.

Los lípidos pulmonares y en concreto el DPPC, son factores favorecedores del desarrollo *in vitro* de numerosas especies de levaduras no consideradas hasta el momento como lipofílicas.

Se han diseñado con éxito nuevos medios de cultivo ricos en lípidos del surfactante pulmonar, que pueden utilizarse para estudiar la microbiota pulmonar mediante técnicas basadas en cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Translational Research*, 2012, Volume 160(4), pp.258-66.
2. Valdes A, Walter J, Segal E and Spector T. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *The BMJ*, 2018, Volume 361, pp. 36-44.
3. Thaïss CA, Zmora N, Levy M and Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*, 2016 Volume 535(7610), pp. 65-74.
4. Dinan TG And Cryan, JF. The microbiome gut brain axis in health and disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2017 Volume 46(1), pp. 77-89.
5. Brestoff J and Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature Immunology*, 2013 Volumen 14, pp. 676-684.
6. Rubio-Portillo E, Orts D, Llorca E, Fernández C, Antón J, Ferrer C et al. The Domestic Environment and the Lung Mycobiome. *Microorganisms*, 2020, Volume 8(11),1717.

7. Wang QM, Theelen B, Groenewald M, Bai FY, Boekhout T. Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. *Molecular Phylogenetics and Evolution Fungi*, 2014, Volume 33, pp.41–47.
8. Cabañes FJ. *Malassezia pachydermatis*: To be, or not to be lipid-dependent. *Rev Iberoam Micol.* 2020;37(1):3–4.
9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485320303017> Fernández-Espejo E. Microorganismos relacionados con un mayor riesgo de presentar la enfermedad de Parkinson. *Neurología.* 2020.
10. S. Youngchim, J.D. Nosanchuk, S. Pornsuwan, S. Kajiwara, N. Vanittanakom. The role of L-DOPA on melanization and mycelial production in *Malassezia furfur*. *PLoS ONE.*, 8 (2013), p. e63764.
11. Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, Volume15(1), pp. 21-57.
12. Fan X, Alekseyenko AC, Wu J, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, et al. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested casecontrol study. *Gut*, 2018, Volume 67(1), pp.120-127.
13. Aykut B, Puhsalkar S, Chen R, Li Q, Abengozar R, Kim Ji, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via MBL activation. *Nature*, 2019, Volume 574(7777), pp. 264-267.
14. Godoy-Vitorino F, Romaguera J, Zhao C, Vargas-Robles D, Ortiz-Morales G, Vázquez-Sánchez F, et al. Cervicovaginal fungi and bacteria associated with cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human Papillomavirus infections in a Hispanic population. *Frontiers in Microbiology*, 2018, Volume 9, pp. 2533.

15. Gaitanis G, Veleglaki A, Magiatis P, Pappas P, Bassukas ID. Could Malassezia yeasts be implicated in skin carcinogenesis through the production of aryl-hydrocarbon receptor ligands?. *Med Hypotheses*. 2011; Vol.77(1):47-51.
16. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, Volume 68, pp. 394-424.
17. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940960216301546?via%3Dihub> Bernhard W. Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Annals of anatomy*. 2016, Vol. 208, Pages 146-150.
18. Bernhard W. Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Annals of Anatomy*. 2016, **208**: 146–150. [doi:10.1016/j.aanat.2016.08.003](https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.08.003). [PMID 27693601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27693601/).
19. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29397349/> Kumar A, Abdelmalak B, Inoue Y, Culver DA. Pulmonary alveolar proteinosis in adults: pathophysiology and clinical approach. *Lancet Respir Med*. 2018, Vol,6(7):554-565.
20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22484272/> Punatar AD, Kusne S, Blair JE, Seville MT, Vikram HR. Opportunistic infections in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *J Infect*. 2012; Vol. 65(2):173-179.
21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7301693/> Zhang, Fei Zhou et al. "Pulmonary Alveolar Proteinosis Due to *Pneumocystis carinii* in Type 1 Hyper-IgM Syndrome: A Case Report. *Frontiers in pediatrics*, 2020 vol. 8 264. 11
22. <https://1library.co/document/q7w40lrz-elaboracion-validacion-indirecto-estimacion-celulas-somaticas-bacterias-mesofilas.html>. Mendez-Sosa EA, Zuniga CV. Elaboración y validación de un método indirecto para la estimación de células

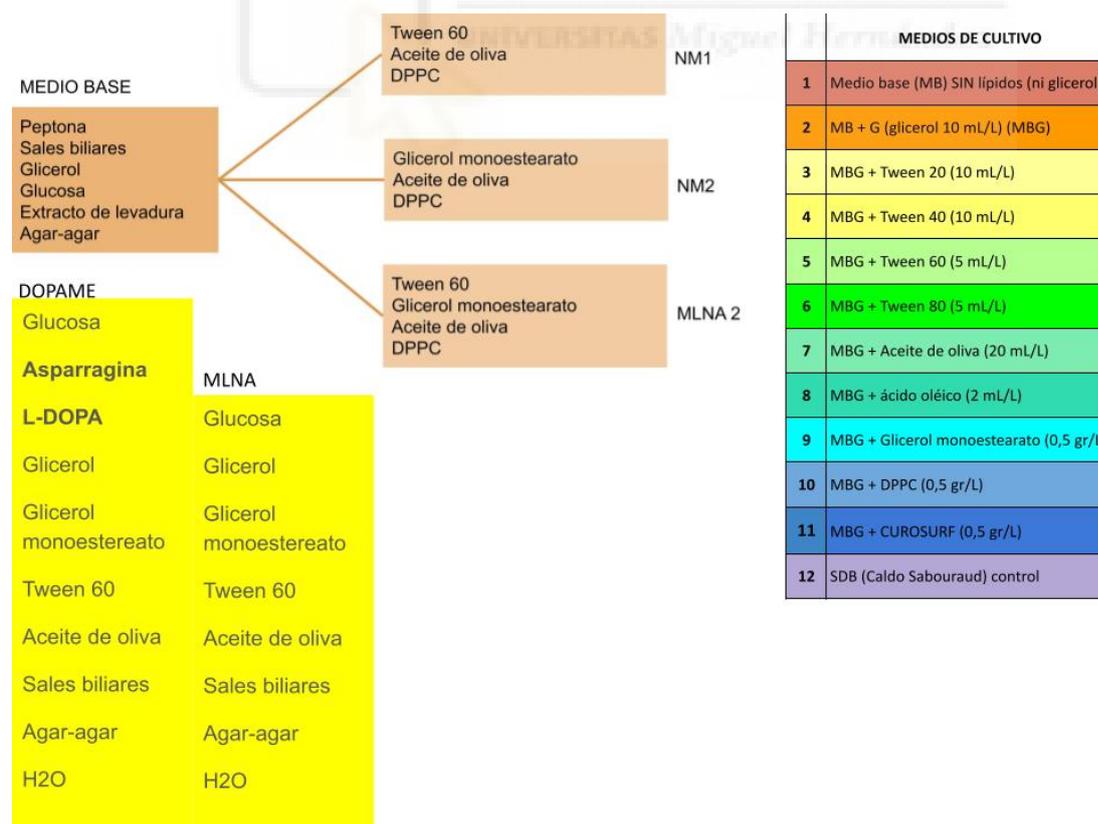
somáticas y bacterias mesófilas aerobias en leche cruda. Escuela Agrícola Panamericana. 2017.

AGRADECIMIENTOS

Durante este curso, he podido disfrutar de una beca de colaboración en el Laboratorio de Micología Médica de la UMH, en el cual he podido desarrollar este trabajo. Me gustaría agradecer a mis tutoras Kika y Consuelo por prestarme tanta ayuda durante el desarrollo de este trabajo y haber podido aprender tantísimo de ellas. De igual modo, a Noelia y a Javi por el apoyo y ayuda en estos meses, y a mis compañeros de laboratorio (especialmente a Sara por prestarme “levaduras del género *Candida*” de su trabajo.

ANEXO

-Anexo 1: medios de cultivo utilizados



-Anexo 2: COIR



Dr. Dña. María Francisca Colom Valiente
Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

178/2015

Elche, a 25 de Junio de 2015

Investigador Principal	María Francisca Colom Valiente	
Tipo de actividad	Proyecto Regional	
Título del proyecto	El MICROBIOMA FÚNGICO DE APARATO RESPIRATORIO: ¿Reservorio de patógenos oportunistas?	
Códigos GIS estancias donde se desarrolla la actividad	Laboratorio de Micología Médica. Edificio Muhammad Al Shafra 1ª planta • Estancias S02P1071; S02P1072; S02P1073	
Evaluación Riesgos Laborales	Conforme condicionado	
Evaluación Ética	Aprobado	
Registro	2014.230.E.OEP	
Referencia	DVM.MCV.01.14	
Caducidad	6 meses	

La evaluación ética del presente proyecto/contrato/prestación de servicios es **favorable**.

Una vez atendidas las observaciones/condiciones mencionadas en el informe adjunto del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, **se autoriza** la realización de la investigación.

Atentamente,

ALBERTO|
PASTOR|
CAMPOS

Firmado digitalmente por ALBERTO|
PASTOR|CAMPOS
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=ALBERTO|PASTOR|CAMPOS,
serialNumber=48361162M,
givenName=ALBERTO, sn=PASTOR|
CAMPOS, ou=Ciudadanos, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2015.06.25 14:31:50 +0200'

Alberto Pastor Campos
Secretario del Órgano Evaluador de Proyectos
Vicerrectorado de Investigación e Innovación

MANUEL
MIGUEL|
JORDAN|VIDAL

Firmado digitalmente por MANUEL MIGUEL|
JORDAN|VIDAL
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=MANUEL MIGUEL|JORDAN|VIDAL,
serialNumber=18965995B,
givenName=MANUEL MIGUEL, sn=JORDAN
VIDAL, ou=Ciudadanos, p=ACCV, c=ES
Fecha: 2015.06.29 12:38:13 +0200'

Manuel Miguel Jordán Vidal
Presidente del Órgano Evaluador de Proyectos
Vicerrectorado de Investigación e Innovación

Página 1 de 1