



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

---

**Biología**

**Título:**

**“Detección de la familia de genes *ALS* de *Candida albicans*  
aisladas de pacientes infectados.”**

**Pasante de Biología: Elizabeth García Rivera**

**No. Cta. 30218149-8**

**Teléfono: 53-59-60-50**

**Dirección: Av. Hidalgo; No. 70 A, Int. 17; Col. San Pedro Xalpa;**

**C.P. 02710; Azcapotzalco, D.F.**

**Correo electrónico: gariveliza@hotmail.com**

**Director de tesis:**

**M en C. Eric Monroy Pérez**

***Proyecto financiado por la DGAPA, UNAM, PAPIME, PE200209***

**Noviembre 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
1.1 Características y morfología de <i>Candida albicans</i> .....	2
1.2 Candidosis orofaríngea y vulvovaginal.....	2
1.3 Factores de virulencia.....	4
III. ANTECEDENTES.....	8
IV. OBJETIVO GENERAL.....	9
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
VI. METODOLOGÍA.....	10
6.1 Selección de los pacientes y toma de los productos.....	10
6.2 Extracción del ADN de las cepas de <i>Candida</i> spp. para PCR.....	10
6.3 Detección de las distintas especies de <i>Candida</i> por PCR multiplex.....	11
6.4 Detección de la familia <i>ALS</i> de <i>C. albicans</i> por PCR.....	12
6.5 Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante por electroforesis en Geles de Agarosa. ....	14

<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>7.1 Pacientes estudiados.....</b>	<b>15</b>
<b>7.2 Identificación de <i>Candida albicans</i> por PCR multiplex.....</b>	<b>17</b>
<b>7.3 Detección de los cuatro genotipos de la familia de ALS.....</b>	<b>18</b>
<b>7.4 Asociación de los genes de la familia ALS en las cepas de     <i>Candida albicans</i> analizadas.....</b>	<b>20</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>8.1 Pacientes estudiados.....</b>	<b>22</b>
<b>8.2 Identificación de <i>Candida albicans</i> por por PCR multiplex.....</b>	<b>25</b>
<b>8.3 Detección de la familia ALS de <i>C. albicans</i> por PCR.....</b>	<b>26</b>
<b>IX.CONCLUSIONES.....</b>	<b>29</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>30</b>

## Resumen

*Candida albicans* posee varios factores de virulencia asociados con la patogénesis, entre los cuales se encuentra la familia ALS (agglutinin-like sequence) formada por 8 genes que codifican para glucoproteínas de la pared celular con diferentes perfiles de adhesión a la superficie del hospedero. El objetivo de este estudio fue identificar los genes *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS4* de *C. albicans* aisladas de los pacientes con infecciones crónicas. La identificación de *C. albicans* se realizó por PCR multiplex y la detección de los genes de la familia ALS se realizó por PCR convencional. El 58% de los pacientes fueron mujeres y el 42% hombres. El intervalo de edad fue de 19-70 años. Se identificaron 50 cepas de *Candida albicans* obtenidas de pacientes adultos con candidiasis crónica oral (n = 40) y vulvovaginal (n = 10). *ALS1* fue identificado en el 74% (n = 37) de las cepas; *ALS2* en el 68% (n = 34); *ALS3* en el 94% (n = 47) y *ALS4* en el 96% (n = 48). Los resultados mostraron que las proteínas de la pared celular *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS4* de *C. albicans* se encontraron involucradas en la adhesión y en la cronicidad de la patología de los enfermos.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Características y morfología de *Candida albicans***

*Candida albicans* es una levadura oval Grampositiva que mide de 2 a 3 de ancho x 4 a 6 micras de largo, fermenta la glucosa y maltosa, produciendo ácido y gas, es miembro de la flora normal de las mucosas de los aparatos respiratorio, digestivo y genital femenino. *C. albicans* presenta morfogénesis (involucrado en la invasión de los tejidos), mediante el cual ocurre la transición de levadura a hifa (Jawet et al., 1996). Puede provocar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (SIDA, quimioterapia por cáncer, antibioticoterapia, diabetes mellitus, neutrofilia, etc.) (Castrillón et al., 2004) o infecciones en boca (algodoncillo), piel, uñas, pulmones, vulvovaginitis y otros órganos (Jawet et al., 1996).

### **1.2 Candidosis orofaríngea y vulvovaginal**

La candidosis orofaríngea afecta a pacientes que se encuentran inmunocomprometidos (SIDA, leucemias, cáncer), como también a pacientes no inmunocomprometidos que se encuentran debilitados por enfermedades como diabetes mellitus o por el uso mde antibióticos de amplio espectro). Por otro lado, la candidosis

vulvovaginal (CVV) es una de infecciones más comunes en mujeres de edad reproductiva (Foxman et al., 1998; Reed 1992; Sobel et al., 1998). Aproximadamente el 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio de CVV durante su vida, con elevada morbilidad (Moreira & Paula 2006). En nuestro país las estadísticas de la CVV a nivel nacional son muy escasas, tan sólo se encuentran las reportadas por algunas instituciones de salud y por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el cual ha reportado que la cervicovaginitis se encuentra entre los 12 principales motivos de consulta en medicina familiar (Velasco et al., 1999; Oviedo et al., 2004), con una elevada incidencia por *Candida albicans* (Martínez et al. 2007). En los EUA anualmente se reportan 13 millones de casos de CVV (Sobel 1999; Ferrer J, 2000) *C. albicans* el agente causal del 85-90% de los casos de CVV, mientras que el 20% son ocasionados por otras especies, como *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, entre otras (Furneri et al., 2008; Sobel et al. 1998). Existen varios factores externos que predisponen a la CVV, como el uso de antibióticos y anticonceptivos orales, la diabetes mellitus no controlada y los altos niveles de estrógenos durante el embarazo (Dorko et al., 2005). En ausencia de estos factores de riesgo, la CVV ocurre frecuentemente en la fase luteal del ciclo menstrual, en la cual los

niveles de estrógenos se encuentran elevados. En contraste las mujeres postmenopáusicas con bajos niveles de estrógenos raramente sufren de CVV (Fidel et al., 2000). Los estrógenos favorecen la transición de células epiteliales de columna a células escamosas estratificadas, facilitando la adherencia y crecimiento de *C. albicans*, además de que las células levaduriformes poseen receptores para los estrógenos que permiten la formación de micelio (Nas et al., 2008). De esta manera la asociación entre los altos niveles de estrógenos y la incidencia de colonización o de infecciones vaginales por *C. albicans* puede deberse a los efectos de los estrógenos en el hospedero, en las levaduras de *C. albicans* o en ambos (Cheng et al., 2006).

### **1.3 Factores de virulencia**

*C. albicans* posee varios factores de virulencia que incluyen la transición de levadura a hifa, cambio de fenotipo, secreción de enzimas hidrolíticas y adherencia celular (tabla 1) (Cutler,1991; Odds 1994; Castrillón 2005).

<b>Factor de virulencia</b>	<b><i>Mecanismo de virulencia</i></b>
Adhesinas (familia Als, Hwp1, Int1) <sup>a</sup>	<i>Adhesión y colonización</i>
Producción de Hifa	<i>Adhesión, invasión, y destrucción de los tejidos</i>
Enzimas hidrolíticas extracelulares	<i>Adquisición de nutrientes,</i>

(familias Sap, Plb y Lip) <sup>b</sup>	<i>invasión, destrucción de los tejidos y evasión de la respuesta del hospedero.</i>
<i>Cambio de fenotipo</i>	<i>Adhesión y evasión de la respuesta del hospedero.</i>

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *C. albicans*.

<sup>a</sup>Als = agglutinin-like sequence; Hwp1 = hyphal cell wall protein 1; Int1= integrin-like protein.

<sup>b</sup>Sap = secreted aspartyl proteinases 1 a 10; Plb = phospholipase B1 and B2; Lip = Lipasas 1 a 10.

En la adhesión de *C. albicans* a la superficie de las células del hospedero se encuentra involucrada la familia de genes *ALS* (agglutinin-like sequence) que codifican para glucoproteínas de la pared celular (Gaur & Klotz, 1997; Hoyer, 2001). La familia de genes *ALS* está compuesta de 8 genes (*ALS1* a *ALS7* y *ALS9*) que expresan adhesinas (125-600 kda) con diferentes perfiles de adhesión (Nas et al., 2008). Cada gen *ALS* tiene una estructura similar de tres dominios, incluyendo el dominio 5' de 1299-1308 pb que es muy semejante (55-90%) entre la familia; un dominio central "tandem" formado por números de copias de secuencias repetidas de 108-bp; y el dominio 3' que es relativamente variable en longitud y secuencia (figura 1) (Hoyer 2001). La familia *ALS* puede ser dividida en subfamilias basadas en la secuencia de repeticiones del dominio central tandem (Hoyer 2001; Kapteyn 2000) (figura 2).

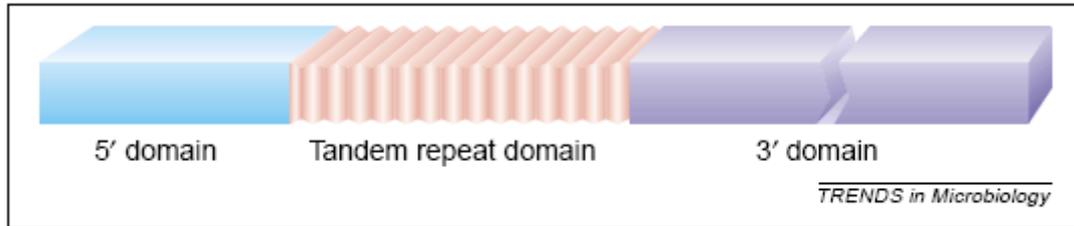


Figura 1. Estructura de ALS. Se aprecia la estructura de los 3 dominios. La longitud del dominio 5' es muy parecido en toda la familia. La longitud del tandem y el dominio 3' son altamente variables.

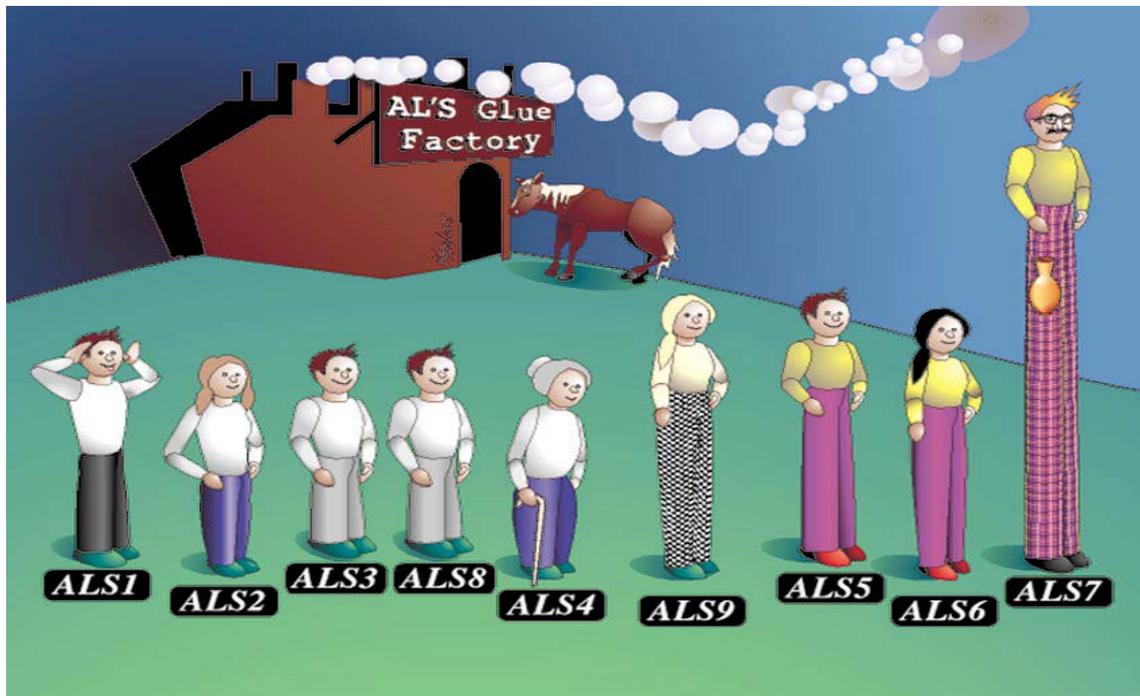


Figura 2. La fotografía de la familia ALS. Las figuras humanas corresponden a los genes ALS. Las cabezas representan el dominio 5', los torsos son el dominio central tandem con números de copias de secuencias repetidas, y las piernas representan el dominio 3'. Nótese que ALS3 y ALS8 son tan similares que ellos son representados como gemelos idénticos. La familia ALS puede ser dividida en subfamilias basadas en la secuencia de números de copias repetidas del tandem.

Los genes *ALS* en *C. albicans* son regulados diferencialmente por condiciones fisiológicas como; cambio en el medio de cultivo (Hoyer 1995), la forma morfológica del hongo (Hoyer 2000) y el estadio de crecimiento (Hoyer 1998). Se ha propuesto que los patrones de expresión los genes de la familia *ALS* podrían encontrarse asociados con las s distintas formas de candidiasis (oral, vaginal o sistémica) (Hoyer 2001b)

Debido a que en nuestro país las estadísticas sobre las infecciones por *Candida* son muy escasas, el presente estudio contribuirá en detectar los marcadores de virulencia de la familia *ALS1-4* involucrados en la adhesión celular en cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes infectados.

### **III. ANTECEDENTES**

- Cheng et al., en el 2005 estudiaron la expresión de los ocho genes de la familia *ALS* de *Candida albicans* en muestras de fluidos vaginales y en un modelo de candidiasis vaginal. Los genes expresados más frecuentemente fueron *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS9*.
- Zhao et al., (2007) analizaron la variabilidad alélica de *ALS5* y *ALS6* en una colección de cepas de *C. albicans* aisladas de diferentes zonas geográficas. Estos autores describieron que los alelos de *ALS5* tuvieron de 2-10 copias de secuencias repetidas del tandem (media= 4.82 copias) mientras que los alelos de *ALS6* presentaron de 2-8 copias (media = 4.00 copias).
- Nas et al., en el 2008 cuantificaron la expresión de los genes *ALS1*, *Hwp1* y *SAP4* en cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres con vaginitis. La expresión de *ALS1*, *Hwp1* y *SAP4* fue encontrada en el 69, 62 y 38%, respectivamente.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

- Contribuir al conocimiento de los factores de virulencia involucrados en la adhesión celular en cepas de *Candida albicans* aisladas pacientes infectados.

#### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificación de las cepas de *C. albicans* obtenidas de los pacientes infectados por PCR multiplex.
- Detección de *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS4* en las cepas de *C. albicans*. por PCR convencional.
- Correlacionar la distribución de *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS4* de *C. albicans* con la candidiasis oral y vaginal de los pacientes enfermos.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 Selección de los pacientes y toma de los productos.**

Para el desarrollo de este estudio se analizarán 50 cepas de *Candida* aisladas de pacientes con candidosis oral y vaginal que acudieron al servicio de Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM.

El género *Candida* será identificado por morfología colonial, microscópica (tinción de Gram) y por pruebas bioquímicas. Todas las cepas de *Candida* spp serán evaluadas por la prueba del tubo germinativo.

### **6.2 Extracción del ADN de las cepas de *Candida* spp. para PCR**

Las cepas de *Candida* spp serán crecidas durante la noche en caldo de sabouraud a 37° C. El ADN será extraído mediante el kit QIAGEN Genomic-tip 20/G (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN molde será almacenado a -20° C hasta su utilización.

### **6.3 Detección de las distintas especies de *Candida* por PCR multiplex**

La detección de las especies de *Candida* (Tabla 2) por PCR multiplex se llevará a cabo por el método descrito por Luo & Mitchell (2002). Para lo cual primero se realizará un PCR sencillo de punto final con los oligonucleótidos universales para el grupo de hongos ITS1 e ITS4 (5 pmol). El volumen final para la mezcla de reacción será de 25 microlitros; 1 microlitro de cada oligonucleótido (ITS1 y ITS4), 20 microlitros de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 3 microlitros de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA se hará bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96°C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión de 72°C por 15 minutos.

Posteriormente se realizará el PCR multiplex con los oligonucleótidos CALB1 y CALB2 (5 pmol), CGL1 y CGL2 (7 pmol), CPA1e, CPA3f y CPA2 (6 pmol), y CTR1 y CTR2 (4 pmol). El volumen final para la mezcla de reacción será de 25 microlitros; 1 microlitro de cada primer, 15 microlitros de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 3 microlitros de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuReTaq™ Ready-To-

Go™ PCR beads). La amplificación del ADN será realizado bajo las mismas condiciones que para ITS1 e ITS4.

Especie	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')	Tamaños de los amplicones (pb)
All fungic	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Variable
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>Candida albicans</i>	CALB1	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	273
	CALB2	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	
<i>Candida glabrata</i>	CGL1	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT	423
	CGL2	CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPA1e	TTG GTA GGC CTT CTA TAT GGG	320 300
	CPA3f	GCC AGA GAT TAA ACT CAA CCA A	
	CPA2	CCT ATC CAT TAG TTT ATA CTC CGC	
<i>Candida tropicalis</i>	CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	357
	CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	

Tabla 2. Oligonucleótidos que se utilizarán para la detección de las distintas especies patógenas del género *Candida*.

#### **6.4 Detección de la familia ALS de *C. albicans* por PCR**

La detección de los genes de la familia ALS de *C. albicans* (Tabla 3) se realizará por un PCR sencillo conforme a lo descrito por Green et al., (2004). El volumen final para la mezcla de reacción será de 25 l; 1 microlitro de cada oligonucleótido (Tabla 2), 20 microlitro de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 3 microlitros de ADN molde, 1.5 mmol de

MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA se procesará bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión de 72°C por 7 minutos.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)	Tamaños de los amplicones (pb)
ALS1	RTALS1F	GAC TAG TGA ACC AAC AAA TAC CAG A	318
	RTALS1R	CCA GAA GAA ACA GCA GGT GA	
ALS2	RTALS2F	CCA AGT ATT AAC AAA GTT TCA ATC ACT TAT	366
	RTALS2R	TCT CAA TCT TAA ATT GAA CGG CTT AC	
ALS3	RTALS3F	CCA CTT CAC AAT CCC CAT C	342
	RTALS3R	CAG CAG TAG TAG TAA CAG TAG TAG TTT CAT C	
ALS4	RTALS4F	CCC AGT CTT TCA CAA GCA GTA AAT	356
	RTALS4R	GTA AAT GAG TCA TCA ACA GAA GCC	
	RTALS9R2	AAC TGA AAC TGC TGG ATT TGG	

Tabla 3. Oligonucleótidos que se utilizarán para la detección de la familia ALS de *C. albicans*.

### **6.5 Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante por electroforesis en Geles de Agarosa.**

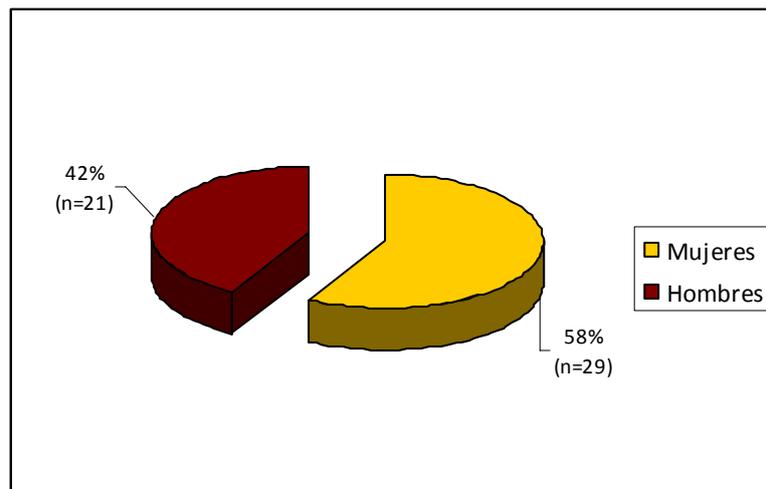
Después de la amplificación del ADN, 10 microlitros de cada muestra serán analizados por electroforesis en geles de agarosa al

2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los geles se teñirán con BrEt y serán fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

## VII. RESULTADOS

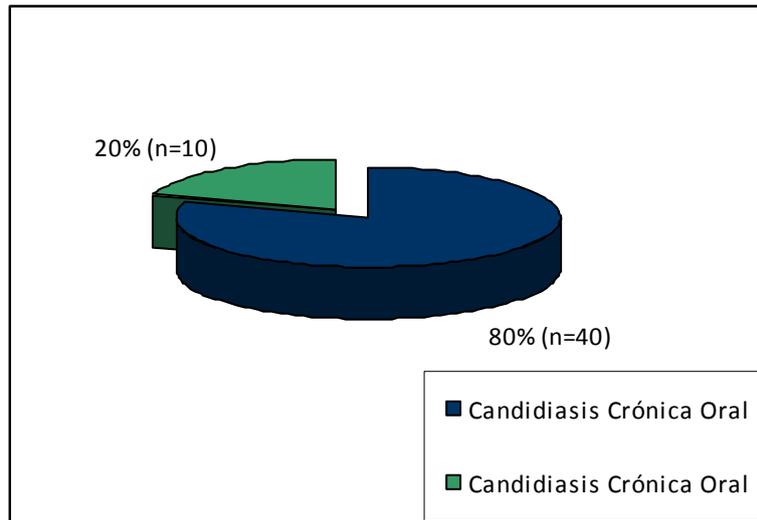
### 7.1 Pacientes estudiados

En este estudio se analizaron un total de 50 cepas de *Candida* spp aisladas de pacientes con procesos infecciosos que acudieron al servicio del Laboratorio Clínico de la CUSI Iztacala, de los cuales el 58% (n= 29) de los pacientes fueron mujeres y el 42% hombres (n= 21) (Gráfica 1), cuya edad se encontró en el intervalo de 19-70 años.



Gráfica 1. Distribución de los pacientes analizados por sexo

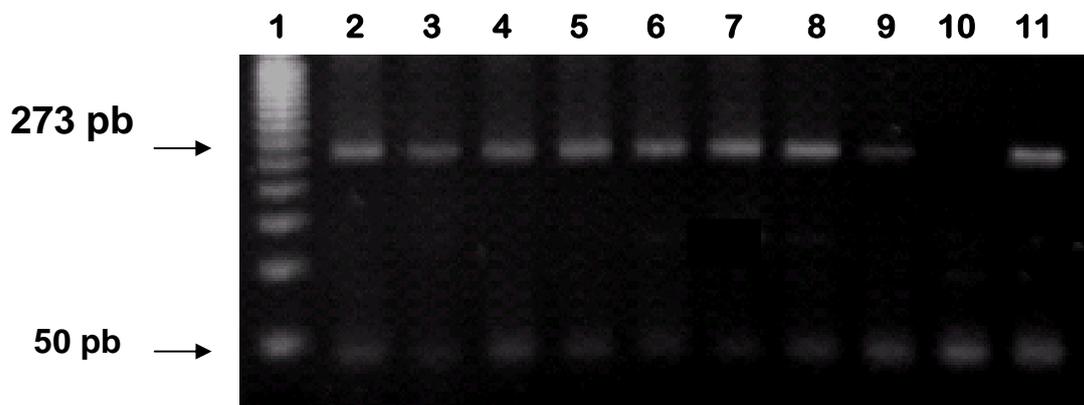
En la gráfica 2 se aprecia que 80% de las cepas fueron recuperadas de pacientes con candidosis crónica oral (n = 40) y el 20% de candidosis crónica vulvovaginal (n = 10).



Gráfica 2. Distribución de los tipos de candidosis que presentaron los pacientes estudiados.

## **7.2 Identificación de *Candida albicans* por PCR multiplex.**

Con el propósito de identificar a las especies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicales*, nosotros utilizamos un método de PCR multiplex que incluyó 10 pares de oligonucleótidos (tabla 2). El 100% de las cepas recuperadas de la candidosis oral y vaginal, correspondieron a la especie de *Candida albicans* (fotografía 1).



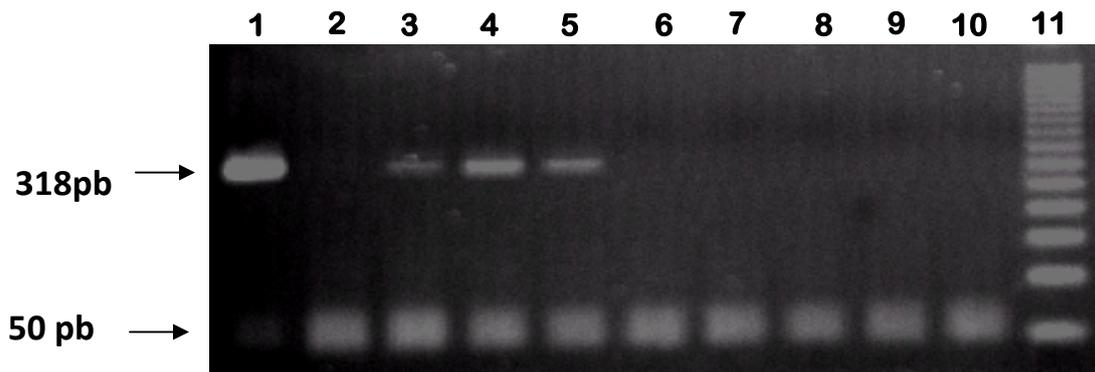
Fotografía 1. Detección de *C. albicans* por PCR multiplex. Línea 1: MWM (50pb ladder). Línea 2-9 *C. albicans* aisladas de pacientes. Línea 10: Control negativo (sin DNA), Línea 11: Control positivo (*C. albicans* ATCC 32354).

## **7.3 Detección de los cuatro genotipos de la familia de ALS**

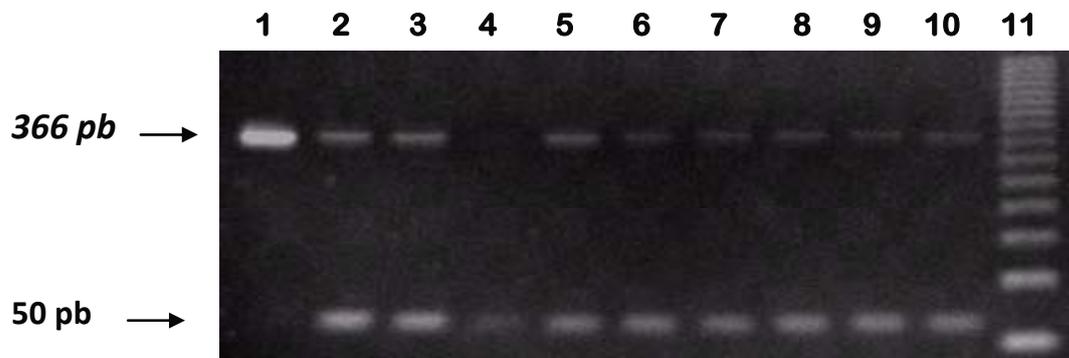
En la tabla 4 se aprecia el número y porcentaje de los distintos genes de la familia ALS. El gen que se identificó con mayor frecuencia en las cepas de *C. albicans* fue ALS4 con el 96% (n = 48), seguido de ALS3 con el 94% (n = 47), ALS1 con el 74% (n = 37) y ALS2 con el 68% (n = 34) (fotografía 2, 3, 4 y 5).

Gen	Número	Porcentaje
ALS 1	37	74%
ALS 2	34	68%
ALS 3	47	94%
ALS 4	48	96%

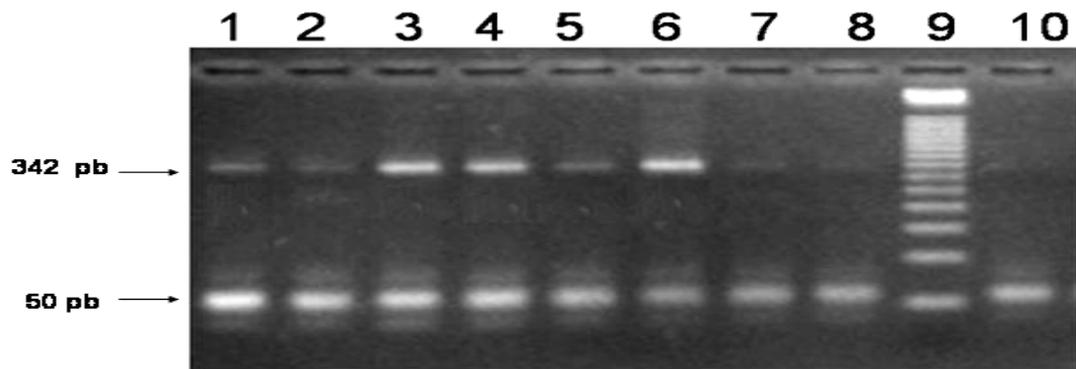
Tabla 4. Porcentaje de los genes de ALS detectados por PCR en las cepas de *C. albicans*.



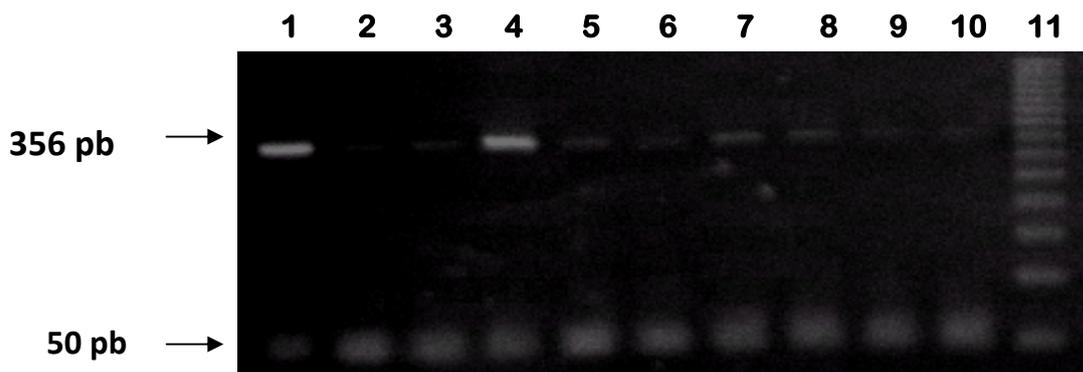
Fotografía 2. Detección por PCR de *ALS1*. Línea 1: Control Positivo (*C. albicans* ATCC 32354). Línea 2: Control Negativo (sin DNA). Líneas 3-5 *ALS1* de *C. albicans* aisladas de pacientes. Líneas 6-10 muestras negativas. Línea 11 MWM (50pb ladder).



Fotografía 3. Detección por PCR de *ALS2*. Línea1: Control Positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 2 y 3: *ALS2* de *C. albicans* aisladas de pacientes, Línea 4: Control Negativo (sin DNA). Líneas 5-10 : *ALS2* de *C. albicans* aisladas de pacientes. Línea 11 MWM (50 pb ladder).



Fotografía 4. Detección por PCR de *ALS3*. Línea 1: Control Positivo (*C. albicans* ATCC 32354). Líneas 2-8 *ALS3* de *C. albicans* aisladas de pacientes. Línea 9: MWM (50 pb ladder). Línea 10: Control Negativo (sin DNA).



Fotografía 5. Detección por PCR de *ALS4*. Línea 1: Control Positivo (*C. albicans* ATCC ATCC 32354). Línea 2: Control Negativo (sin DNA). Líneas 3-10 *ALS4* de *C. albicans* aisladas de pacientes. Línea 11: MWM (50pb ladder).

#### **7.4 Asociación de los genes de la familia ALS en las cepas de *Candida albicans* analizadas**

En la tabla 5 se aprecia que 34 (68%) cepas de *C. albicans* presentaron la asociación de 4 genes de la familia ALS y 8 (16%) cepas presentaron 3 genes.

<b>Asociación de los genes de ALS</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>ALS1/ALS2/ ALS3/ ALS4</i>	34	68%
<i>ALS1/ALS3 /ALS4</i>	8	16%
<i>ALS1/ALS3/ALS4</i>	2	4%
<i>ALS2/ALS3</i>	1	2%
<i>ALS2/ALS4</i>	1	2%
<i>ALS3/ALS4</i>	1	2%
<i>ALS4</i>	2	4%
<i>ALS2</i>	1	2%

Tabla 5. Asociación de los genes de la familia ALS en las cepas de *C. albicans*

## **VIII. DISCUSIÓN**

### **8.1 Pacientes estudiados**

Para el desarrollo de este trabajo nosotros analizamos un total de 50 cepas de *Candida* spp aisladas de un grupo de pacientes (29 mujeres y 21 hombres) (Gráfica 1), con una edad comprendida en el intervalo de 19-70 años, que habían acudido al servicio de Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI Iztacala, por presentar signos y síntomas de candidosis oral (n = 40) y vaginal (n = 10) (Gráfica2). Se ha reportado que la candidosis orofaríngea es una infección oportunista que afecta a pacientes que se encuentran debilitados por enfermedades como diabetes mellitus, tuberculosis, absceso amibiano hepático, cateterismo, por el uso de antibióticos de amplio espectro, o a pacientes inmunocomprometidos por leucemia, SIDA, cáncer y por administración de drogas inmunosupresivas después del trasplante de órganos (Law et al., 1994; Maksymiuk et al., 1984.). El elevado porcentaje de cepas de *Candida* aisladas de la orofaringe de nuestros pacientes no inmunocomprometidos (gráfica 2) corrobora al de un estudio en el cual se determinó la susceptibilidad de 3 antimicóticos en 80 cepas de *Candida albicans* aisladas de la orofaringe de pacientes, dentro de los cuales el 67.5% (n = 54) fueron recuperadas de mujeres y el 32.5% (n = 26) de hombres (Paniagua et al., 2002).

La candidosis vaginal forma parte de los 12 principales motivos de consulta en medicina familiar del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Velasco 1999; Oviedo et al., 2004), tan solo en el periodo de tiempo de 1991 a 2002, la candidosis vaginal se ubicó entre los 20 principales diagnósticos en el primer nivel de atención, representando el 38 % de las consultas a mujeres de 20 a 59 años (División Técnica de Información Estadística en Salud 2003). En el 2004, la candidosis vulvovaginal en la Unidad de Medicina Familiar 53 del IMSS del estado de Guanajuato, en donde existen adscritas 39,814 mujeres de 15 a 49 años, se situó en el décimo tercer lugar de los principales motivos de consulta (Sistema de Información Integral para la Salud 2004). Dentro de la etiología de las cervicovaginitis, 22.6 % de los casos son producidos por *Gardnerella vaginalis*, 19.1 % por *Candida* spp, 7.8 % por *Candida albicans* y 1.5 % por tricomonas. Durante el embarazo, las cervicovaginitis se asocian en 11.5 % con el parto pretérmino y en 11.6 % con ruptura prematura de membranas y como factor predisponente para esterilidad de origen tubárico y cáncer cervicouterino (Holzman et al., 2001; Beltrán et al., 2002; Flores et al., 2003)

La Norma Oficial Mexicana (NOM-039-SSA2-2000) para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual

caracterizadas por flujo vaginal, ha especificado los criterios de diagnóstico y tratamiento para uretritis, cervicitis e infecciones vaginales que se relacionan con la presencia de tricomonas, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y en ocasiones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (Secretaría de Salud, 2000). Dichos criterios señalan que el diagnóstico se realiza por el antecedente de contacto sexual o presencia de signos y síntomas claves como flujo vaginal, prurito vulvar, disuria y mal olor, lo cual se debe confirmar a la exploración con espejo y tacto vaginal. La detección se realiza en el laboratorio mediante examen en fresco del exudado vaginal y tinción de Gram y la confirmación por cultivo e inmunofluorescencia, según corresponda. La secreción blanca, grumosa y pH > 4.5 al examen en fresco es sugerente de infección por *Candida albicans*; si la secreción es verde y mal oliente orienta a tricomonas o bacterias (Secretaría de Salud, 2000). La misma norma oficial mexicana ha señalado que el esquema de tratamiento para *Candida albicans* es itraconazol o clotrimazol.

## **8.2 Identificación de *Candida albicans* por PCR multiplex.**

Con el propósito de identificar las especies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicales*, nosotros utilizamos un método de PCR multiplex que incluyó 10 pares de oligonucleótidos (Luo & Mitchell, 2002) (tabla 2). El 100% de las cepas recuperadas

de la candidosis oral y vaginal correspondieron a la especie de *Candida albicans* (fotografía 1). *Candida albicans* es el hongo patógeno aislado con mayor frecuencia de las infecciones superficiales y sistémicas de los pacientes. Durante las dos décadas pasadas, las infecciones humanas por levaduras se han incrementado dramáticamente, debido a una gran variedad de factores, como el empleo de antibióticos de amplio espectro, el empleo de drogas inmunosupresoras, el empleo de dispositivos intravasculares, y a una supervivencia más larga de neonatos e individuos inmunocomprometidos (Barchiesi et al., 1994). Se ha reportado que la *C. albicans* es la especie aislada con más frecuencia en muestras de pacientes con candidosis vaginal aguda alcanzando una frecuencia del 87.5% en Argentina (Saporiti et al., 2001) del 87.9% en Austria (Paulitschet et al., 2006) y del 60% en Brasil (Lopes et al., 2004). Se han identificado otras especies de *Candida* en las infecciones vulvovaginales, por ejemplo en un estudio realizado en el Hospital Juárez de México, se aisló *C. glabrata* en el 35.9% de las pacientes, *C. albicans* en el 39% y *C. tropicales* en el 16.2%, de un total de 631 aislamientos (Rivera et al., 2006).

### **8.3 Detección de la familia ALS de *C. albicans* por PCR**

En este estudio nosotros describimos que dentro de la familia *ALS*, el gen que se identificó con mayor frecuencia en las cepas de *C. albicans* recuperadas de los pacientes con candidosis fue *ALS4* con el 96% (n = 48), seguido de *ALS3* con el 94% (n = 47), *ALS1* con el 74% (n = 37) y *ALS2* con el 68% (n = 34) (fotografía 2, 3, 4 y 5). Los genes de la familia *ALS* fueron descritos por primera vez en cepas de *C. albicans* (Hoyer et al. 1995), y poco después se describió que podrían existir distintos patrones de expresión de los genes de la familia *ALS* asociados con las distintas formas de candidosis (oral, vaginal o sistémica) (Hoyer en el 2001). En los últimos años se ha tratado de establecer cuales son los genes de la familia *ALS* que se expresan como proteínas de adhesión en las distintas candidosis, para lo cual Grenn y cols (2004) estudiaron la expresión por PCR en Tiempo Real de la familia *ALS* en un modelo de candidosis oral, utilizando células de epitelio reconstituido humano (RHE). Estos autores demostraron que los genes que se expresaron con mayor frecuencia durante la infección y destrucción del epitelio fueron *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5* y *ALS9*. El estudio de los marcadores de virulencia de *C. albicans* involucrados en la adhesión celular, se ha estudiado en otros tipos de candidosis, así Cheng et al., (2005) estudiaron la expresión por PCR RT de la

familia *ALS* en cepas de *Candida albicans* aisladas de fluidos vaginales y en un modelo de candidiasis vaginal. Estos autores describieron que los genes expresados con mayor frecuencia fueron *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS9*.

El número de copias de secuencias repetidas del Tandem de *ALS* varía entre las *C. albicans* y a menudo entre los alelos de la misma cepa. Debido a que los alelos de *ALS* pueden codificar proteínas diferentes con distintas características funcionales, resulta importante definir la variabilidad alélica de los genes *ALS*, para lo cual Zhao et al., (2007) analizaron la variabilidad alélica de *ALS5* y *ALS6* en una colección de cepas de *C. albicans* aisladas de diferentes zonas geográficas. Estos de *ALS5* presentaron de 2-10 copias de secuencias repetidas del tandem (media= 4.82 copias) mientras que los alelos de *ALS6* presentaron de 2-8 copias (media = 4.00 copias).

La participación de las distintas proteínas *ALS* en las distintas candidosis, es un tema que actualmente se está tratando de clarificar, al igual que el de otra familia de genes llamada *SA* (proteínas aspártico secretorias), por ejemplo Nas et al., (2008) cuantificaron la expresión de los genes *ALS1*, *Hwp1* y *SAP4* en cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres con vaginitis. La

expresión de *ALS1*, *Hwp1* y *SAP4* fue encontrada en el 69, 62 y 38%, respectivamente.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. En las infecciones orales y vaginales de los pacientes no inmunocomprometidos se encontró asociado el hongo del género *Candida* spp.
2. El total de las cepas aisladas de los pacientes infectados correspondieron a la especie *C. albicans*.
3. La mayoría de las cepas de *C. albicans* analizadas presentaron los genes *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS4*.
4. La distribución de los marcadores de virulencia involucrados en la adhesión celular en las cepas de *C. albicans*, evidenció la elevada patogenicidad del microorganismo, por lo que fue necesario iniciar inmediatamente la prescripción del tratamiento médico correspondiente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barchiesi, F., A.L. Colombo, D.A. McGough, A.W. Fothergill, and M.G. Rinaldi. 1994. In vitro activity of new antifungal triazole, D0870, against *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2553-2556.
2. Beltrán MJ, Ávila VMA, Valdillo OF, Hernández GC, Peraza GF, Olivares MS. 2002. Infección cervicovaginal como factor de riesgo para parto pretérmino. *Ginecol Obstet Mex.* 7:203-209.
3. Castrillón RLE, Ramos PA, Degarenes PC. 2004. Reacción inmunológica en infecciones por *Candida* spp. *Dermatología Rev Mex.* 48:140-150.
4. Castrillón RLE, Ramos PA, Desgarenes PC. 2005. Factores de virulencia de *Candida* ssp. *Dermatología Rev Mex.* 49:12-27.
5. Cheng G, Wozniak K, Wallig AM, Fidel LP, Trupin SR, Hoyer LL. 2005. Comparison between *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression Patterns in Human Clinical Specimens and Models of Vaginal Candidiasis. *Infect. Immun.* 73:1665-1663.

6. Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. 2006. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eucariotic Cell*. 5:180-191.
7. Cutler JE. 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 45:187–218.
8. División Técnica de Información Estadística en Salud. 2003. Motivos de consulta en medicina familiar en el IMSS 2002. *Rev Med IMSS*. 41:441-448.
9. Dorko E, Baranová Z, Jencá A, Kizek P, Pilipcinec E, Tracikova L. 2005. Diabetes mellitus and candidiasis. *Folia Microbiol*. 50:255-262.
10. Ferrer J. 2000. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet*. 71(Suppl 1):S217.
11. Fidel P, Cutrigh J, Steele C. 2000. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 68:651-657.
12. Flores-Paz, Rivera-Sánchez R, García J, Arriaga M. Etiología de la infección cervicovaginal. México: *Salud Publica Mex* 2003;45(Supl 5): S694-S697)
13. Foxman B, Marsh JV, Gillespie B, Sobel JD. 1998. Frequency and response to vaginal symptoms among white

- and African American women: results of a random digit dialing survey. *J Womens Health*. 7:1167–1174.
14. Furneri PM, Corsello S, Masellis G, Salvatori M, Cammarata E, Roccasalva LS, Mangiafico A, Tempera G. 2008. Econazole-polycarbophil, a new delivery system for topical therapy: microbiological and clinical results on vaginal candidiasis. *J Chemother*. 20: 336-340.
  15. Gaur NK, Klotz SA. 1997. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun*. 65;5289-5294.
  16. Green BC, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum AM, Hoyer LL. 2004. RT-PCR detection of *Candida albicans* *ALS* gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiol*. 150: 267-275.
  17. Holzman C, Leventhal JM, Qiu H, Jones NM, Wang J. 2001. Factors linked to bacterial vaginosis in nonpregnant women. *Am J Public Health*; 91:1664-1670;
  18. Hoyer LL. 1998. Identification of *Candida albicans* *ALS2* and *ALS4* and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol*. 180: 5334–5343.

19. Hoyer LL. 1995 *Candida albicans* ALS1:domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol. Microbiol.* 15;39–54.
20. Hoyer LL. 2001. Characterization of agglutininlike sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics.* 9:176-180.
21. Hoyer LL. 2001b. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9;176-180.
22. Jawet E, Melnick JL, Alberg EA; Brooks GF, Batel J, Ornston LN. 1996. *Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno, 20<sup>a</sup> Ed.* 675-677.
23. Kapteyn JC. 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol.* 35;601–611.
24. Law, D., C.B. Moore, H.M. Wardle, L.A. Ganguli, M.G. Keaney and D.W. Denning. 1994. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:659-668.
25. Lopes Consolaro ME, Aline Albertoni T, Shizue Yoshida C, Mazucheli J, Peralta RM, Estivalet Svidzinski TI. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with

- vulvovaginal candidiasis in Maringa, Parana, Brazil. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 202-205.
26. Luo Guizhen, Mitchell GT. 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 40:2860-2865.
  27. Maksymiuk, A.W, S. Thongprasert, R. Hopfer, M. Luna, V. Fainstein and G.P. Bodey. 1984. Systemic candidiasis in cancer patients. Am. J. Med. 77: 20-27.
  28. Martínez O, Saldaña GJ, Sánchez HMA. 2007. Criterios para el diagnóstico de cervicovaginitis aplicados en el primer nivel de atención. Correlación con la norma oficial mexicana. Rev Med IMSS. 45: 249-254.
  29. Moreira D, Paula CR. 2006. Vulvovaginal candidiasis. Internat J Gynecol Obstet. 92:266-267.
  30. Nas T, Kalkanci, Fidan I, Hizel K, bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E. 2008. Expression of *ALS1*, *HWP1* and *SAP4* genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. Folia Microbiol.:2;179-183.
  31. Odds FC. 1994. *Candida* species and virulence. ASM News. 60:313-318.
  32. Oviedo-Morales MA, Reyes-Morales H, Flores HS, Pérez CR. 2004. Fundamentos de las guías clínicas basadas en

- evidencia. En: Reyes MH, Pérez Cuevas R, Trejo y Pérez JA, editores. Guías de práctica clínica para medicina familiar. México: El Manual Moderno. 9-13.
33. Paniagua CG, Monroy PE, Negrete AE, Vaca PS. 2002. Susceptibility to 5-Fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from the throat of non-AIDS patients. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44:65-68.
34. Paulitsch A, Weger W, Ginter-Hanselmayer G, Marth E, Buzina W. A 5-year (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. *Mycoses* 2006; 49: 471-475.
35. Reed BD. 1992. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol Surv* 47:551- 560.
36. Rivera-Sanchez R, Flores Paz R, Arriaga Alba M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 634-636.
37. Saporiti AM, Gomez D, Levalle S, Galeano M, Davel G, Vivot W, Rodero L. Candidiasis vaginal: etiología y perfil de sensibilidad frente a agentes antifúngicos de uso clínico. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 217-222.

38. Secretaría de Salud. Proyecto de Norma Oficial Mexicana, para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual. PROY-NOM- 039-SSA2-2000. Disponible en [http:// www.salud.gob.mx/conasida/eventos/nomsida/ its.pdf](http://www.salud.gob.mx/conasida/eventos/nomsida/its.pdf).
39. Sistema de Información Integral para la Salud (SIAS). 2004. Principales motivos de Consulta, Unidad de Medicina Familiar 53, México, IMSS.
40. Sobel JD, Faro S, Force RW. 1998. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol*.178:203-211.
41. Sobel JD. 1999. Vulvovaginitis in healthy women. *Compr Ther*. 25:335 46.
42. Velasco-Murillo V, Pozos-Cavanzos JL, Cardona- Pérez JA. 1999. Enfermedades infecciosas del cérvix uterino, vagina y vulva: prevención, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med IMSS*. 37: 185-191...
43. Zhao X, Hwan OS, Jajko R, Diekema JD. 2007. Analysis of *ALS5* and *ALS6* allelic variability in a geographically diverse collection of *Candida albicans* isolates. *Fungal Genetics Biology*. 44:1298–1309.