



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR  
PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL  
GEN ADH1 DE *Candida albicans***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

**LUNA MARTÍNEZ MIRYAM**

ASESORES: Dra. MARÍA LEONOR QUINTERO MORA  
Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **DEDICATORIAS**

### **A DIOS**

Le agradezco a Dios por permitirme llegar hasta este punto de mi vida, por guiar mis pasos y darme la dicha de obtener una profesión como química farmacéutica bióloga, y que por siempre me guie para realizar lo correcto y no defraudar a mis seres queridos.

### **A MIS PADRES**

A mis padres por aguantarme y ayudarme a culminar este sueño que empecé hace mucho tiempo, porque sin ellos no hubiera sido posible esto.

### **A MI HERMANA**

Le dedico este trabajo a mi hermana Elena porque siempre ha estado incondicionalmente conmigo apoyándome y ayudándome. Te quiero mucho hermana!

### **A MI HIJO**

El día de hoy le puedo dedicar este trabajo a mi hijo Gabriel, que si bien no estaba conmigo cuando empecé este sueño, hoy ha sido mi máxima fuerza y esperanza para culminar este sueño y porque es lo que más amo en la vida.

### **A MIS AMIGAS**

A mis amigas como Dulce, Miriam, Alma Fabiola, Hortesia, Olivia, Bety y Alondra que compartieron el mismo sueño que yo, y que son las que vivieron conmigo todos esos días de alegría tristeza, desesperanza y emoción. Y a Ericka que aunque no estuvo en la universidad conmigo y que a pesar de la distancia ha estado a mi lado y a la que estimo y quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco a Dios por ser mi sostén espiritual, por darme la fuerza y la inteligencia para finalizar mi sueño y a mis padres Antonio y Paula que me han ayudado a terminar este sueño, que sin ellos no hubiera podido terminar.

Pero en especial a mi madre porque ella mejor que nadie sabe lo que padecí para llegar a terminar mi sueño, que siempre fue la persona que me escuchaba, aconsejaba y que también lloraba con migo. No tengo palabras para decirle lo agradecida que estoy con ella porque no solo ha estado en esto con migo sino porque está en cada momento sea bueno, malo ó difícil. Te quiero mucho mamá!

A los doctores Leonor y Gerardo les estoy muy agradecida por permitirme trabajar y brindarme la confianza de trabajar con ustedes. Por proveerme de sus conocimientos y por ayudarme a ser lo que hoy soy. De todo corazón

Gracias.

# INDICE

	<b>PÁGINAS</b>
<b>RESUMEN</b>	4
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. <i>Candida albicans</i></b>	<b>5</b>
1.1 Composición de la pared celular	7
1.2 Candidiasis	7
1.3 Factores de virulencia	11
1.3.1 Patogenia	11
1.3.2 Dimorfismo	12
1.3.3 Enzimas	12
1.3.3.1 Proteasas	12
1.3.3.2 Fosfolipasas	13
1.3.3.3 Lipasas	13
1.3.4 Adhesinas	14
1.3.4.1 Als	10
1.3.4.2 Hwplp	15
1.3.4.3 Intlp	15
1.3.4.4 Mntlp	15
1.3.5 Formación de biopelículas	16
<b>2. GEN ADH1 (ALCOHOL DESHIDROGENASA 1)</b>	<b>17</b>
<b>3. EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN ADH1 SOBRE <i>Candida albicans</i></b>	<b>19</b>
<b>4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: Principios básicos</b>	
4.1 Reacción de la cadena de la polimerasa	20
4.2 Fundamento	21
4.3 Componentes de la PCR	22
4.4 Parámetros de la Reacción	23
<b>5 RT-PCR</b>	<b>25</b>
<b>6 Electroforesis en gel de agarosa</b>	<b>27</b>
6.1. Propiedades de los amortiguadores TAE y TBE	28
<b>7 GenBank</b>	<b>29</b>

7.1 Presentaciones de datos en el GenBank	30
7.2 Revisión de una secuencia del GenBank	30
7.3 Uso del GenBank	31
8. BLATS	31
9. Programa FASTA	32
10. Primer3	32
11. Analizador de Oligos	33
12 Oligo Calc	34
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>36</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Crecimiento de la levadura	38
Diseño de los iniciadores	38
Obtención de RNA	38
MÉTODO 1 Extracción de RNA con trizol	39
MÉTODO 2 RNAspin Mini Kit (GE)	40
MÉTODO 3 Extracción de RNA con cloruro de litio	42
Cuantificación de RNA	43
Electroforesis en gel de agarosa	43
RT-PCR (Síntesis de cDNA)	43
PCR para la amplificación del gen ADH1	44
Amplificación del gen de Actina1 de <i>Candida albicans</i> como control	44
<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>62</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>63</b>

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 4, Biología Celular y Morfología Veterinaria, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria y fue apoyado por los proyectos PACIVE:**

**CD-05 Mejoramiento de la enseñanza de la asignatura de Biología Celular.**

**GVC-10 Morfología Veterinaria y Biología Celular.**

# ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN ADH1 DE *Candida albicans*

## RESUMEN

*Candida albicans* es un microorganismo que forma parte de la microflora normal en cavidad oral, tracto gastrointestinal y vagina en individuos sanos, sin embargo puede provocar una gran variedad de infecciones que varían desde superficiales hasta septicemias principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

Conocer los factores de virulencia del microorganismo hace posible determinar, de manera más precisa, cómo se modifica la relación que establece con su huésped una vez que los mecanismos de resistencia se han deteriorado.

Los principales factores de virulencia asociados a *Candida albicans* se relacionan con su genotipo (secreción enzimática, expresión diferencial de genes en respuesta al ambiente, síntesis de adhesinas), fenotipo (dimorfismo, capacidad para formar biopelículas) según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del huésped [17]. El análisis de los genes que codifican para proteínas relacionadas con estos procesos (adhesinas e integrinas) así como otros genes implicados en la formación de biofilms y en la interacción con células del huésped ha tenido un gran auge en los últimos años.

En levaduras y bacterias la principal función de la ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1) es reducir a etanol el piruvato resultante de la glicólisis por medio de la producción de acetaldehído como intermediario bajo la siguiente reacción:  $\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} \rightarrow 2\text{ etanol} + 2\text{ CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$  [45, 52, 65]. De forma interesante, esta enzima que estaba asociada únicamente a reacciones metabólicas citoplasmáticas se ha relacionado en *C. albicans* con la capacidad de producir biofilms y se propone que puede jugar un papel importante en la adhesión a células del huésped [74].



Con la finalidad de profundizar en el papel que esta proteína desempeña en *Candida albicans*, en este trabajo se estandarizó la técnica de RT-PCR (transcripción reversa-PCR) para evaluar los niveles de expresión de este gen.

Inicialmente se compararon diferentes métodos de extracción de RNA evaluando la concentración, pureza así como la integridad obtenidas. Con ayuda del programa Primer3 se diseñaron dos juegos de iniciadores para amplificar distintas regiones del gen ADH1 de *C. albicans*. Finalmente, se estandarizaron las condiciones de PCR que nos permitieron evaluar los niveles de expresión del gen bajo diferentes condiciones.

Para demostrar que las condiciones seleccionadas eran las óptimas se evaluó la expresión diferencial del gen ADH1 de *C. albicans* crecida en presencia de extracto etanólico de propóleo, el cual, previamente se había demostrado por medio de la técnica de despliegue diferencial que produce una subexpresión de este gen dependiente del tiempo y la dosis de exposición.

La estandarización de este método nos permitirá en trabajos futuros estudiar la regulación de la expresión del gen ADH1 bajo diferentes condiciones de crecimiento de la levadura relacionándolo con el proceso de infección y como un posible blanco para el diseño de nuevos antifúngicos.

## INTRODUCCIÓN

### 1. *Candida albicans*

El género *Candida* está dentro de la familia *Saccharomycetaceae*, clase *Saccharomycetes*, Filo *Ascomycota*, Reino *Fungi* [61,67]. Las especies presentes con mayor frecuencia en infecciones humanas son *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* [27, 57].

Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. La forma filamentosas del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical. La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica [8, 30, 69].

## 1.1 Composición de la pared celular

Aproximadamente del 80 al 90% de la pared celular de *C. albicans* son hidratos de carbono. Tres componentes básicos representan los principales polisacáridos de la pared celular: los polímeros de glucosa ramificados con uniones 1,3- $\beta$  y 1,6- $\beta$  ( $\beta$ -glucanos), polímeros no ramificados de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), con enlaces 1,4- $\beta$  glucano-quitina, y polímeros de manosa (mananos) covalentemente asociados con las proteínas (glicoproteínas y manoproteínas). Además, la pared celular contiene proteínas (de un 6 a un 25%) y pequeñas cantidades de lípidos (1 a 7%). Los polímeros microfibrilares ( $\beta$ -glucanos y quitina) representan los componentes estructurales de la pared, ellos forman un esqueleto rígido que proporciona fuertes propiedades físicas de la célula. Desde un punto de vista cuantitativo, los  $\beta$ -glucanos son el constituyente principal, con un 47 a 60% en peso de la pared celular. La quitina presenta menor cantidad (0,6 a 9%), sin embargo, es un importante componente de la pared celular de *C. albicans*. Por otra parte, los polímeros de manosa (mananos), no existen como tal sino que se encuentran en asociación covalente con proteínas (manoproteínas) y representan alrededor del 40% del total de polisacáridos siendo el material principal de la matriz de la de la pared celular. El término "manano" se ha utilizado también para referirse a los principales componentes inmunodominantes solubles presentes en la capa de la pared celular externa de *C. albicans*, llamados fosfomanoproteínas o complejos fosfopeptidomananos. Esta fracción de la pared celular contiene homopolímeros de D-manosa (como el componente principal), proteína de 3 a 5%, y 1 a 2% fosfato [6, 8, 16, 26, 28, 52, 71, 83].

## 1.2 Candidiasis

La candidiasis es una infección primaria o secundaria causada por un miembro del género *Candida*. La enfermedad es causada generalmente por *Candida albicans*, las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variadas, desde aguda, subaguda y crónica a episódica. Su nivel de profundidad o sistematización no depende tanto del agente etiológico en sí, sino del factor predisponente con el que se asocia. También se le conoce como candidiasis, moniliasis, muguet, algodoncillo, blastomicosis. Las variedades clínicas

que se presentan, se muestran en el cuadro 1[8, 30, 43, 69, 71, 80].

**Cuadro 1. Diferentes tipos de Candidiasis según su localización [8].**

CANDIDIASIS	TIPO CLÍNICO	CARACTERISTICAS	CUADRO CLÍNICO
MUCOCUTANEA	<p><i>Oral</i></p> <p><i>Genital</i> a) Vaginitis candidósica b) Balanitis o balanopostitis</p> <p><i>Gastrointestinal</i> a) Esofagitis b) Gastritis c) Peritonitis</p> <p><i>Respiratorias</i> a) Broncopulmonar b) Pulmonar</p>	<p>Es frecuente en niños recién nacidos por su bajo pH, y se obtiene por un fuerte inóculo de la madre a través del canal del parto, sobre todo cuando ésta ha presentado candidiasis vaginal en el último tercio del embarazo. En los adultos se manifiesta en diabéticos o posteriores a tratamientos antibacterianos prolongados.</p> <p><b>a)</b> Es la infección más frecuente, recurrente y molesta que afecta el aparato genital de la mujer, se presenta normalmente en la edad productiva, aunque es posible verla en niñas recién nacidas, esto es atribuible por los altos niveles hormonales heredados de la madre y a la colonización de las mucosas durante el parto.</p> <p><b>b)</b> La mayor parte de los casos provienen de relaciones sexuales con la pareja que cursa con vaginitis por <i>Candida</i>. Es también frecuente en pacientes diabéticos o inmunosuprimidos.</p> <p><b>a)</b> Proviene por lo regular de la candidiasis oral, es común en pacientes leucémicos, diabéticos descompensados, etc.</p> <p><b>b)</b> Esta entidad es extraordinariamente rara debido al pH ácido que tiene el estómago y solamente se presenta en candidiasis generalizadas.</p> <p><b>c)</b> Por la abundante colonización de <i>Candida</i> en intestino, la entidad se puede asociar a pacientes con úlceras o con frecuente es la diarrea, que fácilmente se confunde con cuadros parasitarios (amibiasis).</p> <p><b>a)</b> Es una enfermedad crónica y frecuente en pacientes inmunodeprimidos, se ha visto en niños con fibrosis quística.</p> <p><b>b)</b> Es menos frecuente que la bronquial, su curso es más agudo y grave. Habitualmente se caracteriza por ataque al estado general del paciente, y casi siempre se asocia con padecimientos o enfermedades que abaten severamente a al respuesta inmune.</p>	<p>La sintomatología más común es ardor y dolor, que por lo general impiden la alimentación sobre todo en los niños.</p> <p><b>a)</b> Se presenta con abundante exudado blanquecino (leucorrea), espeso, grumoso, no fétido. La mucosa generalmente se encuentra eritematosa, inflamada y las pacientes refieren intenso prurito y ardor vulvar. A nivel de la vagina existen leucoplasmas de bordes definidos, con fondo eritematosos; cuando el cuadro se hace crónico la leucorrea tiende a desaparecer, para quedar con ardor.</p> <p><b>b)</b> El cuadro clínico característico es el de una balanitis superficial, constituida por eritema, micropústulas, erosiones y fisuras; pueden presentarse leucoplasmas a través de todo el glande y surco balano-prepucial. En raros casos puede afectar el epitelio uretral, o bien extenderse a escroto y región inguinocrural, sobre todo cuando se emplea corticoterapia.</p> <p><b>a)</b> A la esofagoscopia se observan placas blanquecinas similares a las orales, con fondo eritematoso. La sintomatología más frecuente es: disfagia, náuseas y vómitos; los pacientes refieren ardor y dolor que dificultan la alimentación.</p> <p><b>b)</b> El mayor número de casos se observan en autopsias, la morfología característica es de placas blanquecinas de fondo eritematoso y pequeñas úlceras.</p> <p><b>a)</b> No afecta el estado general del paciente y se caracteriza por la presencia de tos constante con expectoración mucoide o gelatinosa. La parasitación se presenta en todo el árbol bronquial y en ocasiones genera cuadros de hipersensibilidad inmunológica.</p> <p><b>b)</b> El cuadro clínico está constituido por abundante tos con expectoración mucoide y sanguinolenta, disnea, dolor torácico y febrícula nocturna. Se puede afectar dos o más lóbulos del pulmón y en ocasiones cursa con derrame pleural; a la exploración física es posible escuchar algunos estertores.</p>

CANDIDIASIS	TIPO CLÍNICO	CARACTERÍSTICAS	CUADRO CLÍNICO
CUTANEA	<i>Muco cutanea-crónica</i>	Esta variedad casi es exclusiva de niños con ciertos desórdenes genéticos, defectos en la función del timo, que por lo general conllevan a alteraciones a nivel de la inmunidad celular.	Las lesiones se presentan en todo el cuerpo y mucosas; en piel pueden ser granulomatosas. Esta entidad es difícil de curar.
	<i>Intertrigos</i>	<i>Candida albicans</i> y otras especies por lo regular no forman parte de la flora habitual de piel, debido a esto la candidiasis cutánea es más rara que la de mucosas; influyen algunos factores para que se presente, como son maceración y humedad de la piel.	
	<i>Onicomycosis</i> a) Con perionixis b) Con onicólisi	<b>a)</b> Es la forma más común (70%), y a diferencia de la tiña de las uñas, se inicia en el borde proximal o lateral; se presenta con inflamación alrededor de la uña (perionixis), dando una zona eritematosa; los pacientes refieren escaso prurito y dolor a la palpación. <b>b)</b> Es la segunda variedad y menos frecuente (30%), se inicia por el borde libre provocando el desprendimiento de la uña (onicólisis) de manera que uno puede introducir fácilmente el bisturí. La uña se hace opaca y estriada.	
	<i>Del área del pañal</i>	Se origina a partir de la dermatitis del área del pañal, debido a que la orina mantiene húmeda esta zona, además se genera irritación de la piel, porque la urea al degradarse se transforma en amoníaco, sustancia sumamente alcalina. Esta entidad es favorecida por el uso de múltiples pomadas, sobre todo con esteroides que provocan una rápida colonización en regiones glúteas, genitales e inguinales.	
	<i>Pustulosis cutánea</i>	Es una entidad nueva y rara, que se presenta sobre todo en pacientes adultos jóvenes adictos a las drogas, en particular las administradas por vía parenteral como la heroína.	Es habitual en barba, cuero cabelludo y axilas, donde aparecen lesiones pustulosas y/o nodulares. Se cree que <i>Candida</i> penetra por vía exógena, por el uso de jeringas no estériles, posteriormente se disemina a piel.
<i>Granuloma</i>	Es una variedad rara, se observa sobre todo en niños como severos defectos de la inmunidad celular y en adultos con diabetes mellitus descompensada.	Las lesiones se pueden presentar en cualquier parte de la piel dando lesiones verrucosas, vegetantes que se ulceran. A la histopatología se observa un claro proceso de granuloma tuberculoide.	

CANDIDIASIS	TIPO CLÍNICO	CARACTERÍSTICAS	CUADRO CLÍNICO
<b>SISTÉMICA O PROFUNDA</b>	<i>Tracto urinario</i>	<p>Se asocia sobre todo en pacientes con corticoterapia, diabéticos y cateterismo. Es más frecuente en mujeres (5:1). El tracto urinario se ve afectado en forma de placas blanquecinas y en pocas ocasiones puede llegar hasta riñón produciendo una pielonefritis.</p>	<p>Se puede presentar fiebre moderada, soplos, esplenomegalia y tienen gran tendencia a la embolia. Su diagnóstico es difícil y debe realizarse por el aislamiento del hongo en sangre (hemocultivos), así como de algunas pruebas serológicas.</p> <p>La meningitis candidosica es similar a la bacteriana y se presenta con intensa cefalea, rigidez de nuca, fiebre intermitente. Los pacientes refieren vértigo, estupor y pueden llegar fácilmente al estado de coma.</p> <p>Su sintomatología es bastante vaga, presentándose al estado general, fiebre y escalofríos; se confunde fácilmente con septicemias bacterianas.</p>
	<i>Endocarditis</i>	<p>Es común en drogadictos heroínómanos que se administran la droga por vía parenteral con jeringas no estériles; en pacientes con cateterismo crónico, que dan paso a la candidiasis y posteriormente a la afección cardiaca, y últimamente se ha observado en pacientes con cirugía cardiaca.</p>	
	<i>Meningitis</i>	<p>Son raras y casi siempre comunes en pacientes leucémicos, diabéticos o tratados con corticoesteroides sistémicos.</p>	
	<i>Septisemia</i>	<p>Es una entidad rara, propia de pacientes severamente inmunosuprimidos.</p>	

### **1.3 Factores de virulencia**

*Candida albicans* tiene varios factores de virulencia para colonizar al huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo. Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del huésped. El delicado equilibrio entre este último y el hongo patógeno puede convertirse en una relación parásita y resultar en enfermedad grave. Existen diversos factores potenciales de virulencia, como la morfología celular, la actividad enzimática extracelular, el cambio fenotípico y los factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas. A continuación se describen, de manera independiente y breve cada uno de ellos [16, 60].

#### **1.3.1 Patogenia**

La candidiasis es una enfermedad oportunista que requiere forzosamente de factores predisponentes, la mayoría de las veces se origina de manera endógena, casi siempre atribuible a dos procesos:

- a) Por el desequilibrio de la flora microbiana, que hace que se incremente la presencia de levaduras como *Candida*, esto se puede deber a cambios de pH, acúmulos de nutrientes como el glucógeno o por disminución de la flora bacteriana por antibióticos.
- b) Por enfermedades o procesos que influyen en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos en polimorfonucleares (PMN) y células T y B.

Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras, por ejemplo por cateterismo o drogadicción ya que los microorganismos se inoculan directamente al torrente circulatorio [8].

### **1.3.2 Dimorfismo**

Los términos "dimorfismo" y "hongo dimórfico", implican que el hongo puede presentar dos morfologías distintas, sin embargo, en *Candida albicans* la morfología va de la forma ovoide de las blastoconidias (levadura) a hifas, por lo que podría considerarse un organismo polimórfico ya que se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa o pseudohifa. La pared celular es la estructura responsable en última instancia de una morfología determinada. *C. albicans* puede reproducirse por gemación, dando lugar a la formación de células levaduriformes (también denominadas blastosporas o blastoconidias). Bajo ciertas condiciones no óptimas de crecimiento, *C. albicans* forma clamidosporas, de forma redonda, las esporas refringentes con una pared celular gruesa. Estas transiciones morfológicas a menudo representan una respuesta del hongo al medio ambiente y para adaptarse a diferentes nichos biológicos. La transición de un comensal a un estilo de vida patógeno también puede involucrar cambios en las condiciones ambientales y la dispersión en el huésped humano [14, 15, 16].

### **1.3.3 Enzimas**

Las enzimas tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, le permiten introducirse a la célula huésped. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas [14, 16, 91].

#### **1.3.3.1 Proteasas**

En *Candida albicans* se han descrito varios miembros de una gran familia de enzimas de secreción aspartil proteasas (SAP), que han sido bastante estudiadas en estos hongos. En particular, las aspartil proteasas secretadas (SAPs) son codificadas por los genes de la familia SAP, cuenta con diez miembros y está regulada diferencialmente; además, sus



distintos miembros se expresan bajo una variedad de condiciones de crecimiento de laboratorio y durante las infecciones experimentales *in vivo* e *in vitro*. La contribución de las SAPs a la patogénesis de *Candida albicans* se ha demostrado con el uso de mutantes e inhibidores de proteasas. La presencia de los genes de la familia SAP en *Candida albicans* proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista. Se ha demostrado que SAP1-3 y SAP6 son importantes en la infección oral, mientras que SAP1 y SAP2 lo son en la candidiasis vaginal. El papel de dichas enzimas es esencial en las infecciones de mucosas en las fases iniciales, pero no cuando el hongo es infiltrado en los vasos sanguíneos. Asimismo, hay pruebas clínicas que correlacionan la secreción de estas enzimas con la candidiasis vaginal [9, 16, 21, 22, ].

### **1.3.3.2 Fosfolipasas**

Las fosfolipasas son enzimas secretadas que están relacionadas con la patogenia de *Candida albicans*. Se han identificado cuatro fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD), de las cuales sólo la PLB1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia en modelo animal de candidiasis. Una cepa con la eliminación de este gen reduce su virulencia hasta en 60%, comparada con la cepa silvestre. La PLB1A es una glucoproteína de 84 kDa, que tiene actividad de hidrolasa y lisofosfolipasa transacilasa. Se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos [12, 13, 16, 17, 18, 33, 42, 87].

### **1.3.3.3 Lipasas**

Las lipasas secretadas por *Candida albicans* están codificadas por una familia de genes con al menos 10 miembros (LIP1-LIP10). El patrón de expresión fue investigado en infecciones experimentales y en pacientes que sufren candidiasis oral. Se ha demostrado que la expresión de esos genes depende del estado de infección, más que de la localización del órgano [12, 16, 17, 81].

### 1.3.4 Adhesinas

Otro importante factor de virulencia es la capacidad adherente de la levadura a las células del huésped. Las cepas adherentes de *C. albicans* son más patógenas que las que tienen fenotipo menos adherente [12, 16, 17].

Una adhesina es una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del huésped o a sus ligandos específicos. Se tienen descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV. Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p [12, 16, 17, 22, 82].

#### 1.3.4.1 Als

Los genes de la familia Als (del inglés agglutination- like secuencia) de *Candida albicans* codifican glucoproteínas grandes de la superficie celular que están relacionadas con el proceso de adhesión a las células del huésped. Estos genes también se encuentran en otras especies de *Candida* que fueron aislados de muestras clínicas [12, 16, 17, 41, 47].

La familia Als tiene características típicas de proteínas de secreción y un residuo carboxilo hidrofóbico terminal que se ancla a un glucosilfosfatidilinositol. El ligando de unión se asocia con el residuo amino terminal de la proteína. Las proteínas Als están densamente N- y O-glucosiladas, sobre todo en la región de repetición variable rica en serina/treonina y en los dominios carboxilo terminal [12, 16, 17].

Los genes Als se describieron primero en *C. albicans* y esta familia incluye, al menos, nueve genes. Cada gen Als tiene una estructura similar de tres dominios, incluyendo un dominio 5' de 1299 a 1308 pb, similar en 55 a 90% entre los componentes de la familia, un dominio central con un número variable de secuencias repetidas de 108 pb y un dominio 3' con una longitud relativamente variable entre los genes de esta familia. El dominio de

repetición variable incluye una secuencia interna de cinco aminoácidos: Val-Ala-Ser-Glu-Ser [12, 16, 17, 41, 47].

La expresión de los genes Als se ha analizado por inmunohistoquímica *in vivo* en tejidos de enfermedad diseminada en ratón. Con esta metodología se demostró que las proteínas Als se distribuyen en la superficie celular, más que en sitios específicos [41, 47].

#### **1.3.4.2 Hwp1p**

El gen Hwp1p (del inglés hyphal- and germ- tube specific gene) codifica una manoproteína de la superficie externa que se cree se orienta por su dominio amino terminal expuesto hacia el espacio extracelular. El carboxilo terminal se integra de manera covalente con el  $\beta$ -glucano de la pared celular. La proteína codificada por este gen (Hwp1p) sirve como sustrato de las transglutaminasas y, por lo tanto, la unión de la hifa de *C. albicans* a las células epiteliales de la boca debería ser estable, covalente y no revertirse por el uso de agentes que interrumpen la unión no covalente [12, 16, 17].

#### **1.3.4.3 Int1p**

El gen Int1p (putative integrin gene) de *Candida albicans* se une a varios ligandos de las proteínas de la matriz extracelular, con fibronectina, laminina y colágenas tipo I y IV. Las cepas en delección de los genes Int1 son menos virulentas o se adhieren con más lentitud a las líneas celulares epiteliales. También tienen deficiencias en la filamentación en su crecimiento en leche-tween y agar Spider, por lo tanto, el gen Int1 juega un papel importante en la adherencia y filamentación de *C. albicans* [12, 16, 17, 32].

#### **1.3.4.4 Mnt1p**

Las cepas mutantes de *C. albicans* en las que se han eliminado el gen  $\alpha$ -1,2 manosil transferasa (Mnt1) son menos capaces de adherirse *in vitro* y son avirulentas. La proteína(Mnt1p) que codifica a este gen es una proteína de membrana tipo II que se requiere

para la manosilación tanto O- y N- en el hongo. Su importancia radica en que los mananos son el principal constituyente de la pared celular como se había mencionado [10, 12, 16, 17].

### **1.3.5 Formación de biopelículas**

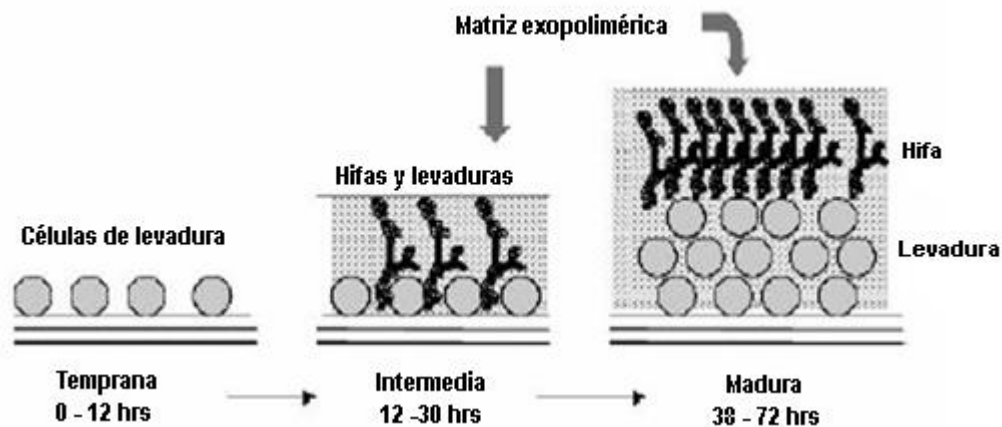
La aparición de *Candida albicans* como patógeno nosocomial es importante, ya que es un factor de riesgo asociado con los procedimientos médicos modernos, sobre todo con el uso de fármacos inmunosupresores o citotóxicos, de antibióticos potentes que suprimen la flora bacteriana normal y de los dispositivos implantados de varias clases. Casi siempre, los dispositivos, como catéteres intravasculares o urinarios y tubos endotraqueales, se asocian con infecciones y se detecta la formación de biopelículas en su superficie. Otros dispositivos, como válvulas cardíacas, marcapasos y reemplazos de articulaciones (cadera o rodilla), pueden ser infectadas por *Candida*, generalmente durante el tiempo de su colocación [2, 9, 12, 31, 46, 42, 54, 72].

La mayor capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas en estas superficies es la razón por la que esta especie es más patógena que otras como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr* que no tienen esta capacidad [12].

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos unidos irreversiblemente a una superficie con matriz exopolimérica y muestra propiedades fenotípicas distintivas. En las biopelículas, las células desarrollan características fenotípicas que son diferentes de sus contrapartes planctónicas (de flotación libre), como el incremento en la resistencia a los agentes antimicrobianos y la protección de las defensas del huésped [12, 46, 54, 55, 72]. La formación de biopelículas de *C. albicans* presenta diversas etapas como son la adhesión inicial de las células de levadura, seguida por la germinación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración.

La formación de biopelículas se manifiesta en tres etapas: temprana (0 a 11 horas), intermedia (12 a 30 horas) y madura (38 a 72 horas) (figura 1). La estructura detallada de

las biopelículas, después de 48 horas de incubación en catéter, consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas. Esta mezcla no se ha observado cuando el organismo crece en medio líquido (células planctónicas) o en una superficie de agar, lo que sugiere que la morfogénesis se dispara cuando un organismo hace contacto con la superficie y que las células de la capa basal pueden tener un papel importante en el anclaje de la biopelícula a la superficie [17, 35, 54, 72].



**Figura 1.** Fases de formación de biopelículas de *Candida sp in vitro*. La morfogenesis se activa cuando la levadura entra en contacto con la superficie y la capa de las células basales. Tiene un papel importante de anclaje de la biopelícula a la superficie, siguiendo el orden: adhesión temprana, crecimiento, proliferación y maduración. [17]

## 2. Gen ADH1

El gen ADH1, codifica para un polipéptido de 350 aminoácidos con función de alcohol deshidrogenasa. Presenta de un 70.5-85.2% de homología con las alcohol deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Schizosaccharomyces pombe* [5], además de que su presencia se extiende a una gran variedad de organismos incluyendo bacterias, hongos, mamíferos y plantas.

A pesar del papel que desempeña como alcohol deshidrogenasa en citoplasma, estudios recientes de proteómica la han identificado en la superficie celular, a nivel de pared y membrana [12, 16, 21]. Se ha agrupado a Adh1p dentro de las proteínas multifuncionales atípicas ya carece de un péptido señal que la dirija hacia retículo endoplásmico y posteriormente a Golgi y se desconoce el mecanismo por el cual llega hasta la superficie

celular, sin embargo, esta localización es compartida con bacterias y protozoarios donde ya se había mencionado que debe requerir de un mecanismo de secreción no convencional [22, 67, 85].

Se ha descrito que esta proteína puede desempeñar un papel importante en la interacción de los hongos con la célula huésped debido a su capacidad de unirse a proteínas de la matriz extracelular como integrinas y plasminógeno [20, 51, 52], además juega un papel inmunogénico durante las infecciones [83]. Otra de las funciones que desempeña es como protección contra el estrés oxidativo, encontrándose una sobre-regulación por respuesta a cadmio, sales y estrés [60].

El gen ADH1 presenta expresión diferencial en biopelículas bacterianas [3, 31] y se ha observado que bajos niveles de expresión en este gen incrementan la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas *in vitro* así como en un modelo de mucosa oral (EHOM) donde la mutante Adh1p mostró mayor capacidad para penetrar estos tejidos [74]. En estudios proteómicos se hacen comparaciones entre los niveles de expresión entre levaduras, hifas y biofilms y han demostrado que estos últimos presentan los niveles más elevados de la proteína [85].

En contraste con lo anterior, en un estudio realizado por Pranab K. et al, (2006) utilizando un enfoque proteómico, se demostró que la alcohol deshidrogenasa (ADH1p) presenta menores niveles de expresión en biopelículas de *Candida* en relación con las células planctónicas (cultivadas en suspensión). La mutante ADH1 o el uso de inhibidores específicos de la enzima (disulfiram o 4-metilpirazol) dan lugar a biopelículas más gruesas *in vitro*. Para demostrar la relevancia *in vivo* del papel de ADH1p en la formación de biopelículas para la práctica clínica, en el mismo estudio se evaluó la capacidad de la mutante para formar biopelículas en un modelo de catéter intravenoso colocado en rata, en el cual encontraron que la supresión de ADH1 también da como resultados un aumento en la formación de biopelículas *in vivo*. Por otra parte, se utilizaron ensayos *in vivo* para demostrar que el etanol inhibe la formación de biopelículas [70, 74].

### **3. EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN ADH1 DE *C. albicans*.**

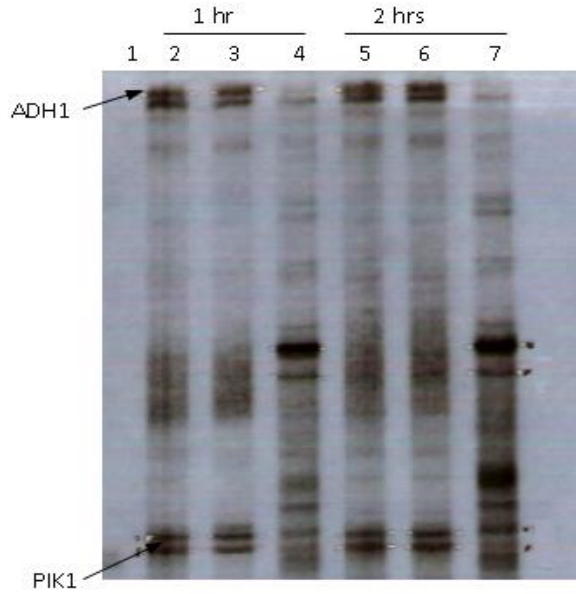
El propóleo es una sustancia resinosa que contiene una mezcla de polifenoles, incluyendo flavonoides aglicanos, ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos fenólicos y cetonas, así como azúcares, aminoácidos, vitaminas y una serie de oligoelementos. Es elaborada por las abejas para el control biológico sanitario y el sellado de paredes y celdillas en las colmenas. Se han reportado varias propiedades farmacológicas, tales como: bactericida, antiviral, hepatoprotectora, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antioxidativa y analgésica [1, 29, 34].

Diversos autores atribuyen la actividad antibacteriana y antifúngica del propóleo a la presencia de compuestos polares, principalmente fenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres) sugiriendo que el posible mecanismo de acción está dado por una inhibición de la replicación del ADN e, indirectamente, la división celular [84].

En trabajos previos realizados en el laboratorio se demostró que el extracto etanólico de propóleo, además de inhibir el crecimiento de *Candida albicans* [76], también inhibe la capacidad de la levadura de formar blastoconidias y presentar el cambio morfo genético, provocando además alteraciones a nivel de membrana y pared celular [86], lo cual coincide con lo descrito por D´Auria (2003), Mello (2006) y Londoño (en vías de publicación).

Debido a que consideramos que era muy probable que estos efectos fueran el producto de la expresión o no de ciertos genes relacionados con dichos procesos, utilizamos la técnica de despliegue diferencial con la finalidad de identificar los genes de *Candida albicans* afectados por la interacción con el EEP.

Uno de estos genes afectados fué ADH1, el cuál, en presencia del extracto sufrió una subexpresión dependiente de la dosis y tiempo de exposición (figura 2).



**Figura 2. Gel representativo del despliegue diferencial de *C. albicans* tratada con extracto etanólico de propóleo.** El RNA total de *C. albicans* fue aislado después de haber sido crecida en presencia de etanol al 70% (carriles 2 y 5), EEP a 0.3 mg/ml (carriles 3 y 6) y 0.6 mg/ml (carriles 4 y 7) por una 1 y 2 horas de exposición. Como se puede apreciar hay genes subexpresados (como ADH1 y PIK1), sobreexpresados y sin alteración.

Aún y cuando el objetivo de esta tesis no es evaluar el efecto del EEP sobre la expresión del gen ADH1, tomamos este modelo para demostrar que las condiciones de RT-PCR que se optimizaron permiten evaluar diferencias en los niveles de expresión de este gen al corroborar lo encontrado por la técnica de despliegue diferencial.



## 4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: PRINCIPIOS BÁSICOS

### 4.1 Reacción de la cadena de polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* la cual permite que una secuencia de DNA sea copiada (millones de copias). Además permite alterar el DNA al introducir enzimas de restricción en sitios específicos o hacer mutaciones al realizar cambios en las bases particulares de DNA. El método de PCR fue ideado por Kary Mullis y colegas de la Corporación CETUR en 1983. La PCR es el mayor desarrollo en el análisis de DNA. Esta reacción de amplificación es la base para una variedad de técnicas de secuenciación y etiquetado [37, 62].

### 4.2 Fundamento

La PCR no es una técnica analítica *per se*, sino más bien una metodología, resultante de la aplicación práctica de tres conceptos:

- 1.- Desnaturalización del DNA para dar hebras sencillas
- 2.- Hibridación específica de la hebra sencilla con un oligonucleótido. También se conoce como etapa de templado (disminución de la temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica, en inglés *annealing*).
- 3.- Replicación de la hebra sencilla por una DNA polimerasa a partir del oligonucleótido, también se conoce como elongación, extensión o polimerización.

Mediante la aplicación en forma cíclica de estos tres procesos se consiguen múltiples copias del fragmento de ácido nucleico en un corto espacio de tiempo [59].

Por lo tanto, se basa en la capacidad natural de la DNA polimerasa para replicar hebras de DNA en dirección 5' a 3', utilizando ciclos de alta y baja temperatura para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las polimerasas para duplicarlas [37, 62].

### 4.3 Componentes de la PCR

Los requisitos de la reacción son simples:

- i) Desoxinucleótidos (dNTP's) llevan a cabo la síntesis de nuevas cadenas de DNA, están presentes en gran exceso y deben ser añadidos en la reacción en concentraciones de 50 a 200  $\mu$ M de cada uno. [37, 62].
- ii) Iniciadores (también conocidos como iniciadores, cebadores u oligonucleótidos) uno antisentido (reverse) y otro con sentido (forward), son secuencias artificiales generalmente de 18 a 30 pares de bases (pb) complementarias al DNA molde y que sirven como el punto de anclaje para la DNA polimerasa, cada uno complementario a las cadenas opuestas de la región de DNA a amplificar delimitándola. Los iniciadores se organizan de modo que cada reacción de extensión el iniciador dirige la síntesis de DNA hacia el otro lado, por lo tanto el iniciador antisentido dirige la síntesis de una cadena de DNA que puede ser preparado por el iniciador con sentido y viceversa. Esto da lugar a la síntesis de *novο* de la región de DNA flanqueado por dos iniciadores [37, 62].
- iii) Magnesio, cataliza la reacción de la DNA polimerasa, así como también afecta el funcionamiento de esta enzima. La concentración de magnesio tiene un efecto en la especificidad y en el rendimiento de la amplificación. Generalmente el exceso de magnesio da como resultado la acumulación de productos de amplificación no específicos e insuficiente magnesio reduce el rendimiento de amplificación [37, 62].
- iv) Polimerasa, aun y cuando cualquier tipo de polimerasa tiene la capacidad de llevar a cabo la reacción es necesario considerar que va a estar sometida a altas temperaturas en cada ciclo de la PCR, por lo anterior se prefiere una termoestable (110°C, 230°F) como la Taq polimerasa, la cual fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*. Su función es unir los dNTP's por medio de la formación de un enlace fosfodiester. Esta enzima tiene el inconveniente de carecer de la actividad correctora (exonucleasa 3'), por lo que la frecuencia de errores es superior a la de la replicación alrededor de un error por cada 5000 nucleótidos incorporados por lo que en la actualidad se cuenta con algunas otras polimerasas termoestables, por ejemplo polixon [37, 62].
- v) El DNA molde ó cDNA, contiene la región del fragmento a amplificar.

#### 4.4 Parámetros de la reacción

La PCR se realiza mediante la incubación de las muestras a tres temperaturas correspondientes a los tres pasos de un ciclo de desnaturalización, reconocimiento y extensión esquematizados en la figura 3. Cuando se desarrolló esta técnica estos ciclos se realizaron de forma manual con baños de agua pre-establecidos, en la actualidad se realiza automáticamente con el termociclador [37, 62].

En una reacción típica, de doble cadena, el DNA es desnaturalizado con un breve calentamiento de la muestra a 90-95 °C, temperaturas superiores a la  $T_m$  (temperatura de fusión, del inglés melting temperature) [37, 62].

Con una breve disminución de la temperatura de entre 40-60 °C, los iniciadores pueden reconocer a sus secuencias complementarias en el DNA molde. La temperatura a la que el reconocimiento se realiza depende de la duración y el contenido de GC de los iniciadores. Una temperatura de 55 °C es un buen punto de partida para los oligonucleótidos de 20 bases y alrededor del 50% de contenido de GC, incluso temperaturas más altas pueden ser necesarias para aumentar la especificidad de los iniciadores. Esta temperatura generalmente está por debajo de la  $T_m$ . Esta etapa en la mayoría de las ocasiones es determinada empíricamente [36, 62].

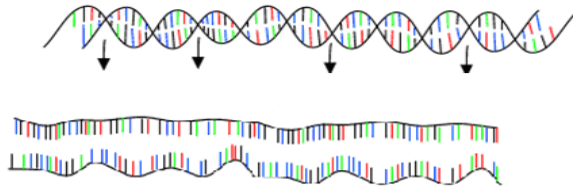
La etapa de amplificación propiamente dicha (extensión) se da por un calentamiento de 70-75 °C. El tiempo de incubación varía en función de la longitud del fragmento amplificado. La replicación transcurre en la dirección 5'→3' empleando como sustrato los cuatro dNTP's hasta terminar la lectura del molde o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización. El paso de la extensión puede ser eliminado por completo si la secuencia total es de aproximadamente 150 bases o menos [37, 62].

Además de las tres etapas anteriores de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, a elevada temperatura, sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del DNA. La etapa final, por su parte, consiste en una

prolongación de la última etapa de alargamiento para permitir que se completen todos los fragmentos [37, 62].

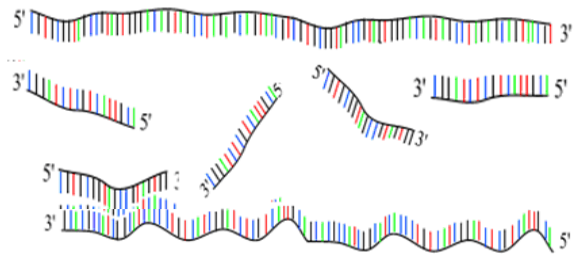
Otro parámetro importante es el número de ciclos necesarios para la amplificación óptima que varía dependiendo de la cantidad de material y del enfriamiento de cada paso de amplificación. En general 25 a 35 ciclos debería ser suficiente para producir 100 ng de DNA de una sola copia de la secuencia. Debido a que la acumulación de copias es exponencial, después de 35-40 ciclos ya hay una acumulación de productos y una escasez de reactivos limitantes como los iniciadores o los dNTP's alcanzando una fase de meseta. Cuando se desea comparar los productos resultantes en dos muestras independientes de forma semicuantitativa, siempre se recurre a optimizar el número de ciclos alcanzando aproximadamente la mitad de la fase exponencial. La literatura reporta que para determinar los diferentes niveles de expresión se emplean entre 20-30 ciclos para asegurar que se obtuviera la amplificación durante la fase logarítmica [37].

La duración de cada una de las tres etapas de cada ciclo también debe optimizarse dependiendo de la secuencia a amplificar. La especificidad suele ser muy elevada cuando hay una buena selección de iniciadores, pero se puede optimizar con la temperatura de alineamiento o la concentración de Mg [37, 62].



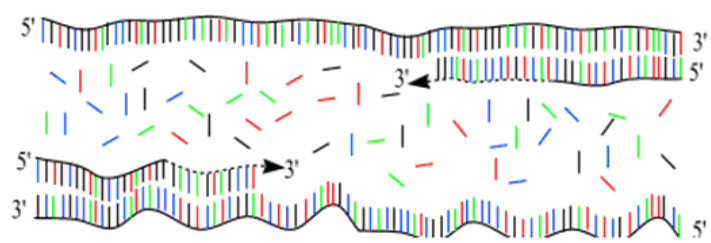
#### DESNATURALIZACIÓN

Una reacción de doble cadena de DNA es desnaturalizado con un breve calentamiento de la muestra que puede ser de 90 a 95°C.



#### RECONOCIMIENTO

Con una breve disminución de la temperatura de 40 a 60°C se da el reconocimiento de las secuencias complementarias del DNA molde.



#### EXTENSIÓN

En esta etapa se da por un calentamiento de 70 a 75°C. La replicación transcurre de 5' a 3' empleando como sustrato los cuatro dNTP's.

**Figura 3. PCR.** Se esquematizan los tres pasos elementales que se llevan a cabo en la PCR. [37, 62].

## 5. RT-PCR

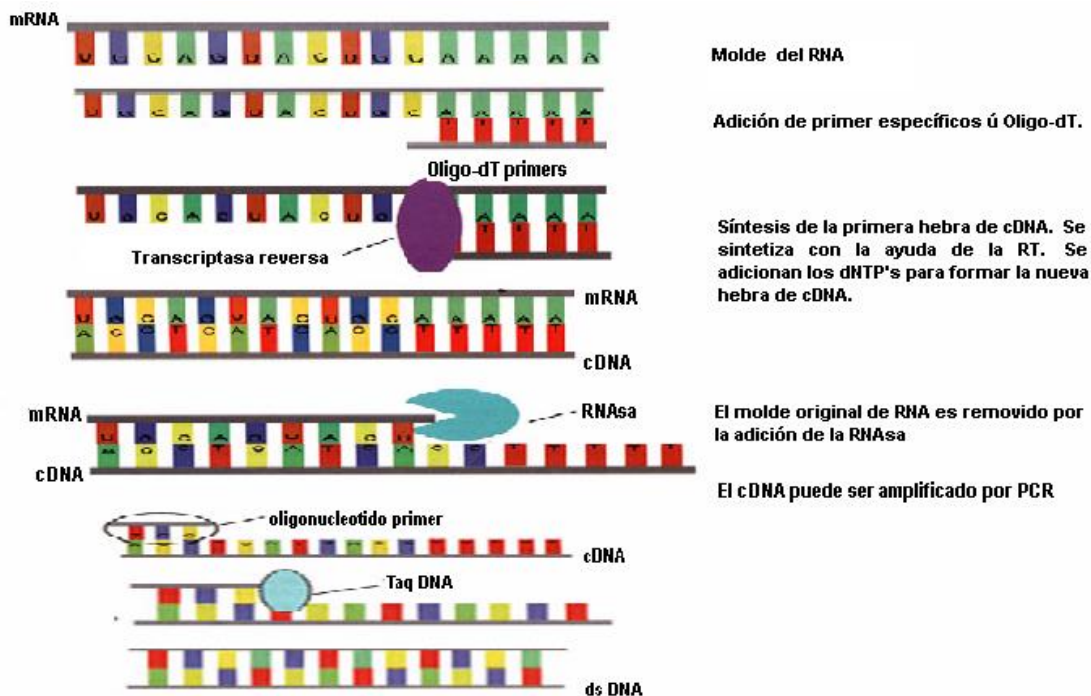
El advenimiento de la PCR en 1986 y la combinación con la transcriptasa inversa llevó rápidamente al uso de RT-PCR para la semi-cuantificación del RNAm. Actualmente es el método con mayor capacidad de detección para la medida de la expresión génica *in vitro* después de la PCR en tiempo real [37, 39, 62].

La técnica es delicadamente sensible y permite el análisis de la expresión génica para muy pequeñas cantidades de mRNA (incluso en el nivel del contenido de una sola célula) [19, 38, 39] sin embargo se sugiere utilizar una cantidad mínima de  $10^7$  células, porque sería mucho mejor para su manipulación y porque también es conveniente preparar grandes lotes de células, ya que pueden ser almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su futuro uso [39, 88]. Por

otra parte, este enfoque puede ser realizado en un gran número de muestras y/o muchos genes diferentes en el mismo experimento.

El paso inicial en la RT-PCR es la producción de una sola hebra complementaria de cDNA (DNA complementario) del RNA a través de la reacción de la enzima retroviral de la transcriptasa inversa (figura 4). Utilizando una de las dos enzimas, virus de la leucemia murina Molones (MMLV-RT) o virus aviar mieloblastosis (AMV). La elección es en gran medida de una cuestión de preferencia personal o de costos [19, 39, 89]. Para la AMV transcriptasa reversa se requiere de una temperatura de incubación a 42 °C y MMLV transcriptasa reversa requiere de 37 °C [39].

Los oligonucleotidos son requeridos inicialmente para la síntesis del cDNA. Los iniciadores se alinean al RNA y el cDNA es extendido hacia la posición 5' a través de la DNA polimerasa por la transcriptasa reversa. Los iniciadores son los genes específicos que contienen al azar todas las posibles combinaciones de nucleotidos de 6-bases de oligonucleotidos y la unión a todos los RNAs presentes. Los oligonucleotidos consisten en una plantilla de residuos de desoxitimidina (Oligo dT) que se alinean al final de la región poliadenilada 3' presente en todos los mRNAs (figura 4) [4, 39].



**Figura 4. Pasos de la RT-PCR.** Para llevar a cabo la RT-PCR se necesita obtener cDNA, con la adición de la transcriptasa inversa y la adición de los dNTP's se forma una nueva hebra de cDNA. El mRNA es removido por la RNasa, dejando la hebra de cDNA, con los iniciadores y la taq polimerasa dará origen a una cadena complementaria de doble hebra de DNA [39, 89].

## 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis a través de gel de agarosa es un método usado para separar, identificar y purificar ácidos nucleicos (figura 5 A). La técnica es simple, rápida de interpretar y de resolver fragmentos que difieren un 0.2% de tamaño. La electroforesis ocurre bajo la influencia de un campo eléctrico: moléculas cargadas semejantes a los ácidos nucleicos migran en la dirección del electrodo con la carga opuesta (ánodo). La movilidad electroforética del ácido nucleico es determinada por un número de parámetros, pero las moléculas de doble cadena lineal de DNA migran a través de la matriz del gel a una velocidad que es inversamente proporcional a log 10 de pares de bases, por lo tanto, moléculas de mayor tamaño migran más lentamente porque la fricción es grande al hacer el arrastre (figura 5 B). Otros factores que afectan a la movilidad electroforética incluyen el valor del pK, la composición de la base, la concentración de la matriz del gel, composición y fuerza iónica del buffer electroforético, temperatura y la intercalación del reactivo bromuro de etidio [11, 93].

La matriz usada para electroforesis deber ser químicamente inerte, por lo que se ha escogido a la agarosa, un polímero lineal extraído de algas marinas que forma una matriz de gel por enlaces de hidrógeno cuando se calienta y se deja enfriar. El gel de agarosa es el medio más popular para la separación de ácidos nucleicos de tamaño moderado o largo. La densidad y la porosidad de la matriz del gel es determinada por la concentración de agarosa utilizada, conocida como el porcentaje de agarosa (peso/vol) en el amortiguador. Las concentraciones típicas del gel están dentro del rango de 0.8 a 2.5 % (peso/vol) dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar (tabla 1) [7].

**Tabla 1. Rango de separación lineal de moléculas de DNA en diferentes concentraciones de Gel de Agarosa [7]**

Concentración de agarosa (% (peso/vol))	Rango de eficiencia de separación lineal de moléculas de DNA (Kb)
0.3	5 – 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

Los dos amortiguadores para electroforesis comúnmente utilizados son tris-acetato (TAE) o tris-borato (TBE) y contienen EDTA en una concentración aproximada de 50 mM. El pH de estos dos amortiguadores es básico [7].

### 6.1 Propiedades de los amortiguadores TAE y TBE

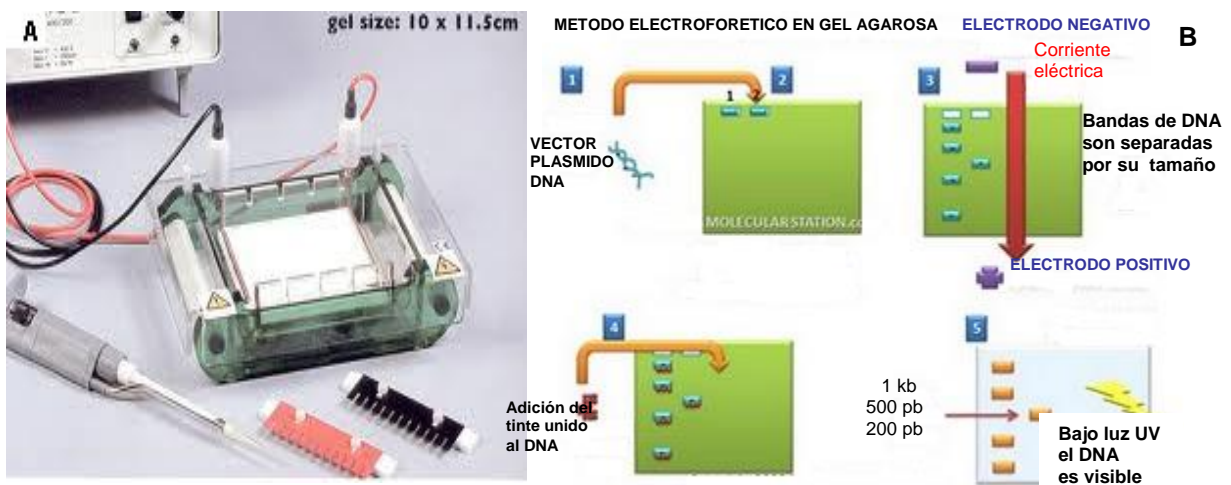
TAE: Se usa cuando se requiere recuperar DNA y cuando este es grande (>12kb), además se utiliza para tiempos de corrimiento electroforéticos prolongados (> 1hr) [92].

TBE: Usado para DNA pequeño (<1kb), al usar este amortiguador hay una disminución en la movilidad del DNA, presenta una alta capacidad de recirculación y es requerido para tiempos de corrimientos cortos [92].



El método más común para la visualización en geles de agarosa es por tinción con bromuro de etidio (3,8-diamino-6-etil-5-fenil-fenandidio bromo), compuesto fluorescente, que contiene una estructura química plana que se intercala entre las bases apiladas de DNA. La posición fija y la proximidad a las bases hace que muestre un incremento en la fluorescencia [7].

El bromuro de etidio promueve el daño de los ácidos nucleicos cuando se observan bajo luz ultravioleta, por lo tanto, si el ácido nucleico se va a utilizar en las siguientes reacciones de visualización, el gel deber ser visto con luz ultravioleta de onda larga (300 nm) [7].



**FIGURA 5. A.** Se muestra la cámara de electroforesis así como el carril donde se coloca el gel de agarosa, así mismo los peines los cuales tienen la función de crear los pozos donde se coloca la muestra, se utiliza una micropipeta la cual ayuda a cargar manualmente las muestras a los pozos, y por último un voltímetro el cual genera la energía para el corrimiento de las mismas. **B. 1** Muestra de DNA, **2** Se coloca la muestra a los pozos y se colocan dos pares de electrodos colocados a lo largo del perímetro del gel horizontal de agarosa, **3** Los distintos pares de electrodos son activados secuencialmente durante un determinado tiempo. Este procedimiento requiere que las moléculas alargadas avancen a través de los canales del gel, en la dirección que va desde el cátodo hacia el ánodo. **4 y 5** El DNA más corto migra más rápidamente que los fragmentos largos produciéndose así su separación y que se puedan visualizar en rayos UV. [93]

## 7. GenBank

GenBank<sup>®</sup> es la base de datos de secuencias genéticas del NIH, una colección de todas las secuencias de DNA disponibles al público (*Nucleic Acids Research*, 2011 Jan; 39 (tema de base de datos): D32-7). Hay aproximadamente 126 551 501 141 bases en la secuencia de los registros de 135,440,924 en las divisiones tradicionales de GenBank y

191,401,393,188 bases en la secuencia de 62,715,288 registros en la división de los GTs en abril de 2011 [96].

Las notas completas para la versión actual de GenBank están disponibles en el sitio FTP NCBI. Una nueva versión se realiza cada dos meses. GenBank es parte de la Colaboración Internacional para la base de datos de las secuencias de nucleótidos, que comprende el Banco de Datos de DNA de Japón (DDBJ), la European Molecular Biology Laboratory (EMBL), y en el NCBI GenBank. Estas tres organizaciones realizan el intercambio de datos sobre una base diaria [96]

### **7.1 Presentaciones de datos en GenBank**

Muchas revistas requieren la presentación de información de la secuencia de una base de datos antes de su publicación, para que un número de acceso pueda aparecer en el documento. Hay varias opciones para la presentación de los datos de GenBank:

**BankIt**, una herramienta de comunicación basada en la WWW para la presentación conveniente y rápida de datos de secuencias

**tbl2asn**, un programa de línea de comandos, automatiza la creación de registros para la presentación de la secuencia a GenBank utilizando muchas de las mismas funciones que con lentejuelas. Se utiliza principalmente para la presentación de genomas completos y grandes cantidades de secuencias.

### **7.2 Revisión de una secuencia de GenBank**

Las revisiones o actualizaciones a las entradas de GenBank se pueden hacer en cualquier momento. Las actualizaciones deben ser enviadas por correo electrónico o el UpdateMacroSend formulario. Se debe de asegurar dar el número de acceso de la secuencia que se actualizará en la GenBank [96].

1.- Buscar GenBank para los identificadores de secuencias y las anotaciones con Entrez Nucleotide , que se divide en tres divisiones: CoreNucleotide (la colección principal),

dbEST (etiquetas de secuencia expresada), y dbGSS (secuencias del genoma de la encuesta).

2.- Busca y alinea las secuencias de GenBank a una secuencia de consulta utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). CoreNucleotide búsquedas BLAST, dbEST y dbGSS de forma independiente.

3.- Búsqueda, enlaces, y las secuencias de descarga mediante programación utilizando NCBI e-servicios públicos.

### **7.3 Uso de datos de GenBank**

La base de datos GenBank está diseñado para proporcionar y fomentar el acceso de la comunidad científica a la mayor parte de información actualizada y completa la secuencia del ADN. Por lo tanto, NCBI no impone restricciones sobre el uso o la distribución de los datos. Sin embargo, algunos peticionarios pueden solicitar patentes, derechos de autor u otros derechos de propiedad intelectual en todo o una parte de los datos que han presentado. NCBI no está en condiciones de evaluar la validez de tales afirmaciones, y por lo tanto no pueden proporcionar comentarios o permiso sin restricciones sobre el uso, copia o distribución de la información contenida en el GenBank [96].

### **8. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

Es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. BLAST es capaz de calcular la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen [96]

Normalmente el BLAST es usado para encontrar probables genes homólogos. Por lo general, cuando una nueva secuencia es obtenida, se usa el BLAST para compararla con otras secuencias que han sido previamente caracterizadas, para así poder inferir su función.

BLAST es la herramienta más usada para la anotación y predicción funcional de genes o secuencias proteicas. Muchas variantes han sido creadas para resolver algunos problemas específicos de búsqueda [96].

BLAST es desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud del gobierno de EE. UU., por lo que es de dominio público y puede usarse gratuitamente desde el servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). También está disponible para ser instalado localmente. Algunas ventajas de usar el servidor del NCBI son que el usuario no tiene que mantener ni actualizar las bases de datos y que la búsqueda se hace en un cluster de computadoras, lo que otorga rapidez. Las desventajas son: no se permiten hacer búsquedas masivas dado que es un recurso compartido, no se puede personalizar las bases de datos contra la que busca el programa, y las secuencias son enviadas al servidor del NCBI sin ningún tipo de cifrado, lo que puede ser un problema para quienes quieran mantener sus secuencias privadas. La aplicación local de BLAST tiene la ventaja de que permite manejar varios parámetros que en las búsquedas de NCBI están estandarizados, por lo que provee una mayor flexibilidad para los usuarios avanzados [96].

## **9. Programa FASTA**

Es un programa para alineamiento de secuencias de ADN y de proteínas. Fue descrito por primera vez (como FASTP) por David J. Lipman y William R. Pearson en 1985 en el artículo "Rapid and sensitive protein similarity searches". El programa original fue diseñado para buscar similitudes de secuencias proteicas. FASTA, descrito en 1988, agregó la posibilidad de hacer búsquedas de DNA contra DNA, DNA contra proteínas traducidas y un programa más sofisticado de aleatorización para evaluar la significancia estadística de los resultados. El nombre FASTA viene de "FAST-ALL" porque busca con cualquier alfabeto, es una extensión de "FAST-P" (proteínas) y "FAST-N" (nucleótido) [96].

El paquete actual de FASTA incluye programas para búsquedas del tipo proteína/proteína, DNA/DNA, proteína/DNA (con cambios del marco de lectura), y búsqueda ordenada y desordenadas de péptidos. Las versiones recientes incluyen un algoritmo para manejar errores de desplazamiento del marco de lectura, las cuales las

búsquedas que traducen los seis marcos suelen tener problemas) cuando compara datos de secuencia de proteínas con los nucleótidos [96].

## **10. Primer3**

Es ampliamente utilizado para el diseño del programa PCR. La PCR es una herramienta esencial y omnipresente en la genética y la biología molecular. Primer3 También puede diseñar sondas de hibridación y los cebadores de secuenciación [96].

Primer3 se desarrolló en Whitehead\_Institute y el Instituto Médico Howard Hughes por Steve Rozen y Helen Skaletsky.

El desarrollo inicial de Primer 3 y su sitio Web fue financiado por el Instituto Médico Howard Hughes y por el National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute.

Primer3 es una herramienta online gratuita para diseñar y analizar los cebadores para PCR y PCR en tiempo real. Primer3 también puede seleccionar un solo cebadores para las reacciones de secuenciación y se pueden diseñar sondas de hibridación de oligonucleotidos. La herramienta en línea que constituye algunas de las características importantes como la detección de imprimación, la clonación, la secuenciación y la lista de Primer [96].

## **11. Analizador de Oligos (oligoAnalyzer)**

Es una herramienta simple para determinar las propiedades de imprimación, como los bucles de cebadores de Tm, porcentaje de GC, dímeros de cebadores y la compatibilidad-primer cebador. Todo lo que tienes que hacer es pegar o escribir la secuencia de imprimación y dejar que el Analizador de Oligo para calcular todas las propiedades importantes de imprimación antes mencionados [95].

## **12. OligoCalc**

Es una herramienta gratuita de análisis de secuencia. Esta herramienta en línea da los informes de las propiedades de DNA y RNA de una sola hebra y de doble cadena, incluyendo el peso molecular, concentración de la solución, la temperatura de fusión, el coeficiente de absorción entre otras propiedades relacionadas.

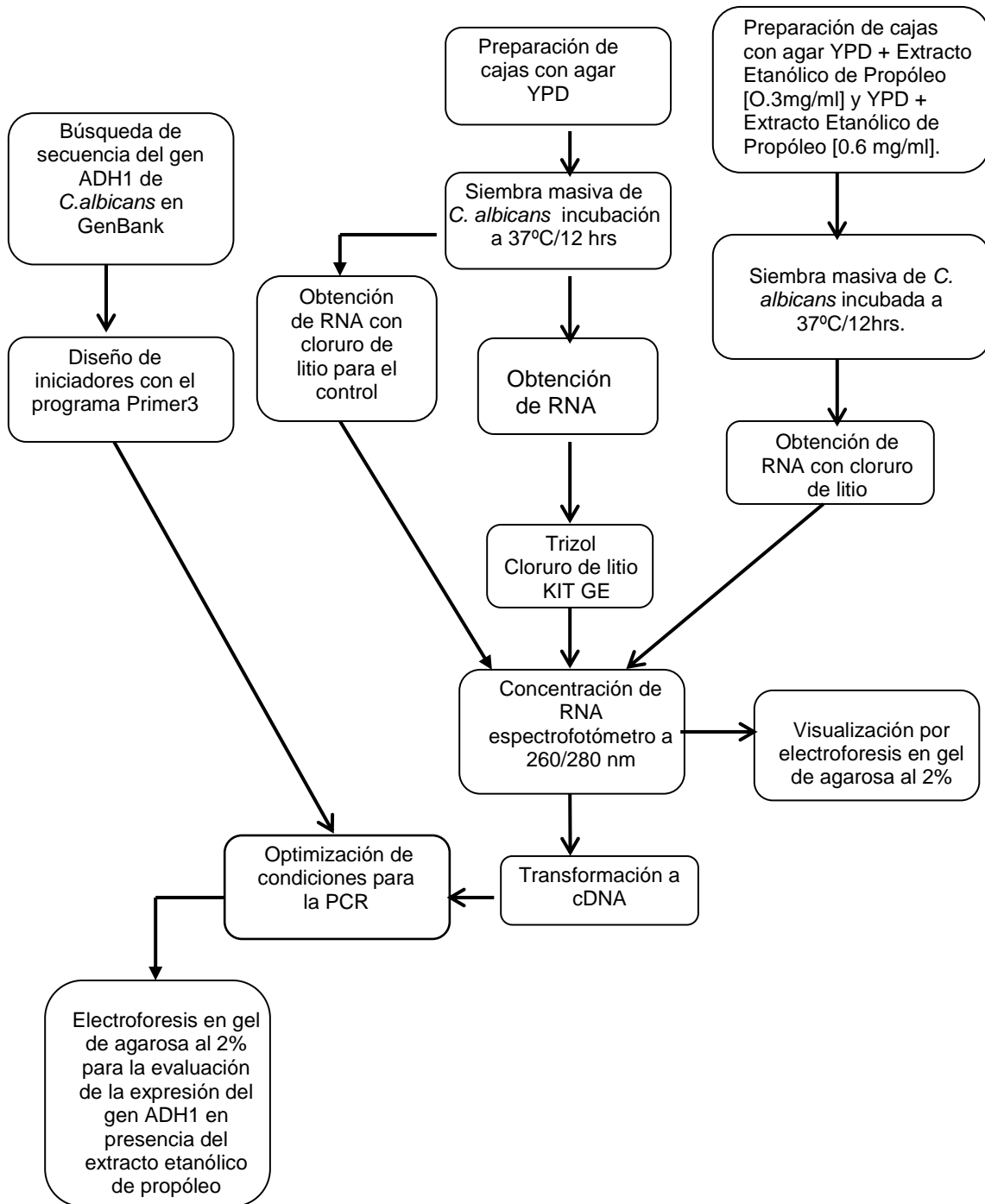
## **OBJETIVO GENERAL**

Estandarización de la técnica de RT-PCR para evaluar la expresión diferencial del gen ADH1 de *Candida albicans* en base al número de ciclos, volumen y concentración de reactivos, empleando como modelo las alteraciones producidas por el extracto etanólico de propóleo en los niveles de expresión de dicho gen.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Análisis de la secuencia y diseño de iniciadores para la amplificación del gen ADH1 en *Candida albicans*.
- Evaluación de tres métodos de extracción de RNA de *Candida albicans* (trizol, RNAspin Mini Kit y cloruro de litio).
- Estandarización de las condiciones óptimas para la obtención de cDNA y la amplificación del gen ADH1 de *Candida albicans*.
- Demostrar que las condiciones seleccionadas son las óptimas al evaluar la alteración de la expresión diferencial del gen ADH1 por efecto del extracto etanólico de propóleo

## METODOLOGÍA



**Figura 6.** Estrategia experimental para realizar la estandarización de la amplificación del gen ADH1 de *C. albicans*.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Crecimiento de la Levadura**

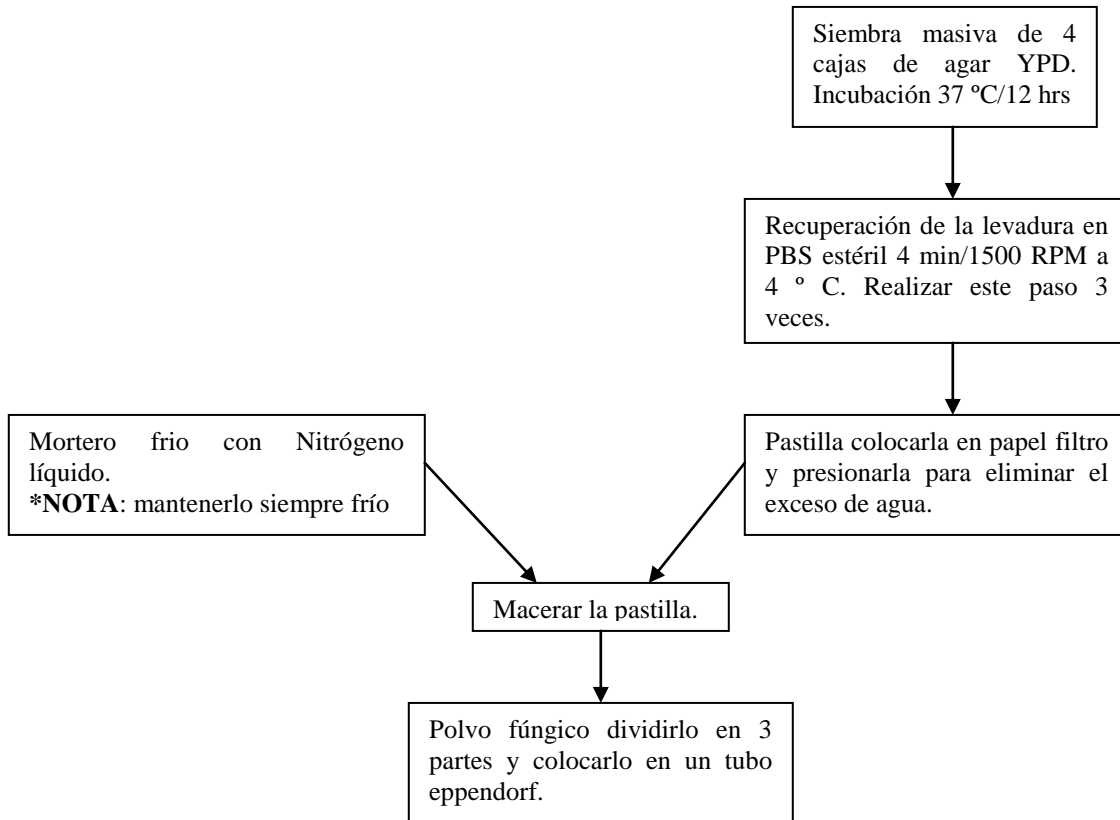
La cepa de *C. albicans* ATCC 10231 se hizo crecer en placas de agar YPD incubadas por 12 horas a 37 °C. Para la evaluación del efecto del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) la levadura se hizo crecer en cajas petri con medio YPD a concentraciones de 0.3 mg/ml y 0.6 mg/ml del extracto durante 1 y 2 horas cada una a 37 °C.

### **Diseño de iniciadores**

La secuencia del gen ADH1 de *Candida albicans* fue obtenida a partir del GenBank de NCBI –National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el número de acceso X81694.1. El diseño de los iniciadores se obtuvo con ayuda del programa primer3 solicitando diez opciones de una longitud de 18-20 pb con una Tm cercana a 55°C, que la variación entre ellos no fuera de más de 3°C, el contenido de GC cercano al 50% y la longitud del fragmento fuera de entre 350 y 600 pb. Los iniciadores propuestos fueron analizados con el programa Oligo Analyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) para evaluar formación de homo y heterodímeros y estructuras secundarias. Posteriormente se seleccionaron dos pares de iniciadores y se sometieron a un análisis con BLAST para determinar su especificidad.

### **Obtención de RNA**

Para la obtención de RNA a partir de *C. albicans* se evaluaron tres métodos: 1)trizol, 2)RNAspin Mini Kit y 3)extracción con cloruro de litio. Se inocularon cuatro cajas de agar YPD de forma masiva y se incubaron a 37 °C durante 12 horas en una estufa bacteriológica, las levaduras se recuperaron en PBS estéril por centrifugación a 4 °C (marca Hermle Z400K) durante 4 minutos a 25 000 x g realizando tres lavados con PBS, la pastilla formada se colocó en papel filtro y se presionó para eliminar el exceso de humedad; el paquete se colocó en un mortero estéril previamente enfriado con nitrógeno líquido y se procedió a macerar evitando que se hidratara la muestra, finalmente, el polvo fúngico se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se dividió la muestra para utilizarla con los tres métodos mencionados a continuación. Se esquematiza en la siguiente figura.

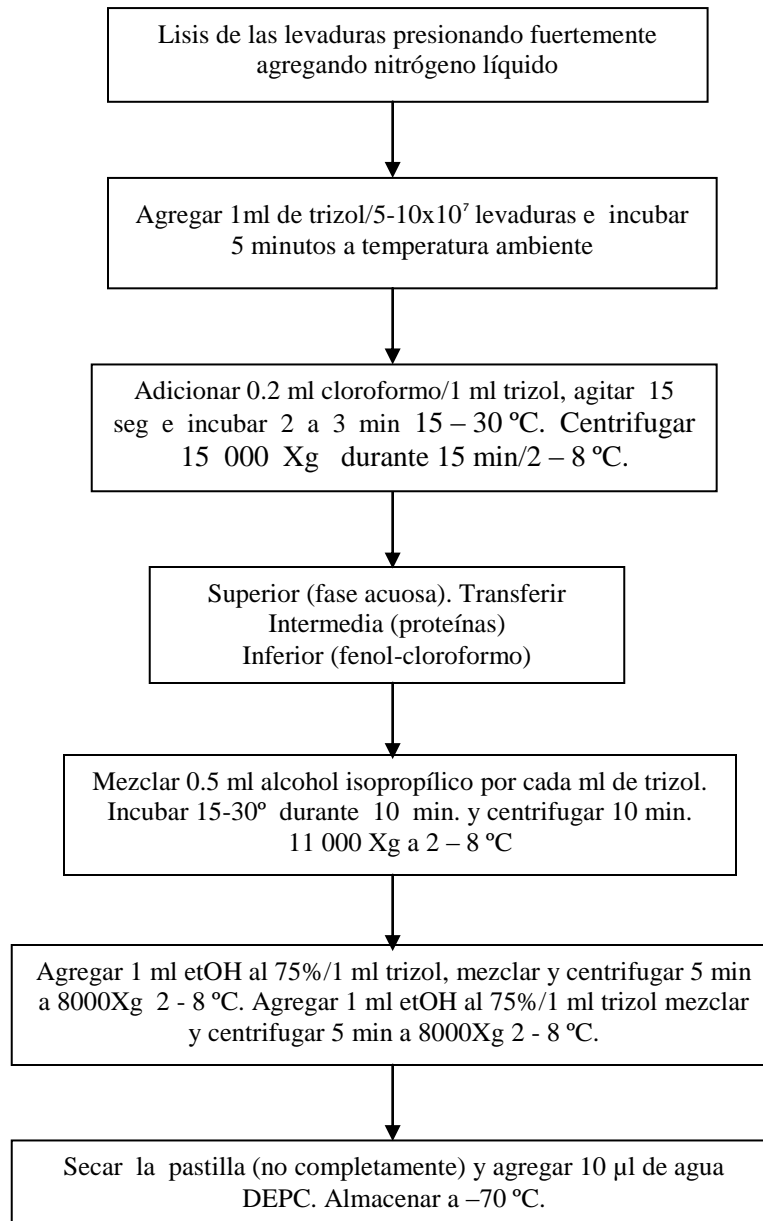


**Figura 7:** Diagrama de extracción de RNA con nitrógeno líquido.

### **MÉTODO 1 Extracción de RNA con Trizol (Invitrogen)**

Después de lisar las células como se mencionó anteriormente, se empleó 1 ml de trizol por cada  $5-10 \times 10^7$  [88] levaduras (de acuerdo a lo descrito por el proveedor). Se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de trizol agitándolo fuertemente por 15 segundos e incubando de 2 a 3 minutos de 15-30 °C, se centrifugó a  $11\ 000 \times g$  durante 15 minutos a 2-8 °C. Al sacar el tubo de la centrifuga se pudieron observar tres fases: fenol-cloroformo (inferior), proteínas (intermedia) y la fase acuosa (superior), la cuál fue transferida a un tubo nuevo. Para precipitar el RNA se mezcló con 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de trizol empleado, se incubó a 15-30 °C por 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a  $11\ 000 \times g$  a 2-8 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de trizol, se mezcló con ayuda del vortex y se centrifugó a  $8\ 000 \times g$  por 5 minutos a 2-8 °C, se secó la pastilla de

RNA (no completamente) y por último se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua DEPC. Se esquematiza en la figura.

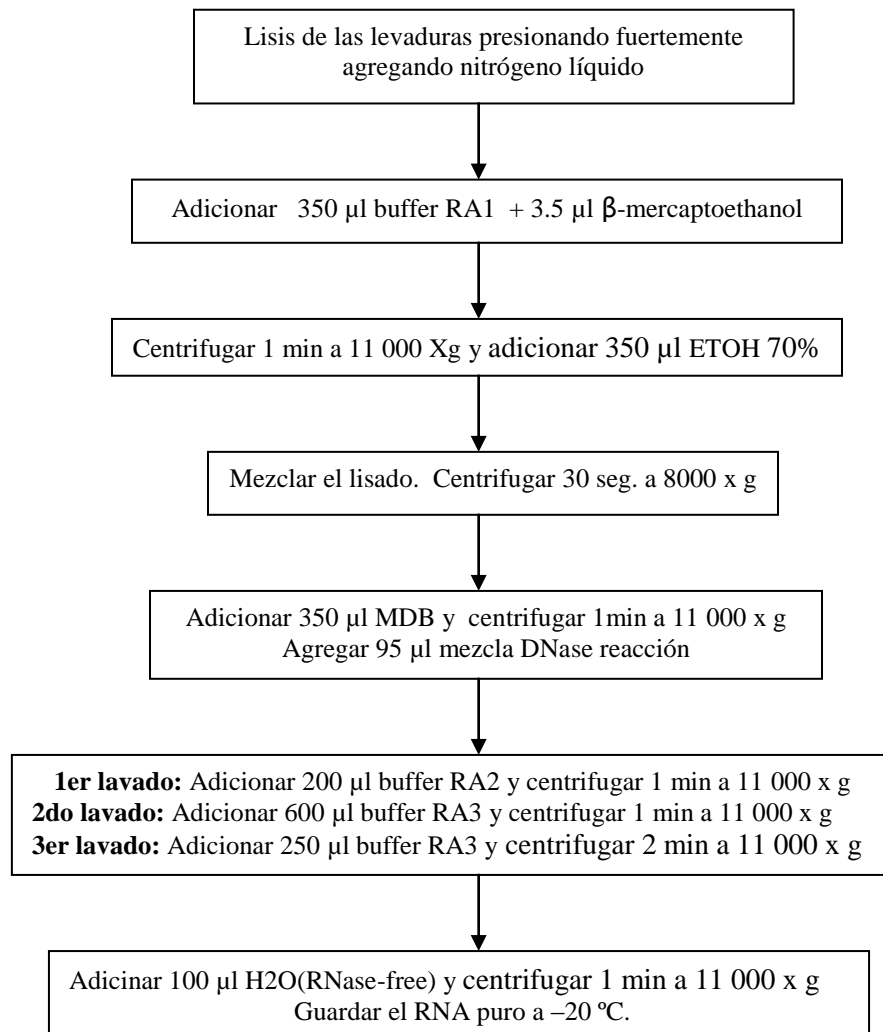


**Figura 8:** Diagrama de obtención de RNA por medio de Trizol.

## MÉTODO 2 RNAspin Mini Kit (GE)

Se partió del mismo método de lisis con nitrógeno líquido hasta obtener el polvo fúngico. Una vez realizado esto se agregaron 350  $\mu$ l de buffer RA1 (GE) y 3.5  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol al paquete celular, el volumen se recuperó y se pasó a un minifiltro, se centrifugó por un minuto a 11 000 x g, se transfirió el filtrado a un tubo de microcentrífuga

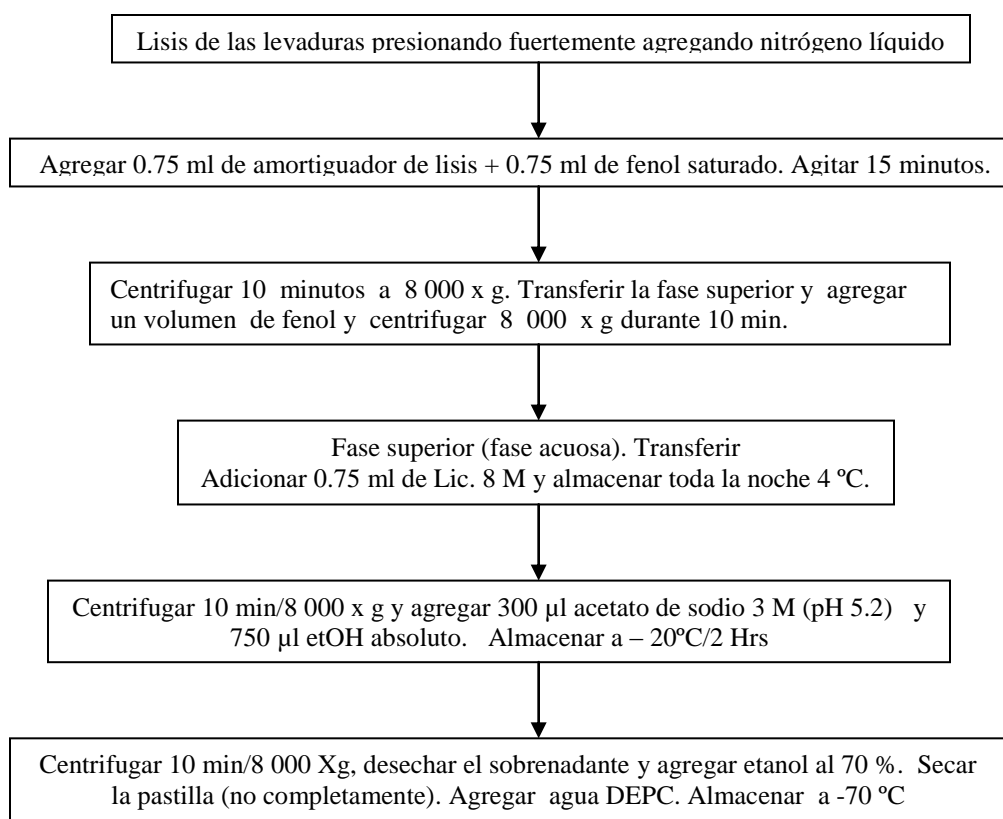
de 1.5 ml y se adicionaron 350  $\mu$ l de etanol 70%. Se homogenizó el lisado de 2 a 5 segundos, se pasó a una columna y se pipeteó suavemente. Se centrifugó a 8 000 x g por 30 segundos, se adicionaron 350  $\mu$ l de MDB y se centrifugó a 11 000 x g por 1 minuto. Se preparó en un tubo de microcentrífuga estéril una mezcla de 10  $\mu$ l DNaseI reconstituida y 90  $\mu$ l Buffer de reacción de Dnasa se mezcló y de esta mezcla se adicionaron 95  $\mu$ l a la membrana de la columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavó la membrana adicionando 200  $\mu$ l de buffet RA2 (GE), se centrifugó un minuto a 11 000 x g (este buffer inactiva la DNaseI). Se hizo un segundo lavado adicionando 600  $\mu$ l y centrifugando por un minuto a 11 000 x g. En el tercer lavado se adicionaron 250  $\mu$ l, se centrifugó 2 minutos a 11 000 x g y el líquido se recuperó en un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas. El RNA puro se diluyó en 50  $\mu$ l de agua.



**Figura 9:** Esquema de obtención de RNA por medio del método RNApin Mini Kit.

### MÉTODO 3 Extracción de RNA con cloruro de litio

Al polvo fúngico obtenido previamente se le agregaron 0.75 ml de amortiguador de lisis (previamente preparado, NaCl 0.6 M, EDTA 10 mM, TrisHCl 100 mM pH 8.0, SDS 4%) y 0.75 ml de fenol (previamente saturado con Tris HCl 0.1 M pH 8). Se tapó el tubo y se agitó por 15 a 20 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 8 000 x g, se transfirió la fase superior a un tubo nuevo adicionándole un volumen de fenol, se agitó con vortex y nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 8 000 x g. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le adicionaron 0.75 volúmenes de LiCl 8 M (previamente preparado), se almacenó toda la noche a 4 °C y pasado este tiempo se agitó la muestra en vortex brevemente y se centrifugó por 10 minutos a 8 000 x g. Se resuspendió el pellet en 300 µl de agua destilada estéril, y se mezcló con 30 µl de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 750 µl de etanol absoluto, se almacenó a -20 °C por 2 horas y nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 8 000 x g, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%. Se secó la pastilla de RNA a temperatura ambiente y disolvió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato). Se almacenó a -70 °C. Se esquematiza en la figura.



**Figura 10:** Diagrama de obtención de RNA por medio de Trizol.

### **Cuantificación de RNA**

Para llevar a cabo la cuantificación de RNA se utilizó un espectrofotometro Jenway 6365 realizando una dilución 1/500 de agua estéril. Para la cuantificación se hizo una lectura a 260 nm para el RNA, las proteínas a 280 nm y los carbohidratos, restos de fenol, sales y otros contaminantes a 230 nm,

### **Electroforesis en gel de agarosa**

Una vez obtenido el RNA por los tres métodos se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El gel se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó buffer TBE 1X hasta cubrir los pozos, con la micropipeta se colocaron en papel parafilm 2 µl de buffer de carga con 8 µl de muestra y se homogenizaron transfiriendo a uno de los pozos del gel de agarosa. Se procedió a hacer el corrimiento procurando revisar que los pozos estuvieran en el polo negativo, se encendió la fuente de poder (Bio-Rad) programando un voltaje de 70 V por 1 hora, dejando que avanzara hasta que el azul de bromofenol recorriera aproximadamente 2/3 partes del gel, se apagó la fuente de poder y se retiró la charola transfiriéndola a un contenedor para teñir con bromuro de etidio durante 15 minutos, pasado este tiempo se enjuagó con agua destilada y se visualizó en un transluminador UVP (Upland,CA).

### **RT-PCR (síntesis de cDNA)**

Una vez obtenido el RNA se procedió a transformarlo a cDNA, bajo las condiciones sugeridas por el proveedor (Invitrogen). En un tubo eppendorf de 0.2 ml se agregaron 1 µl de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 µl/ml), 3 µl de RNA, 1 µl de la mezcla de dNTP's 10 mM y 12 µl de agua estéril. Se colocaron en el termociclador a 65 °C durante 5 minutos y pasado este tiempo se colocaron en hielo. Se agregaron 4 µl de amortiguador de primera cadena 5X y 2 µl de DTT 0.1 M, se incubó por 2 minutos a 37° C y por último se adicionó 1 µl (200 U) de M-MLV RT, se mezcló por pipeteo y se incubó por 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 37 °C. Finalmente se inactivó la reacción por 15 minutos a 70 °C. Este cDNA fue utilizado para la amplificación de PCR.

### **PCR para la amplificación del gen ADH1**

Se trabajó con un volumen final de 25 µl, para lo que se agregaron 1 µl de cDNA, 1U Taq DNA, 25 pmol de cada uno de los iniciadores (**ADH11F** secuencia 5' a 3' (DNA)- TTG CCA TTA GTT GGT GGT CA y **ADH11R** TAT TGA ACG GCC AAA GAA CC el cual amplifica un producto de 389 pb y **ADH14F** secuencia 5' a 3'(DNA)- GTT CCA ACT CCA AAG CCA AA y **ADH14R** TTT CGT CAC CAC CGT CAA TA, que amplifican un producto de 544 pb), amortiguador 1X, 0.8 mM de dNTP y 4 mM de MgCl. Las condiciones a probar inicialmente fueron: 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 1:30 minutos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. El producto de la reacción fue observado por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con un transluminador. La cantidad de ciclos se fueron modificando dependiendo de la intensidad de fluorescencia de la banda.

### **Amplificación del gen Actina 1 de *Candida albicans* como control**

Como un control para poder normalizar la expresión del gen ADH1 se empleó el gen de actina. La secuencia de los iniciadores fue tomada de Mello et. al. 2006 los cuales fueron ACT1F (5'-AGA ATT GAT TTG GCT GGT AGA GAC) y ACT2R (5'AGA AGA TGG AGC CAA AGC AGT AAT). Se trabajó con un volumen total de 25 µl, para lo que se agregaron 1 µl de cDNA, 1 µl Taq DNA (5U/ µl), 2.5 µl de amortiguador para PCR 10X, 0.5 µl de dNTP 10 mM y 0.75 µl de MgCl 50 mM . Las condiciones a probar fueron: 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1:30 minutos y una extensión final a 72 °C por 7 minutos. El producto de la reacción presentó un tamaño 443pb y fue observado por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

## RESULTADOS

Para poder realizar la identificación del gen ADH1 por medio de RT-PCR fue necesario diseñar iniciadores específicos. El primer paso en el diseño fue obtener la secuencia del gen en el GenBank con el número de acceso X81694.1 (figura 11).

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

Nucleotide  
Alphabet of Life

Search: Nucleotide Limits Advanced search Help

Search Clear

Display Settings: GenBank Send: Change region shown Customize view

### C.albicans ADH1 gene for alcohol dehydrogenase 1

GenBank: X81694.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to](#)

LOCUS X81694 2568 bp DNA linear PLN 18-APR-2005  
DEFINITION C.albicans ADH1 gene for alcohol dehydrogenase 1.  
ACCESSION X81694  
VERSION X81694.1 GI:608689  
KEYWORDS ADH1 gene; alcohol dehydrogenase 1.  
SOURCE Candida albicans  
ORGANISM [Candida albicans](#)  
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;  
Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;  
Candida.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2568)  
AUTHORS Shen,H.D., Choo,K.B., Lee,H.H., Hsieh,J.C., Lin,W.L., Lee,W.R. and Han,S.H.  
TITLE The 40-kilodalton allergen of Candida albicans is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies  
JOURNAL Clin. Exp. Allergy 21 (6), 675-681 (1991)  
PUBMED [1777830](#)  
REFERENCE 2

AUTHORS Bertram,G., Swoboda,R.K., Gooday,G.W., Gow,N.A. and Brown,A.J.  
TITLE Structure and regulation of the Candida albicans ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase  
JOURNAL Yeast 12 (2), 115-127 (1996)  
PUBMED [8686375](#)  
REFERENCE 3 (bases 1 to 2568)  
AUTHORS Bertram,G.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (14-SEP-1994) G. Bertram, University of Aberdeen, Dept.of Molecular and Cell Biology, Marischal College, Aberdeen, AB9 1AS, UK

COMMENT Related sequence: S80403.

FEATURES  
Location/Qualifiers  
source 1..2568  
/organism="Candida albicans"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:5476"  
[TATA\\_signal](#) 1315..1320  
[gene](#) 1433..2485  
/gene="ADH1"  
[CDS](#) 1433..2485  
/gene="ADH1"  
/EC\_number="1.1.1.1"  
/codon\_start=1  
/transl\_table=12  
/product="alcohol dehydrogenase"  
/protein\_id="CAA57342.1"  
/db\_xref="GI:608690"  
/db\_xref="GOA:P43067"  
/db\_xref="InterPro:IPR002085"  
/db\_xref="InterPro:IPR002328"  
/db\_xref="InterPro:IPR011032"  
/db\_xref="InterPro:IPR013149"  
/db\_xref="InterPro:IPR013154"  
/db\_xref="InterPro:IPR016040"  
/db\_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P43067"  
/translation="MSEQIPKTKAVVFDINGGQLVYKDYVPTPKPNELLIHVKYSGVCHTDLHARKGDWPLATKPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWIKGDFAGIKWLNGSCMS

Analyze this sequence  
Run BLAST  
Pick Primers  
Find in this Sequence

All links from this record  
Related Sequences  
Full text in PMC  
Protein  
PubMed

Recent activity  
Turn Off Clear  
C.albicans ADH1 gene for alcohol dehydrogenase 1 Nucleotide  
Glycolytic enzymes of Candida albicans are nonubiquitous immunogens during C PubMed  
Related Citations for PubMed (Select 8686375) (173) PubMed  
Structure and regulation of the Candida albicans ADH1 gene encoding an PubMed  
ADH1 expression inversely correlates with CDR1 and CDR2 in Candida albican PubMed  
See more...



```

1      tctagaggaatcacagttacaattgtagaggaaaccgaactagtaaaactagcaccacaac
61     acttctaacaacaaccaatcaattcaatgggtataacaaatcgtctaccagaagttatgcta
121    atatgaaacatcaattgacaacatggacatcaactgaagctttaacaaatgaataaaaaa
181    aaaagcccatacatagaccattggctatagtttcatttgcggccgcccacttttattgt
241    tgagttgaataattgtgagcatcagctgattttaaaattataaatttttttttcgtccat
301    tgtaattctatttttagtttttcttctccatcgtctccgaattattccggaagctggta
361    gcgataagttttagaatcattgagcctcttttcaatgccggatggttatctgcaactgat
421    gttagtttagttagtataagacttaaattttcataaagagtgcgaaaagtccaatctaa
481    acttctctaaacgaatttcagacaatagtcggaaaaaaacaaaacccattattgt
541    cgacatgtcaaaggattcaacggttgagatggagccgtcaaatatccaaaacactcttct
601    tttcaactaatttgcgtaaaactatctccatcgtacgattaagataaaaaaaaaacaatt
661    ctttcttacaatatttgatagagaccaatgcaaagccagcgagaaagaggagtattggc
721    attgttgggttagtagatgaatgagtaattcttagccaaaacaaaataaaccacaagaac
781    agtaggcaaaactgagtaattgatagcgtttagtctttgtatttaaaaaaacctaatt
841    gtccaaaattgaaaatcatgagttgcaaatgtgtgaaatcaccaggtaaatagatcat
901    ttagctatatcgccttatcattcttctgtacaagaattatacacaataaccaccaccacac
961    caccagaaattttacacggtttttctaaaattactttccggtggccaattaaattgaa
1021   attttcttgttcgaaacggctagtcctcaacatatagtagcaagttatgcctaaga
1081   gtttccgctctcgtgccccccccccctatccccttttgaatttgccaaaatagctcaaa
1141   aaggataaccgcgacttttttttccgagttctcgtcatgcaagcaagcttattcagaat
1201   tttcagaggtgagctcaccactaccactgcagctgcatcttttacagcaacagcaac
1261   agcaggtgccaccacggcaaaacattgtctggatccactgtgctccgaaaactgtataa
1321   aaggactattcatcccctggcttatcttctccagaattattttttttcatcagtttaa
1381   caacaacaacggtattgtcatacaacaacaacaacaatacaaaaacaattatgtctga
1441   acaaatccccaaaactcaaaaagccggttcttttgataccaatgggtgcaattagtcta
1501   caaggattaccaggttccaactccaaagccaaatgaattgttgattcacgtcaaaactc
1561   tgggtctgtcacactgatttacatgcaaggaagggtgactggccattggctactaaatt
1621   gccattagttggtggtcacgaaggtgccggtgctggtgctggtatgggtgaaaacgtcaa
1681   aggatggaaaaatcgggtgactttgcccggatcaaatgggtaattggttcttgtatgagttg
1741   tgaattctgtcaacaaggtgctgaaccaaactgtgggtgaagctgacttgtctggttacac
1801   tcacgatgggtcattcgaacaatacgcctactgctgatgctgttcaagccgctaaaattcc
1861   agctggtactgatttagccaatgtcgcaccaatcttatgtgctggtggtactgtttacaa
1921   agccttaaagactgctgacttagcagctggccaatgggttggctatctccggtgctgggtg
1981   tggtttaggttctttggccgttcaatcgcagagccatgggtttgagagttgttgctat
2041   tgacggtggtgacgaaaaaggtgaatttgttaaatcattgggtgctgaagcttacgttga
2101   tttcaccaaagataaagatattgttgaagctgtcaagaaagctactgatgggtggccaca
2161   cgggtctatcaatgtctctgtttctgaaaaagccattgaccaatctggtgaatagtttag
2221   accattaggtaaagttgtttgggttaccagctcagctaaagtcactgctccag
2281   tttcgtatgctgttgcattcattgaaatcaaaaggttcttacgttggtaacagaaaaga
2341   cactgctgaagctattgacttcttctccagaggtttaatcaaatgtccaatcaagattgt
2401   cggtttatctgacttgccagaagcttcaaatgatggaagaaggtaaaatcttgggtgag
2461   atacgtcttggacaccagtaataagcaaatagctaaattatatacgaattaatggtatg
2521   attaagtgtttacgagtgcgatatttttattactatcttatacagttg

```

**Figura 11. Secuencia del gen ADH1 de *C. albicans*.** En la parte superior se muestra la página resultante de la secuencia del gen en GenBank. Posteriormente se muestra la secuencia del gen con una longitud de 2568 pares de bases (pb).

Una vez que se obtuvo la secuencia en el formato FASTA el diseño de iniciadores se realizó con el programa primer3, en el que se ingresan algunos datos necesarios como el porcentaje de GC el cual fue del 50%, la temperatura de alineamiento (Tm) de los iniciadores que se propuso entre 53 y 57°C con la temperatura óptima de 55 °C, la longitud de los iniciadores entre 18 y 20 pb y por último el tamaño del fragmento esperado entre 350 y 600 pb. Se introdujo toda la secuencia al análisis debido a que no se requería alguna

región en particular. Se solicitaron 10 juegos de iniciadores al programa y en la figura 12 se muestra uno de los resultados obtenidos.

Primer3Plus

[Primer3Manager](#)   [Help](#)  
[About](#)   [Source Code](#)

pick primers from a DNA sequence

< Back

Pair 1:

Left Primer 1:

Sequence:

Start: 1558
Length: 20 bp
Tm: 55.0 °C
GC: 55.0 %
ANY: 5.0
SELF: 3.0

Right Primer 1:

Sequence:

Start: 1788
Length: 20 bp
Tm: 54.9 °C
GC: 45.0 %
ANY: 4.0
SELF: 1.0

Product Size: 231 bp
Pair Any: 6.0
Pair End: 3.0

Send to Primer3Manager
Reset Form

1	TCTAGAGGAA	TCACAGTTAC	AATTGTAGAG	GAAACCGAAC	TAGTAAACT
51	AGCACCCAAC	ACTTCTAAAC	AAACCAATCA	ATTCATGGT	ATAACAAATC
101	GTCTACCAGA	AGTTATGCTA	ATATGAAACA	TCAATTGACA	ACATGGACAT
151	CAACTGAAGC	TTTAACAAAT	GAATAAAAAA	AAAAGCCCAT	ACATAGACCA
201	TTGGTCATAG	TTTCATTTGC	CCCCGCCCCA	CTTTTATTGT	TGAGTTGAAT
251	AATTGTGAGC	ATCAGCTGAT	TTTAAAATTA	TAATTTTTTT	TTTCGTCCAT
301	CCCTTTGTA	ATTTGCCAAA	ATAGCTCAAA	AAGGATAACC	
351	CGCACTTTTT	TTTCCGAGT	TCTCGTCATG	CAAGCAAGCT	TATTCAGAAT
401	TTTCAGAGGT	GCGAGTCTCA	CCACTACCAC	TGCAGCTGCA	TCTTTTACAG
451	CAACAGCAAC	AGCAGGTGCC	ACCACGGCAA	AGACATTGTC	TGGATCCACT
501	GTGCTCCGAA	AACTGTATAA	AAGGACCTAT	TCATCCCTGG	TCTTATCTTC
551	TCCAGAATTA	TTTTTTTTTC	ATCAGTTTAA	CAACAACAAA	CGTTATTGTC
601	ATACAACAAC	AACAACAAAT	ACAAAAACAA	TTATGTCTGA	ACAAATCCCA
651	AAACTCAAA	AAGCCGTTGT	CTTTGATACC	AATGGTGGTC	AATTAGTCTA
701	CAAGGATTAC	CCAGTTCCAA	CTCCAAAGCC	AAATGAATTG	TTGATTCACG
751	TCAAATACTC	TGGTGTCTGT	CACACTGATT	TACATGCAAG	GAAAGGTGAC
801	TGGCCATTGG	CTACTAAATT	GCCATTAGTT	GGTGGTCACG	AAGGTGCCGG
851	TGTCGTTGTC	GGTATGGGTG	AAAACGTCAA	AGGATGGAAA	ATCGGTGACT
901	TTGCCGGTAT	CAAATGGTTG	AATGGTTCTT	GTATGAGTTG	TGAATTCTGT
951	CAACAAGGTG	CTGAACCAAA	CTGTGGTGAA	GCTGACTTGT	CTGGTTACAC
1001	TCACGATGGT	TCATTCGAAC	AATACGCTAC	TGCTGATGCT	GTTCAAGCCG
1051	CTAAAATTCC	AGCTGGTACT	GATTTAGCCA	ATGTCGCACC	AATCTTATGT
1101	GCTGGTGTTA	CTGTTTACAA	AGCCTTAAAG	ACTGCTGACT	TAGCAGCTGG
1151	CCAATGGGTT	GCTATCTCCG	GTGCTGGTGG	TGGTTAGGT	TCTTTGGCCG
1201	TTCAATACGC	CAGAGCCATG	GGTTTGAGAG	TTGTTGCTAT	TGACGGTGGT
1251	GACGAAAAAG	GTGAATTTGT	TAAATCATTG	GGTGCTGAAG	CTTACGTTGA
1301	TTTACCAAAA	GATAAAGATA	TTGTTGAAGC	TGTCAAGAAA	GCTACTGATG
1351	GTGGTCCACA	CGGTGCTATC	AATGTCTCTG	TTTCTGAAAA	AGCCATTGAC
1401	CAATCTGTTG	AATATGTTAG	ACCATTAGGT	AAAGTTGTTT	TGGTTGGTTT
1451	ACCAGCTCAC	GCTAAAGTCA	CTGCTCCAGT	TTTCGATGCT	GTTGTCAAAT
1501	CCATTGAAAT	CAAAGTTTCT	TACGTTGGTA	ACAGAAAAGA	CACTGCTGAA

**Figura 12. Diseño de iniciadores con el programa primer3.** Como se puede observar el programa proporciona la secuencia de los pares de iniciadores sugeridos por el programa en base a la información introducida y nos muestra la localización de los mismos, así como la longitud del fragmento, la Tm y el contenido de GC.

A pesar de que el programa primer3 toma en cuenta factores como la formación de homo y heterodímeros así como estructuras secundarias que pudieran impedir que la reacción de PCR se lleve a cabo o disminuya su eficiencia, los iniciadores obtenidos fueron analizados con el programa OligoAnalyzer 3.1 para evaluar estas características seleccionando dos pares en los que eran pocas estructuras secundarias y posibilidades de dímeros (figura 13).

**HOMO-DIMER ANALYSIS** ?

**Dimer Sequence**

5'- TTGCCATTAGTTGGTGGTCA -3'

Maximum Delta G -37.58 kcal/mole

**Delta G** -5.02 kcal/mole  
**Base Pairs** 3

```

5'   TTGCCATTAGTTGGTGGTCA
      |||   :::
3'   ACTGGTGGTTGATTACCGTT
  
```

**Delta G** -5.02 kcal/mole  
**Base Pairs** 3

```

5'   TTGCCATTAGTTGGTGGTCA
      : ||| : : ::: :
3'   ACTGGTGGTTGATTACCGTT
  
```

**Delta G** -3.14 kcal/mole  
**Base Pairs** 2

```

5'           TTGCCATTAGTTGGTGGTCA
              : || :
3'   ACTGGTGGTTGATTACCGTT
  
```

**Results**

General Information  
Batch Date: 6/20/2011 2:59 PM

TTG CCA TTA GTT GGT GGT CA

Nucleotide Type: DNA  
Sequence Type: Linear

Temperature: 25 °C  
Max Foldings: 20

Na Concentration: 50 mM  
Start Position:

Mg Concentration: 4 mM  
Stop Position:

Suboptimality: 50 %

Update Add To Order

Structures



Structure Name	Image	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )	Records: 1 - 3 of 3 - Pages: 1	Ct	Det
1		-2.06	48.3	-28.4	-88.35	Ct	Det
2		-1.42	46.2	-21.4	-67.02	Ct	Det
3		-1.35	38.8	-30.5	-97.78	Ct	Det

Figura 13. Análisis de iniciadores. Con ayuda del programa Oligo Analyzer 3.1 se analizaron las posibilidades de formación de dímeros y estructuras secundarias que podrían tener efecto durante la reacción de PCR.

Los iniciadores seleccionados se denominaron ADH11F-ADH11R y ADH14F-ADH14R, y amplificaron fragmentos del gen de diferentes tamaños como se muestra en la tabla 1. En la figura 14 se muestra la localización de los cuatro iniciadores y la región amplificada.

GEN	INICIADOR	SECUENCIA (5' a 3')	Número de pares de bases a amplificar
ADH11F	sentido	TTG CCA TTA GTT GGT GGT CA	398
ADH11R	antisentido	TAT TGA ACG GCC AAA GAA CC	
ADH14F	sentido	GTT CCA ACT CCA AAG CCA AA	544
ADH14R	antisentido	TTT CGT CAC CAC CGT CAA TA	

**Tabla 1. Secuencia de los iniciadores seleccionados para amplificar el gen ADH1.** Se observa la secuencia de cada par de iniciadores así como la longitud de cada uno de ellos indicando además la región amplificada.

```

gtggtcaattagtctacaaggattacca1515gtccaactccaagccaatgaattgtgattcacgtcaataactctggtgtctgcactgattacat
gcaaggaaaggtgactggcattggctactaaa1619ttgccattagttgggtgacgaagggtccggtgctgtgctggtatgggtgaaaacgtcaaa
ggatgaaaatcgggtacttggccgtatcaaatggtgaatggttcttgtatgagttgtaattctgcaacaaggtgctgaaccaactgtggtgaagctgact
tgtctggttacactcacgatggttcattgaacaatacgtactgctgatgctgttcaagccgctaaaattccagctggtactgattagccaatgctgcaccaat
cttatgtgctggttactgttacaaagcctaaagactgctgacttagcagctggccaatgggtgctatctccggtgctgggtggttta1919ggttcttg
gccgtcaatacgccagagccatgggttgagagttgtgctattg2043acggtggtgacgaaaaaggtgaattgttaaatcattgggtgctgaagcttac

```

**Figura 14. Localización de los iniciadores y región de amplificación de ADH11 y ADH14.** Se muestra la parte de amplificación de los dos pares de iniciadores que se obtuvieron. **ADH1 1** se muestra en color negro, letras blancas y amplifica en el par de bases 1619 a 1919. **ADH1 4** se muestra con letras cursivas en color gris más tenue, amplificando en el par de bases 1515 a 2043.

El siguiente paso en el diseño fue realizar una búsqueda en el BLAST con la finalidad de evaluar la especificidad de estos iniciadores, por lo que se compararon con las secuencias de *Candida albicans* taxid:5476 y *Candida albicans* sc5314 taxid: 237561, encontrando un 100% de homología con el gen ADH1 y algunas proteínas hipotéticas con menos del 65-70%. En la figura 15 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos.



**Figura 15. Análisis de comparación de los iniciadores con secuencias de *Candida albicans*.** Con la finalidad de corroborar que los iniciadores no identificaran alguna otra región que no era de nuestro interés se compararon con las secuencias conocidas de *Candida albicans* taxid:5476 y *Candida albicans* sc5314 taxid: 237561 con ayuda del programa BLAST. Una vez que se concluyó con este análisis los iniciadores se mandaron sintetizar.

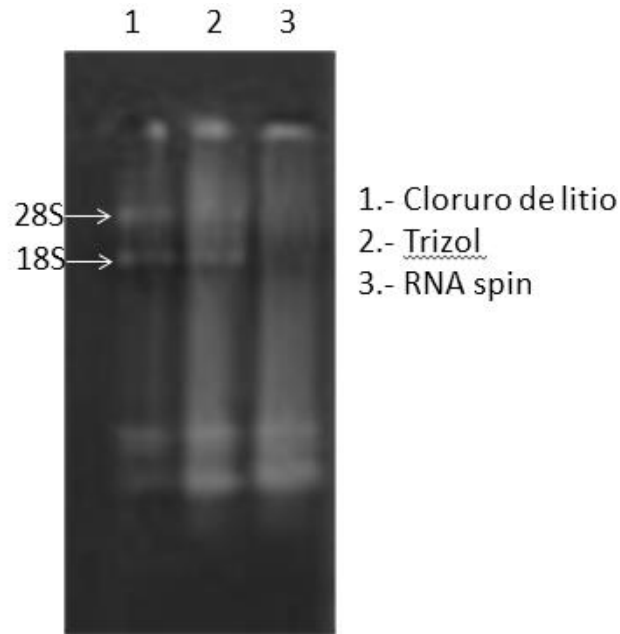
Por otra parte, el éxito de una buena reacción de RT-PCR depende de la calidad del RNA extraído, por tal motivo se evaluaron tres métodos de obtención de RNA comparando la concentración, la pureza y la integridad (evaluada por corrimiento electroforético) obtenidos.

La extracción se realizó a partir de cultivos de toda la noche alcanzando una concentración de  $1 \times 10^7$  cel/ml para que se encontraran a la mitad de la fase exponencial. En la tabla 2 se muestra una comparación de la concentración y de la pureza obtenida, de acuerdo a los datos proporcionados por la literatura, a partir de una concentración de  $1 \times 10^7$  células se esperaba una concentración de 5-10  $\mu\text{g}$ . La proporción de 260/280 determinada en el espectrofotómetro debiera estar entre 1.8 y 2.1. De acuerdo a los resultados obtenidos, el método del cloruro de litio proporcionó una buena concentración y una buena proporción 260/280.

<b>Método</b>	<b>Concentración mg/ml</b>	<b>Proporción 260/280</b>
<b>Trizol</b>	3	1.45
<b>Cloruro de litio</b>	3	1.93
<b>KIT RNA spin</b>	2	1.12

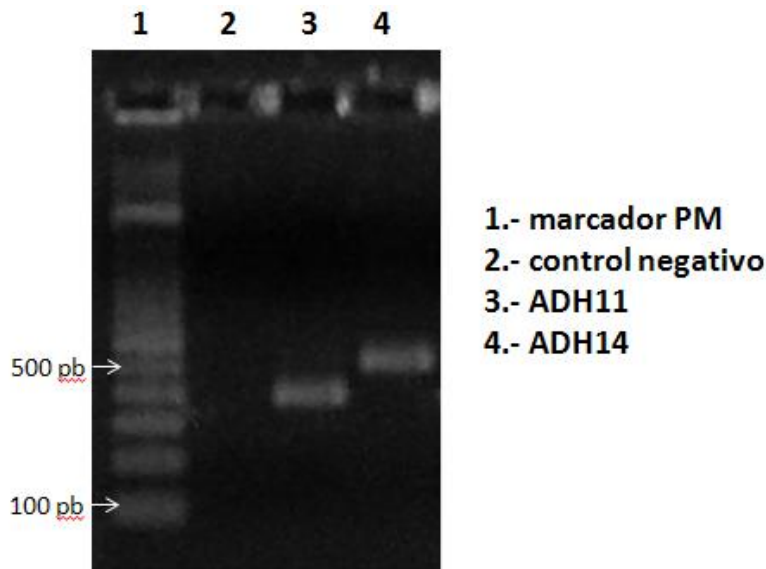
**Tabla 2. Cuantificación y análisis espectrofotométrico del RNA obtenido.** Se muestran los resultados promedio de tres extracciones independientes con cada uno de los métodos mencionados.

En la figura 16 se observa la calidad del RNA evaluada por electroforesis en gel de agarosa. La mayoría de los métodos de extracción mencionan que un RNA de buena calidad deberá presentar las bandas evidentes correspondientes a los RNAs 18 S y 28S, siendo esta última del doble de intensidad que la primera. Como podemos observar en la figura, en el RNA obtenido por los métodos de cloruro de litio y trizol se observan perfectamente estas dos bandas aunque también se aprecian las de RNAs de bajo peso molecular (tRNA y 5SRNA). En el caso del kit RNA spin no se aprecian los RNAs 28 y 18S, únicamente los de bajo peso molecular. En el carril correspondiente al de cloruro de litio es donde se aprecia un menor barrido que podría ser indicativo de degradación. De acuerdo a lo anterior las siguientes extracciones se realizaron por el método de cloruro de litio.



**Figura 16. Visualización del RNA total extraído bajo tres métodos diferentes.** Se observan las bandas correspondientes a los RNAs 18 S y 28S de *C. albicans*, las cuales están señaladas por flechas. Las dos bandas inferiores corresponden a RNA's de bajo peso molecular. Carril 1 extracción por medio del método de cloruro de litio, Carril 2 extracción por medio de trizol, Carril 3 extracción de RNA por medio del Kit RNA mini Spin.

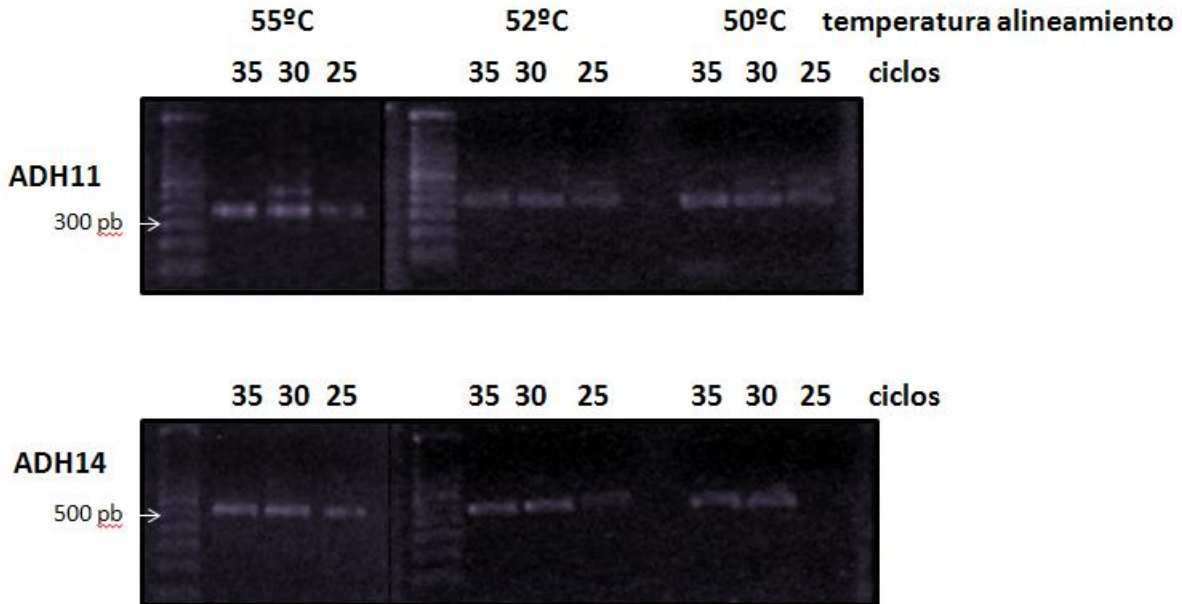
Para llevar a cabo la reacción de RT-PCR el siguiente paso fué obtener el cDNA, lo cual se llevó acabo de acuerdo a las condiciones indicadas por el proveedor (Invitrogen). Posteriormente se realizó la reacción de PCR. Con el fin de optimizar dicha reacción inicialmente se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación en las que se manejaron diferentes concentraciones de Mg que oscilaron entre 1.5 a 4 mM, los dNTP's se emplearon a concentraciones de 0.2 a 10 mM. Los productos esperados eran de 398 pb para ADH11 y 544 pb para ADH14, como se puede ver en la figura 17 estas bandas se obtuvieron únicamente a 0.75  $\mu$ l (1.5) mM de Mg y 0.5  $\mu$ l (0.2) mM de dNTP's (no se muestra el resto del gel, donde no hubo presencia de bandas).



**Figura 17. Optimización de la concentración de magnesio y dNTP's.** Se amplificaron dos fragmentos del gen ADH1 empleando los iniciadores ADH11(F y R) y ADH14 (F y R), carriles 3 y 4 respectivamente. Los tamaños de los productos esperados eran de 398 pb para el primero y 544 para el segundo. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular ladder de 100pb. En el carril 2 se encuentra el control negativo de la reacción, el cual no contiene DNA. Estas bandas corresponden a las reacciones llevadas a cabo con una concentración de Mg de 1.5 mM y 0.2 de dNTP's con 40 ciclos de amplificación.

Debido a que nuestro interés era estandarizar las condiciones que nos permitieran evaluar la expresión diferencial del gen se tuvieron que disminuir el número de ciclos de tal forma que la reacción se encontrara en la mitad de la fase exponencial. En la literatura se han reportado el uso de 20 a 30 ciclos (C). En nuestro caso se evaluaron 25, 30 y 35 ciclos y se emplearon también diferentes temperaturas de alineamiento, de 50, 52 y 55 °C con la finalidad de optimizar la reacción tomando como punto de partida la  $T_m$  calculada para cada par de iniciadores en la pagina electrónica (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>). En la figura 18 se puede observar que los mejores resultados para la amplificación fueron para ADH11 25 C a 55 °C y para ADH14 25 C a 52°C. Bajo estas condiciones las bandas aun eran evidentes pero mostraban una menor intensidad, indicativo de un menor número de amplicones.





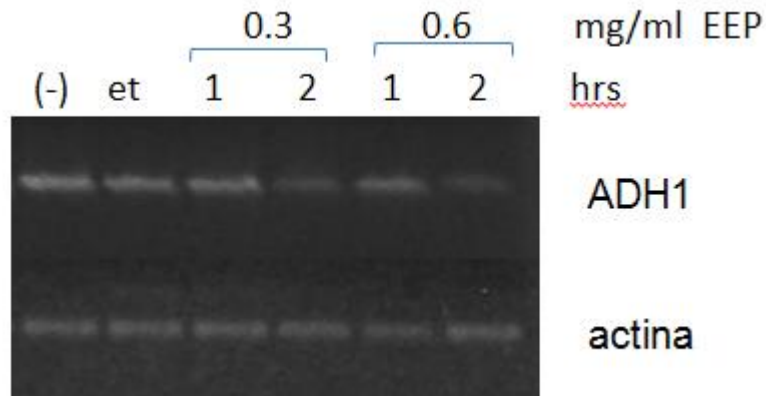
**Figura 18. Optimización del número de ciclos y la temperatura de alineamiento.** Se llevaron a cabo las reacciones de PCR empleando los iniciadores ADH11 (F y R) y ADH14 (F y R) disminuyendo el número de ciclos a 25, 30 y 35 ciclos. El cálculo de la  $T_m$  de la reacción se llevó a cabo con ayuda del programa beta-calculator y se consideraron dos grados abajo y tres arriba de dicha temperatura. Se muestran los carriles correspondientes a los marcadores de peso molecular ladder 100 pb. En el cuadro superior se observan las bandas del gen ADH1 1 con 35 Ciclos (C), 30C y 25C a diferentes temperaturas de alineamiento las cuales son 55°C, 52°C y 50°C. En el cuadro inferior se observa las bandas del gen ADH1 4 con 35 C, 30C y 25C con diferentes temperaturas las cuales son 55°C, 52°C y 50°C.

Los resultados finales para amplificar los dos pares de iniciadores ADH11 y ADH14 fueron: para un volumen final de 25  $\mu$ l se utilizaron 2.5  $\mu$ l de 10 X buffer PCR para una concentración final de 1 X, 0.5  $\mu$ l de dNTP's a una concentración final de 0.2 mM, 0.75  $\mu$ l de magnesio para una concentración final de 1.5 mM, 1.25  $\mu$ l de iniciadores para cada 0.5  $\mu$ M, cDNA 1  $\mu$ l y 0.5  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (5U/  $\mu$ l) para cada 2.5 U. Mientras que para ADH11 se puede amplificar con 25 C a 55 °C y para ADH14 el mejor resultado para amplificar son con 25 C a 52 °C.

Con la finalidad de demostrar que estas condiciones eran útiles para evaluar la expresión diferencial del gen ADH1 se evaluó el efecto que produce el extracto etanólico de propóleo sobre este gen.

Para lograr esto se hizo crecer la levadura bajo la presencia del EEP a concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/ml de extracto etanólico de propóleo (EEP) y con etanol al 70% como control durante 1 y 2 hrs de exposición, se extrajo el RNA por el método de cloruro litio y

se llevó a cabo la RT-PCR. En la figura 19 podemos observar que hay una subexpresión del gen dependiente de concentración y tiempo, de acuerdo a como se habían obtenido por la técnica de despliegue diferencial. Estos resultados se compararon con los niveles de expresión del gen de actina el cual se usó como control y como se puede apreciar su nivel de expresión se mantuvo constante.



**Figura 19. Efecto del EEP en la expresión diferencial del gen ADH1 evaluada por RT-PCR.** *Candida albicans* fue crecida en condiciones normales (-), en presencia de etanol al 70% (et) y en contacto con el extracto etanólico de propóleo (EEP) en concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/ml durante 1 y 2 horas. En la parte superior se observan las bandas correspondientes a la amplificación del gen ADH1 encontrando subexpresión del mismo en forma proporcional a la concentración y tiempo de contacto con el EEP. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación del gen de actina, donde la intensidad de la banda permanece constante.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular y la secuenciación del genoma de *C. albicans* ha hecho posible una identificación más completa de los genes asociados a la resistencia a los antifúngicos actuales, al crecimiento de la levadura, sus factores de virulencia y a los mecanismos moleculares de interacción con la célula huésped.

En el presente trabajo, se estandarizó la técnica de RT-PCR para evaluar la expresión diferencial del gen ADH1 de *Candida albicans*. La importancia de analizar este gen radica en que si bien, su función normal como cualquier alcohol deshidrogenasa es catalizar la conversión de acetaldehído a etanol, también parece desempeñar otros papeles importantes

en la célula que aún no son del todo comprendidos como por ejemplo la posible asociación a la superficie celular tanto a nivel de pared como de membrana, su interacción con componentes de la matriz extracelular y su posible papel en la adhesión a la célula hospedera o en la producción de biofilms.

Algunas referencias mencionan que es una molécula inmunogénica que juega un papel importante durante el proceso de invasión de *Candida albicans* a la célula huésped siendo una de las primeras proteínas en ser reconocida por el sistema inmune [30, 49, 60, 73, 83]. Se ha descrito también que interactúa con componentes de la matriz extracelular como el plasminógeno y fibrinógeno [20, 45], lo que sin duda debe estar relacionado con la capacidad de adhesión de la levadura, un importante factor de virulencia específico de *Candida albicans*. Esta capacidad de adhesión le permite formar biopelículas, una forma de crecimiento que les confiere a los organismos resistencia a desinfectantes y antifúngicos, además es una de las causas principales de candidemia cuando se forma en dispositivos intravenosos como los catéteres.

Con respecto a lo anterior, se ha demostrado que la proteína ADH1 se expresa diferencialmente en biopelículas bacterianas [5, 38]. En *Candida albicans* se han analizado los niveles de expresión de esta proteína durante el proceso de formación de las biopelículas y se han comparado con levaduras en estado planctónico (suspensión) y con hifas. Los resultados hasta el momento no son contundentes, debido a que hay contradicción respecto a la forma de crecimiento en la que se presenta mayor expresión de mensajeros y mayor concentración de proteína [85]. Mukherjee y colaboradores (2006) demostraron que en la formación de biopelículas hay una disminución de los niveles de ADH1 tanto de proteína como de mRNA comparados con células planctónicas y que la eliminación del gen disminuye la capacidad de formar biopelículas. Por otro lado, Martínez (2009) demuestra lo contrario, que los niveles de proteína se encuentran incrementados en las biopelículas, posteriormente en levaduras y quienes presentan menos expresión son las hifas, resultados compatibles con Gomariz (1999). En los estudios realizados por Ebanks (2006) se menciona que hay una sobrerregulación en respuesta a la transición de levadura a hifa. Los estudios de expresión durante la interacción con células tampoco son claros, a

pesar de que la localización en membrana y pared sugieren que la proteína podría estar participando en el proceso de adhesión [39, 67, 74].

Las evidencias anteriores indican que la proteína ADH1 no sólo actúa a nivel citoplasmático, sino que lleva a cabo funciones en la superficie de la célula. Existen diversos estudios proteómicos en los que se ha localizado a la proteína en fracciones provenientes de pared y membrana celular [12, 16, 21, 22, 52, 41, 85], aunque aún no se sabe como se une la proteína a estas estructuras [85]. Más difícil de entender es el hecho de que la proteína carece de un péptido señal que la acerque a las envolturas celulares. Se ha postulado incluso que para poder alcanzar pared y membrana debe de hacerlo por medio de un mecanismo no convencional de secreción, independiente del Golgi [16, 67, 85].

Otro hallazgo importante respecto a esta proteína es que se encuentra diferencialmente expresada en cepas resistentes a fluconazol indicando que la vía metabólica donde participa la enzima puede contribuir a la resistencia a dicho antifúngico en *C. albicans* [90]. También, por medio de un análisis proteómico se ha reportado que un nuevo compuesto antifúngico denominado 2-amino-nonyl-6-methoxyl-tetralin muriático (10b) favorece la subexpresión de la proteína y aunque se desconoce su mecanismo de acción pudiera estar relacionado con la generación de energía en la mitocondria [57].

Todo lo anterior hace importante su evaluación para poder comprender el papel que desempeña en todos los procesos mencionados anteriormente. Debido a que la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo por análisis proteómicos que involucran el análisis de muchas proteínas alteradas durante una condición en particular, nosotros proponemos que el análisis de la expresión del gen por medio de una técnica como la RT-PCR podría proporcionarnos información útil. En este trabajo se diseñaron los iniciadores y se estandarizaron las condiciones de la reacción que nos permitirán la evaluación de la expresión diferencial del gen bajo diferentes condiciones.

Para este trabajo la secuencia del gen fue obtenida a partir del Gen Bank y con ayuda del programa Primer3, con lo que se pudieron diseñar 10 pares de iniciadores de los cuales

seleccionamos dos que amplificaban la misma región pero generando fragmentos de diferente tamaño. Las características de estos iniciadores era que presentaban baja probabilidad de formar dímeros (homo y heterodímeros) y estructuras secundarias que pudieran disminuir la eficiencia de la PCR. Cuando se hizo la comparación de secuencias con el programa BLAST se encontró que eran 100% específicos para el gen ADH1 y que tenían homología con algunas otras regiones pero menores al 65%. Una vez que se contó con esta información se mandaron sintetizar los iniciadores.

Además de los iniciadores otro factor importante para que una reacción de RT-PCR sea exitosa es la calidad del RNA que se empleará. Para asegurarnos que contábamos con una buena muestra de RNA se probaron tres métodos distintos de extracción-purificación, dos comerciales (spin RNA y trizol) y el método de cloruro de litio. Principalmente son tres los parámetros que nos indican que el procedimiento es el adecuado, uno es la cantidad de RNA obtenido que va a depender del número de células de las que se parte sin embargo, e independientemente del método empleado, la concentración deberá ser superior a 0.5 mg/ml. Por esta razón se partió de un mismo cultivo y el volumen fue dividido por partes iguales entre los tres métodos. La cuantificación se llevó a cabo por medio de la lectura en el espectrofotómetro a 260 nm no encontrándose diferencias significativas entre los tres métodos.

La pureza de la muestra de RNA de *C. albicans* obtenido con cloruro de litio es otro factor importante a considerar, y este principalmente se determina por la proporción de las lecturas de absorbancia a 230, 260 y 280 nm generadas por el espectrofotómetro. La literatura menciona que la proporción  $A_{260}/A_{280}$  deberá ser entre 1.8 – 2.1. En las extracciones realizadas los mejores resultados se obtuvieron con el método de cloruro de litio, obteniendo una proporción de 1.93. Este factor se consideró adecuado debido a que la muestra fue diluida en agua y se ha reportado que los valores cercanos a 2 solo se obtienen cuando se emplea TE como diluyente. Algo parecido sucedió con la proporción  $A_{260}/A_{230}$ , que se recomienda que sea entre 1.8 – 2.1 y en la muestra obtenida de RNA seleccionada por el método de cloruro de litio la proporción obtenida fue de 1.93.

El tercer factor es la integridad de las bandas de RNA ribosomal 18S y 28S. Esto es evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa y se espera observar bandas bien definidas. La banda de 28S deberá presentar el doble de intensidad respecto a la de 18S y bandas tenues o no presentes de menor peso molecular que corresponden a los tRNA y al 5S. Cualquier barrido que se observe será indicativo de degradación. En este parámetro se observaron diferencias entre los tres métodos, las bandas 18S y 28S fueron evidentes en la extracción con cloruro de litio y trizol, sin embargo, con el kit RNA spin solo se observaron las de menor peso molecular. Una posible explicación a los resultados obtenidos en dicho kit puede ser que está diseñado para partir de una muestra tratada con enzimas para romper la pared celular y en este trabajo se realizó por maceración con nitrógeno líquido, lo anterior pudo haber afectado la calidad del RNA obtenido. Por otro lado, la muestra que presentó menos barrido fue la de cloruro de litio que fue la que se seleccionó para el resto de las pruebas.

Respecto al costo de cada uno de los métodos utilizados se observan grandes variaciones ya que el Kit RNA spin tiene un costo de 150 dólares (equivalente a \$1,950.00) y se pueden realizar 20 reacciones y 100 mililitros de trizol tienen un costo de 200 dólares (equivalente a \$2,600.00) considerando que con cada reacción se utiliza 1 mililitro de trizol en total se pueden realizar 100 reacciones y con cloruro de litio el costo es menor ya que este método utiliza varios reactivos que se pueden encontrar fácilmente en un laboratorio.

Para estandarizar la reacción de PCR las primeras corridas se realizaron a 40 ciclos con la finalidad de asegurar la visualización del producto por débil que fuera la banda. Primero se estandarizó la concentración de Mg y dNTP's encontrando que de las condiciones probadas solo las correspondiente a 1.5 y 0.2 mM respectivamente, fueron con las que se obtuvo producto de amplificación. La Tm se calculó con el programa olicalc beta calculator y en base a esta temperatura se determinó la temperatura de alineamiento. Se probaron algunos grados arriba y por debajo de esta temperatura con la finalidad de optimizar la reacción. El criterio de selección fue la presencia de una sola banda del tamaño esperado.

La literatura ha reportado que para poder tener resultados semicuantitativos en la PCR es necesario asegurarse que la amplificación se detiene durante la mitad de la fase logarítmica de la reacción, que puede ser desde los 20 hasta los 30 ciclos dependiendo del gen a amplificar [38,39,30] Por esta razón se evaluaron 25, 30 y 35 ciclos y después de visualizar los productos en gel de agarosa se seleccionó el número de ciclos en los que había menor intensidad de la banda pero era visible. De esta forma nos aseguramos que la reacción no estaba saturada y que nos permitiría evaluar diferencias en la expresión.

Una vez que se establecieron estas condiciones era necesario demostrar que eran las adecuadas para permitir evaluar la expresión diferencial del gen. En un trabajo previo realizado en el laboratorio se determinó que el extracto etanólico de propóleo provoca la subexpresión del gen ADH1, lo cual fue evaluado por medio de la técnica de despliegue diferencial. Bajo las condiciones determinadas en este trabajo se corroboraron los resultados de subexpresión del gen en forma proporcional a la concentración y al tiempo de exposición con el EEP, observando así una disminución en los niveles de expresión del gen ADH1 dependientes de la concentración y el tiempo de exposición, comparados con los niveles de expresión que se obtuvieron con el gen de ACT1 utilizado como control.

De acuerdo a lo anterior podemos concluir que los iniciadores diseñados y las condiciones establecidas permitirán evaluar la expresión diferencial del gen ADH1 de *C. albicans* bajo diferentes condiciones de crecimiento, lo cual permitirá profundizar en el estudio de la función que este gen desempeña en células planctónicas, en hifas y formación de biopelículas.

## CONCLUSIONES

1. Se diseñaron dos pares de iniciadores específicos para la amplificación de una región del gen ADH1 de *Candida albicans* denominados ADH11 y ADH14.
2. Se evaluaron tres métodos de extracción de RNA de *Candida albicans*, seleccionando como mejor el de cloruro de litio debido a que se obtuvo mejor pureza e integridad.
3. Respecto a los rendimientos de obtención de RNA no se encontraron diferencias significativas entre los tres métodos, sin embargo, en costos es mucho mayor el correspondiente al kit.
4. Se establecieron como concentraciones óptimas para la reacción de PCR: 1.5 mM de magnesio y 0.2 mM de dNTP`s debido a que en estas concentraciones los dos iniciadores probados mostraron una sola banda sin productos inespecíficos.
5. Las temperaturas óptimas de alineamiento para el par de iniciadores fue de 55°C y para el par ADH14 de 52°C.
6. El número de ciclos óptimo para ambos iniciadores fue de 25 ciclos ya que los dos pares de iniciadores presentaron bandas bien definidas y permitieron mostrar diferencias en la expresión diferencial.
7. Con las condiciones seleccionadas fue posible demostrar una subexpresión del gen ADH1 cuando se hizo crecer a *Candida albicans* en presencia de extracto etanólico de propóleo a concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/ml. Lo anterior demuestra que se logró una buena estandarización de la técnica de RT-PCR para evaluar los niveles expresión de este gen.



## **GLOSARIO**

**ADH1:** Alcohol deshidrogenasa 1.

**Adh1p:** Alcohol deshidrogenasa 1 proteína.

**Als:** del inglés Agglutinin-like secuencia.

**AMV:** Virus Aviar Mieloblastosis.

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dNTP's:** Desoxinucleótidos.

**EEP:** Extracto Etanólico de Propóleo.

**GC:** Guanina y citosina.

**GE:** marca comercial General Electric.

**Hwp1p:** del inglés hyphal and germ tube specific gene.

**Int11p:** del inglés putative integrin gene.

**MMLV-RT:** Virus de la Leucina Murina Malones.

**Mnt1p:** gen manosil transferasa.

**Pb:** Pares de bases.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa- transcriptasa reversa.

**SAP:** aspartil proteasas.

**Tm:** Temperatura de alineamiento.

**YPD:** del inglés Yeast Peptone Dextrose.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed G. H. (2011) Propolis An Overview, page. Available at: <http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/propoleos/propoleos.htm>. Accessed Jun 6.
2. Banerjee SN, Emori TG, Culver TH. (1991). Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National nosocomial infections surveillance system. *Am J Med.* 91: 86S-89S.
3. Becker K, Badehorn D, Keller B, Schulte M, Bohm KH, Peters G. (2001). Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for identification of *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata* by PCR. 39(9): 3356 – 3359.
4. Beggs Kyle T., Holmes Ann R., Cannon Richard D., Rich Alison M. (2004), Detection of *Candida albicans* mRNA in Archival Histopathology Samples by Reverse Transcription-PCR. 42(5): 2275 – 2278.
5. Bertram G, Swoboda R. K., Gooday G. W., Gow N. A., Brown A. J. (1996). Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health. *Yeast.* 12(2): 115 - 27.
6. Betram G., Swoboda R. K., Hollander H., Greenspan D., Greenspan J. S., Gow N. A. R., Gooday G. W., Brown A. J. P.(1993). Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during Candidiasis. 61(10): 4263-4271.
7. Bimal D. M. Theophilus and Ralph Rapley, *Methods in Molecular Biology, PCR Mutation Detection Protocols*, Humana Press Totowa New Jersey. 187: 1-11.
8. Bonifaz A, *Micología Médica Básica*, Ed. Editores Mendez, México D.F. 1994, p. 277-301.
9. Blankenship Jill R., Mitchell Aaron P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology.* (9): 588 – 594.
10. Burman C. (1998). Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 7670-5.
11. Burdon R. H. *Biosíntesis de RNA*, Ediciones Omega, Barcelona España 1978, p. 3-67.

12. Cabezón Virginia, Llama-Palacios Arancha, Nombela César, Monteoliva Lucía, Concha Gil. (2009). Analysis of *Candida albicans* plasma membrane, Proteomics. 9: 4770 – 4786.
13. Calderone AR, Fonzi AW. (2001). Virulence factors of *C. albicans*. Trends Microbiol; 9(1): 327-35.
14. Calderone Richard A., Braun Phyllis C. (1991). Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. Microbiological Reviews. 55(1): 1-20.
15. Cairns Timothy, Minuzzi Florencia, Bignell Elaine. (2010). The host-infecting fungal transcriptome. FEMS Microbiol Lett. 1 – 11.
16. Castillo Luis, Calvo Enrique, Martínez Ana I., Ruiz-Herrera José, Valentín Eulogio, Lopez Juan A., Sentandre Rafael. (2008). A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. Proteomics. 8: 3871–3881.
17. Castrillon Rivera Laura Estela, Palma Ramos Alejandro, Padilla Desgarranes Carmen. (2005). Factores de virulencia, Dermatología Rev Mex. 41(1): 12 - 27.
18. Copping Vanessa M. S., Barelle Caroline J., Hube Bernhard, Gow Neil A. R., Brown Alistair J. P., Odds Frank C. (2005). Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 55: 645 – 654.
19. Costa Josep. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Métodos microbiológicos para el diagnóstico clínico. 88 – 93.
20. Crowe Jonathan D., Siewqright Isla K., Auld Giltlan C., Moore Norma R., Gow Neli A. R., Booth Nuala A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. Molecular Microbiology. 47(6): 1637- 1651.
21. Chaffin LaJean W. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 72 (3): 495–544.
22. Chaffin WL. (1998). Cell wall and secreted proteins of *C. albicans*. Identification, function and expression. Microbiol Mol Biol Rev. 62: 130-80.
23. Charles N, Okeke R, Hideoki O. (2001). Quantification of *Candida albicans* Actin mRNA by the Light Cycler System as a Means of assesing Viability in modelo of cutaneous candidiasis. 3(10): 3491-3494.
24. D’Auria F. D, Tecca M, Scazzocchio F, Renzini V, Strippoli V. (2003). Effec of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. J Chemoter. 15(5):454 - 460
25. Donlan RM. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 8: 1-19.

26. Douglas L. Julia. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 139-143.
27. Eckert Sabine E., Fritz A. Mühlshlege. (2009). Promoter regulation in *Candida albicans* and related species. Federation of European Microbiological Societies. 2-9
28. Ebanks Roger O., Chisholm Kenneth, McKinnon Stewart, Whiteway Devan Malcolm, Pinto M. (2006). Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins. *Proteomics*. 6: 2147 – 2156.
29. Farré R., Frassetto I., Sánchez A. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*. 45(1): 21-43.
30. Fernández-Arenas Elena, Molero Gloria, Nombel César, Díez-Orejas Rosalía, Gil Concha. (2004). Low virulent strains of *Candida albicans*: Unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics*. 4: 3007 – 3020.
31. Finelli, A., C.V. Gallant, K. Jarvi, L. Burrows. (2003). Use of in-Biofilm expression technology to identify genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. 185: 2700 - 2710.
32. Gale CA. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene. INT1. *Science*. 279: 1355-8.
33. Ghannoum MA. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*; 3: 122-43.
34. Ghisalberti E.L. (1979). Propolis: A Review. *Bee Wld*. 60(2): 59-84.
35. Gordon Ramage, Kacy VandeWalle, Brian L. Wickes, José L. López-Ribot. (2001) Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18: 163-170.
36. Harley L, *Biología Celular y Molecular*, ed 5ª, Ed Médica Panamericana 2004, p. 107-111.
37. Henry A. Erlich, *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification*, ED. Oxford University press, New York 1992, p. 1- 104.
38. Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. (2000). Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(10): 693-700.

39. Herrington C. Simon and O'leary John J., PCR3 A practical approach PCR in situ Hybridization, Ed. IrL Press Oxford University Press, New York Tokyo 1998, p. 87- 99.
40. Hernaez María Luisa, Ximénez-Embún Pilar, Martínez-Gomariz Montserrat, Gutiérrez-Blázquez María Dolores, Nombela César, Gil Concha. (2010). Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. Journal of Proteomics. 1404 – 1409.
41. Hoyer LL. (1998). Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. Bacteriol. 180: 5334-43. Als
42. Hube B, Naglik J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family, Microbiology; 147: 1997 - 2005.
43. Jean-Marcel Senet. (1997). Risk factors and physiopathology of candidiasis. Revista Iberoamericana de Micología. 14: 6-13.
44. Jong Hee Shin, Seung Jung Kee, Myung Geun Shin, Soo Hyun Kim, Dong Hyeon Shin, Sang Ku Lee, Soon Pal Suh, Dong Wook Ryang. (2002) Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. Journal of Clinical Microbiology. 40(4): 1244–1248.
45. Josep Costa Crowe Jonathan D., Slevwrigth Isla K., Auld Gillian C., Moore Norma R., Gow Nell A. R., Booth Nuala A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. Molecular Microbiology. 47(6):1637-1651.
46. Jyotsna Chandra, Duncan M. Kuhn, Pranab K. Mukherjee, Lois L. Hoyer, Thomas McCormick, Mahmoud M. Ghannoum. (2001). Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. Journal of Bacteriology, 183(18): 5385–5394
47. Kapteyn JC. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. Mol Microbiol. 35:601-11.
48. Kart W. Henry, Joseph T. Nickels, Thomas D. Edlind. (2000). Upregulation of Erg Genes in *Candida* Species by Azoles and Other Esterol Biosynthesis Inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(10): 2693-2700.
49. Keebaara Bessie W., Nielsen Lindsey E., Nickerson Kenneth W., Atkin Audrey L. (2006). Determination of mRNA half-lives in *Candida albicans* using thiolutin as a transcription inhibitor. Genome. 49: 894 – 899.

50. Kyle T, Ann H, Richar C, Alisson Rich. (2004). Detection of *Candida albicans* mRNA in archival histopathology samples by Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 4(5): 2278-2278.
51. Kelly Judy, Kavanagh Kevin. (2010). Proteomic analysis of proteins released from growth-arrested *Candida albicans* following exposure to caspofungin. *Medical Mycology*. 48: 598 – 605.
52. Kelly T. Mary, M. MacCallum Donn, D. Clancy Susanne, C. Odds Frank, J. P. Brown Alistair, Butler Geraldine. (2004). The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Molecular Microbiology*. 53(3): 969-983.
53. Klotz A. Stephen, Pendrak L. Micheal, Hein C. Raymond. (2001) Antibodies to  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  integrins react with *Candida albicans* alcohol dihydrigebase. *Microbiology*. 147: 3159-3164.
54. Kuhn D. M., Chandra J., Mukherjee P. K., Ghannoum M. A. (2002). Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity*. 70(2): 878–888.
55. Kumamoto Carol A. (2005). *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 608 – 611.
56. Lehninger D., Principios de bioquímica, 4ª ed., Ed. Omega Barcelona España 2005
57. Liang RM, Cao YB, Zhou YJ, Xu Y, Gao PH, Dai BD, Yang F, Tang H, Jiang YY., Transcriptional response of *Candida albicans* biofilms following exposure to 2-amino-nonyl-6-methoxyl-tetralin muriate, (2010) 31(5), p. 616 – 28.
58. Londoño Orosco Ampara (en vias de publicación)
59. Luque José y Hernández Angel, Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética, Harcourt Elservier España, 2005.
60. Martínez-Gomariz Montserrat, Peruma Palani, Mekala Satish, Nombela César, Chaffin W. LaJean, GillConcha. (2009). Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics*. 9: 2230 – 2252.
61. McCullough M. J., Ross B. C., Reade P. C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Journal of Oral and Maxillofacial*. 25: 136-144.
62. Mc Pherson M. J., Quirke P., Taylor G. R., PCR, Ed. Oxford University Press, New York 1991, p. 1 - 13

63. Mello A.S.A., Padovan A.C.B., Serafin R.C., Puzer L., Carmona A.K., Neto Juliano L., Brimstein A. (2006). The *Candida albicans* AAA ATPase homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Rix7p(YLL034c) is essential for proper morphology, biofilm formation and activity of secreted aspartyl. *Pharmacology*. 5(4): 664-687.
64. Nikawa H. (1998). Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation *in vitro*. *Mycopathologia*. 144: 125-9.
65. Nelson , David L. And Cox, Michael M. Lehninger, Principles of Biochemistry, New York; W. H. Freeman and Company 2000, p. 180.
66. Niewerth M, Kunze D, Seibold M, Schaller M, Korting HC, Hube B. (2003). Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence. 47(6), p. 1805 - 1817.
67. Nombela César, Gil Concha, Chaffin W. LaJean. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *Microbiology*. 14(1): 15 – 21.
68. Okeke Charles N., Tsuboiryoji, Hideoki Ogawa. (2001). Quantification of *Candida albicans* Actin mRNA by the LightCycler System as a Means of Assessing Viability in a Model of Cutaneous Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(10): 3491 – 3494.
69. Pardi German, Cardozo Elba Inez. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal, *Acta Odontológica Venezuela*. 40(1): 10 – 15.
70. Park Yong-Cheol, Yun Na-Rae, San Ka-Yiu, Bennett George N. (2006) Molecular cloning and characterization of the alcohol dehydrogenase ADH1 gene of *Candida utilis* ATCC 9950. *Microbiol Biotechnol*. 33: 1032 – 1036.
71. Pelczar M, *Microbiología*, ed. 2ª, Ed. McGrawHill, México D.F. 1982, pag. 271-279.
72. Pemán Javier, Cantón Emilia, Valentín Amparo. (2008) Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25: 124-128.
73. Pitarch A, Díez-Orejas R, Molero G, Pardo M, Sánchez M, Gil C, Nombela C. (2001) Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics*. 1(4): 550 - 559.
74. Pranab K. Mukherjee, Sotohy Mohamed, Jyotsna Chandra, Duncan Kuhn, Shuqing Liu, Omar S. Antar, Ryan Munyon, Aaron P. Mitchell, David Andes, Mark R. Chance, Mahmoud Rouabhia, Mahmoud A. Ghannoum. (2006). Alcohol Dehydrogenase Restricts the Ability of the Pathogen *Candida albicans* To Form a

Biofilm on Catheter Surfaces through an Ethanol-Based Mechanism. *Infection and Immunity*. 74(7): 3804–3816

75. Prasad and Rajendra, *Candida albicans*, Cellular and Molecular Biology, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Berlin 1991, 5-79.
76. Quintero Mora ML, Londoño Orozco A, CI. Soto Zárate, CG. García Tovar, L. Carrillo Miranda, JG. Penieres Carrillo and TA. Cruz Sánchez. (20011). Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Pag 1068 - 1073
77. Richard Mathias L., Nobile Clarissa J., Bruno Vincent M., Mitchell1Aaron P. (2005). *Candida albicans* Biofilm-Defective Mutants. *Eukaryotic Cell*. 4(8): 1493 – 1502.
78. Roetzer Andreas, Gabaldón Toni, Schüller Christoph. (2011). From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 1 – 9.
79. Rogers P. David, Barker Katherine S. (2002). Evaluation of Differential Gene Expression in Fluconazole-Susceptible and -Resistant Isolates of *Candida albicans* by cDNA Microarray Analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(11): 3412–3417.
80. Schaechter Moseelio, *Microbiología, Mecanismos de las enfermedades*, ed 2ª, Ed. Medica Panamericana Buenos Aires, Argentina 1994, 595-599.
81. Sther F, Felk A, Gacser A, Kretschmar M, Mahnss B, Neuber K, et al. (2004). Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res*. 4(4-5): 401-8.
82. Sturtevant J, Calderone R. (1997). *C. albicans* adhesins: biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol*. 14: 90-97.
83. Swoboda R. K., Bertram G., Hollander H., Greenspan D., Greenspan J. S. (1993). Glycolytic Enzymes of *Candida albicans* Are Nonubiquitous Immunogens during Candidiasis. *Infection and Immunity*. 61(10): 4263 – 4271.
84. Takaisi-Kikuni N. B. and Schilcher H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*. 60, 222–227.



85. Thomas Derek P., Bachmann Stefano P., Lopez-Ribot Jose L. (2006). Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics*. 6: 5795 – 5804.
86. Martínez Urban Carol. (2008). Efecto del extracto etnólico del propóleo sobre el crecimiento y el daño estructural de *Candida albicans*. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitán.
87. Weig M, Grob U, Muhlschlegel F. Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. *Trends* (1998). *Microbiol*, 6(12): 468 - 70. Sap
88. Wiley, 4 ed. *Protocols in Molecular Biology* 1999
89. Willard Freeman M., Stephen Walker J., Kent Vrana E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. 26: 112-125.
90. Yan L, Zhang JD, Cao YB, Gao PH, Jiang YY *et al.* (200). Proteomic Analysis Reveals a Metabolism Shift in a Laboratory Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Strain. *Proteomics*. 6(6): 2248-56
91. Yeater Kathleen M., Chandra Jyotsna, Cheng Georgina, Mukherjee Pranab K., Zhao Xiaomin, Rodriguez-Zas Sandra L., Kwast Kurt E., Ghannoum Mahmoud A., Hoyer Lois L. (2007). Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology*. 15: 2373 – 2385.
92. Your complete guide for DNA. Separation and Analysis. FMC. pag 1 – 3
93. <http://estudiarfarmaciablogspot.com>
94. <http://trucha.ins.vabc.mc/molecula/default.htm>
95. <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ingenieria/2001832/lecciones/tinformacion.html>
96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>