



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN ADH1 EN CEPAS DE
AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans* CON DIFERENTE
CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MIGUEL VELÁZQUEZ GÓMEZ

ASESORES: Dra. MARÍA LEONOR QUINTERO MORA

Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Análisis de la expresión del gen ADH1 por medio de RT-PCR en copas de *Candida albicans* con diferente capacidad de formación de biopelícula

Que presenta el pasante: Miguel Velázquez Gómez
Con número de cuenta: 303265562 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.E. Fernando Flores Benítez	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Aceco	
SECRETARIO	Dra. Ma. Leonor Quintero Mora	
1er. SUPLENTE	QFB. Sara Hernández Matilde	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/12C

Dedicatorias

A mi Madre

A mi Madre que jamás dejó de creer en mí y hasta el último instante me brindó su ayuda, me ofreció su total confianza y me impulsó a no desistir.

A mis hermanos

En particular a mi hermana Carmen y Tony que fueron como mis padres y me brindaron protección, alimento y educación, a mi hermana Mimi, que cuando más la necesite siempre me brindó auxilio, a mi hermano Domingo, que jamás me negó su ayuda cuando la solicite y a mi hermano Shaggy.

Agradecimientos

A mi Madre por hacer de todos mis proyectos posibles y por financiar mis estudios hasta el término de este trabajo.

A la doctora Leonor por ofrecerme su confianza y paciencia y permitir que desarrollara una gran pasión por la investigación, más que brindar la ayuda para la realización de este trabajo, dio una nueva dirección a mi vida.

A los doctores Gerardo, Carlos Ignacio y José Luis por ofrecerme su amistad, confianza y ayuda cuando la solicite.

Agradezco al M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz por el Apoyo Técnico que brindó para la realización de este trabajo. Sobre todo agradezco el gran interés por mantener el orden y el buen estado del material y equipo y por atender inmediato los desperfectos que surgieron.

El presente trabajo se desarrolló con el apoyo del Proyecto PAPIPE PE 204414 y la Cátedra de Investigación "Morfología Veterinaria y Biología Celular".

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	3
Introducción.....	5
Virulencia	5
Adaptación al pH	6
Adhesinas	6
Enzimas	7
Hidrofobicidad celular.....	7
Dimorfismo y cambio morfológico	8
Biopelícula	8
Gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH1)	11
Proteína Adh1 (Adh1p).....	13
Efecto del gen y de la proteína Adh1 en la producción de biopelícula.	15
Antecedentes	16
Objetivo General.....	19
Objetivos particulares	19
Diseño experimental	20
Metodología.....	21
Cepas de <i>C. albicans</i>	21
Cultivo de <i>C. albicans</i>	21
Formación de biopelícula	21
Extracción de RNA utilizando perlas de vidrio	22
Síntesis de cDNA.....	23
PCR.....	23
Procesamiento de imágenes con programa imageJ	24
Resultados	24
Estandarización de la formación de biopelícula	24
Evaluación de la capacidad de adhesión de las levaduras procedentes de aislados clínicos. ...	28
Formación de biopelícula a partir de cepas de <i>C. albicans</i> obtenidas de aislados clínicos.....	29
Estandarización de la técnica de extracción de RNA.....	31
Niveles de expresión del gen ADH1 de diferentes cepas de <i>C. albicans</i> evaluadas por RT-PCR.....	32
Efecto del etanol	35

Discusión.....	38
Conclusiones.....	44
Referencias	45

Abreviaturas

ADH1-5	Gen de la alcohol deshidrogenasa 1-5
ADH14	Primer de secuencia del gen ADH1, designado con el número 4
Adh1p	Proteína alcohol deshidrogenasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ALS	Secuencia del gen semejante a aglutinina (agglutinin-like sequence gen, por sus siglas en inglés)
Als	Secuencia semejante a la proteína aglutinina (protein agglutinin-like sequence, por sus siglas en inglés)
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
EFG1	Regulador positivo de crecimiento filamentoso
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatos
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco (Dubecco's modified Eagle medium, por sus siglas en inglés)
DTT	Dithiothreitol
D.O	Densidad óptica
ΔCph, Δgen	Δ indica delección de la proteína o del gen
GSP	Cebador específico de gen (gen specific primer, por sus siglas en inglés)
Hwp1	Hyphal wall protein 1 (por sus siglas en inglés)
nt	Nucleótido
nm	Nanómetro

MEB	Microscopia electrónica de barrido
M-MLV RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (por sus siglas en inglés)
Oligo- dT	Oligonucleótido desoxitimidina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PHR1	Gen regulado por pH (pH-regulated gene, por sus siglas en inglés)
Poli-A	Residuos de adenina en el extremo 3' del RNAm
Q1-Q5	Isoformas del gen ADH1 con delección cuádruple, el número indica el único gen que se encuentra intacto.
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI 1640	Roswell park memorial institute medium (por sus siglas en inglés)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
SFB	Suero fetal bovino
Taq polimerasa	Polimerasa II de <i>Thermus aquaticus</i> (por sus siglas en inglés)
UFC/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
YPD	Extracto de levadura peptona dextrosa

Resumen

Una biopelícula es un ecosistema complejo de microorganismos y sus productos extracelulares adheridos sobre una superficie biótica o abiótica. Las biopelículas de *C. albicans* son causa de infecciones persistentes en los humanos debido a que se establecen en dispositivos médicos como catéteres intravasculares y son resistentes a drogas y tratamientos.

El gen ADH1 de *C. albicans* codifica para un polipéptido de 350 aminoácidos con función de alcohol deshidrogenasa pero también se ha visto que es una proteína inmunogénica y que tiene capacidad de unirse a componentes de la matriz extracelular de la célula hospedero. Evidencias moleculares y bioquímicas muestran que la proteína Adh1 juega un papel importante en la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas. En algunos ensayos se ha demostrado que la interrupción dirigida del gen ADH1 mejora la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas *in vitro*, mejorando así su capacidad para invadir y dañar las mucosas de los tejidos del hospedero.

En estudios previos realizados en el laboratorio hemos clasificado 26 cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas de diferentes orígenes anatómicos de acuerdo a su capacidad de formación de biopelículas. En este trabajo, nuestro objetivo fue analizar la expresión del gen ADH1 en algunas de estas cepas y evaluar si existe alguna relación entre la capacidad de formación de la biopelícula y los niveles de expresión del gen.

Se emplearon dos muestras representativas de cada grupo (grupos con alta, media y baja capacidad de formación de biopelículas) y empleamos la técnica de formación de biopelículas en placas de poliestireno, se realizó un seguimiento por microscopía y los niveles de expresión del gen se evaluaron por medio de la técnica de RT-PCR.

A nivel de microscopía observamos que había diferencias importantes en la estructura de las biopelículas formadas dependiendo de las cepas empleadas y estas iban desde biopelículas donde únicamente se encontraban levaduras hasta aquellas que tenían una organización espacial bien estructurada con presencia de levaduras, pseudohifas e hifas. Se encontró también que había una relación directa entre la capacidad de adhesión al poliestireno, el cambio morfológico y el tipo de estructura que presentaba la biopelícula.

Respecto a la expresión del gen ADH1 observamos que en las cepas menos adherentes y que formaron biopelículas más pobres hubo una baja expresión, en tanto que las cepas que presentaron mayor adherencia y formación de biopelículas bien estructuradas se presentaron niveles altos de expresión del gen.

De estos resultados concluimos que hay una relación directa entre la expresión del gen ADH1, la capacidad de llevar a cabo el cambio morfogénico, la adhesión a poliestireno y la capacidad de formación de biopelícula y estas características son distintas para cada una de las cepas de *C. albicans* analizadas sin que se presente relación alguna con su origen anatómico.

Introducción

Candida albicans es un hongo levaduriforme, asociado a manifestaciones clínicas localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Su incidencia entre las micosis es de 7.45 % y constituye 25 % de las micosis superficiales. Afecta a individuos de cualquier edad, grupo étnico o sexo. *C. albicans* forma parte de la flora normal de las vías gastrointestinales, la mucosa bucal y vaginal, así como la unión mucocutánea de orificios naturales de individuos sanos, coexistiendo como comensal con otros microorganismos, cuando el equilibrio se pierde se torna patógena y causa afección en piel y mucosas.

La clasificación taxonómica de *C. albicans* es la siguiente:

Súper reino-Eukaryota
Reino-Fungí
Subreino-Dikarya
Filo-Ascomycota
Subfilo-Saccharomycotina
Clase-Saccharomycetes
Orden-Sacharomycetales
Género- <i>Candida</i>
Especie- <i>albicans</i>

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Virulencia

C. albicans es un hongo patógeno oportunista, que con frecuencia produce infecciones superficiales de las mucosas, también puede producir infecciones sistémicas potencialmente mortales en pacientes inmunocomprometidos (Arenas 2009).

El primer evento en la infección por *C. albicans* es su adherencia al organismo hospedador y/o superficie de dispositivos médicos, que a menudo conducen a la formación de una biopelícula (Chandra, Kuhn et al. 2001). Así, la adhesión es un paso muy importante en el proceso de infección, y a su vez es dependiente del

microorganismo, del hospedador y las propiedades de las superficies abióticas, tales como la hidrofobicidad de la superficie celular y la composición de la pared celular (Chaffin 1983).

La candidiasis requiere de factores predisponentes; la mayor parte de las veces se origina de manera endógena, casi siempre atribuible a dos procesos: el desequilibrio de la flora microbiana, que favorece el incremento de levaduras de *Candida*, lo cual se puede deber a cambios en el pH, acumulación de nutrientes como el glucógeno, o la disminución de la flora bacteriana por antibióticos; o bien, debido a enfermedades o procesos que influyen en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular (Arenas 2009).

En el desarrollo del padecimiento influyen una serie de factores que actúan de manera coordinada, así se enuncian los más importantes que son:

Adaptación al pH

C. albicans se adapta a los cambios de pH de diversos medios y sustratos. Esta adaptación está regulada por dos genes, PHR1 y PHR2; ambos se activan e inactivan a diferentes condiciones de pH, PHR1 se expresa cuando el pH del ambiente es 5.5 o superior, mientras que PHR2 tiene el patrón de expresión inversa, su supresión provoca un defecto en la morfogénesis y virulencia condicionado por el pH (Calderon, Zavrel et al. 2010).

Adhesinas

Influyen en la adaptación o adhesión de la levadura. Las más importantes son las manoproteínas, las mananas y, en las células receptoras o del hospedero, las manoproteínas de superficie tipo lectina, las cuales están reguladas por genes específicos. Además de los mananos y las manoproteínas se ha reconocido como adhesina putativa a la quitina. Las adhesinas más estudiadas son la familia ALS, compuesta por ocho miembros (Als1-7 y Als9). Los genes ALS codifican para el glicosilfosfatidilinositol (GPI), que son glicoproteínas ligadas a la superficie celular. De las ocho proteínas Als, la adhesina Als3 es especialmente importante para la adhesión (Calderone 1991, Phan 2007, Cho 2009, Murciano 2012). Otra

adhesina importante de *C. albicans* es Hwp1, que es una proteína GPI-vinculada, asociada a la hifa. (Calderone 1991, Staab 1999, Sundstrom 2002). Hwp1 sirve como un sustrato para transglutaminasas de mamíferos y esta reacción puede ligar covalentemente las hifas de *C. albicans* a las células hospedero. Un mutante Hwp1 Δ/Δ mostró adherencia reducida a células epiteliales bucales y en un modelo de candidiasis sistémica mostró una virulencia atenuada (Staab 1999, Sundstrom 2002, Sundstrom, Cutler 2002). Hwpl y Als3 contribuyen a la formación de biopelículas, actuando como adhesinas complementarias (Nobile 2008).

Enzimas

Diversas enzimas son consideradas como factores de virulencia; las más importantes son: queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas y hialuronidasas. De forma específica se ha demostrado que lipasas y fosfolipasas contribuyen a la transición morfológica, colonización, citotoxicidad y a la penetración en el hospedero (Staniszewska 2012). Las fosfolipasas producen daños en los tejidos, en células epiteliales, producen ruptura de membranas y favorecen la penetración de hifas en el citoplasma. En *Candida* la producción de proteinasas aumenta la capacidad para colonizar y penetrar en el tejido del hospedero, engañar al sistema inmune, e interrumpir un número significativo de proteínas importantes para la inmunidad, tales como inmunoglobulinas, proteínas del complemento y citocinas (Ombrella 2008, D'Eca Junior 2011, Mattei 2013).

Hidrofobicidad celular

La hidrofobicidad de la superficie celular es una característica variable en *C. albicans* y está directamente relacionada con la adherencia a plástico y con la formación de biopelículas (Blanco 2010). El género *Candida* parece ser extremadamente sensible a las condiciones de crecimiento específico (Hazen 1986). La temperatura de cultivo de *C. albicans* afecta la adherencia al plástico por el cambio de la hidrofobicidad de la superficie celular, aumentando la hidrofobicidad de las cepas cuando crecen a 22 °C y haciéndolas más hidrofílicas a 36 °C (Blanco 1997). Por su parte Hazen y colaboradores (1990) demostraron en un modelo

murino que cepas hidrófobas de *C. albicans* son más virulentas que las cepas hidrófilas.

Dimorfismo y cambio morfogenético

El cambio morfogenético es la capacidad que tienen las levaduras de cambiar morfológicamente de la forma de blastoconidio (levadura) a pseudohifa e hifa. Este cambio está bajo la influencia de condiciones ambientales y representa uno de los factores de patogenicidad o virulencia más significativa para *C. albicans* que es considerada como una levadura dimórfica y puede presentar las formas de pseudofilamentos y filamentos, las cuales son las que llevan a cabo la infección (Baillie 1999, Ramage 2001, Ramage 2002).

Biopelícula

La formación de biopelículas de *C. albicans* conlleva importantes repercusiones clínicas por su alta resistencia a la terapia antifúngica, y su capacidad de soportar las defensas inmunitarias del hospedero. Los dispositivos tales como cánulas, derivaciones, prótesis, implantes, tubos endotraqueales, marcapasos, y diversos tipos de catéteres, son colonizados por *C. albicans*, que es la especie de hongo más comúnmente asociado con la formación de biopelícula; el aumento en infecciones por *Candida* en las últimas décadas se correlaciona con el aumento y uso generalizado de una amplia gama de dispositivos de implantes médicos, sobre todo en individuos con defensas deterioradas. La formación de biopelículas impacta negativamente en el hospedador, haciendo del dispositivo un puente para futuras infecciones continuas, lo que en algún momento hace necesaria su remoción (Ramage 2005).

Las biopelículas de *C. albicans* son comunidades bien estructuradas con células fúngicas incrustadas dentro de una matriz extracelular de polisacáridos, presentan una estructura tridimensional compleja con heterogeneidad espacial extensa que consiste en una red densa de levaduras, hifas y pseudohifas incluidas en una matriz de polisacáridos, hidratos de carbono, proteínas y componentes desconocidos. Se cree que esta complejidad estructural en la disposición espacial facilita la afluencia de nutrientes,

la eliminación de productos de desecho y el establecimiento de micronichos a lo largo de la biopelícula (Ramage 2005).

Las biopelículas de *C. albicans* constan estructuralmente de tres capas de acuerdo a lo observado en fotografías de MEB:

1. La capa basal, que actúa como células fundadoras anclando la biopelícula en desarrollo sobre el sustrato.
2. La capa intermedia, que se compone de hifas y pseudohifas.
3. La capa más superficial, compuesta fundamentalmente de una capa más gruesa de hifas y poros acuosos con abundante matriz extracelular (figura 1).

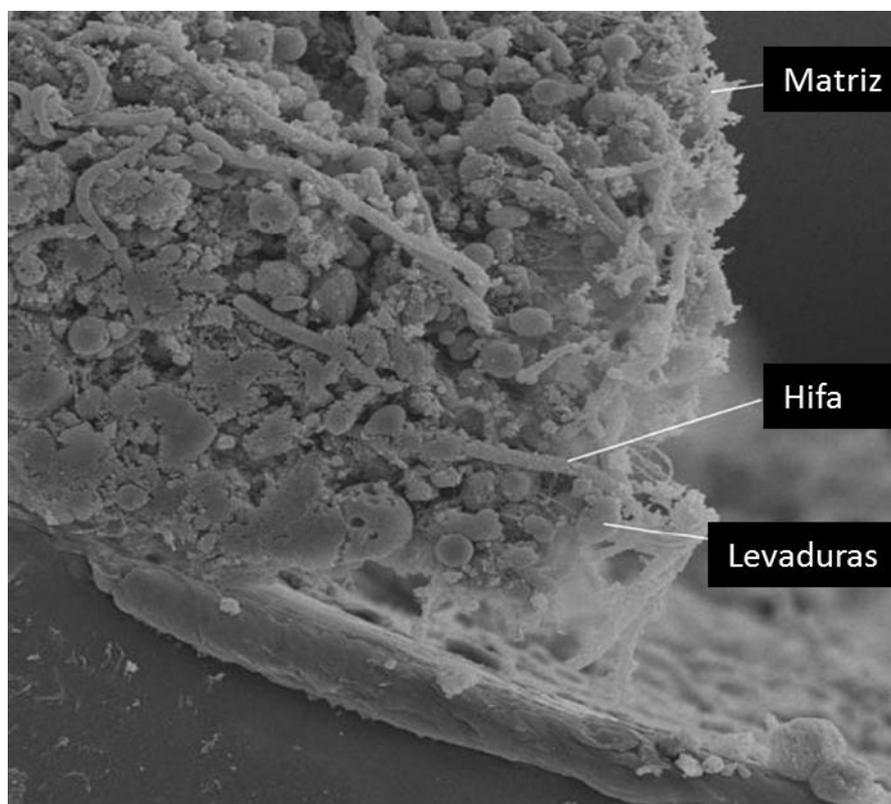


Figura 1 Corte transversal de Biopelícula de *C. albicans* adherida a catéter intravenoso. Imagen tomada de Current Opinion in Microbiology 2006, 9:340–34

La formación de biopelículas de *C. albicans* tiene tres fases de desarrollo: la adhesión de células de levadura a la superficie del dispositivo (fase temprana), la formación de una matriz de conmutación donde se presenta el cambio de levadura a las formas de hifas (fase intermedia) y aumento en el material de la matriz extracelular con tres dimensiones arquitectónicas (fase de maduración). Así, la formación de biopelículas

comienza con la adherencia de formas levaduriformes al sustrato (0-2 hrs), seguida por gemación y formación de microcolonias (2-4 hrs), filamentación (4-6 hrs), crecimiento confluyente (6-8 hrs), proliferación (8-24 hrs) y envejecimiento (24-48 hrs) (Ramage 2001).

La morfogénesis juega un papel fundamental en el desarrollo de biopelículas de *C. albicans*; Baillie y colaboradores (1999), demostraron que las hifas son elementos esenciales para proporcionar la integridad estructural y la arquitectura de múltiples capas características de biopelículas maduras.

Aunque se han descrito biopelículas rudimentarias en las que únicamente están presentes levaduras, la transición de levaduras a hifas es un punto crucial para poder construir biopelículas maduras con una estructura espacial altamente organizada (López 2005).

Se sugiere que la capa basal de levadura juega un papel importante en el anclaje de la biopelícula a la superficie, se ha observado que los tubos germinativos de *C. albicans* son más adhesivos que las células de levadura (Kimura 1980), también se encontró evidencia de que la adhesión está inversamente relacionada con la proporción de las hifas en cultivo, que contiene una mezcla de formas morfológicas y que las hifas alargadas pueden interferir con las etapas iniciales del proceso de fijación (Vargas 1994, Baillie 1999).

La formación y la estructura de la biopelícula de *C. albicans* está influenciada por la naturaleza de la superficie de contacto y factores ambientales. La naturaleza química de la superficie de contacto influye en la magnitud y arquitectura de la formación de biopelícula, distintas cepas de *C. albicans* y diferentes *Candidas* spp, difieren en su capacidad de formar biopelícula. Lo que indica que la formación de biopelícula puede depender de la expresión altamente específica de genes inducidos por contacto (Ramage 2005).

Ramage y su equipo (2002) midieron la capacidad de formar biopelícula de cepas mutantes con delección de gen Δ EFG1 y doble delección Δ Cph1/ Δ EFG1 de *C. albicans* las cuales mostraron que eran incapaces de formar filamentos bajo diferentes condiciones ambientales, las biopelículas fueron pobres, carentes de estructura tridimensional y compuestas principalmente por monocapas dispersas de células

alargadas. La doble mutante $\Delta\text{Cph1}/\Delta\text{EFG1}$ también resultó profundamente deficiente en la colonización de los catéteres de poliuretano recubiertos con plasma (Lewis 2002), pero aún tenía la capacidad de formar biopelícula delgada sobre vidrio, estaba compuesta principalmente por blastosporas (Garcia-Sanchez 2004). Estos resultados demuestran que la proteína reguladora del gen EFG1 es un factor clave en la formación y posterior desarrollo de biopelículas maduras de *C. albicans* en superficies biológicas y artificiales, considerando que tienen un efecto importante en la filamentación ya que varias cepas con otros genes mutados implicados en este proceso también muestran defectos en su capacidad de formar biopelícula (Garcia-Sanchez 2004, Kelly 2004). Posiblemente el dimorfismo *per se* puede no ser un requisito absoluto previo para la formación de biopelícula ya que se han descrito biopelículas sustancialmente de levaduras, pero podría ser necesario para el desarrollo de la estructura espacialmente organizada vista en biopelículas maduras y altamente estructuradas (Ramage 2005).

Gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH1)

El gen ADH1 de *C. albicans* se encuentra localizado en el alelo orf19.11480 del cromosoma 5 de *C. albicans*. La secuencia revela un marco de lectura abierto de 1050 pb con el potencial de codificar un polipéptido de 350 aminoácidos con función de alcohol deshidrogenasa. En la figura 2 se muestra la secuencia de nucleótidos del gen ADH1 y la secuencia de aminoácidos de la proteína Adh1.

A

C.albicans ADH1 gene for alcohol dehydrogenase 1

GenBank: X81694.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gi|608689|emb|X81694.1| C.albicans ADH1 gene for alcohol dehydrogenase 1
TCTAGAGGAATCACAGTTACAATTGTAGAGGAAACCGAACTAGTAAAACCTAGCACCCCAACTTCTAAAC
AAACCAATCAATTCATGGTATAACAAATCGTCTACCAGAAGTTATGCTAATATGAAACATCAATTGACA
ACATGGACATCAACTGAAGCTTTAAACAAATGAATAAAAAAAAAAGCCCATACATAGACCATTGGTCATAG
TTTCATTTGCCCCCGCCCACTTTTATGTTGAGTTGAATAATTGTGAGCATCAGCTGATTTTAAAATTA
TAATTTTTTTTTTCGTCATTGTTAATTCTATTTTAGTTTTTTCTTCTCCATCGTCTCCGAATTATTCCG
GAAGCTGGTAGCGGATAAGTTTLAGAATCATTGAGCCTCTTTTCAATGCCGGATGTTATCTGCAACTGAT
GTTAGTTAGTTAGTATAAGACTTAAATTTTCATAAAGAGTGACGAAAAGTCCAAATCTAAACTTCTCTAA
ACGAATTTAGACAATAGTCCGAAAAAAAAAAAAACAAAACCCATTATTGTGACATGTCAAAGGATTCAA
CGGTTGAGATGGAGCCGTCAAATATCCAAAACACTCTTCTTTTCAACTAATTTGCCGTAACACTATCTCCA
TCGTACGATTAAGATAAAAAAAAAAACAATTTCTTTCTTACAATATTTGATAGAGACCCAATGCAAAAGCCAG
CGAGAAGAGGAGTATTGGCATTGTTGGGTAGTAGATGAATGAGTAATCTTCTAGCCAAAAACAAAATAAA
CCACAAGAACAGTAGGCAAAACTGAGTAATGATAGCGCTTGTAGTCTTTGTATTTAAAAAAACCTAAT
GTCCAAAAATGAAAATCATGAGTTGCAAAATTTGTTGAAATCACCAGGTAATAGATCATTTAGCTATAT
CGCCTTATCATTCTTCGTACAAGAATTATACACAAATACCACCACCACCCAGAAAATTTTACACGT
GTTTTCTAAATTTACTTTCCGTGGCCAAATTAATTTGAAATTTTTCTTGTTCGAAACGGCTAGTGCCTC
AAACATATAGTAGCAAGTATTGCCTAAAGAGTTTCCGTCTCGTGCCCCCCCCCCTATCCCCTTTTGTA
ATTTGCCAAAATAGCTCAAAAAGGATAACCCGCACTTTTTTTTTCCGAGTTCTCGTCATGCAAGCAAGCT
TATTGAGAAATTTGAGAGGTGCGAGTCTCACCCTACCCTGCAGCTGCATCTTTTACAGCAACAGCAAC
AGCAGGTGCCACCACGGCAAGACATTGTCTGGATCCACTGTGCTCCGAAAACCTGATAAAAGGACCTAT
TCATCCCTGGTCTTATCTTCCAGAAATTTTTTTTTTTCATCAGTTTAAACAACAAACGTTATTGTC
ATACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
CTTTGATACCAATGGTGGTCAATTAGTCTACAAGGATTACCCAGTTCCAACCTCCAAAGCCAAATGAATTG
TTGATTCACGTCAAATACTCTGGTGTCTGTCACTGATTTACATGCAAGGAAAGGTGACTGGCCATTGG
CTACTAAATGGCATTAGTTGGTGGTCAAGAGGTGCCGGTGTCTGTGCGGTATGGGTGAAAACGTCAA
AGGATGGAAAATCGGTGACTTTGCCGGTATCAATGGTTGAATGGTTCTTGTATGAGTTGTGAATTTCTGT
CAACAAGGTGCTGAACCAAACTGTGGTGAAGCTGACTTGTCTGGTTACACTCAGATGGTTTCAATCGAAC
AATACGCTACTGCTGATGCTGTTCAGCCCGCTAAAATTCAGCTGGTACTGATTTAGCCAAATGTCGCACC
AATCTTATGTCTGGTGTACTGTTTACAAAAGCCTTAAAGACTGCTGACTTAGCAGCTGGCCAAATGGGTT
GCTATCTCCGGTGTGGTGGTGGTTAGGTTCTTTGGCCGTTCAATACGCCAGAGCCATGGGTTTGAGAG
TTGTTGCTATTGACGGTGGTGACGAAAAGGTGAATTTGTTAAATCATTGGGTGCTGAAGCTTACGTTGA
TTTTACCAAGATAAAGATATTGTTGAAGCTGTCAAGAAAGCTACTGATGGTGGTCCACACGGTGTCTATC
AATGTCTCTGTTTCTGAAAAGCCATTGACCAATCTGTTGAATATGTTAGACCATTAGGTAAAAGTTGTTT
TGGTTGGTTTTACCAGCTCACGCTAAAGTCACTGCTCCAGTTTTCGATGCTGTTGTCAAATCCATTGAAAT
CAAGGTTCTTACGTTGGTAACGAAAAGACACTGCTGAAGCTATTGACTTCTTCTCCAGAGGTTTAAATC
AAATGTCCAATCAAGATTGTCGGTTTATCTGACTTGCCAGAAGTCTTCAAATGATGGAAGAAGGTAATAA
TCTTGGGTAGATACGTTCTTGGACACAGTAAATAAGCAAAATAGCTAAATTTATATACGAATTAATGTTATG
ATTAAGTGTTCAGAGTGGCATAATTTTTTATTACTATCTTATACAGTTG
```

B

alcohol dehydrogenase [Candida albicans]

GenBank: CAA57342.1

[GenPept](#) [Graphics](#)

```
>gi|608690|emb|CAA57342.1| alcohol dehydrogenase [Candida albicans]
MSEQIPKTKQKAVVFDNTNGGQLVYKDYFVPTPKPNELLIHVKYSVCHTDLHARKGDWPLATKLPVGGHE
GAGVVVGMGENVKWKIGDFAGIKWLNKSCMSCEFCQQGAEPNCGEADLSGYTHDGSFEQYATADAVQAA
KIPAGTDLANVAPILCAGVTVYKALKTADLAAGQVVAISGAGGGLGSLAVQYARAMGLRVVAIDGGDEKG
EFVKSLGAEAYVDFTKDKDIVEAVKATDGGPHGAINVSVSEKAIDQSVYVYRPLGKVVVLVGLPAHAKVI
APVFDVAVKSIEIKGSYVGNRKTAEAI DFFSRGLIKCPIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILGRYVLDTSK
```

Figura 2. Secuencia del gen (A) y la proteína (B) de la alcohol deshidrogenasa 1 de *C. albicans*. GenBank NCBI.

El genoma de *C. albicans* contiene una familia de al menos seis genes de alcohol deshidrogenasa que son: ADH1/orf19.3997, ADH2/orf19.5113, ADH3/orf19.4505, ADH4/orf19.27, ADH5/orf19.2608 y orf19.4504 .

Los análisis de comparación de secuencias de DNA demuestran que el gen de la alcohol deshidrogenasa 1 de *C. albicans* presenta los siguientes porcentajes de homología con genes de *S. cerevisiae*: del 74.5% con ADH1, 70.5% de ADH2 y 70.8% de ADH3.

Comparando ADH1 de *C. albicans* con la secuencia de genes de *Kluyveromyces lactis* se encontró una homología de 71.5% con KIADH2, 74.9% con KIADH3 y 74.5% con KIADH4. En el caso de *Schizosaccharomyces pombe* presentó una menor homología y fue del 56%. Un análisis de las secuencias genómicas y de DNA complementario determinó que el gen ADH1 de *C. albicans* no posee intrones (Shen 1991, Smith 1992, Swoboda 1994).

Con respecto a la regulación de la expresión del gen ADH1 Swoboda y colaboradores (1994) reportaron que los niveles del mRNA de ADH1 de *C. albicans* cambian durante la transición de levadura a hifa y durante el crecimiento.

Bertram (1996) empleó la cepa 3153 y la hizo crecer en medio YPD encontrando que el mRNA de ADH1 presenta bajos niveles de expresión al inicio de la fase exponencial para alcanzar un máximo en las etapas tardías de esta misma fase (aproximadamente entre las 5 y 8 horas de crecimiento) y decae nuevamente a niveles bajos durante la fase estacionaria (de 12 a 24 horas de crecimiento). Esta disminución coincide con la baja de los niveles de glucosa en el medio y con el punto donde el etanol empieza a utilizarse. Estos mismos autores analizaron la regulación de la expresión del gen en respuesta a la fuente de carbono y demostraron que el nivel mínimo de expresión se obtiene cuando la levadura crece en presencia de etanol, seguido por glucosa, piruvato, lactosa, glicerol, sucrosa y galactosa por lo que deducen que la expresión del gen ADH1 responde principalmente a la fuente de carbono (Bertram 1996).

Proteína Adh1 (Adh1p)

La proteína alcohol deshidrogenasa es una oxido-reductasa involucrada en la fermentación de glucosa que cataliza la conversión reversible de acetaldehído a etanol en la última etapa de fermentación



La producción de etanol ocurre bajo condiciones anaeróbicas in vitro, en el tracto gastrointestinal y durante las infecciones (Chang 1989, Ogasawara 2006, Spinucci 2006).

A pesar de que en otros microorganismos se han encontrado varios genes que codifican para distintas alcohol deshidrogenasas, en el caso de *C. albicans*, Bertram y colaboradores (1996) no encontraron más de una isoforma de la proteína, pero no pudieron determinar si solo existe un locus de ADH o si existen más. Sus experimentos demostraron que este locus es regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional.

La proteína Adh1 de *C. albicans* tiene un peso de 40-kilodaltones e inicialmente se predijo que su localización debía ser intracelular. Sin embargo, en diversos estudios de proteómica se ha demostrado que esta proteína puede ubicarse también a nivel de superficie, en membrana y pared celular y que posee propiedades inmunogénicas siendo la proteína de mayor tamaño con estas características (Bertram 1996, Cabezon 2009, Castillo 2008, Chaffin 2008) aunque aún se debe esclarecer el papel preciso que ahí desempeña la proteína.

Adh1p ha sido agrupada dentro de las proteínas multifuncionales atípicas ya que carece de un péptido señal que la dirija hacia retículo endoplásmico y posteriormente al Aparato de 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 (Nombela 2006, Thomas 2006).

Esta proteína presenta capacidad de unión a proteínas estructurales (plasminógeno e integrinas) del hospedero, por lo que se asume que puede tener un papel en las interacciones hongo-hospedero (Shen 1991, Swoboda 1993, Bertram 1996, Pitarch 2001).

Otros estudios han demostrado que Adh1p, reacciona con anticuerpos contra integrinas humanas tales como vitronectina y fibronectina, lo que indicaría que en la superficie celular Adh1p juega un papel en la adhesión a la matriz extracelular durante las infecciones (Klotz 2001, Mukherjee 2006).

El equipo de Bertram (1996) demostró que los niveles de la proteína alcohol deshidrogenasa no tienen una estrecha correlación con los niveles de mRNA, concluyendo que el gen está regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Efecto del gen y de la proteína Adh1 en la producción de biopelícula.

Mukherjee y colaboradores (2006) fueron los primeros en evaluar el papel del gen ADH1 tanto en células planctónicas como en biopelículas de *C. albicans* y encontraron que los niveles de expresión de Adh1p y del mRNA se encuentran disminuidos en biopelículas respecto a células planctónicas en todos los tiempos de crecimiento evaluados (de 6 a 48 horas). En este mismo trabajo obtuvieron una mutante adh1 que mostró que era capaz de formar más biopelícula que la cepa silvestre. De forma similar, la inhibición de Adh1p con inhibidores bioquímicos como el disulfiram y el 4 metil pirazol mostraron que la biopelícula que se formó fue más compleja que la cepa silvestre. De estos experimentos ellos concluyen que el papel de Adh1p en la formación de biopelículas es mediado por su actividad enzimática y que la proteína contribuye a la capacidad de *C. albicans* en la formación de biopelículas tanto *in vivo* como *in vitro* por un mecanismo dependiente de etanol.

Una posible explicación para el papel de la ADH1 en la formación de biopelícula de *C. albicans* podría basarse en el concepto de que el etanol, producto final del metabolismo de esta levadura, es un inhibidor de la producción de biopelícula. En condiciones de inhibición por productos de desecho ADH1 puede ser regulada a la baja como una manera de evitar la toxicidad del etanol (Bertram 1996).

Por otra parte, Thomas y colaboradores (2006) encontraron una sobreexpresión de Adh1p y una subexpresión de Adh2p en biopelículas comparadas con células planctónicas contrario a lo que había mostrado Mukherjee (2006).

Existen otros reportes en los que se evalúan los niveles de expresión del gen y la proteína alcohol deshidrogenasa 1 tanto en levaduras como en hifas y se mencionan a continuación:

Swoboda y colaboradores (1994) demostró que los niveles de mRNA aumentaron 3.5 veces cuando se indujo el cambio de levadura a hifa empleando un aumento de temperatura combinado con la adición de suero en el medio.

Por su parte Ebanks y colaboradores (2006) reportaron una sobreexpresión de la proteína en la hifa respecto a la levadura. Martínez y colaboradores (2009) emplearon

estudios proteómicos y demostraron que los niveles de Adh1 fueron mayores en biopelículas que en levadura y estos a su vez fueron mayores que en hifa a nivel de proteínas de superficie. En proteínas citoplasmáticas los niveles mayores se encontraron en biopelícula seguidos de hifas y luego levaduras con niveles muy parecidos entre estos últimos dos.

Antecedentes

Las biopelículas juegan un papel importante en la patogénesis microbiana, especialmente a nivel de pacientes hospitalizados donde el uso de los dispositivos médicos sigue en aumento. Específicamente, las biopelículas producidas por *C. albicans* favorecen que este hongo sea resistente a las terapias antifúngicas con anfotericina, azoles y 5-flucitosina y cuando esto sucede lo más recomendado es retirar el dispositivo con las implicaciones que esto trae consigo.

Existen diversos reportes en los que se menciona que a pesar de que *C. albicans* es la especie con mayor capacidad de producción de biopelículas, ésta es distinta entre diferentes aislados clínicos. En estos trabajos se analizó la relación entre la formación de biopelículas y el origen del aislamiento y los resultados son contradictorios: Kuhn y colaboradores (2002) sugieren que aislamientos recuperados de fuentes invasoras presentan una mayor capacidad de formación de biopelículas, sin embargo, autores como Jin (2003), Li (2003), Shin (2002) y Durán (2007), no pudieron establecer diferencias en la formación de biopelículas entre aislamientos provenientes de diferentes muestras clínicas y las diferencias parecen deberse a variantes entre las metodologías y el número de cepas empleadas.

En un trabajo previo realizado en el laboratorio se comparó la capacidad de formación de biopelículas de 27 aislados clínicos provenientes de diferentes orígenes anatómicos. La formación de las biopelículas se llevó a cabo en microplacas de poliestireno de 96 pozos y se empleó para su desarrollo medio RPMI (70%) con PBS (25 %) y suero fetal bovino (5%). La evaluación se llevó a cabo empleando tres diferentes métodos que fueron la microscopía directa, cristal violeta y la reducción de XTT (Hernández 2013).

Los resultados obtenidos demostraron que cada cepa de *C. albicans* presenta diferente capacidad de formación de biopelícula lo que nos permitió agruparlas en baja, media y

alta capacidad, pero no se observó ninguna relación con el origen anatómico, en la figura 5 se muestran algunos de los resultados obtenidos.

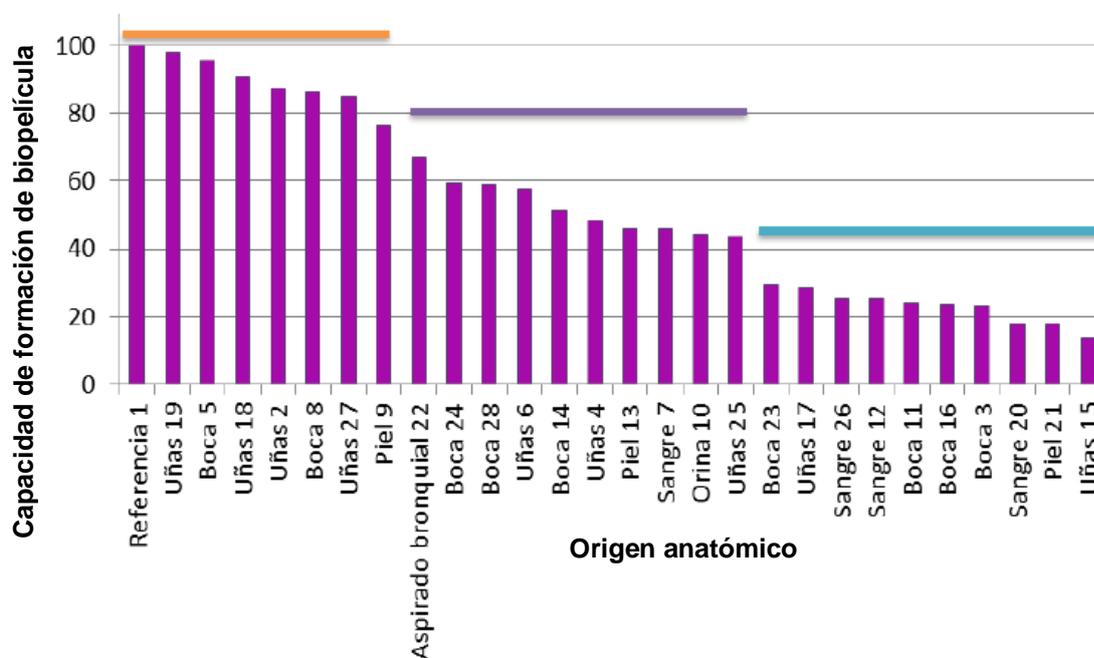


Figura 5. Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de CV. La línea naranja muestra cepas de alta capacidad, la línea morada de mediana capacidad y la azul de baja capacidad (Hernández 2013).

Considerando los resultados anteriores y que la capacidad de producción de biopelícula va estrechamente relacionado con la probabilidad de que se genere una infección y que esta derive en candidiasis, consideramos de vital importancia la comprensión de los mecanismos moleculares de formación las biopelículas de *C. albicans* y su resistencia a los antifúngicos con la finalidad de proporcionar los medios para desarrollar nuevas terapias profilácticas y de tratamiento.

Uno de los genes que se ha demostrado que presenta diferentes niveles de expresión durante la formación de biopelículas y con respecto a la levadura y a las hifas es el gen ADH1, que además de participar en las vías glicolíticas parece desempeñar un papel importante a nivel de superficie celular, probablemente como inmunógeno y en la adhesión a superficies y a la célula hospedera. Hasta el momento ha habido avances importantes en esta línea de investigación, sin embargo falta mucho por esclarecer.

De forma muy interesante, este gen (ADH1) también ha sido asociado con la resistencia de las cepas de *C. albicans* hacia los azoles. Yan y colaboradores (2007) demostraron que una de las proteínas expresadas diferencialmente en una cepa resistente a fluconazol (comparada con una sensible) era la proteína Adh1.

En reportes recientes se ha demostrado que la expresión de este gen correlaciona de forma inversa con la expresión de CDR1 y CDR2, genes ligados a la resistencia a los azoles en *C. albicans*. En células planctónicas de aislados clínicos de pacientes con síndrome poliglandular autoinmune (APECED, APS-I) se observó que el gen ADH1 es expresado en bajos niveles en muestras resistentes a fluconazol donde CDR1 y CDR2 presentan una alta expresión (Siikala, 2011).

Por su parte, Hui y colaboradores (2013) emplearon aislados clínicos de 20 pacientes con candidosis vulvovaginal y encontraron que en muestras resistentes a fluconazol, los niveles de expresión de ADH1 correlacionan de forma positiva con los de CDR1, CDR2 y FLU1. Como ellos mismos mencionan, los altos niveles de expresión del gen ADH1 están íntimamente relacionados con la resistencia a fluconazol pero aun es necesario aclarar el mecanismo que está involucrado.

En este trabajo nuestro principal interés fue analizar los niveles de expresión del gen ADH1 en cepas de *C albicans* con diferente capacidad de formación de biopelículas por medio de la técnica de RT-PCR.

Para lo anterior, se emplearon una cepa de referencia (ATCC10231) y cinco cepas provenientes de aislados clínicos de diferentes orígenes anatómicos de las cuales dos cepas fueron clasificadas como de alta capacidad de formación de biopelícula, dos de mediana y dos de baja (de acuerdo a la clasificación realizada por Hernández en 2013) y se analizó si existía una relación directa con los niveles de expresión de ADH1 tratando de esclarecer un poco más el papel que este gen desempeña bajo estas condiciones.

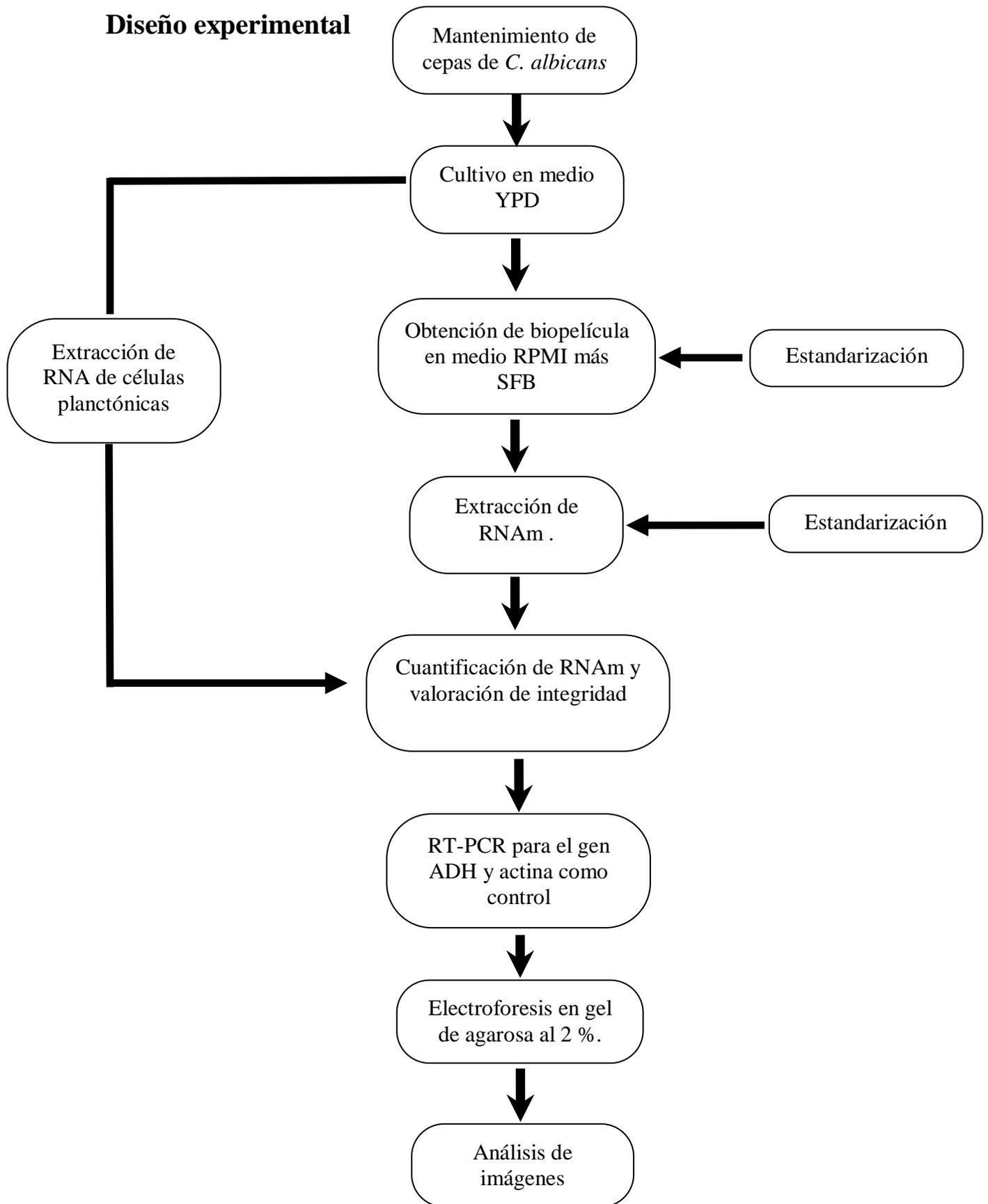
Objetivo General

Analizar los niveles de expresión del gen ADH1 en cepas de *C albicans* con diferente capacidad de formación de biopelículas por medio de la técnica de RT-PCR.

Objetivos particulares

- Estandarización de la técnica de formación de biopelícula en placas de poliestireno de 60x10.
- Estandarización de la técnica de extracción de RNA a partir de biopelículas.
- Evaluación de la formación de biopelícula de cepas de diferentes aislados clínicos por microscopía óptica.
- Evaluación de los niveles de mRNA a las 6 hrs de formación de biopelícula comparándolos con los niveles de las células planctónicas.

Diseño experimental



Metodología

Cepas de *C. albicans*

Se empleó la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 y 5 cepas de aislados clínicos que fueron identificadas por métodos tradicionales (filamentación en suero, producción de clamidioconidios en agar harina de maíz, crecimiento en CHROMagar Candida, asimilación de carbohidratos con el sistema API-20-AUX y que fueron proporcionadas amablemente por la M. en C. Patricia Manzano Gayosso del laboratorio de Micología de la Facultad de medicina UNAM.

A continuación se menciona su origen anatómico

CEPA	ORIGEN ANATÓMICO
1039	Boca
112U	Uñas
627-05	Piel
648	Boca
520	Boca

Tabla 1. Origen anatómico de las cepas de *C.albicans*.

Cultivo de *C. albicans*

Las levaduras se mantuvieron en agua (López, Giro et al. 2005) hasta su uso y una vez reactivadas se hicieron crecer y se mantuvieron en medio SDA.

Formación de biopelícula

Con la finalidad de poder llevar a cabo la evaluación de los niveles de expresión del gen ADH1 en biopelículas obtenidas a partir de diferentes aislados clínicos, como primer paso fue necesario estandarizar las condiciones para obtener de forma reproducible las biopelículas.

En un trabajo previo llevado a cabo en el laboratorio, Hernández (2013) optimizó un protocolo de producción de biopelículas usando como soporte microplacas de poliestireno de 96 pozos, sin embargo, la cantidad de células que se obtienen por pozo

en este formato no era suficiente para la extracción de RNA, por lo que para este trabajo fue necesario escalarlo a cajas de Petri de 60 x 10 mm.

Para ello se empleó la cepa de referencia ATCC 10231 y los parámetros a modificar fueron la velocidad de agitación, el número de células del inóculo y la concentración de los suplementos del medio (PBS, SFB, RPMI 1640) empleado.

Se sembró un inóculo de cada cepa en 5 ml de medio YPD estéril en tubos Falcon de 15 ml y dejó crecer hasta la mitad de la fase exponencial (D.O=1 a 600 nm). Se realizaron dos lavados con PBS 1x estéril y resuspendió en 5 ml de PBS 1x. En cajas petri de poliestireno de 60x10 mm, se colocaron 8 ml de RPMI 1640 suplementado con 20-30 % PBS 1x, 2-10 % de SFB más (1×10^7 - 3×10^7 UFC/ml) e incubo por (1-2 hrs) a 37° C y (20-100 rpm). Pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante y se lavó en tres ocasiones con PBS 1x estéril frío para eliminar las células no adheridas. Se colocaron nuevamente 8 ml de RPMI 1640 suplementado e incubo a 37 °C, (20-100 rpm), durante (1-8 hrs).

Extracción de RNA utilizando perlas de vidrio

Se empleó la técnica descrita por Collar y Olivero (2001) con algunas modificaciones.

Una vez completadas las seis horas de incubación, se eliminó el sobrenadante y se adicionó de tres a cuatro ml de PBS 1x frío, se retiró la biopelícula por pipeteo y se recuperó en tubos Falcon de 15 ml, se centrifugó de 2500- 3000 rpm y se recuperó el precipitado. Se transfirió a un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml y se microcentrifugó 10 segundos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 300 µl de buffer para RNA (0.5 M de NaCl, Tris Cl 200 mM, EDTA 10 mM, preparado en el momento) y se añadió un volumen de perlas de vidrio refrigeradas lavadas con ácido equivalente a 200 µl de agua, se agregó 300 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 equilibrado con Tris. Se agitó vigorosamente en vórtex por (3-5) min. Se microcentrifugó 2 min a 3500 rpm a temperatura ambiente, se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml. Se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo alcohol isoamílico 25:24:1 de 200-250 µl y se agitó vigorosamente 10 seg. Se microcentrifugó 2 min a 3500 rpm, recuperando la fase acuosa en un tubo nuevo. Se adicionaron 600 µl de etanol absoluto, se mezcló y se dejó de mínimo 30 minutos a -70 °C o en hielo seco 5 min. Pasado el tiempo se centrifugó 2 min a 3500 rpm a 4 °C y se

decanto el sobrenadante y lavo la pastilla con etanol frío al 70 %. Se centrifugo a 3500 rpm por 2 min a 4 °C. Se decanto el sobrenadante y dejo secar al aire. Se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua DEPC y se determino la concentración por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Se guardo el RNA a -70 °C.

Síntesis de cDNA.

Se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor usando M-MLV RT (Invitrogen). Se colocaron 1 µl de oligo-dT 500 µg/ml, 500 ng de mRNA, 1 µl de dNTP's 10 µM y agua destilada estéril para 12 µl. Se coloco en termociclador a 65 °C/15 min y coloco posteriormente en hielo. Se adicionaron 4 µl 5 X de buffer de primera cadena y 2 µl DTT 0.1M mezclando e incubando a 37 °C/2 min. Se agrego 1 µl M-MLV RT (200 unidades) y se mezclo suavemente por pipeteo, incubando 50 min a 37 °C y a 70 °C durante 15 min, el volumen final obtenido fue de 20 µl.

PCR

La amplificación del DNA complementario para el gen **ADH1** se realizó con los primers diseñados en un trabajo previo en el laboratorio y empleando las mismas condiciones (Luna 2012). Se colocaron en un tubo para PCR 2.5 µl Buffer sin Mg (10 X), 0.75 µl MgCl₂ (50 µM), 0.5 µl de dNTP`s (10 µM), 1.25 µl de cada primer (10 µM), 0.5 µl Taq polimerasa 5 U/µl y 2-4 µl cDNA. Las condiciones de la reacción fueron de: 95°C/5 min, 25 ciclos de 94 °C/1 min, 52°C/1 min y 72°C/1.5 min.

Con la finalidad de normalizar los resultados de RT-PCR obtenidos para el gen ADH1, se empleo el gen de **actina** como control. Para el gen de **actina** se colocaron en un tubo para PCR 2.5 µl Buffer sin Mg 10 X, 0.75 µl MgCl₂ (50 µM), 0.5 µl de dNTP`s (10 µM), 0.5 µl de cada primer (10 µM), 0.5 µl Taq polimerasa (5 U/µl) y 2-4 µl cDNA. Las condiciones de la reacción fueron de: 95°C/5 min, 25 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1 min y 72°C/1.5 min.

PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO
ADH14F	GTT CCA ACT CCA AAG CCA AA	544 pb
ADH14R	TTT CGT CAC CAC CGT CAA TA	
ACT1F	AGA ATT GAT TTG GCT GGT AGA GAC	443 pb
ACT2R	AGA AGA TGG AGC CAA AGC AGT AAT	

Tabla 2. Secuencia de los primers empleados y tamaño de los productos de amplificación (Luna 2012)

Una vez que se concluyó la reacción de PCR los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

Procesamiento de imágenes con programa imageJ

Las imágenes de los geles mostradas se procesaron de acuerdo a imageJ para geles (imageJ.nih.gov/ij/) a 8 bits y los resultados se presentan en base a la intensidad de señal en función de área. Para la comparación entre células planctónicas y biopelícula se comparó cada señal y se representaron en forma de gráfica de barras.

Resultados

Estandarización de la formación de biopelícula

En la formación de biopelícula la velocidad de agitación fue un factor importante para poder obtener una biopelícula con las características que se buscaba. Cuando se incrementaba a más de 50 rpm se producían biopelículas que crecían solo en la parte central de las cajas, donde se acumulaban una gran cantidad de células y hacia la zona periférica se encontraba poco crecimiento.

Además, se observó que a mayor velocidad de agitación, menor era la capacidad de las células para adherirse al sustrato (poliestireno), y como sabemos éste es el primer paso que se debe llevar a cabo para la formación de la biopelícula. En la tabla 3 se resume la capacidad de adhesión observada dependiendo de la velocidad de agitación empleada.

Se muestra además el efecto que tiene el medio de cultivo en la adhesión. En caso del medio se observó menor porcentaje de adhesión o se mantuvo con el incremento en las proporciones de los complementos (PBS, SFB), por ello se decidió mantenerse las condiciones establecidas por (Hernández 2013). Al sustituir el medio RPMI por medio DMEM las células no presentaron la misma capacidad de unirse a la superficie y tampoco realizaron el cambio morfológico, ya que se observaron únicamente levaduras en todos los tiempos evaluados (0-24 horas). En el medio RPMI, por el contrario, después de 1 hr de incubación comenzaron a formarse los tubos germinativos y a las 2 hrs estaban presentes en más del 90% de las células alcanzando una estructura característica de biopelícula formada por levaduras, pseudohifas e hifas en una extensa red de estructura tridimensional.

Velocidad de agitación			
Medio	75 RPM	50 RPM	25 RPM
RPMI 1640	++	+++	++++
DMEM	-	-	+

Tabla 3. Efecto de la velocidad de agitación (rpm) y del medio empleado en la capacidad de adhesión de las células al soporte (poliestireno).

Respecto al inóculo se probaron diferentes concentraciones a partir de 1×10^7 hasta 3×10^7 células y se encontró que el óptimo fue de 2×10^7 . Bajo estas condiciones se consiguió que las levaduras se distribuyeran en la caja de forma uniforme y a una distancia adecuada entre ellas para que permitiera dar el seguimiento de la formación de la biopelícula en microscopía óptica. Una vez recuperadas estas células fueron suficientes para poder obtener una buena cantidad de RNA.

En la tabla 4 se resumen las condiciones del trabajo previo (Hernández 2013) y se compara con las condiciones finales que nos permitieron obtener una biopelícula adecuada para nuestro trabajo.

	Hernández (2013)	Presente estudio
	Micro placas de 96 pozos	Cajas petri de 60 x 10 mm
Superficie	Poliestireno claro Superficie tratada TC	Poliestireno claro Superficie tratada TC
Medio empleado para el proceso de adhesión y para la formación de biopelícula.	RPMI 1640 + 25 % PBS 1x + 5% SFB	RPMI 1640 + 25 % PBS 1x + 5% SFB
Condiciones de adhesión	1.5 hrs, 37 °C, 75 rpm	1.5 hrs, 37 °C, 25 rpm
Condiciones de formación de biopelícula	24 hrs, 37°C, 25 °C, 75 rpm	24 hrs, 37°C, 25 °C, 25 rpm
Volumen de medio	100 µl por pozo	8 ml por caja
Número de células (inóculo)	1x10 ⁷	2x10 ⁷
Velocidad de agitación	75 rpm	25 rpm
Temperatura	37 °C	37 °C

Tabla 4. Comparación de las condiciones finales para la obtención de biopelícula en placa de 96 pozos (Hernández 2013) y en cajas de petri de 60 x 10 mm presente estudio.

En la figura 6 se muestran las imágenes correspondientes al proceso de formación de la biopelícula de la cepa ATCC 10231 tomadas cada hora hasta las 6 hrs de incubación. Cada una de las etapas observadas corresponde a las descritas en la literatura (Remage, Vandewalle et al. 2001). Durante las primeras dos horas posteriores al periodo de adhesión comenzó a formarse el tubo germinativo encontrándose que al final de este tiempo ya estaba presente en casi el 100% de las células. En la tercera hora se observa un alargamiento mayor del tubo germinativo y comienzan a formarse las hifas. A partir de la cuarta hora inicia la formación de microcolonias, donde las hifas las mantienen unidas y se van extendiendo aún más en las siguientes dos horas; al final de la sexta hora se observa ya una red compleja donde se pueden apreciar una mezcla de formas levaduriformes, pseudohifas e hifas verdaderas.

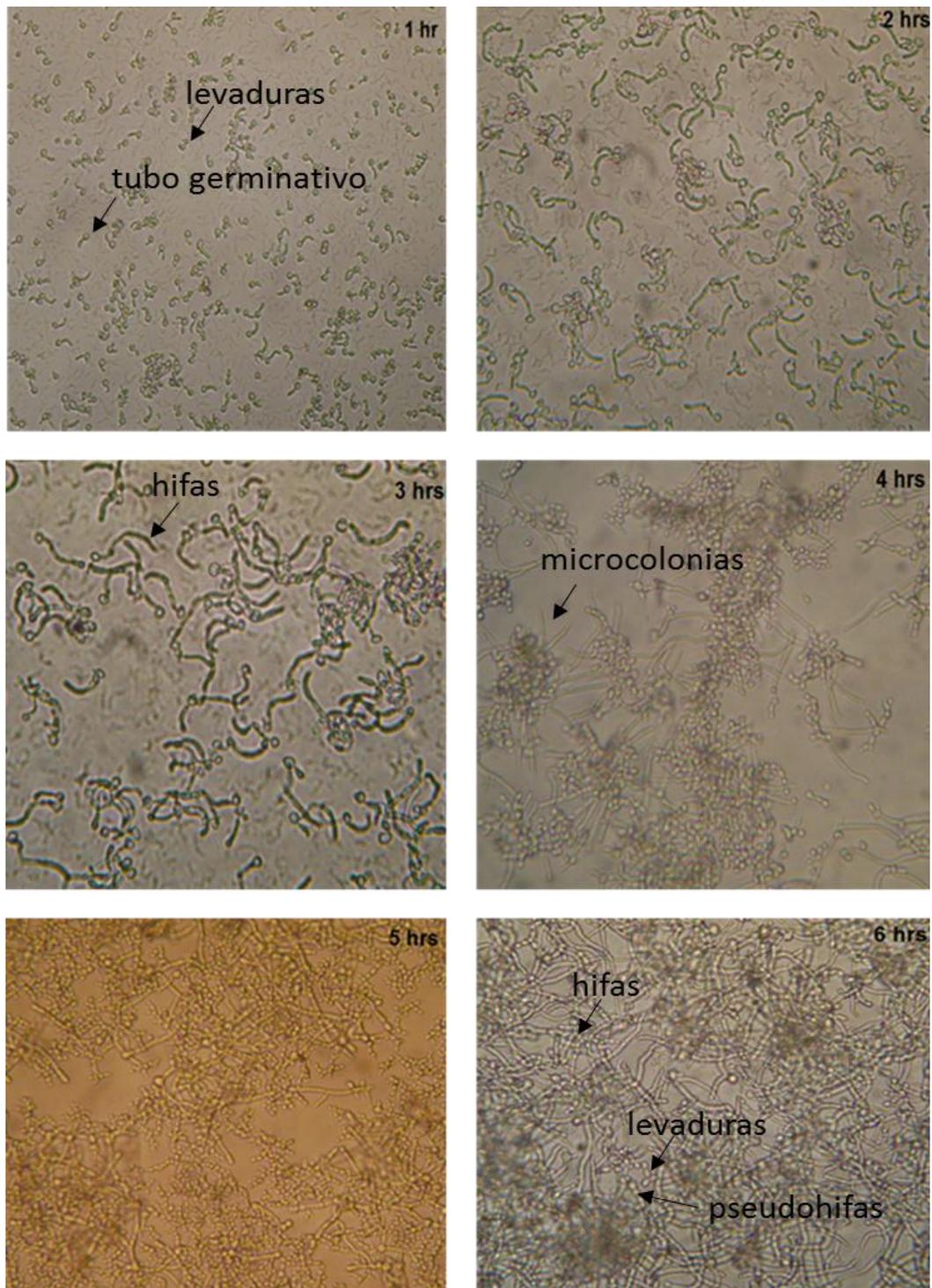


Figura 6. Formación de la biopelícula de la cepa ATCC 10231 en medio RPMI. Se muestran los resultados obtenidos desde la primera hasta la sexta hora de incubación. Microscopía óptica 40X.

Evaluación de la capacidad de adhesión de las levaduras procedentes de aislados clínicos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el desarrollo de la biopelícula con la cepa de referencia (ATCC 10231) se procedió a trabajar con las otras cinco cepas provenientes de aislados clínicos. Como ya se había mencionado anteriormente un paso esencial para el establecimiento de la biopelícula es la capacidad de adhesión a la superficie, para lo cual, en nuestra metodología esto se favoreció incubando a las levaduras durante 1.5 hrs a 37°C y 25 rpm con medio RPMI 1640 + 25% PBS 1X + 5 % SFB. Una vez pasado este tiempo fue necesario realizar 3 lavados con PBS con la finalidad de eliminar todas las levaduras que no se hubieran unido a la caja y después de esto se observaron al microscopio encontrando que había diferencias importantes en cuanto a la capacidad de adhesión de las diferentes muestras. En la tabla (5) se resumen estas observaciones asignando cruces para representarlo: se asignó + a las cepas con menor capacidad de adhesión y +++++ a las de mayor capacidad. Como puede observarse las cepas 1039 y 112U presentaron baja capacidad de adhesión, las cepas 627-05 y 648 mostraron media capacidad y las cepas 10231 y 521 son las que se adhirieron con mayor fuerza a la caja.



Capacidad de adhesión de cepas de <i>Candida albicans</i> en orden creciente						
Cepa	1039	112U	627-05	648	10231	520
Capacidad de adhesión	+	+	++	+++	++++	++++

Tabla 5. Capacidad de adhesión al poliestireno de las cepas de *C. albicans* aisladas. Se ordenan de menor a mayor adhesión.

Formación de biopelícula a partir de cepas de *C. albicans* obtenidas de aislados clínicos.

Después del proceso de adhesión durante 1.5 hr y se realizaron los lavados se colocó el medio RPMI 1640 suplementado con la finalidad de que se formaron las biopelículas.

En la figura (7) podemos apreciar imágenes representativas de la morfología y estructura de las biopelículas obtenidas después de 6 hrs de incubación para cada una de las cepas analizadas. Las cepas 1039 y 112U clasificadas con baja capacidad únicamente presentaron levaduras (blastosporas), fueron incapaces de formar hifas y se desprendían fácilmente de la superficie. Las cepas 627-05 y 648 por su parte, se adhirieron con mayor fuerza a la placa y mostraron filamentos pero no alcanzaron una estructura tridimensional compleja. Otra diferencia importante fue que la cepa 627-05 presentó blastosporas e hifas largas y delgadas, al contrario de la cepa 648 cuyas hifas fueron cortas y más anchas y fue mayor la cantidad de blastosporas. Finalmente, en las cepas de referencia (ATCC 10231) y la 520 hubo presencia de hifas, pseudohifas y blastosporas y presentaron una red más compleja con mayor densidad aunque se observó mayor heterogeneidad en la cepa de referencia. La estructura que presentaron estas dos cepas era la característica de las biopelículas reportadas en la literatura demostrando que la presencia de hifas es fundamental para la adhesión a la superficie y mantener unidas a las microcolonias permitiendo que se desarrolle una red tridimensional bien estructurada.

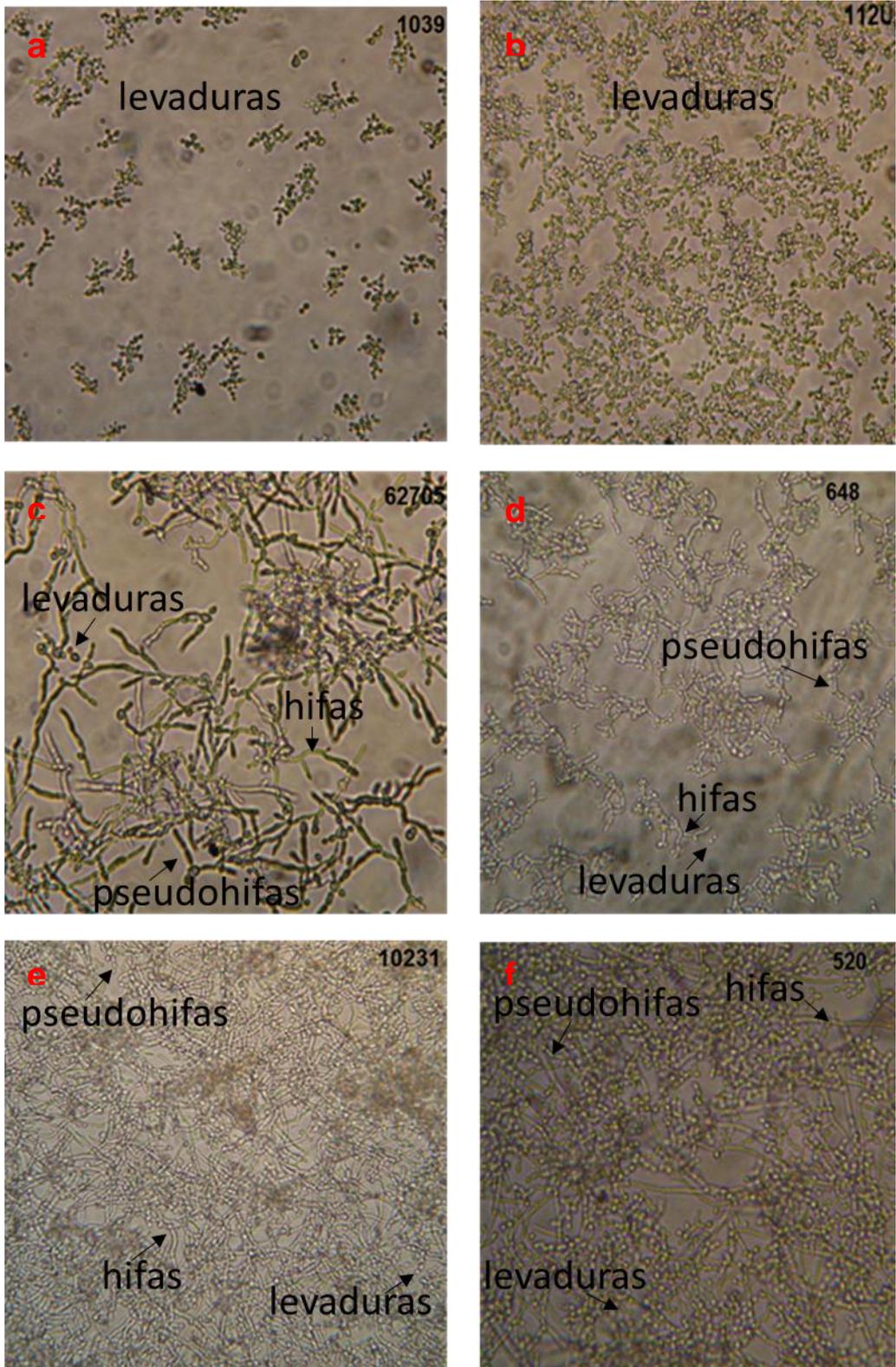


Figura 7. Características morfológicas y estructurales de las biopelículas obtenidas después de 6 hrs de incubación a partir de las cinco cepas de aislados clínicos y la cepa de referencia. Cepas con baja capacidad de formación de biopelícula a) cepa 1039 y b) 112U. Cepas con mediana capacidad, c) cepa 62705, d) cepa 648. Cepas con alta capacidad de formación de biopelícula e) cepa 10231, f) cepa 520. Microscopía óptica 40X.

Estandarización de la técnica de extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo por medio de lisis con perlas de vidrio seguida por la extracción con fenol cloroformo. Para la lisis fue necesario hacer algunas modificaciones principalmente en el tiempo de contacto de la levadura con las perlas de vidrio con la finalidad de lograr la recuperación de una buena cantidad de RNA a partir de las biopelículas y que además presentara una calidad y pureza adecuadas.

En la figura 8 se muestran imágenes de geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio en los que se observa la integridad del RNA obtenido después de 3, 5 y 7 minutos de lisis con las perlas de vidrio. Como se puede apreciar, los 3 minutos que indica la técnica original produjeron rendimientos muy bajos de RNA y en el gel apenas son visibles las bandas. Con 5 minutos de lisis las bandas obtenidas presentan una buena intensidad e integridad, la cual disminuye cuando se incrementa el tiempo a 7 minutos y se observa una mayor degradación.

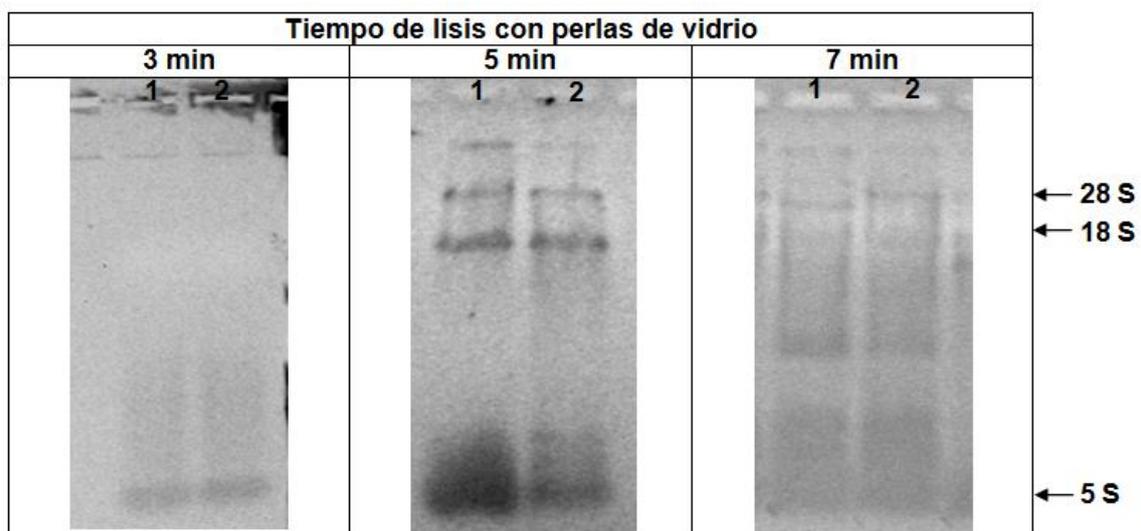


Figura 8. Integridad del RNA obtenido a partir de diferentes tiempos de lisis celular por duplicado. Geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio.

En la tabla 6 se puede observar la concentración obtenida para cada uno de los tiempos empleados, así como la pureza calculada a partir de las lecturas As260/As280. Se muestran los rangos obtenidos después de varias extracciones. Como se pueda apreciar a nivel de pureza no hubo diferencias importantes pero si en cantidad e integridad (observada en el gel).

	3 min	5 min	7 min
Concentración (µg/ml)	1	10-60	10-90
As260/As280	1.16-2.0	1.27-2.1	1.1-2.0

Tabla 6. Comparación de la cantidad y pureza del RNA obtenido a tres tiempos diferentes de lisis celular con perlas de vidrio.

En base a lo anterior se seleccionaron 5 minutos de lisis como el tiempo óptimo a utilizar y fue adecuado tanto para las células planctónicas como para las biopelículas.

Niveles de expresión del gen ADH1 de diferentes cepas de *C. albicans* evaluadas por RT-PCR

Para poder evaluar los niveles de expresión del gen ADH1 se empleó la técnica de RT-PCR. Las extracciones de RNA se trabajaron tanto para células planctónicas como para biopelículas, es importante señalar que ambas extracciones de RNA se realizaron a partir de las mismas cepas crecidas la noche anterior a la extracción, una vez que alcanzaron la densidad óptica esperada se separaron las células planctónicas y de ahí se tomó el inóculo para la formación de las biopelículas esperando hasta las 6 horas para poder realizar la extracción. Una vez que se extrajo el RNA se igualaron las concentraciones y se obtuvo el cDNA correspondiente a cada una de las cepas empleadas. Finalmente se amplificó el gen ADH empleando los primers ADH14F y ADH1R que generaron un fragmento de 544 pb. Empleamos únicamente 28 ciclos de amplificación para poder hacer la prueba semi cuantitativa y que nos permitiera ver diferencias en la expresión (Luna 2012). Como control se empleó el gen de actina y se amplificó empleando los primers ACT1F Y ACT2R obteniendo un producto de 443 pb.

En la figura 9 se observa el gel correspondiente mostrando los productos de amplificación. Como se puede apreciar hay diferencias importantes en los niveles de expresión del gen ADH1 entre las diferentes cepas evaluadas, en tanto que el control de actina permanece prácticamente constante en todas ellas.

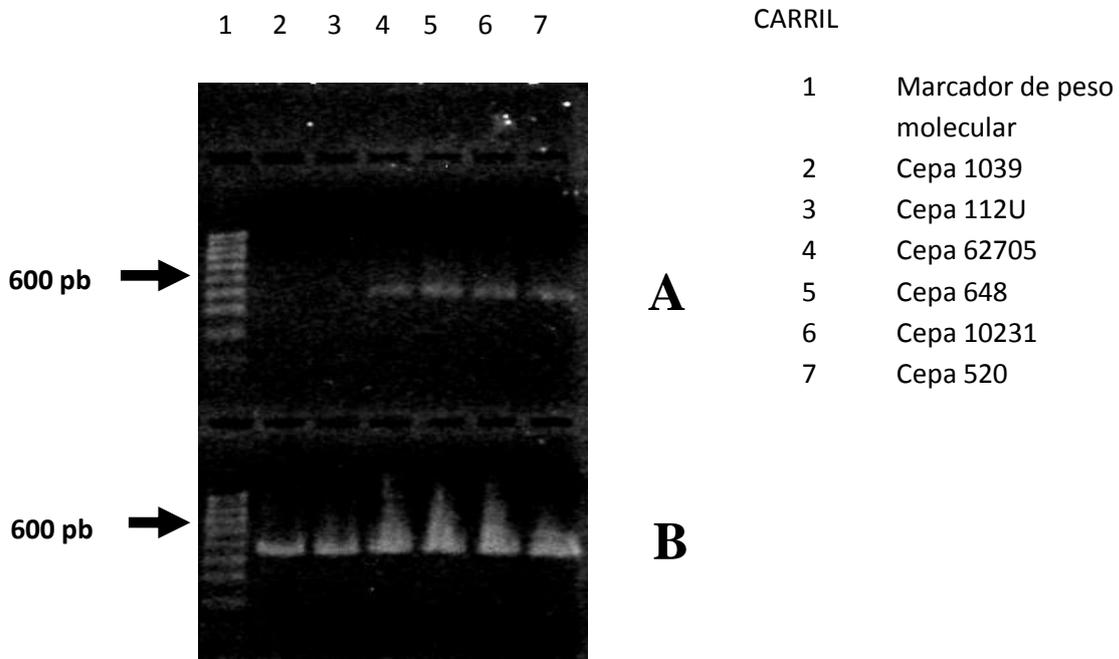


Figura (9). Productos de PCR. A. Se muestran los productos obtenidos para la amplificación del gen ADH1 de cada una de las cepas probadas. B. Se muestran los amplificados para el gen de actina. Las flechas indican la banda correspondiente a 600 pb del marcador ladder 100pb. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

En la figura 10 se muestran las imágenes correspondientes a los productos de ADH1 como de actina y se comparan los niveles de expresión en las células planctónicas con las biopelículas, para lo cual los valores obtenidos para el gen ADH1 fueron normalizados con los de actina.

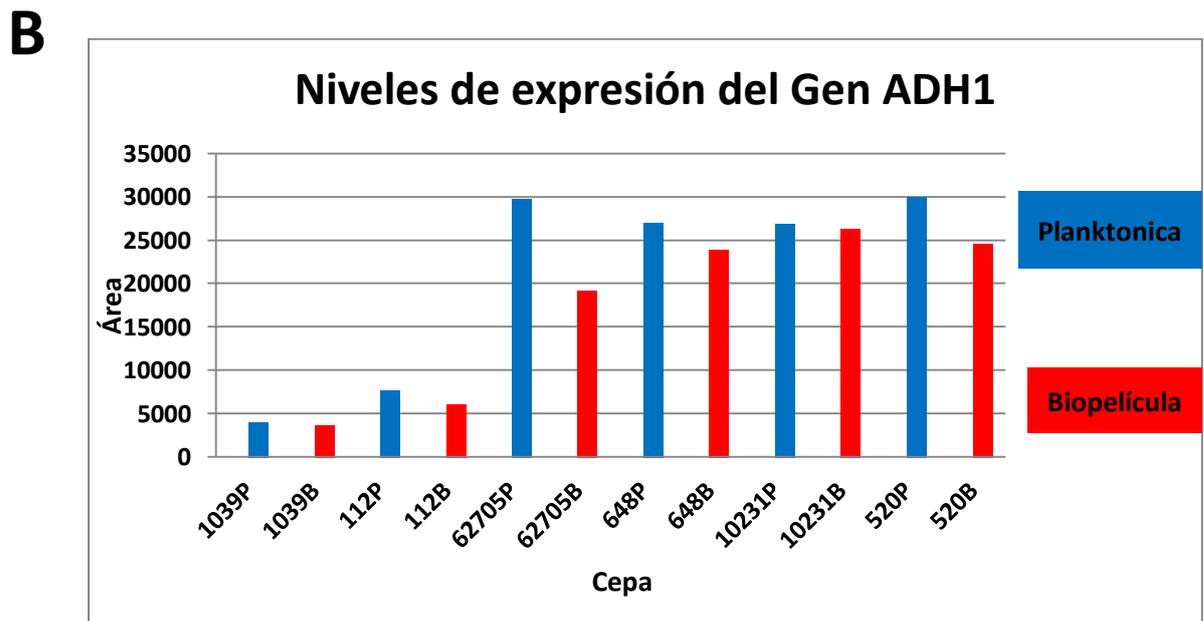
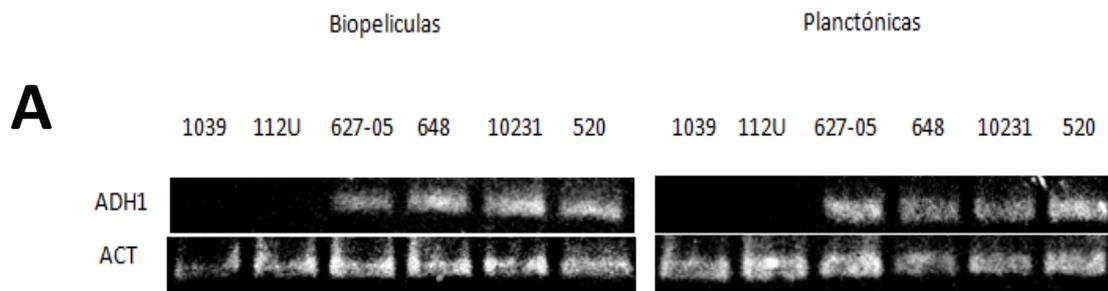


Figura 10. Niveles de expresión del gen ADH1 en cepas provenientes de aislados clínicos, comparación entre biopelículas y células planctónicas. A, imágenes correspondientes a los geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio. B. Gráfica correspondiente al análisis de imágenes considerando la unidad de área. Las imágenes de los geles mostradas se procesaron a 8 bits.

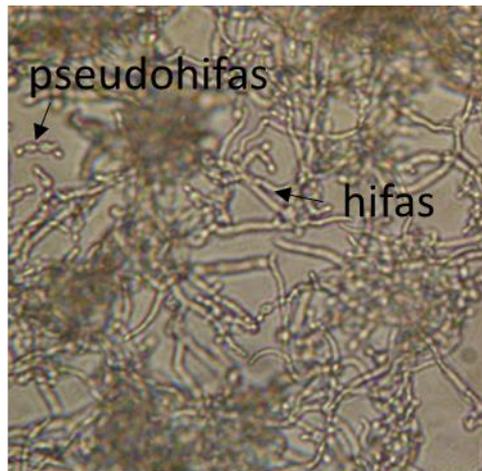
Como se puede apreciar, para todas las cepas empleadas, los niveles de expresión fueron menores en biopelículas (barras rojas) que en células planctónicas (barras azules) aunque se aprecian diferencias entre cepas en cuanto a los niveles de sobre-expresión.

Por otra parte, las cepas que presentaron niveles de expresión menores del gen ADH1 fueron la 1039 y 112U, cepas que presentaron menor capacidad de adhesión y de formación de biopelícula. Las cepas restantes, con mediana y alta capacidad (627-05, 648, 10231 y 520) presentaron niveles de expresión mayores.

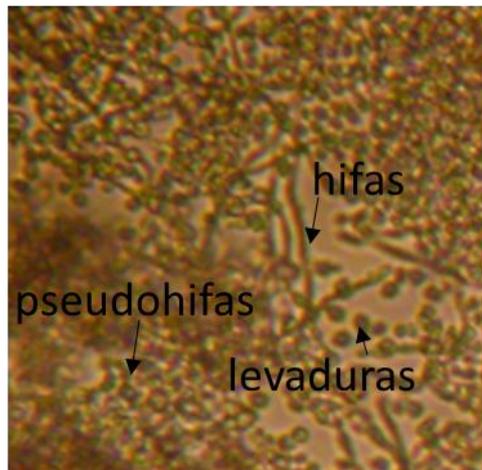
Si se analizan en conjunto los resultados de la capacidad de adhesión, con las características morfológicas y estructurales de las biopelículas formadas y los niveles de expresión de ADH1 en estas últimas se observa que a mayor adhesión y complejidad de la biopelícula formada es mayor la expresión de ADH1 quedando en primer lugar la cepa 10231, seguida de la 520, 648, 627-05 y finalmente 112-U y 1039 cuyas biopelículas únicamente estaban formadas por blastosporas. Respecto a las células planctónicas no hay diferencias significativas entre las cepas con media y alta capacidad.

Efecto del etanol

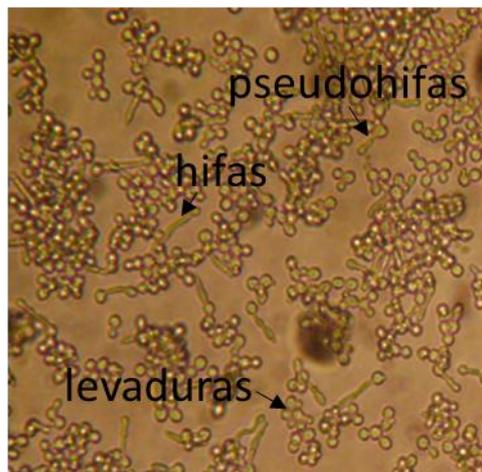
Debido a que se ha reportado que el alcohol etílico tiene un efecto inhibitorio en la formación de biopelículas decidimos profundizar un poco más en ello y evaluar los niveles de expresión del gen ADH1 bajo estas condiciones. En la figura 11 podemos apreciar el efecto del etanol encontrando que a una concentración del 2% ya había disminución de formas filamentosas y aumento de levaduras (comparado con el control sin etanol). Este efecto fue aún más evidente al aumentar la concentración al 4%.



Control



Etanol 2%



Etanol 4%

Figura 11. Efecto del etanol sobre el desarrollo de biopelículas de *C. albicans* ATCC10231. El desarrollo de la biopelícula se llevó a cabo en ausencia y presencia de etanol al 2 y al 4%. Observación al microscopio invertido con un aumento de 40X.

Bajo estas condiciones se extrajo el RNA y se evaluó el nivel de expresión del gen ADH1 por medio de RT-PCR. Como se observa en la figura 12 hay un aumento de 1.5 veces en la expresión cuando la biopelícula se desarrolló en presencia de etanol al 4% respecto al 2%. De acuerdo a los resultados anteriores el etanol aumenta la expresión del gen ADH1.

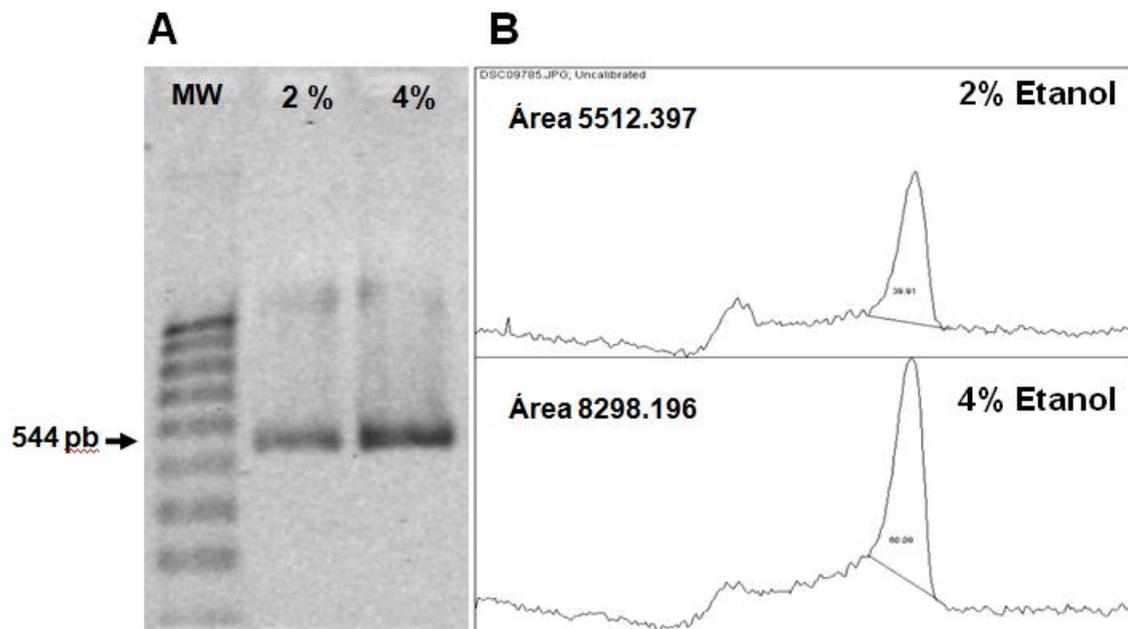


Figura 12. Niveles de expresión del gen ADH1 en biopelículas de *C. albicans* desarrolladas en presencia de etanol. A. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio mostrando los productos amplificados de la cepa de referencia 10231 ATCC crecidas en etanol al 2 % y 4 %. B. Gráficos analizados mediante ImageJ, se observa el área bajo la curva correspondiente a cada muestra.

Discusión

Las levaduras del género *Candida*, como son *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son capaces de formar biopelículas en prácticamente cualquier material implantado en el humano. Las biopelículas son la primera causa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados debido a que causan candidiasis recurrentes e invasivas difíciles de erradicar. Se ha demostrado que las células que forman parte de la biopelícula muestran una elevada resistencia a los tratamientos antifúngicos y a los mecanismos de defensa del hospedero además de que presentan una gran capacidad de adherirse a los biomateriales (Cuéllar 2012). Por lo anterior, entender los mecanismos que favorecen la formación de biopelículas ayudaría a desarrollar herramientas que permitan su detección o prevención y para identificar nuevas estrategias antifúngicas (Bonhomme 2013).

Previamente en el laboratorio, Hernandez (2013) analizó 26 aislados clínicos y la cepa de referencia ATCC 10231 respecto a su capacidad de formación de biopelículas, pudiendo hacer una clasificación en cepas de alta, media y baja capacidad. El soporte que empleó fueron placas de poliestireno de 96 pozos que de acuerdo a lo reportado por Ramage (2005) es un material que promueve la adherencia de las levaduras y ha sido considerada como la técnica de elección. Al analizar los resultados no se encontró ninguna relación entre el origen anatómico del que provenía la cepa y su capacidad de formación de la biopelícula, lo que concuerda con los resultados reportados por Jin (2003), Li (2003), Shin (2002), Durán (2007) y Villar (2011), sin embargo, si hay diferencias importantes entre los aislados clínicos.

Aunque son muchos los genes que se han relacionado con la producción de biopelículas nuestro interés específico sobre el gen ADH1 es porque se le ha relacionado con la producción de biopelículas bacterianas, específicamente en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Becker 2001, Finelli 2003). En 2006, Mukherjee y colaboradores demostraron que existe una relación entre el gen ADH1 de *Candida albicans* y su capacidad para producir biopelículas.

En este trabajo nos interesamos en analizar los niveles de expresión del gen ADH1 en algunas de estas cepas de *C. albicans* con diferente capacidad de formación de biopelículas por medio de la técnica de RT-PCR tratando así de profundizar un poco más en la comprensión de este tema. Para ello empleamos placas de poliestireno y una vez que se estandarizaron las condiciones de crecimiento fue posible obtener biopelículas de *C. albicans* con las características reportadas en la literatura, es decir, estructuras tridimensionales bien organizadas en las que se observaron hifas, pseudohifas y levaduras (Baillie 1999, Ramage 2002, 2005), esto último sólo se observó con la cepa de referencia ATCC 10231 y la cepa 520, ambas clasificadas como de alta capacidad. Las dos cepas correspondientes a media capacidad, 627-05 y 648, presentaron biopelículas menos densas, con diferencias entre ellas en el tamaño y grosor de la hifa y proporción hifas/levaduras. Finalmente, las cepas 1039 y 112U, clasificadas como de baja producción de biopelícula, estaban formadas únicamente por levaduras y en ningún momento formaron pseudohifas o hifas, incluso después de 24 horas de incubación.

Estas observaciones estuvieron estrechamente relacionadas con la capacidad de adhesión que presentaron durante las primeras 1.5 hrs; las cepas que se adhirieron poco no fueron capaces de presentar el cambio morfogénico de levadura a hifa y tampoco formaron una biopelícula bien estructurada, en cambio, las cepas con mayor capacidad de adhesión fueron las que produjeron una biopelícula bien estructurada.

Si bien los experimentos para la evaluación del gen ADH1 en la formación de la biopelícula se llevaron a cabo a las 6 horas de incubación, cabe mencionar que las observaciones morfológicas continuaron hasta las 24-48 horas, tiempo suficiente para que, en su caso, pudiéramos observar una biopelícula madura.

El papel importante que juega la filamentación en la formación de biopelículas de *C. albicans* ha sido reportado por varios autores que mencionan que aunque se han observado biopelículas de blastosporas (levaduras), son las hifas las que proporcionan la arquitectura característica de las biopelículas maduras, incluso, estudios realizados con mutantes que no presentan la capacidad de adquirir la forma filamentosa son incapaces de producir biopelículas (Baillie 1999, Ramage 2002). Esta estructura tridimensional tan bien organizada facilita la entrada de nutrientes, la eliminación de desechos y el establecimiento de micronichos (Ribot 2005).

García (2004), Cao (2005) corroboran los resultados anteriores, al demostrar la subexpresión de muchos genes inducidos específicamente en la forma de hifa que también tiene efectos en la disminución de la formación de biopelículas. Sin embargo, también se debe considerar que la regulación entre la formación de hifas y biopelícula es independiente, hay cepas que no forman biopelícula pero si forman hifas en medio líquido. Análisis de microarreglos indican que mutantes en el factor de transcripción BCR1 podrían estar inactivando adhesinas como Hwp1p y Als3p que pueden participar en el mantenimiento de la integridad de la biopelícula indicando entonces que se trata de alteraciones funcionales y no estructurales de la formación de la biopelícula (Nobile 2005, Ribot 2005). Otro ejemplo es TYE7, cuya inactivación afecta la formación de la biopelícula pero no la morfogénesis ya que es un gen necesario para una glucólisis eficiente durante la formación de la misma (Bonhomme 2011).

Con respecto a la capacidad de adhesión de las levaduras a las superficies se ha considerado que este factor juega un papel importante en la patogenicidad de *C. albicans*. La adhesión es un paso importante para la colonización y establecimiento de la infección. Una adhesión irreversible a los tejidos del hospedero o bien, a los dispositivos médicos empleados trae como consecuencia la formación de biopelículas, las cuales son difíciles de erradicar y comprometen la salud del paciente pudiendo presentar candidemias.

Raut y colaboradores (2010) evaluaron la capacidad de adhesión de cincuenta aislados clínicos de *C. albicans* al poliestireno, encontrando variaciones importantes entre las diferentes muestras que iban desde 79 hasta 478 células unidas por campo observado, lo cual está de acuerdo con lo que nosotros encontramos en las cepas analizadas donde observamos diferencias importantes en su capacidad de adhesión. También nuestros resultados coinciden con Kimura (1980) puesto que demostramos que las cepas **10231** y **520** que formaron tubos germinativos fueron más adhesivas que las cepas que no lo hicieron; cepas **1039** y **112U**, y se notó que estas últimas fueron incapaces de formar biopelícula.

Los resultados de Nobile (2008) demuestran que las hifas son células especializadas en presentar moléculas de adherencia y es por esa razón que soportan la integridad de la biopelícula.

En lo que corresponde a la evaluación de los niveles de expresión del gen ADH1 encontramos que las cepas que presentaron mayor expresión fueron aquellas que también presentaron una mayor adherencia y capacidad de producir biopelícula, en tanto que las cepas que tuvieron una baja expresión, se adhirieron menos y la biopelícula estuvo formada únicamente por blastosporas, incapaces de presentar el cambio morfológico.

Mukherjee (2006) y colaboradores reportaron que la mutante del gen ADH1 genera una biopelícula más gruesa e incrementa su capacidad de invadir y dañar tejidos de la mucosa, y lo corroboraron con el uso de inhibidores de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa observando que esta inhibición favorece la capacidad de producción de una biopelícula más densa. Con esto, ellos muestran que la disminución de la expresión del gen ADH1 o la inactivación de la proteína origina biopelículas más gruesas.

Contrario a estos estudios, nosotros observamos que en cepas en las que no hay expresión del gen no hay producción de una biopelícula estructurada y en las cepas en las que se expresa más hay mayor producción de biopelícula. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Swoboda (1994) quien observó que los niveles de mRNA de ADH1 se ven incrementados 3.5 veces en la forma de hifa con respecto a las células planctónicas. Nuestros resultados también muestran que los niveles de expresión de ADH1 son característicos de cada cepa y se mantienen tanto en la forma planctónica como en la biopelícula presentándose siempre ligeramente más bajo en esta última con respecto a las células planctónicas, lo que está de acuerdo con lo reportado por Mukherjee (2006) y Siikala (2011).

Resumiendo lo anterior, las cepas que presentan baja capacidad de formación de biopelícula presentan bajos niveles de la expresión del gen ADH1 tanto en la forma planctónica como en la misma biopelícula, y en aquellas cepas que presentan alta capacidad hay altos niveles de expresión en ambas formas de crecimiento.

Chauhan (2011) y colaboradores demostraron que el alcohol etílico tiene un efecto sobre el dimorfismo y el desarrollo de biopelículas de *C. albicans* inhibiendo la formación de tubo germinativo a partir de una concentración del 4%. A esta misma concentración observaron una disminución considerable en la formación de biopelículas después de 24 hrs, encontrando, que la mayoría de las células presentaban la forma levaduriforme.

En nuestro trabajo empleamos la cepa de referencia ATCC 10231 para evaluar el efecto del etanol sobre la formación de la biopelícula y la expresión del gen ADH1 y acorde con lo reportado por Chauhan (2011), observamos una disminución de la formación de biopelícula a partir de una concentración del 2% de etanol; a una concentración del 4% el efecto fue aún mayor. Bajo estas condiciones evaluamos la expresión del gen ADH1 encontrando que a mayor concentración de etanol (4%) había un aumento de la expresión de 1.5 veces respecto a la concentración de 2% este efecto hasta el momento no se ha reportado.

La enzima alcohol deshidrogenasa está involucrada en la conversión de acetaldehído a etanol. Chauhan (2011 b) demostró que el acetaldehído a una concentración de 7 mM inhibe la formación de levadura a hifa. Esta misma concentración inhibió el desarrollo de la biopelícula y sólo se encontraron células levaduriformes por lo que ellos concluyen que el acetaldehído ejerce un efecto regulador de la morfogénesis implicado en el cambio de levadura a hifa y la formación de biopelículas.

En este trabajo nosotros no medimos los niveles de acetaldehído, sin embargo la disminución en los niveles de ADH1 en algunas de las cepas de aislados clínicos (específicamente 1039 y 112U) pudiera ocasionar un incremento en los niveles de acetaldehído y esto a su vez traer como consecuencia la inhibición de la morfogénesis y de la formación de biopelículas observando únicamente células levaduriformes tal y como lo encontramos en nuestros experimentos. En el resto de las cepas se observó, aunque en diferente grado, cambio morfogénico y formación de biopelículas lo que pudiera deberse a que la expresión del gen ADH1 permite que los niveles de acetaldehído disminuyan. En otras palabras, de acuerdo a nuestros resultados las cepas que expresan ADH1 en mayor cantidad son mejores formadoras de biopelículas y esto podría deberse a que disminuyen los niveles de acetaldehído. Esto último deberá de comprobarse de forma experimental posteriormente ya que explicaría nuestros hallazgos.

Por otra parte, recientemente se ha encontrado una relación entre los niveles de expresión del gen ADH1 y la resistencia a fluconazol, Yan en 2007 reportó que una cepa hecha resistente a fluconazol en el laboratorio, presentó niveles mayores de expresión de la proteína Adh1 que una cepa sensible; por otro lado Hui (2013) empleó 20 aislados clínicos de candidosis vulvovaginal y encontraron altos niveles de expresión

de ADH1 en las cepas que fueron resistentes a fluconazol correlacionando positivamente con los niveles de expresión de los genes CDR1, CDR2 y FLU1, genes ligados a la resistencia a los azoles.

De acuerdo a los resultados de estos autores cabe la posibilidad de que las cepas que analizamos en las que se presentan mayores niveles de expresión del gen ADH1 y que tienen mayor capacidad de adhesión y formación de biopelículas también pudieran ser resistentes a fluconazol y en cambio, aquellas donde hay menos expresión de ADH1 y son menos adherentes, con menor capacidad de formación de biopelículas pudieran ser sensibles a fluconazol, lo que deberá comprobarse en otros estudios.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen en evidencia que hay diferencias importantes entre la capacidad de formación de biopelículas de cepas obtenidas de aislados clínicos y hay una relación directa con la capacidad de adhesión a poliestireno, y los niveles de expresión del gen ADH1. Consideramos que estos factores deberían de ser considerados al momento de prescribir un tratamiento en vez de generalizar todas las cepas de *C. albicans*.

Respecto al papel exacto que desempeña el gen ADH1 en la producción de biopelículas aún hay mucho por esclarecer, sin embargo aquí se han sentado las bases para futuras investigaciones como la relación de los niveles de expresión de este gen con los niveles de proteína, el uso de otros sustratos, la adhesión a células, la relación con la resistencia a los azoles, los niveles de etanol y acetaldehído producidos, entre otros.

En este trabajo demostramos que existe una relación directa entre los niveles de expresión del gen ADH1 en aislados clínicos de *C. albicans* con su capacidad de adhesión y de formación de biopelículas, y que hay diferencias importantes entre las cepas analizadas independientemente de su origen anatómico.

Conclusiones

- La capacidad de formación de biopelícula de *C. albicans* está directamente relacionada con su capacidad de adhesión.
- Las cepas que presentaron menor capacidad de adhesión no fueron capaces de llevar a cabo el cambio de levadura a hifa y sus biopelículas estuvieron compuestas únicamente por células levaduriformes
- Las cepas que presentaron mayor capacidad de adhesión fueron capaces de llevar a cabo el cambio morfogénico y estructurar biopelículas bien organizadas con presencia de levaduras, pseudohifas e hifas.
- Las cepas que presentaron mayor expresión del gen ADH1 fueron capaces de producir biopelículas más estructuradas, y aquellas con bajos niveles de expresión formaron biopelículas más pobres.
- En todas las cepas probadas la expresión del gen ADH1 fue menor en biopelículas que en su contraparte, las células planctónicas.
- El etanol inhibe la formación de biopelícula de *C. albicans* a partir de una concentración del 2% y provoca un aumento en la expresión del gen ADH1 de forma directa al aumento de la concentración

Referencias

- Arenas R. (2011). "Micología Médica Ilustrada" (4ta ed), Mc Graw-Hill, DF, México.
- Baillie, G. S. and L. J. Douglas (1999). "Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms." J Med Microbiol **48**(7): 671-679.
- Becker, P., W. Hufnagle, et al. (2001). "Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis." Appl Environ Microbiol **67**(7): 2958-2965.
- Bertram, G., R. K. Swoboda, et al. (1996). "Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase." Yeast **12**(2): 115-127.
- Blanco, M. T., J. Blanco, et al. (1997). "Incubation temperatures affect adherence to plastic of *Candida albicans* by changing the cellular surface hydrophobicity." Microbios **89**(358): 23-28.
- Blanco, M. T., B. Sacristan, et al. (2010). "[Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*]." Rev Iberoam Micol **27**(4): 195-199.
- Bonhomme, J., M. Chauvel, et al. (2011). "Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*." Mol Microbiol **80**(4): 995-1013.
- Cabezón, V., A. Llama-Palacios, et al. (2009). "Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome." Proteomics **9**(20): 4770-4786.
- Calderon, J., M. Zavrel, et al. (2010). "PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion." Microbiology **156**(Pt 8): 2484-2494.
- Calderone, R. A. and P. C. Braun (1991). "Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*." Microbiol Rev **55**(1): 1-20.
- Castillo, L., E. Calvo, et al. (2008). "A study of the *Candida albicans* cell wall proteome." Proteomics **8**(18): 3871-3881.
- Collins, T. J. (2007). "ImageJ for microscopy." Biotechniques **43**(1 Suppl): 25-30.
- Chaffin, W. L. and D. M. Stocco (1983). "Cell wall proteins of *Candida albicans*." Can J Microbiol **29**(10): 1438-1444.
- Chandra, J., D. M. Kuhn, et al. (2001). "Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance." J Bacteriol **183**(18): 5385-5394.
- Chang, J. and S. E. Kollman (1989). "The effect of temperature on the formation of ethanol by *Candida albicans* in blood." J Forensic Sci **34**(1): 105-109.
- Cho, T. (2009). "[Virulence factors of the fungal pathogen *Candida albicans*]." Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi **50**(3): 179-185.
- Chauhan, N. M., J. S. Raut, et al. (2011). "A morphogenetic regulatory role for ethyl alcohol in *Candida albicans*." Mycoses **54**(6): e697-703.
- Chauhan, N. M., R. B. Shinde, et al. (2013). "Effect of alcohols on filamentation, growth, viability and biofilm development in *Candida albicans*." Braz J Microbiol **44**(4): 1315-1320.
- Collart, M. A. and S. Oliviero (2001). "Preparation of yeast RNA." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 13**: Unit 13.12.
- Cuellar-Cruz, M., A. Vega-Gonzalez, et al. (2012). "The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(10): 2513-2527.

- D'Eca Junior, A., A. F. Silva, et al. (2011). "In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*." Rev Soc Bras Med Trop **44**(3): 334-338.
- Duran, E. L., M. T. Mujica, et al. (2007). "[Examination of the genetic variability among biofilm-forming *Candida albicans* clinical isolates]." Rev Iberoam Micol **24**(4): 268-271.
- Estivill, D., A. Arias, et al. (2011). "Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials." J Microbiol Methods **86**(2): 238-242.
- Finelli, A., C. V. Gallant, et al. (2003). "Use of in-biofilm expression technology to identify genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." J Bacteriol **185**(9): 2700-2710.
- García-Sánchez, S., S. Aubert, et al. (2004). "*Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns." Eukaryot Cell **3**(2): 536-545.
- Hazen, K. C., B. J. Plotkin, et al. (1986). "Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*." Infect Immun **54**(1): 269-271.
- Hernández Pérez José Roberto. 2013. "Comparación de la formación de biopelículas de aislados clínicos de *Candida albicans* recuperados de varias zonas anatómicas empleando las técnicas de microscopía, viabilidad celular y cristal violeta". Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Jin, Y., H. K. Yip, et al. (2003). "Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection." J Clin Microbiol **41**(7): 2961-2967.
- Kelly, M. T., D. M. MacCallum, et al. (2004). "The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence." Mol Microbiol **53**(3): 969-983.
- Kimura, L. H. and N. N. Pearsall (1980). "Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells." Infect Immun **28**(2): 464-468.
- Klotz, S. A., M. L. Pendrak, et al. (2001). "Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase." Microbiology **147**(Pt 11): 3159-3164.
- Kojic, E. M. and R. O. Darouiche (2004). "*Candida* infections of medical devices." Clin Microbiol Rev **17**(2): 255-267.
- Kuhn, D. M., J. Chandra, et al. (2002). "Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces." Infect Immun **70**(2): 878-888.
- Lewis, R. E., H. J. Lo, et al. (2002). "Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth." Antimicrob Agents Chemother **46**(4): 1153-1155.
- Li, X., Z. Yan, et al. (2003). "Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*." Microbiology **149**(Pt 2): 353-362.
- Lopez, C., L. Giro, et al. (2005). "[Comparison of different methods for species identification of genus *Candida*]." Rev Argent Microbiol **37**(1): 16-21.
- Luna Martínez Miriam. (2012). "Estandarización de la técnica de RT-PCR para la evaluación de la expresión del gen ADH1 de *Candida albicans*". Tesis

- licenciatura (químico farmacéutico biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Martinez-Gomariz, M., P. Perumal, et al. (2009). "Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*." Proteomics **9**(8): 2230-2252.
- Mattei, A. S., S. H. Alves, et al. (2013). "Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*." Rev Soc Bras Med Trop **46**(3): 340-342.
- Mukherjee, P. K., S. Mohamed, et al. (2006). "Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism." Infect Immun **74**(7): 3804-3816.
- Murciano, C., D. L. Moyes, et al. (2012). "Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions." PLoS ONE **7**(3): e33362.
- Nobile, C. J. and A. P. Mitchell (2005). "Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p." Curr Biol **15**(12): 1150-1155.
- Nobile, C. J., H. A. Schneider, et al. (2008). "Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation." Curr Biol **18**(14): 1017-1024.
- Nombela, C., C. Gil, et al. (2006). "Non-conventional protein secretion in yeast." Trends Microbiol **14**(1): 15-21.
- Ogasawara, A., K. Odahara, et al. (2006). "Change in the respiration system of *Candida albicans* in the lag and log growth phase." Biol Pharm Bull **29**(3): 448-450.
- Ombrella, A. M., L. Racca, et al. (2008). "[Protease and phospholipase activities of *Candida albicans* isolated from vaginal secretions with different pH values]." Rev Iberoam Micol **25**(1): 12-16.
- Phan, Q. T., C. L. Myers, et al. (2007). "Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells." PLoS Biol **5**(3): e64.
- Pitarch, A., R. Diez-Orejas, et al. (2001). "Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model." Proteomics **1**(4): 550-559.
- Raut, J., V. Rathod, et al. (2010). "Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*." Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi **51**(3): 131-136.
- Ramage, G., S. P. Saville, et al. (2005). "Candida biofilms: an update." Eukaryot Cell **4**(4): 633-638.
- Ramage, G., K. VandeWalle, et al. (2002). "The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*." FEMS Microbiol Lett **214**(1): 95-100.
- Ramage, G., K. Vandewalle, et al. (2001). "Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*." Rev Iberoam Micol **18**(4): 163-170.
- Rueden, C. T. and K. W. Eliceiri (2007). "Visualization approaches for multidimensional biological image data." Biotechniques **43**(1 Suppl): 31, 33-36.
- Sanchez-Vargas, L. O., D. Estrada-Barraza, et al. (2013). "Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species." Arch Oral Biol **58**(10): 1318-1326.
- Shen, H. D., K. B. Choo, et al. (1991). "The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies." Clin Exp Allergy **21**(6): 675-681.

- Shin, J. H., S. J. Kee, et al. (2002). "Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources." J Clin Microbiol **40**(4): 1244-1248.
- Siikala, E., P. Bowyer, et al. (2011). "ADH1 expression inversely correlates with CDR1 and CDR2 in *Candida albicans* from chronic oral candidosis in APECED (APS-I) patients." FEMS Yeast Res **11**(6): 494-498.
- Smith, D. J., M. Cooper, et al. (1992). "The *Candida albicans* PMM1 gene encoding phosphomannomutase complements a *Saccharomyces cerevisiae* sec 53-6 mutation." Curr Genet **22**(6): 501-503.
- Spinucci, G., M. Guidetti, et al. (2006). "Endogenous ethanol production in a patient with chronic intestinal pseudo-obstruction and small intestinal bacterial overgrowth." Eur J Gastroenterol Hepatol **18**(7): 799-802.
- Staab, J. F., S. D. Bradway, et al. (1999). "Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1." Science **283**(5407): 1535-1538.
- Staniszewska, M., M. Bondaryk, et al. (2012). "[Virulence factors of *Candida albicans*]." Przegl Epidemiol **66**(4): 629-633.
- Sundstrom, P. (2002). "Adhesion in *Candida* spp." Cell Microbiol **4**(8): 461-469.
- Sundstrom, P., E. Balish, et al. (2002). "Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice." J Infect Dis **185**(4): 521-530.
- Sundstrom, P., J. E. Cutler, et al. (2002). "Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the ENO1 locus." Infect Immun **70**(6): 3281-3283.
- Swoboda, R. K., G. Bertram, et al. (1994). "Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism." Mol Microbiol **13**(4): 663-672.
- Swoboda, R. K., G. Bertram, et al. (1993). "Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis." Infect Immun **61**(10): 4263-4271.
- Thomas, D. P., S. P. Bachmann, et al. (2006). "Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle." Proteomics **6**(21): 5795-5804.
- Vargas, K., P. W. Wertz, et al. (1994). "Differences in adhesion of *Candida albicans* 3153A cells exhibiting switch phenotypes to buccal epithelium and stratum corneum." Infect Immun **62**(4): 1328-1335.
- Villar-Vidal, M., C. Marcos-Arias, et al. (2011). "Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*." Enferm Infec Microbiol Clin **29**(9): 660-665.
- Yan, L., J. D. Zhang, et al. (2007). "Proteomic analysis reveals a metabolism shift in a laboratory fluconazole-resistant *Candida albicans* strain." J Proteome Res **6**(6): 2248-2256.

<http://imagej.nih.gov/ij/>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.