



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Efecto de inhibidores de la alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) de *Candida albicans* en la formación de tubo germinativo.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LAURA HERNÁNDEZ SALINAS

ASESOR: Dra. MARÍA LEONOR QUINTERO MORA

COASESOR: Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

Efecto de inhibidores de la alcohol deshidrogenasa 1 (Adh1) de *Candida albicans* en la formación de tubo germinativo

Que presenta la pasante: Laura Hernández Salinas

Con número de cuenta: 094601530 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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 02 de Julio de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	Dr. Carlos Gerardo García Tovar	
SECRETARIO	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
2do. SUPLENTE	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	

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

HMI/iac

El presente trabajo se realizo en el laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán UNAM, con el apoyo de los proyectos PIAPIC 15 y PAPIME 204414.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios y a la Virgen de Guadalupe, por crearme y cuidar de mí durante toda mi vida, por consolidar y guiar mis pasos, por poner en mi camino a las mejores personas y por darme siempre la luz en los momentos de oscuridad. A San Judas Tadeo por aumentar mi fe.

Gracias a mis padres por darme la vida, llenarme de amor y apoyarme en todo momento en que les he necesitado. Con su ejemplo de empeño y trabajo diario me han inspirado para lograr llegar a la meta tan esperada.

Gracias a mis hermanos, Elda y Miguel, quienes han sido mis compañeros de vida, los primeros amigos que Dios me dio, y de quien sé tengo su apoyo incondicional. Los quiero mucho.

Gracias a mis abuelos, que han sido signo de fortaleza y de lucha, que con sus cansados pasos han dado alegría a mi vida y que me han mostrado lo fuertes que son mis raíces.

Gracias a Miguel Ángel, por compartir no solo este anhelo sino mi vida, por dar todo de ti para mí y para nuestra familia, por tu esfuerzo, por todo lo que has logrado, te amo.

Gracias a mis hijos Michelle, Mario y Carmen, por ser pacientes y entenderme, por los momentos que han tenido que estar solos y por todo lo que no pude dar; esta meta la he cumplido en especial por ustedes, para demostrar que no hay imposibles en la vida; que la familia siempre será quién te de la fuerza para seguir adelante, porque jamás pude retroceder mis pasos al pensar en que ustedes veían mi camino. Ustedes son mi corazón, los amo.

Gracias a mis compañeros y amigos, Ale y Miguel, Ana, Malena, Sandra, Diana, Tigger, Enrique, George, Gabriel y a todos con quienes compartí la dicha de ser estudiante de la FES Cuautitlán. A Rocío, Ana, Karla, Karina, Diana y Emmanuel, por su amistad incondicional. A Eli, Samy, Miguel, Roberto, Gaby, Fila, Alex, Crispin, Cinthya, Tania y todos los que compartimos nuestras esperanzas en el L-4.

A mis familias Salinas y Hernández, a quién espero sirva de estímulo este paso que he dado; y a quienes están en el cielo espero los llene de orgullo.

Gracias a todos mis profesores, quienes me han formado con ética y me han compartido el amor por el estudio, que más allá de buscar una meta económica han buscado trascender en los corazones de cada uno de sus alumnos, han sembrado semillas en nosotros para lograr ser mejores profesionales, para buscar siempre la excelencia y ser honestos en nuestras actividades.

Gracias a mi asesora, Dra. María Leonor Quintero Mora, quién deposito su confianza en mí para realizar este trabajo, de quién aprendí no solo técnicas sino que encontré a un ser humano maravilloso que me ha transmitido su amor por la investigación.

Gracias a mi coasesor Dr. Carlos Gerardo García Tovar, por todo su apoyo y consejos para lograr realizar un mejor trabajo.

Quiero hacer patente mi agradecimiento a M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz y M.V.Z. José Luis Nieto Bordes por su apoyo técnico y colaboración en mi capacitación para desarrollar las diferentes técnicas llevadas a cabo en la realización del trabajo experimental de mi tesis.

ÍNDICE

Índice de tablas y figuras

Abreviaturas

	PÁGINA
Resumen	1
Introducción	3
Características generales del género <i>Candida</i>	3
Taxonomía	5
Patogénesis	5
Dimorfismo	8
Alcohol deshidrogenasa de <i>Candida albicans</i>	10
Aldehído deshidrogenasa de <i>Candida albicans</i>	13
Efecto del acetaldehído en <i>Candida albicans</i>	15
Inhibidores de la alcohol deshidrogenasa	16
Antecedentes directos	17
Justificación	19
Objetivo General	21
Objetivos Particulares	21
Diseño experimental	22
Materiales y métodos	23
Resultados	26
Discusión	46
Conclusiones	51
Referencias	52

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	PÁGINA
1. Morfología de <i>Candida albicans</i> .	4
2. Esquema representativo de los mecanismos de patogenicidad de <i>Candida albicans</i> .	7
Tabla 1. Ejemplos de actividades durante la infección de <i>Candida albicans</i> dependientes de la morfología.	9
3. Esquema representativo de la degradación de etanol en <i>Candida albicans</i> .	11
4. Vía fermentativa de <i>Candida albicans</i> .	14
5. Capacidad de formación del tubo germinativo de la cepa ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> .	26
6. Representación gráfica del efecto del etanol en la formación de tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	27
7. Efecto del etanol en la formación de tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	28
8. Efecto del etanol en la actividad metabólica de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	29
9. Efecto del etanol en el crecimiento celular de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	30
10. Formación de tubo germinativo en <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, 520 y 112U.	32
11-A. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	34
11-B. Representación gráfica.	35

12-A. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de <i>Candida albicans</i> 520.	36
12-B. Representación gráfica.	37
13. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de <i>Candida albicans</i> 112U.	38
14-A. Efecto de la diadzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	40
14-B. Representación gráfica.	41
15-A. Efecto de la diadzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de <i>Candida albicans</i> 520.	42
15-B. Representación gráfica.	43
16. Efecto de la diadzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de <i>Candida albicans</i> 112U.	44

ABREVIATURAS

ADH	alcohol deshidrogenasa
ALD	aldehído deshidrogenasa
APECED	polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
CGD	Candida Genome database
DNA	ácido desoxiribonucleico
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
MET	receptor membranal de la tirosina cinasa
kD	kiloDalton
mM	milimolar
MTS	sal interna de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NAD ⁺	nicotinamida-adenindinucleótido
NADP ⁺	fosfato de nicotinamida-adenindinucleótido
nm	nanómetros
rpm	revoluciones por minuto
TG	tubo germinativo
μ L	microlitros
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
YPD	agar de extracto de levadura, peptona y dextrosa

RESUMEN

C. albicans es considerada como un patógeno importante en pacientes inmunocomprometidos provocando altas frecuencias de mortalidad. Esta levadura es polimórfica y dos de sus formas de crecimiento, levaduras e hifas, parecen ser importantes para la virulencia presentando diversas funciones durante diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad. Diversos estudios han demostrado que la morfogénesis es un factor de virulencia importante en esta levadura, desempeña un papel crucial en la formación de biopelículas, adhesión, invasión, daño, diseminación, evasión del sistema inmune y la respuesta del huésped.

Estudios recientes han asociado el metabolismo del etanol con la formación de biopelículas. El gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH1) está involucrado con la capacidad de *C. albicans* de formar biopelículas, probablemente porque es la encargada de la conversión de acetaldehído a etanol. Se ha demostrado que el etanol al 4% inhibe la formación de biopelículas en poliestireno y afecta también la formación de tubo germinativo. Por otro lado, el acetaldehído a partir de 7mM también inhibe la filamentación de *C. albicans*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición de la actividad de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa de *Candida albicans* en la formación de tubo germinativo. Para lo anterior primero evaluamos el efecto del etanol (en concentraciones del 1 al 8%), en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 midiendo el crecimiento celular, por medio de espectrofotometría, y la actividad metabólica, por medio de la reducción de MTS, bajo esas mismas condiciones.

Posteriormente evaluamos por medio de microscopía el efecto de dos inhibidores, el 4-metilpirazol y la daidzina (inhibidores de la alcohol y la aldehído deshidrogenasa respectivamente) en la formación de tubo germinativo en tres cepas de *C. albicans*.

Nuestros resultados demuestran que la vía fermentativa juega un papel regulador importante en el cambio morfogénico de *C. albicans*, en el que participan los niveles de etanol, acetaldehído y las dos enzimas que regulan estos niveles que son la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa.

Estos datos son importantes para poder plantear nuevas medidas profilácticas y de tratamiento de las infecciones causadas por *C. albicans*, en las que el blanco es la inhibición de su cambio morfogénico.

INTRODUCCIÓN

Características generales del género *Candida*

Candida es una levadura comensal del hombre, que habita en la piel, las mucosas, el tracto respiratorio alto, el tracto genitourinario y el tracto digestivo. Existen aproximadamente 200 especies de *Candida*; sin embargo, la especie que causa infección con mayor frecuencia es *C. albicans*; otras especies menos frecuentes son *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis* (Vázquez 2011).

Los hongos del género *Candida* son levaduras redondas u ovaladas de 3 a 7 micras que se reproducen por blastoconidios, forman pseudomicelio y tienen capacidades de asimilación y fermentación de carbohidratos. Estas características hacen fácilmente distinguible a cada una de las especies. Por su parte, *C. albicans* y *C. dubliniensis*, además, tienen la capacidad de formar micelios verdaderos y clamidioconidios. Ninguna de las especies forman pigmento carotenoide, ni asimilan inositol y todas carecen de cápsula (López 2004).

Candida albicans se desarrolla rápidamente (24-48 horas) a temperatura ambiente y a 25-30°C en agar dextrosa Sabouraud, tanto con cicloheximida y cloranfenicol como sin antibióticos. Las colonias que se desarrollan son cremosas, blanco-amarillentas, lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos (López 2004).

En el agar Biggy Nickerson, que contiene citrato de bismuto amónico y sulfito de sodio, algunas especies de *Candida* reducen estas sales y crecen como colonias con una coloración marrón brillante, característica que muchos consideran útil para diferenciar *C. albicans* de otras especies y otras levaduras. En Chromagar *Candida* también podemos diferenciar las colonias de *C. albicans* de otras porque presentan un color verde claro (López 2004).

El género *Candida* es un grupo extremadamente heterogéneo de organismos que crecen como levaduras. Muchos de sus miembros también producen un tipo de crecimiento filamentoso (pseudohifas o pseudomicelio) pero *C. albicans* y *C. dubliniensis* además forman hifas verdaderas (micelio verdadero). Por lo anterior, ambas especies son consideradas polimórficas. La diferencia entre hifas y pseudohifas se realiza en base a la forma en la que esta se formó. La pseudohifa se forma a partir de las células levaduriformes o de las hifas por gemación, pero las nuevas células permanecen unidas a las células originales y se alargan resultando en filamentos con constricciones en las uniones celulares de los filamentos. Las hifas verdaderas, en cambio, se forman a partir de levaduras o como ramificaciones de las hifas existentes. A partir de las levaduras comienza a crecer el tubo germinativo por una extensión apical y con formación de septos detrás del crecimiento de la hifa. Las gemaciones ocurren de forma lateral justo detrás de la formación del septo. *Candida albicans* forma abundantes tubos germinativos cuando crece en presencia de suero u otros inductores y en esas condiciones se forman más ramificaciones de las hifas y se retrasa el proceso de gemación. Las pseudohifas parecen ser una etapa de crecimiento intermedio entre las levaduras y las hifas (Calderone 2002). En la figura 1 se muestran fotografías de estas morfologías.

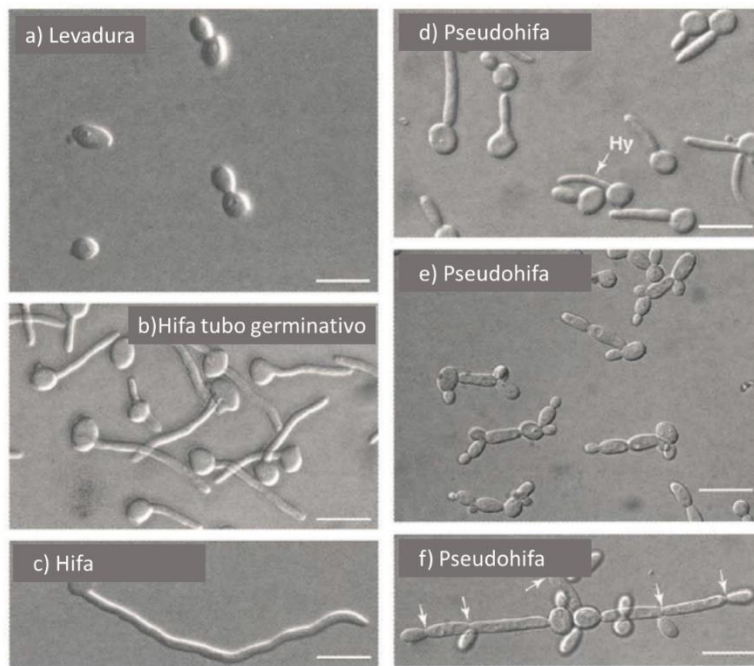


Figura 1. Morfologías de *C. albicans*. La barra de escala representa 10 μm . (Tomado de Sudbery 2004).

Taxonomía

En el caso de las levaduras la clasificación taxonómica ha evolucionado considerablemente a través de los años debido a que, a pesar de poseer morfologías engañosamente parecidas, presentan una gran variedad de características fisiológicas que las hacen diferentes entre sí. Los géneros y especies se encuentran en continua clasificación al descubrirse nuevas características. La clasificación taxonómica para *C. albicans* que se describe en NCBI Taxonomy Browser es:

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Género: *Candida*

Especie: *C. albicans*

Patogénesis

Las especies de *Candida* normalmente son comensales del tracto gastrointestinal y genitourinario, sin embargo también pueden ser patógenos importantes que provocan desde infecciones superficiales como vaginitis hasta infecciones más severas en boca y esófago en pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo con VIH) e incluso pueden llegar hasta el torrente sanguíneo (Sudbery 2004).

La candidiasis es la micosis oportunista más frecuente. Es una infección aguda o crónica de las mucosas, piel, uñas o tejidos profundos, causada por levaduras del género *Candida*. En general afecta a todos los grupos de edad, sexo, raza y ocupación, aunque algunos tipos particulares de candidiasis afectan con mayor frecuencia a determinados grupos de

personas, por ejemplo, la forma oral es más frecuente en lactantes, la mucocutánea crónica y la granulomatosa se observan preferentemente en preescolares, la intertriginosa en adultos obesos y diabéticos (López 2004).

La patogénesis de la candidiasis combina tres factores importantes: el hospedero, el hongo y los factores microambientales.

Respecto al hospedero, los factores predisponentes incluyen alteraciones endócrinas como la diabetes mellitus, el embarazo, fallas renales e hipertiroidismo, la depresión del sistema inmune generalmente causada por el uso de antineoplásicos o inmunosupresión en el caso de pacientes con trasplantes, o bien, enfermedades del sistema inmune como el SIDA. También existen otras enfermedades predisponentes como linfomas o leucemias, anemia aplásica, o el uso prolongado de tratamientos con antibióticos, corticosteroides, antidepresivos, antineoplásicos o inmunosupresores (Coronado 2013).

Debido a que *C. albicans* forma parte de la microbiota normal del cuerpo humano, su homeostasis es compleja y depende de muchos factores, entre ellos, la inmunidad mediada por células que desempeña un papel destacado debido a que la asociación linfocitos CD4-macrófago ejerce un poder de vigilancia y su déficit redundante en una mayor facilidad de *Candida* para adherirse a las células epiteliales. La frecuencia y gravedad de las infecciones dependen, sobre todo, del nivel de células CD4 en sangre. Las candidiasis son evidentes en enfermos con recuentos inferiores a 400 linfocitos CD4/ μ L. Debe tenerse en cuenta que las mananas y las mananoproteínas de la pared celular de *Candida* son activadoras de las células CD8 y deprimen la actividad de las CD4, potenciando el efecto inmunodepresor del VIH. Por esta razón, en pacientes VIH positivos, se ha propuesto la administración de tratamientos antifúngicos durante lapsos prolongados a fin de reducir el nivel de antígenos libres en sangre y tejidos, evitando un deterioro mayor de la inmunidad. La preservación de la función fagocitaria de los neutrófilos en los pacientes VIH positivos, así como la buena producción de anticuerpos contra el antígeno de 47 KDa de *Candida*, reducen la frecuencia de candidiasis diseminadas en condiciones habituales.

Las candidiasis superficiales están relacionadas con alteraciones en la hidratación y cambios en el pH de la piel, boca, faringe y otros tejidos superficiales (Castañón 2012).

Con lo que respecta al hongo, *Candida albicans* tiene la capacidad de infectar una gran variedad de nichos y para ello emplea diversos factores de virulencia como pueden ser la transición morfológica entre la forma de levadura e hifa (dimorfismo), la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, el tigmotropismo, la formación de biopelículas, el cambio fenotípico y la secreción de enzimas hidrolíticas; además de que este hongo presenta características muy importantes como lo son la rápida adaptación a fluctuaciones en el pH del ambiente que la rodea, poderosos sistemas de adquisición de nutrientes, flexibilidad metabólica, y fuertes maquinarias de respuesta a estrés como se aprecia en la figura 2 (Mayer 2013).

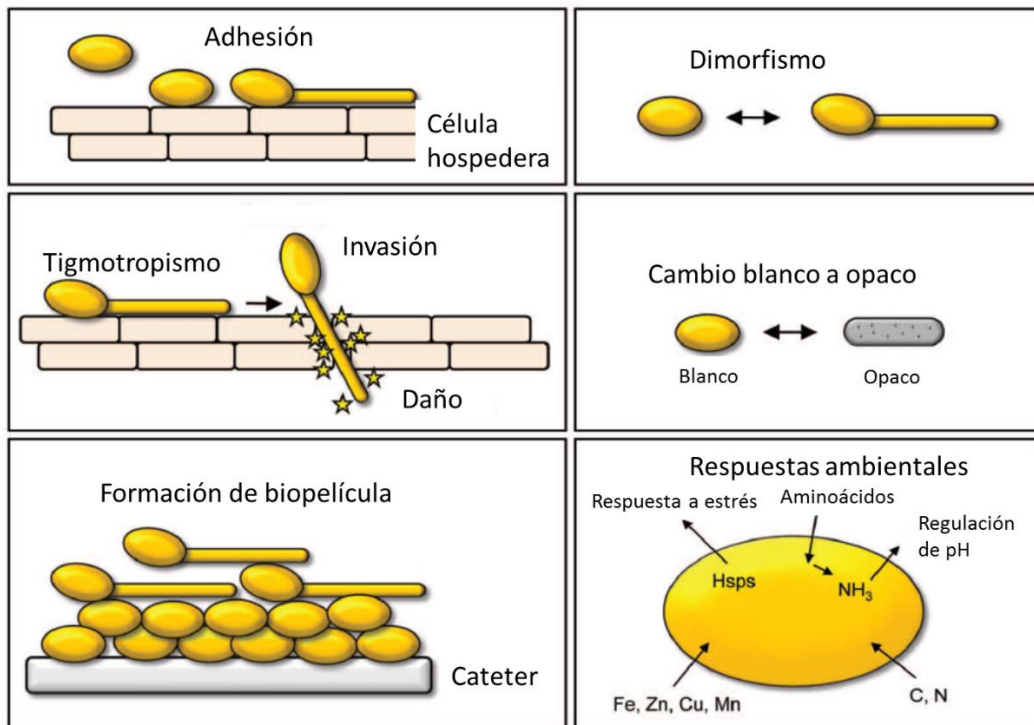


Figura 2. Esquema representativo de los mecanismos de patogenicidad de *C. albicans* (Tomada de Mayer 2013).

Dimorfismo

La capacidad de *Candida albicans* para cambiar entre levadura e hifa es uno de los factores más importantes asociados con la virulencia. La morfogénesis es inducida por un sin número de factores ambientales y nutricionales, por ejemplo, a bajo pH (<6) *C. albicans* crece preferencialmente en forma de levadura pero a pH's elevados (>7) se induce el cambio hacia la forma de hifa. Otros factores importantes que favorecen la producción de hifas son la escasez de nutrientes, la presencia de suero o N-acetilglucosamina, temperatura fisiológica y CO₂ (Mayer 2013, Shepherd 1980, Kelly 2004, Martins 2007).

Los estudios han mostrado que mutantes de *Candida albicans* que presentan únicamente la forma filamentosas son virulentas en modelos de ratones (Lo 1997) sugiriendo que, aunque la forma de levadura es necesaria para la diseminación, la hifa es necesaria para invadir el tejido del hospedero. Por otro lado, se ha observado que las mutantes que son incapaces de formar hifas en condiciones *in vitro* resultan ser menos virulentas. A pesar de lo mencionado, actualmente se prefiere considerar que ambas formas son importantes para la infección: en órganos donde *C. albicans* ha invadido es posible encontrar tanto hifas como levaduras, y dependiendo del órgano será la forma predominante. Por ejemplo, durante una candidiasis, en riñón generalmente se observan hifas pero no están presentes en hígado o bazo. Durante la etapa de comensal aún no se ha esclarecido cuál es la forma predominante (Jacobsen 2012).

Las infecciones producidas por *C. albicans* pueden dividirse en al menos cuatro etapas distintas, la colonización, las infecciones superficiales, las infecciones profundas y las sistémicas. Durante la colonización la levadura habita como comensal, en equilibrio con la microbiota sin causar ningún daño al hospedero, incluso, la mayoría de la población es asintomática, pero las infecciones ocurren cuando ese equilibrio se pierde. De una forma simplificada se dice que una vez que el equilibrio se rompe las hifas son patógenas en tanto que las levaduras son formas no patogénicas, sin embargo, en la tabla 1 se

muestran ejemplos de actividades de *C. albicans* durante la infección, que dependen específicamente de la morfología ya sea como hifa o como levadura (Jacobsen 2012).

Tabla 1. Ejemplos de actividades durante la infección de *C. albicans* dependientes de la morfología (Adaptada de Jacobsen 2012).

ACTIVIDAD FUNGICA	MORFOLOGÍA	
	LEVADURA	HIFA
Expresión de genes asociados a la hifa	Bajo ciertas condiciones	Por definición
Adhesión	Moderada	Fuerte
Invasión <ul style="list-style-type: none"> • Endocitosis inducida • Penetración activa 	Baja Ninguna	Moderada Alta
Daño	Ninguno	Alto
Diseminación	A través del torrente sanguíneo	A través de las barreras epiteliales; interepitelial
Adquisición de hierro vía ferritina	No se ha descrito	Vía Als3
Escape de fagocitos	No se ha descrito	Sí

El paso de levadura a hifa es muy complejo y requiere de gran cantidad de procesos celulares, dentro de los que encontramos a la expresión génica y los mecanismos de señalización.

Se ha demostrado que para que se lleve a cabo el cambio morfogenético se requiere de la expresión de genes relacionados con factores de virulencia que no necesariamente están involucrados en la formación de la hifa *per se*, tales como las proteínas de la pared de la hifa Hwp1, proteínas similares a aglutininas Als3, proteasas como Sap4, Sap5 y Sap6 y

proteínas asociadas con las hifas como Ece1 y Hyr1. Sin embargo, también se sabe que existen factores que regulan este proceso como Ras1, Efg1, Cph1, Tec1 y Rim101 y otros factores responsables de regular el proceso inverso (el paso de hifa a levadura) tales como los represores Nrg1 o Tup1 (Jacobsen 2012; Mayer 2013).

Respecto a la señalización, previamente se ha reportado que en los microorganismos los metabolitos producidos bajo diferentes condiciones ambientales actúan como moléculas de virulencia. En *C. albicans* la capacidad de llevar a cabo el cambio morfogénico también se encuentra bajo la regulación de diversas moléculas de señalización (*quorum sensing*) como el farnesol y el tirosol que promueven dicho cambio. Por otro lado, también hay moléculas que en *C. albicans* inhiben este cambio como el alcohol etílico, dodecanol, alcohol isoamílico y nerolidol, aun cuando se encuentren en presencia de inductores de tubo germinativo como el suero, temperatura, pH, etc., por lo que se considera que estas moléculas también desempeñan actividades de señalización (Martins 2007, Davis-Hanna 2008, Chauhan 2011 a y b).

Alcohol deshidrogenasa de *C. albicans*

La alcohol deshidrogenasa es una de las enzimas involucradas en la oxidación de alcoholes primarios y secundarios usando la coenzima NAD(P)⁺. En microorganismos Gram-negativos y etanologénicos, se ha demostrado que son dos isoenzimas de ADH (ADH1 y ADH2) las que están involucradas en la formación de piruvato a partir de etanol (Moon 2011).

En levaduras y bacterias la principal función de la alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) es reducir a etanol el piruvato resultante de la glicólisis por medio de la producción de acetaldehído como intermediario bajo la siguiente reacción (Nelson 2005):



La producción de etanol (fermentación) ocurre bajo condiciones anaeróbicas *in vitro*, en el tracto gastrointestinal y durante las infecciones (Chang 1989, Ogasawara 2006, Spinucci 2006). En el crecimiento, bajo condiciones aeróbicas, la fermentación domina durante la fase *lag* y la respiración tiene lugar durante la fase *log* (Ogasawara 2006).

Por otro lado, se ha encontrado que a pesar de que en *C. albicans* el etanol es un producto del metabolismo de la glucosa y lo puede utilizar como única fuente de carbono, esta levadura es relativamente intolerante al etanol en altas concentraciones cuando está presente en su medio ambiente (Zeuthen 1988). Cuando emplea el etanol como fuente de carbono lo hace para la producción de acetil-CoA a partir del acetaldehído en una reacción de dos pasos. En el primer paso el etanol es oxidado a acetaldehído gracias a la acción de la alcohol deshidrogenasa y en el segundo paso lo convierte a acetil-CoA como se observa en la figura 3 (Strijbis 2010).

También se ha reportado que ADH1 puede participar en la conversión de acetaldehído a etanol, es decir que puede actuar en ambas direcciones (Bertram 1996, Mukherjee 2006).



Figura 3. Esquema representativo de la degradación de etanol en *C. albicans* (adaptado de CGD, Candida Genome database; * Bertram 1996, Mukherjee 2006)

El genoma de *C. albicans* contiene una familia de al menos seis genes de alcohol deshidrogenasas ADH1/orf19.3997, ADH2/orf19.5113, ADH3/orf19.4505, ADH4/orf19.271, ADH5/orf19.2608 y orf19.4504, y en todas ellas las predicciones apuntan a que pueden llevar a cabo el primer paso en la degradación del etanol, que es convertirlo

a acetaldehído, sin embargo, experimentalmente solo se ha demostrado el papel de ADH1.

El gen ADH1 de *C. albicans* tiene una fuerte homología (70.5-85.2%) con las alcoholes deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Schizosaccharomyces pombe* (Bertram 1996) y ha sido demostrado que presenta la actividad de alcohol deshidrogenasa cuando se expresa en *Saccharomyces cerevisiae* (Bertram 1996).

De forma interesante se ha encontrado que, esta proteína (Adh1p) que estaba asociada únicamente a reacciones metabólicas citoplasmáticas, como otras enzimas que participan en el metabolismo de los azúcares, se puede localizar a nivel de la superficie celular, donde puede llevar a cabo otras funciones, entre ellas ser inmunogénica para el hospedero infectado (Shen 1991, Bertram 1996).

Adh1p presenta capacidad de unión a proteínas estructurales (plasminógeno e integrinas) del hospedero, por lo que se asume que también puede desempeñar un papel en las interacciones hongo-hospedero (Shen 1991, Swoboda 1993, Bertram 1996, Pitarch 2001).

Otros estudios han demostrado que Adh1, reacciona con anticuerpos contra integrinas humanas tales como vitronectina y fibronectina, lo que indicaría que en la superficie celular Adh1p participa en la adhesión a la matriz extracelular durante las infecciones (Klotz 2001, Mukherjee 2006).

Con respecto a la regulación del gen, en 1994 Swoboda y colaboradores demostraron que los niveles del mRNA de ADH1 de *C. albicans* cambian durante el crecimiento. Por otra parte, el equipo de Bertram (1996) demostró que al inicio de la fase exponencial de crecimiento de la levadura los niveles de mRNA se encuentran bajos, pero estos aumentan y alcanzan su máximo en las etapas tardías de esta misma fase para nuevamente caer durante la fase estacionaria donde coincide con la baja de glucosa y el punto donde el etanol comienza a utilizarse. Estos autores mencionan que los niveles de la proteína

alcohol deshidrogenasa no tienen una estrecha correlación con los niveles del mRNA, concluyendo que el gen está regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Durante el cambio morfogénico se ha reportado que hay un aumento en los niveles de mRNA de ADH1 (Swoboda 1994), además de que hay una sobreexpresión de la proteína en la hifa respecto a la levadura (Ebanks 2006).

La expresión de ADH1 de *C. albicans* disminuye en la formación de biopelículas y las mutantes *adh1* presentan biopelículas más gruesas en superficies sólidas indicando que el etanol producido por esta enzima puede inhibir la formación de las mismas (Mukherjee 2006).

Un estudio adicional confirma que el etanol al 4% inhibe significativamente la producción de biopelícula así como la formación del tubo germinativo y el alargamiento del mismo. De los estudios realizados por estos autores queda claro que el metabolismo del etanol está implicado en la formación de biopelículas y en el cambio morfogénico actuando (el etanol) como una molécula reguladora aunque ellos no mencionan como sería el papel del gen ADH y su proteína (Chauhan 2011).

Aldehído deshidrogenasa de *C. albicans*

La producción de acetaldehído corresponde a otra ramificación de la vía fermentativa de *C. albicans* (figura 4) y, aunque la conversión de acetaldehído a acetato no ha sido bien caracterizada, se ha demostrado experimentalmente que hay producción de acetato y que esta reacción podría ser catalizada por una aldehído deshidrogenasa (Samaranaya 1983).

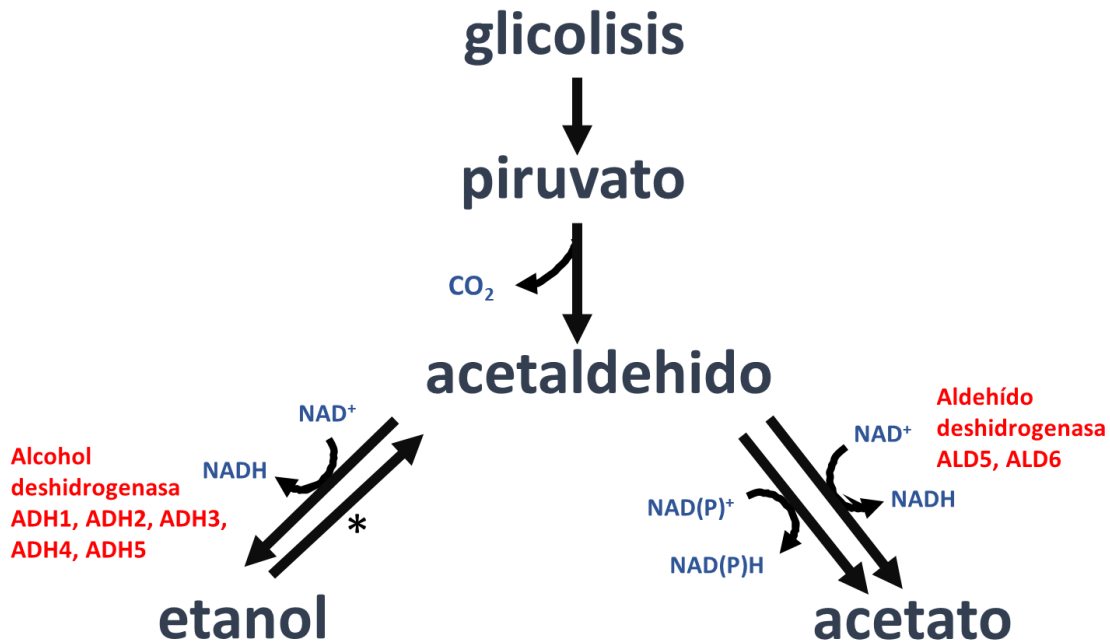


Figura 4. Vía fermentativa de *C. albicans* (tomado de CGD, Candida Genome database; * Bertram 1996, Mukherjee 2006).

El genoma de *C. albicans* incluye varios genes putativos de aldehído deshidrogenasas: ALD5/orf19.5806 es ortólogo al gen ALD5 de *S. cerevisiae* que codifica para una aldehído deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, y ALD6/orf19.8361, orf19.3045, and orf19.6306 son similares a ALD4 de *S. cerevisiae*, que codifica para una aldehído deshidrogenasa que utiliza NADP⁺ y NAD⁺ como coenzimas. En *S. cerevisiae*, tanto Ald4p como Ald5p contribuyen a la producción de acetato (Saint Prix 2004).

Sin embargo, experimentalmente no se ha demostrado su presencia ni su actividad, únicamente en algunos estudios proteómicos o de microarreglos que demuestran que la expresión diferencial del gen o los niveles de la proteína se ven modificados bajo ciertas condiciones (Rogers 2002, Marttila 2013).

Efecto del acetaldehído en *C. albicans*

Muchas especies de *Candida* son capaces de producir el compuesto carcinogénico acetaldehído, entre ellas están *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. Guillermondii* y *C. krusei* (Uittamo 2010).

C. albicans produce cantidades significativas de acetaldehído en concentraciones de etanol clínicamente relevantes (Tillonen 1999). Se ha sugerido que en la saliva humana, el acetaldehído producido por la flora microbiana incluyendo a *C. albicans*, podría ser un factor predisponente importante para que se origine el cáncer oral, además de que en pacientes con APECED (del inglés autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, esto es candidiasis distrófica poliendocrinopática ectodérmica autoinmune) los niveles de acetaldehído podrían ser responsables de la mayoría de las candidiasis orales crónicas que presentan desde temprana edad (Uittamo 2009).

Recientemente se han reportado los efectos del acetaldehído en el cambio de levadura a hifa de *C. albicans* y en la formación de biopelículas encontrando que a una concentración de 7mM hay una inhibición de la morfogénesis del 80-100%, sin embargo estos niveles no tienen efecto sobre el crecimiento ni la viabilidad celular, pero en concentraciones superiores si se ve afectada la viabilidad. En concentraciones de 7 y 14 mM se inhibe al 50% la formación de la biopelícula y se observan únicamente levaduras adheridas (Chauhan 2011).

Aunque todavía no se conocen a detalle los mecanismos moleculares detrás de estos efectos se ha reportado que al exponer a *S. cerevisiae* a concentraciones de acetaldehído de 1 mg/mL hay efectos sobre la progresión del ciclo celular, la replicación del DNA y la biosíntesis de proteínas sin que se observe un efecto significativo en la viabilidad celular. También se reportó que el acetaldehído podría causar una inducción de los genes MET involucrados en el metabolismo del azufre y la represión de genes involucrados en el mantenimiento y polaridad celular. Estos podrían ser efectos que ocurrieran en *C. albicans* bajo las mismas condiciones (Aranda y de Olmo 2004).

Chauhan y colaboradores (2011) proponen que en condiciones *in vivo*, en aquellos sitios donde predomina *C. albicans*, la acumulación de acetaldehído puede inhibir la formación de hifas favoreciendo la presencia de levaduras, lo que traería como consecuencia su diseminación en el hospedero. A nivel de biopelículas su formación también podría inhibirse al incrementar los niveles de acetaldehído, pero al hacerlo se provocaría que aparecieran formas levaduriformes que se desprendan con mayor facilidad y que nuevamente puedan diseminarse. Estos autores concluyen que el acetaldehído producido por *C. albicans* ejerce un papel regulador de la morfogénesis que participa en el cambio de levadura a hifa, la formación de la biopelícula, la diseminación y el establecimiento de la infección.

Inhibidores de la alcohol deshidrogenasa

4-Metilpirazol

El 4-metilpirazol es un potente inhibidor de la alcohol deshidrogenasa (Eklund 1982), a ciertas dosis y solo o en conjunto con etanol (10%) logra inhibir hasta un 60%. El tratamiento combinado de estas sustancias incrementan la actividad microsomal del metabolismo de fármacos. Experimentos donde la alcohol deshidrogenasa se satura con alcohol muestran una más lenta eliminación de 4-metilpirazol. La administración de etanol y 4-metilpirazol muestran una amplia relación en el metabolismo de ambos, logrando así tener una alta concentración en sangre. Debido a su baja toxicidad el 4-metilpirazol y a su alta capacidad inhibitoria puede ser usado como herramienta en experimentos clínicos de metabolismo de alcohol y sus efectos. El 4-metilpirazol es también un potente agente terapéutico en envenenamiento con etilenglicol o metanol (McMartin 1980, Blomstrand 1983).

El 4-metilpirazol es más específico como inhibidor de la alcohol deshidrogenasa que un pirazol (Makar 1975). El rango de inhibición de 4-metilpirazol depende de la dosis, es una buena alternativa de un inhibidor competitivo de ADH con una larga duración de acción. La habilidad del 4-metilpirazol para bloquear el metabolismo de ADH ha sido utilizado

experimentalmente para evaluar su efectividad en la reducción de toxicidad de alcoholes (Chou 1978).

Daidzina

Daidzina es una isoflavona y es un compuesto biológicamente activo que se encuentra en la soya de manera natural, se ha reportado que inhibe la aldehído deshidrogenasa mitocondrial y disminuye la ingesta de etanol (Tian 2002). La aldehído deshidrogenasa es una enzima constante con una variabilidad arquitectónica parecida a la alcohol deshidrogenasa de otra familia la cual es también múltiple. Aparentemente pequeñas variaciones son asociadas con los segmentos no funcionales (alcohol deshidrogenasa clase III y aldehído deshidrogenasa clase 2). Este es el patrón típico de las enzimas conservadas (alcohol deshidrogenasa clase I y clase II) que guardan la función básica de ambas familias y es en contraste para las enzimas generales con más variaciones y sitios funcionales (Hjelmqvist 1997).

La daidzina junto con sus conjugados es uno de los principales componentes de la soya, ha sido reportado que inhiben el crecimiento celular de tumores in vivo e in vitro en el cáncer de mama y de próstata (Li 2006).

También se ha encontrado que la daidzina es uno de los componentes de la *Pueraria lebata*, una planta medicinal china, la cual ha mostrado retardar y disminuir la concentración de alcohol en sangre de animales (ratas), administrar daidzina no muestra un efecto crónico, ya que al administrarlo una sola vez o durante siete días no altera las funciones de la alcohol deshidrogenasa o la aldehído deshidrogenasa del hígado (Xie).

Antecedentes directos

La capacidad de *C. albicans* de sufrir un cambio morfológico entre levadura, pseudohifa e hifa ha sido considerada como un factor indispensable para su virulencia. Tanto hifas como pseudohifas son invasivas y se piensa que estas formas promueven la penetración

de los tejidos durante las fases tempranas de la infección, mientras que la forma de levadura podría ser la encargada de llevar a cabo la diseminación en el torrente sanguíneo (Sudbery 2004).

La comprensión de los mecanismos de patogenicidad que *C. albicans* usa durante la infección son cruciales para el desarrollo de nuevas terapias antifúngicas y diagnósticas. Las drogas antifúngicas fueron diseñadas para matar el microorganismo, sin embargo recientemente se ha propuesto que los factores de virulencia podrían ser nuevos blancos para estrategias antifúngicas y, entre ellos, se encuentran el dimorfismo, la secreción de proteasas y la expresión de adhesinas e invasinas (Mayer 2013). A este respecto son varios los autores que han enfatizado que la inhibición de la filamentación podría reducir la patogénesis y la formación de biopelículas en *C. albicans* (Lo 1997, Baillie 1999, López-Ribot 2005, Chauhan 2014).

En el desarrollo de estas últimas son las hifas quienes proporcionan la arquitectura espacial tan organizada que se observa en las biopelículas maduras. Sin embargo, hay evidencias de que existen eventos moleculares específicos de las biopelículas y que son independientes de la filamentación como los regulados por el factor de transcripción Bcr1p en los que su mutante es incapaz de formar biopelícula pero presenta una capacidad normal de filamentación normal en medio líquido (López-Ribot 2005).

En el 2006 Mukherjee y colaboradores describieron que el mecanismo por el que Adh1p regula la formación de biopelículas podría estar relacionado con la actividad enzimática de ésta proteína. Ellos demostraron que la proteína cataliza la producción de etanol en la biopelícula y que la eliminación del gen ADH1 provocó una disminución en los niveles de etanol y un aumento en los niveles de acetaldehído. De forma parecida, ellos emplearon dos inhibidores específicos de la Adh1p que fueron el 4-Metilpirazol y el Disulfiram y observaron que *C. albicans* era capaz de producir biopelículas más gruesas.

A partir de los resultados publicados por Chauhan y colaboradores (2011 a,b) queda claro que el metabolismo del etanol juega un papel muy importante en la morfogénesis y la

producción de biopelículas, y ellos demuestran que estos dos procesos están regulados por los niveles de etanol y acetaldehído presentes en el medio, sin embargo, como se mencionó antes, Mukherjee y colaboradores (2006) demostraron que estos niveles son regulados por los niveles de expresión y actividad de las enzimas involucradas en esta ruta metabólica, específicamente se enfocaron al gen ADH1 y su producto la alcohol deshidrogenasa 1.

Por otra parte, las vías fermentativas de *C. albicans* no sólo están relacionado con la capacidad de infección de la levadura, sino que además Marttila y colaboradores (2013) demostraron que *C. albicans* produce altos niveles de acetaldehído (bajo tensiones bajas de oxígeno, como en las biopelículas) que podrían explicar la relación que hay entre una pobre higiene dental y el cáncer oral. De acuerdo a los estudios de northern blot que realizaron, ellos encontraron que los genes ALD6 (aldehído deshidrogenasa) y ACS (acetil CoA sintetasa) disminuyen significativamente en bajas tensiones de oxígeno por lo que pueden ser indicadores de la producción de acetaldehído a partir de la glucosa. Sin embargo, esta relación no fue directa, como se esperaría, con los genes ADH1, ADH2 (alcohol deshidrogenasa 1 y 2) o piruvato descarboxilasa (PDC11) demostrando que ALD6 y ACS son los principales involucrados en los niveles de acetaldehído.

Justificación

En el laboratorio nos interesa profundizar en la regulación de la formación de biopelículas y el cambio morfogénico de *Candida albicans*, dos importantes factores de virulencia de ésta levadura, y hemos abordado este tema estudiando la regulación de la expresión del gen, los niveles de proteína y su actividad.

En un trabajo previo, Velázquez (2014) analizó cepas con diferente capacidad de formación de biopelícula que provenían de diferentes aislados clínicos y encontró que la expresión del gen ADH1 fue menor en las cepas menos adherentes y que formaron biopelículas más pobres, en tanto que las cepas que presentaron mayor adherencia y formación de biopelículas bien estructuradas se presentaron niveles altos de expresión del

gen. De sus resultados concluimos que hay una relación directa entre la expresión del gen ADH1, la capacidad de llevar a cabo el cambio morfogénético, 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.

En este trabajo deseamos profundizar en el papel que desempeña la alcohol deshidrogenasa en la formación del tubo germinativo de *C. albicans*, para lo cual evaluamos el efecto del etanol en el cambio morfogénético y empleamos el inhibidor específico de la alcohol deshidrogenasa 4-metilpirazol, además de que ampliamos el estudio al utilizar un inhibidor específico de la aldehído deshidrogenasa, la daidzina, con la finalidad de determinar si esta enzima también participa en el proceso del cambio de levadura a hifa.

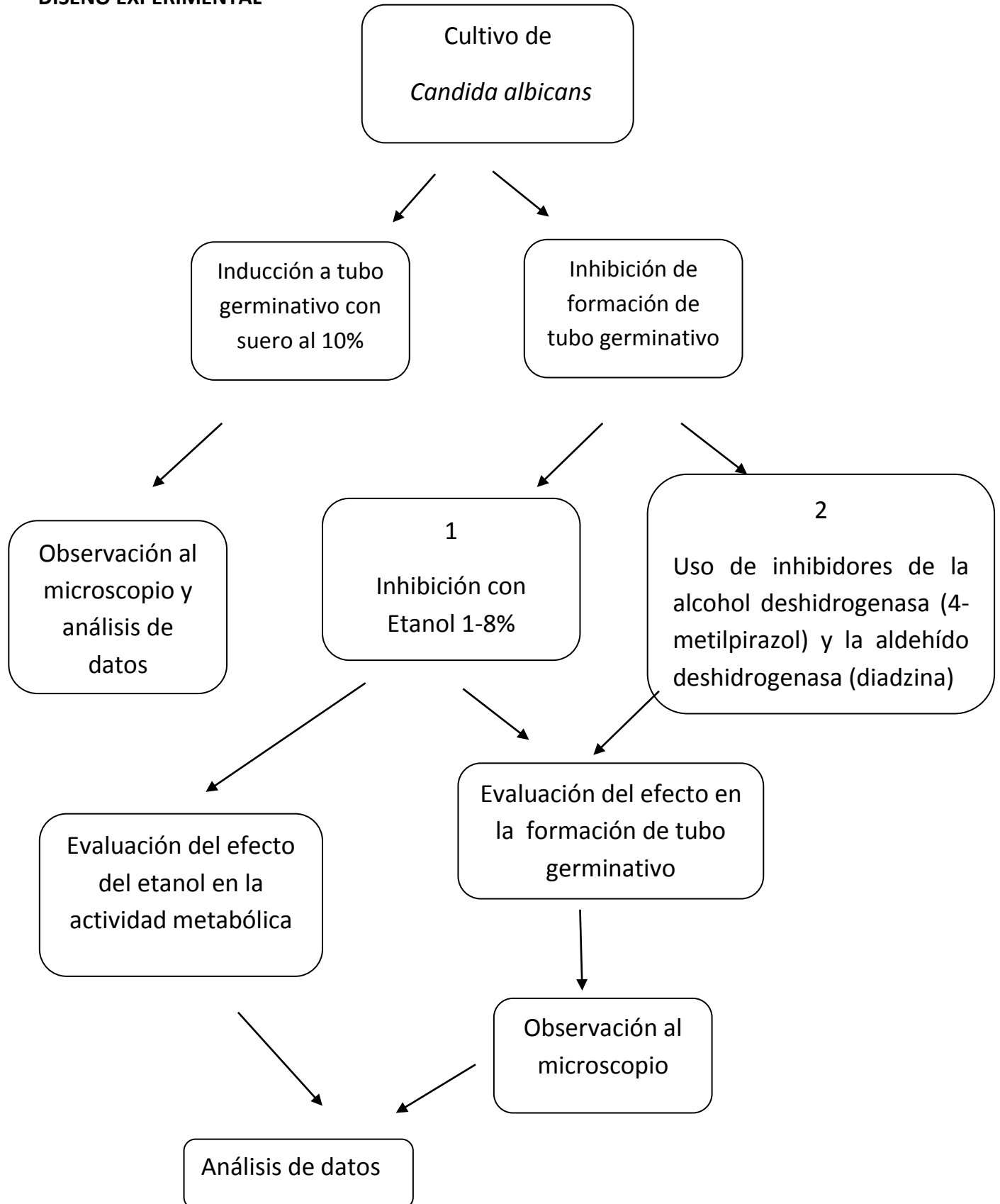
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inhibición de la actividad de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa de *Candida albicans* en la formación de tubo germinativo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el crecimiento celular de *C. albicans* ATCC 10231 en ausencia y presencia de etanol en concentraciones del 1 al 8% por medio de espectrofotometría.
- Evaluar el efecto del etanol, en concentraciones del 1-8%, en la formación de tubo germinativo de *C. albicans* ATCC 10231.
- Evaluar la actividad metabólica de *C. albicans* ATCC 10231 en ausencia y presencia de etanol en concentraciones del 1 al 8% por medio de la reducción de MTS (sal interna de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio).
- Evaluar el efecto del inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, 4-metilpirazol, en la formación de tubo germinativo en tres cepas de *C. albicans* por medio de microscopía.
- Evaluar el efecto del inhibidor de la aldehído deshidrogenasa, diadzina, en la formación de tubo germinativo en tres cepas de *C. albicans* por medio de microscopía.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas empleadas.

Se empleó la cepa de referencia *C.albicans* ATCC10231 y dos cepas (112U y 520) obtenidas a partir de aislados clínicos e identificadas por métodos tradicionales (filamentación en suero, producción de clamidioconios en agar de harina de maíz, crecimiento en el CHROMagar Candida, asimilación de carbohidratos con el sistema API-20-AUX) en el Centro Médico Nacional y en el laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

En pruebas de formación de biopelícula, las cepas 10231 y la 520 fueron clasificadas con alta capacidad de formación y la 112U con baja capacidad.

Cultivo de *C .albicans*.

Las levaduras se mantuvieron en agar YPD hasta su uso. Para las pruebas de filamentación en ausencia y presencia de inhibidores las levaduras fueron crecidas en 5mL de medio YPD a 37°C y 150 rpm durante toda la noche hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 1$ (equivalente a 3×10^7 células por mL) a partir de ahí se hicieron las diluciones correspondientes para colocar en cada pozo 1×10^6 células.

Inducción de la formación de tubo germinativo.

Los ensayos de filamentación fueron llevados a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Chauhan (2011) con algunas modificaciones. Brevemente, en cada pozo se colocaron 1×10^6 levaduras en medio YPD con suero fetal bovino al 10% para completar un volumen final de 200 μ L. En la evaluación del efecto del etanol se adicionó a cada pozo el volumen necesario para obtener concentraciones del 1 al 8% del alcohol. Las células se incubaron a 37°C, y fueron observadas al microscopio invertido desde el inicio (tiempo 0) y a intervalos de 1 hora durante 3 horas para observar la morfogénesis. Al cultivo sin alcohol (control) y a los cultivos con diferente porcentaje de etanol se les tomaron fotografías de diferentes campos del cultivo; analizando cien células de cada campo contando las que presentaban

formación de tubo germinativo y las que no lo presentaban. Se calculó el porcentaje de formación de tubo germinativo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{formación de tubo germinativo} = \frac{\# \text{ tubos germinativos en la muestra}}{\# \text{ tubos germinativos en el control}} \times 100$$

Efecto del etanol en el crecimiento y la viabilidad celular.

Estas mediciones se llevaron a cabo en microplaca de 96 pozos, para lo cual, se colocaron 1×10^6 levaduras por pozo en medio YPD más suero al 10%, en ausencia, y con diferentes concentraciones de etanol a partir de 1 al 8% para completar un volumen final de 200 μL . Para ambas pruebas cada concentración se llevó a cabo por duplicado en la misma placa. Se indujo la formación de tubos germinativos durante 2 horas incubando la placa a 37°C y 200 rpm. Posteriormente, para determinar el efecto del etanol en el crecimiento se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de ELISA. Para evaluar la viabilidad celular a cada pozo se le adicionaron 20 μL del reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (solución acuosa para ensayos de proliferación celular)(Promega). Después de 1 hr de incubación se realizó la lectura en un lector de ELISA con un filtro de 490 nm.

Uso de inhibidores, 4-metilpirazol y daidzina.

El efecto fue evaluado en microplaca de 96 pozos, para lo cual, se colocaron 1×10^6 levaduras por pozo en medio YPD más suero al 10%, en ausencia, y con diferentes concentraciones de cada inhibidor para completar un volumen final de 200 μL . Para ambas pruebas cada concentración se llevó a cabo por duplicado en la misma placa. Posteriormente se incubó la microplaca a 37°C y 200 rpm para inducir la formación de tubos germinativos durante 2 horas.

Para la inhibición de la alcohol deshidrogenasa se empleó 4-metilpirazol partiendo de la concentración 2mM y hasta 16 mM: para la daidzina partimos de concentraciones de 0.3mM y hasta 1.5 mM.

Se llevaron a cabo las observaciones al microscopio a los tiempos 0, 60, 120 y 180 minutos, se tomaron fotografías de varios campos y se contaron cien células de cada campo considerando las que presentaban formación de tubo germinativo y las que no lo presentaban.

RESULTADOS

El objetivo principal de nuestro trabajo fue evaluar el efecto de inhibidores de dos enzimas involucradas en el metabolismo del etanol en *C. albicans* (la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa) en la formación de tubo germinativo, para lo cual el primer paso que llevamos a cabo fue estandarizar las condiciones de trabajo induciendo el cambio morfológico con suero al 10% en la cepa 10231. En la figura 5 se observa que a los 60 min de incubación ya se empezaban a formar los tubos germinativos en el 30 % de las células y las hifas largas comenzaron a aparecer a los 120 min observándose presentes en el 90% de las células y alcanzando el 100% a los 180 min.

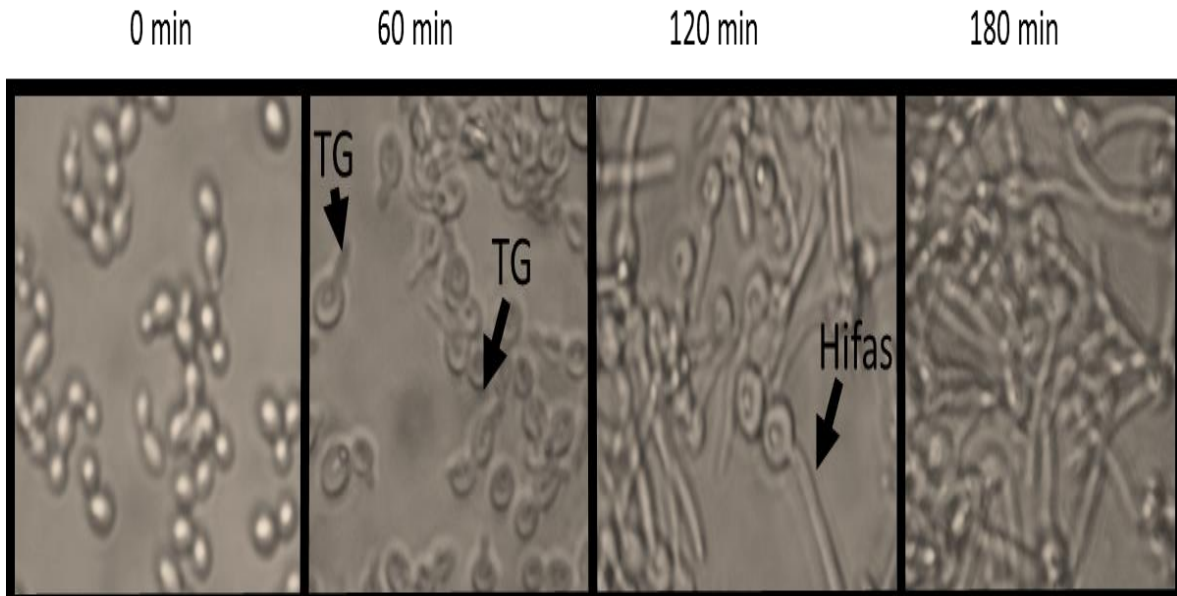


Figura 5. Capacidad de formación del tubo germinativo de la cepa 10231 de *Candida albicans* inducido con suero al 10%. Las flechas indican tubo germinativo(TG) e hifas. Observación al microscopio óptico, aumento 40X.

Una vez que obtuvimos estas condiciones de formación de tubo germinativo se evaluó el efecto del etanol en el mismo, para lo cual, se emplearon diferentes concentraciones que van desde 1 hasta 8%.

En la figura 6 podemos observar que después de un periodo de incubación de 3 horas el efecto fue dependiente de la concentración de etanol empleada, la formación de tubo germinativo disminuyó hasta la concentración correspondiente a 5% donde observamos un 0% de formación de tubo germinativo o dicho de otra forma, la inhibición fue del 100%.

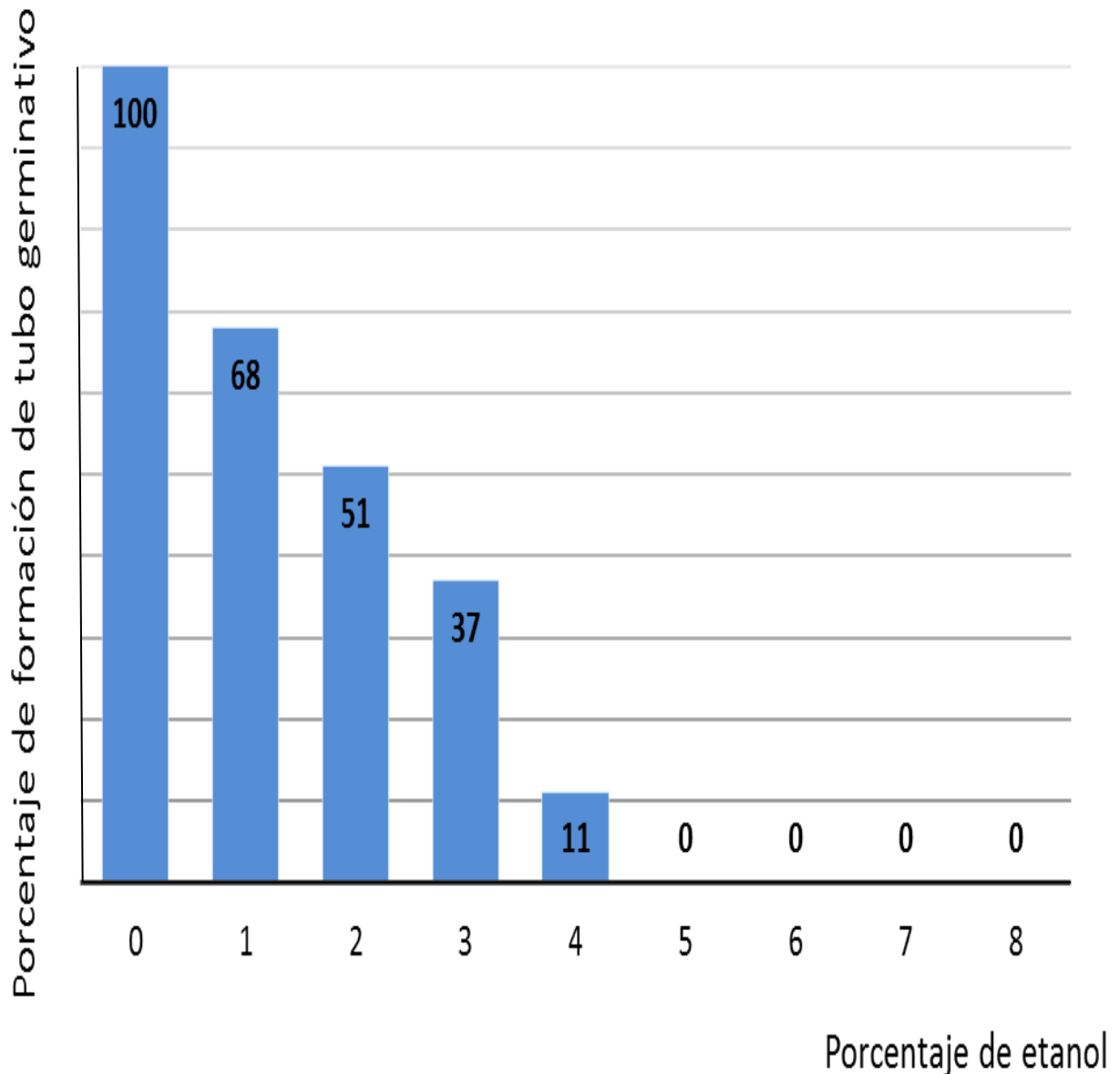


Figura 6. Efecto del etanol en la formación de tubo germinativo inducido por suero en la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. Evaluado a las 3 horas de incubación y en presencia de suero al 10%.

En la figura 7 se observan las fotografías correspondientes a las levaduras incubadas en ausencia de etanol y en presencia de etanol al 5%. Como podemos apreciar, en ausencia de etanol se presentaron hifas largas en el 100% de las células, en tanto que cuando se incubaron en presencia del 5% de etanol únicamente se apreciaron células levaduriformes.

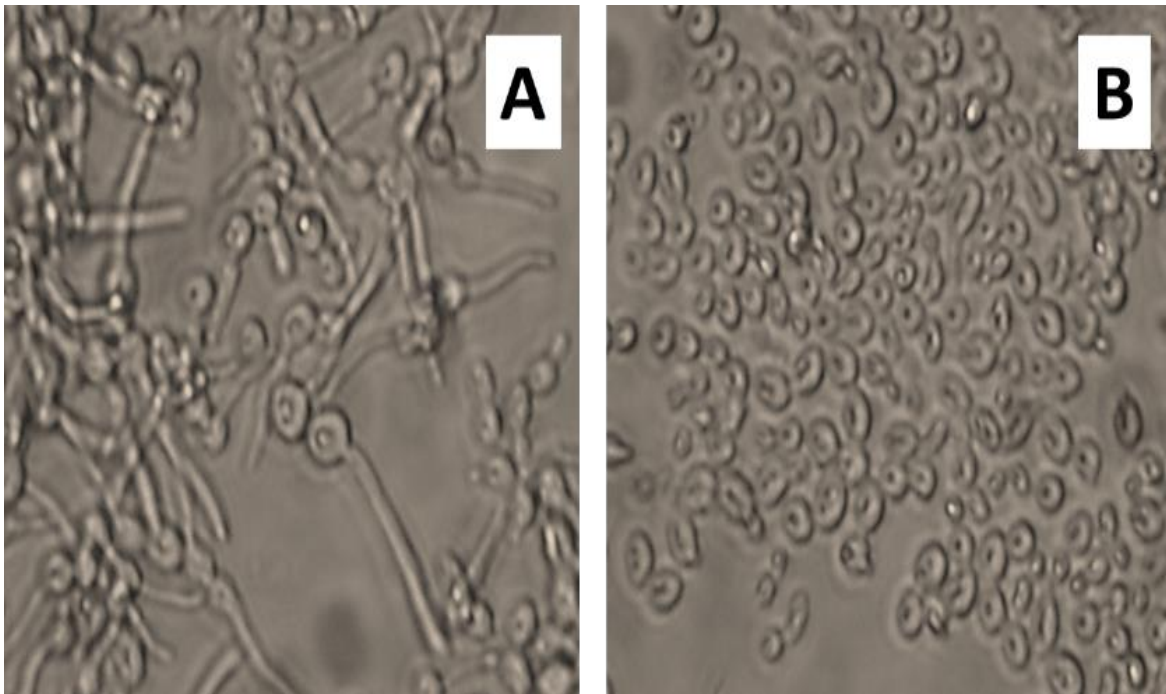


Figura 7. Efecto del etanol sobre la formación de tubo germinativo de la cepa ATCC 10231. Evaluado a las 3 horas de incubación en medio YPD y suero al 10%. A. Levaduras incubadas en ausencia de etanol. B. Levaduras incubadas en etanol al 5%. Observadas al microscopio óptico, aumento 40X.

De acuerdo a los resultados anteriores podemos decir que el etanol tiene un efecto inhibitor de la formación de tubo germinativo. Con la finalidad de conocer si también presenta efecto sobre la viabilidad celular se llevó a cabo la prueba de reducción de MTS empleando las mismas concentraciones de etanol del 1 al 8%.

La figura 8 muestra los resultados obtenidos y como se puede apreciar el etanol disminuyó la actividad metabólica de forma dependiente a la concentración, encontrando una disminución del 50% desde la concentración correspondiente al 5%. Aún al 8% de etanol las levaduras permanecían viables aunque con un metabolismo probablemente basal.

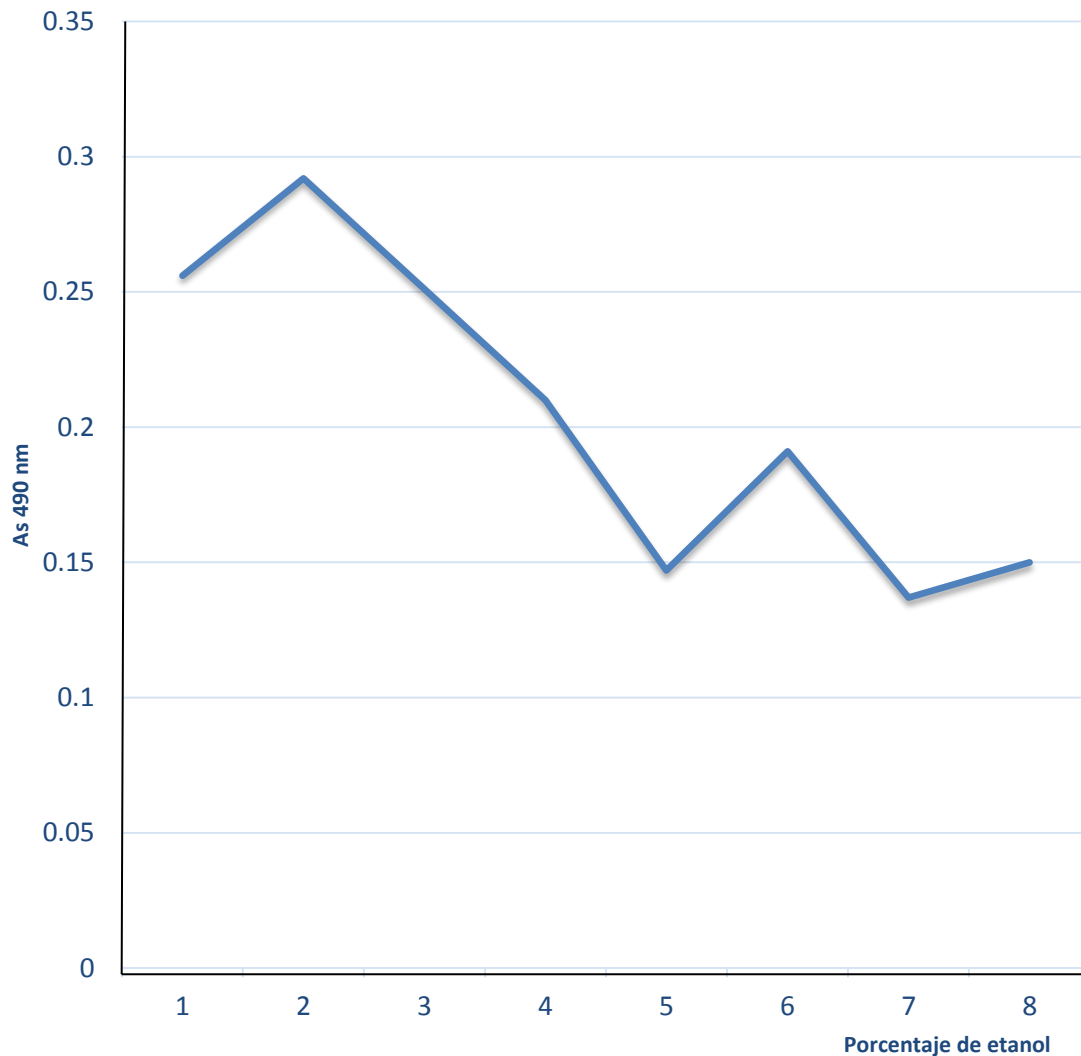


Figura 8. Efecto del etanol en la actividad metabólica de *C. albicans*. Evaluada por reducción de MTS.

En estas mismas condiciones se evaluó el crecimiento celular y los resultados los podemos observar en la figura 9. Como se puede apreciar el etanol también disminuyó el crecimiento celular evaluado por la absorbancia a 600nm de forma proporcional a la concentración de etanol.

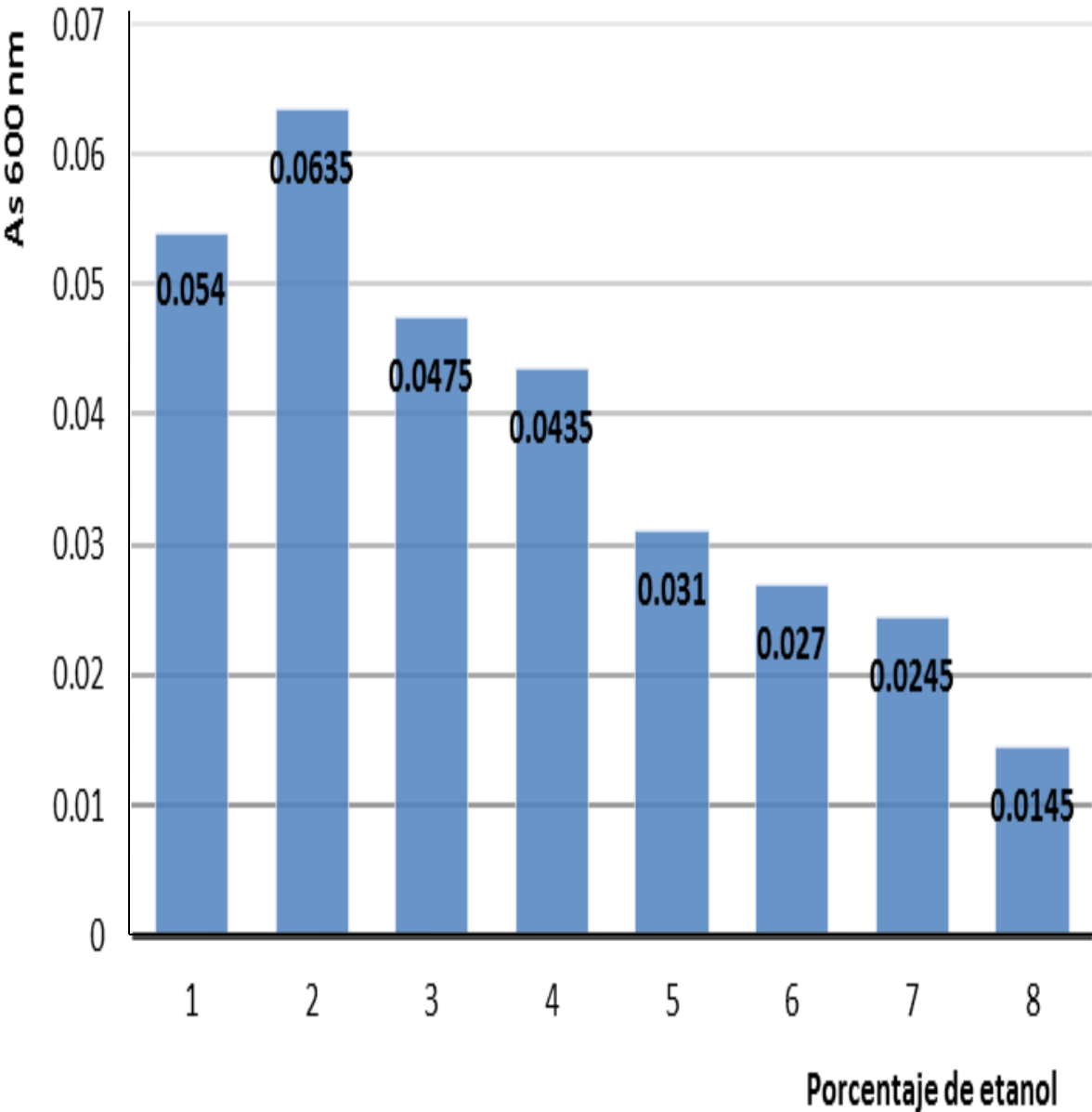


Figura 9. Efecto del etanol en el crecimiento celular de *C. albicans*. Evaluada por espectrofotometría a 600 nm.

Para evaluar el efecto de los inhibidores de la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa se emplearon tres cepas de *C. albicans*, 10231 (ATCC), 520 y 112U, las dos últimas fueron obtenidas a partir de aislados clínicos de boca y de uñas respectivamente. Estas cepas se seleccionaron debido a que previamente habían sido caracterizadas con base en su capacidad de formación de biopelícula encontrando que la 10231 y la 520 presentaban alta capacidad de formación, en tanto que la 112U fue clasificada como de baja capacidad (cuando se induce la formación de la biopelícula únicamente se observan células levaduriformes, Velázquez 2014). Se empleó suero al 10% para inducir la formación de tubo germinativo y como se aprecia en la figura 10 encontramos que la cepa 112U no fue capaz de llevar a cabo el cambio morfogénico aún a las 3 horas de incubación, en cambio las cepas 520 y 10231 comenzaron la formación de tubo germinativo desde la primera hora de incubación y a las 3 horas ya se observaron el 100% de las células de la cepa 10231 con hifas, en tanto que en el mismo tiempo se observó un 95% con la cepa 520.

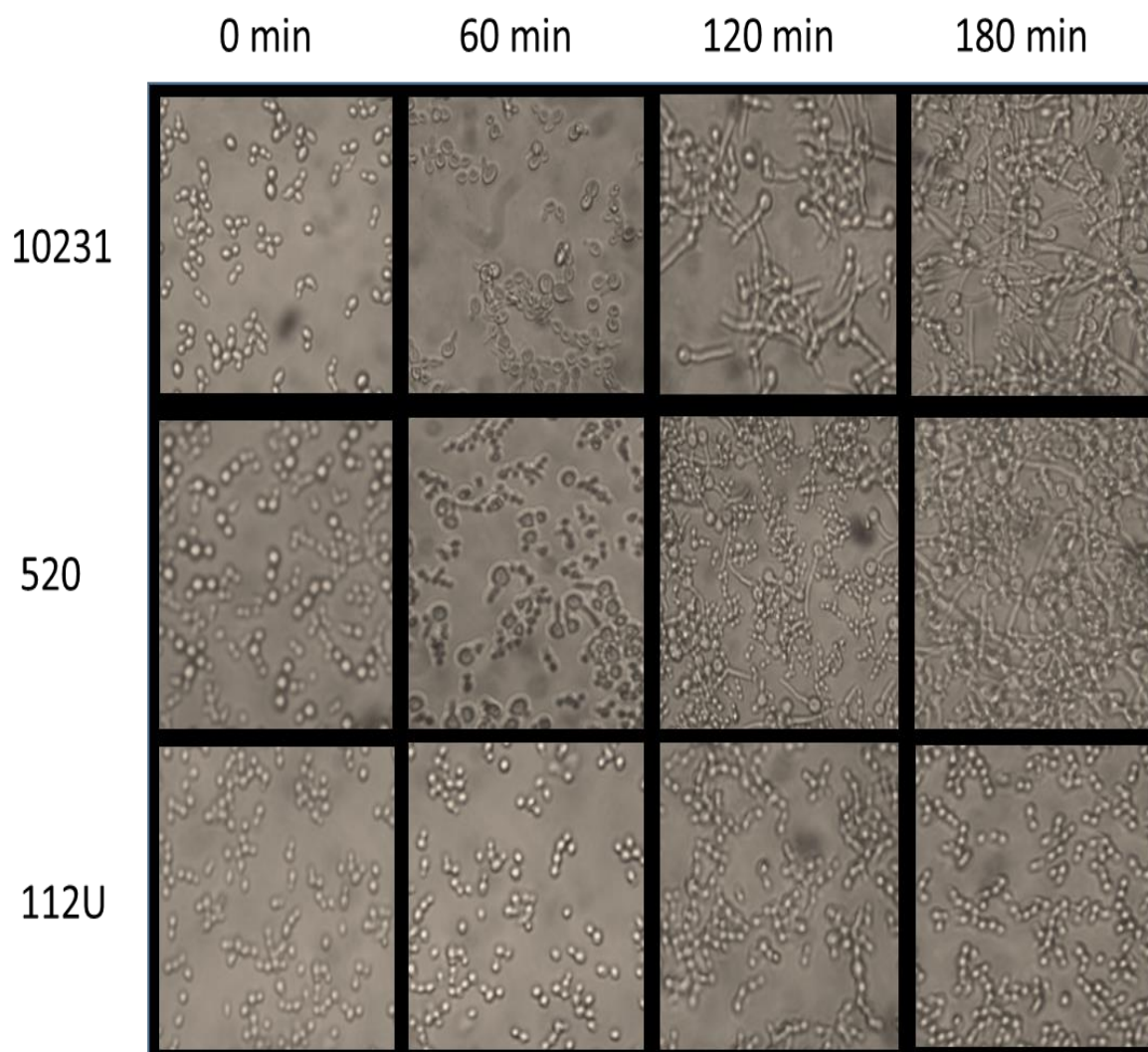


Figura 10. Formación de tubo germinativo inducido por suero en las cepas de *C. albicans* ATCC 10231, 520 y 112U. Observadas al microscopio óptico, aumento 40X.

Estas cepas fueron empleadas para evaluar el efecto del 4-metilpirazol (inhibidor de la alcohol deshidrogenasa), y se emplearon concentraciones del inhibidor desde 2 mM y hasta 16 mM, encontrando que sólo hubo efecto en las últimas dos concentraciones, 8 y 16 mM y los resultados de las observaciones al microscopio se aprecian en las figuras 11, 12 y 13. De cada condición empleada se fotografiaron varios campos con la finalidad de poder contabilizar cien células, a partir de ahí se determinó el porcentaje de formación de tubos germinativos y los resultados fueron graficados. El 4-metilpirazol inhibió la formación de tubo germinativo de forma muy parecida en las dos cepas capaces de llevar a cabo este cambio morfogénico en ausencia del inhibidor, 520 y 10231. A la concentración de 4-metilpirazol de 8 mM observamos únicamente un retraso en el inicio de la formación de tubo germinativo con respecto al control que no contiene inhibidor, sin embargo a las 3 hrs de incubación se observó que en ausencia y presencia del mismo se presentó el tubo germinativo en el 100% de las células. Respecto a la concentración de 16 mM en ambas cepas se observó una inhibición del 100% hasta los 120 min, sin embargo, a los 180 min comenzaron a aparecer algunas hifas y en ambas cepas correspondieron al 5% del total de las células. En la cepa 112U al ser incapaz de presentar cambio morfogénico no hubo ningún efecto como se puede apreciar en la figura 11.

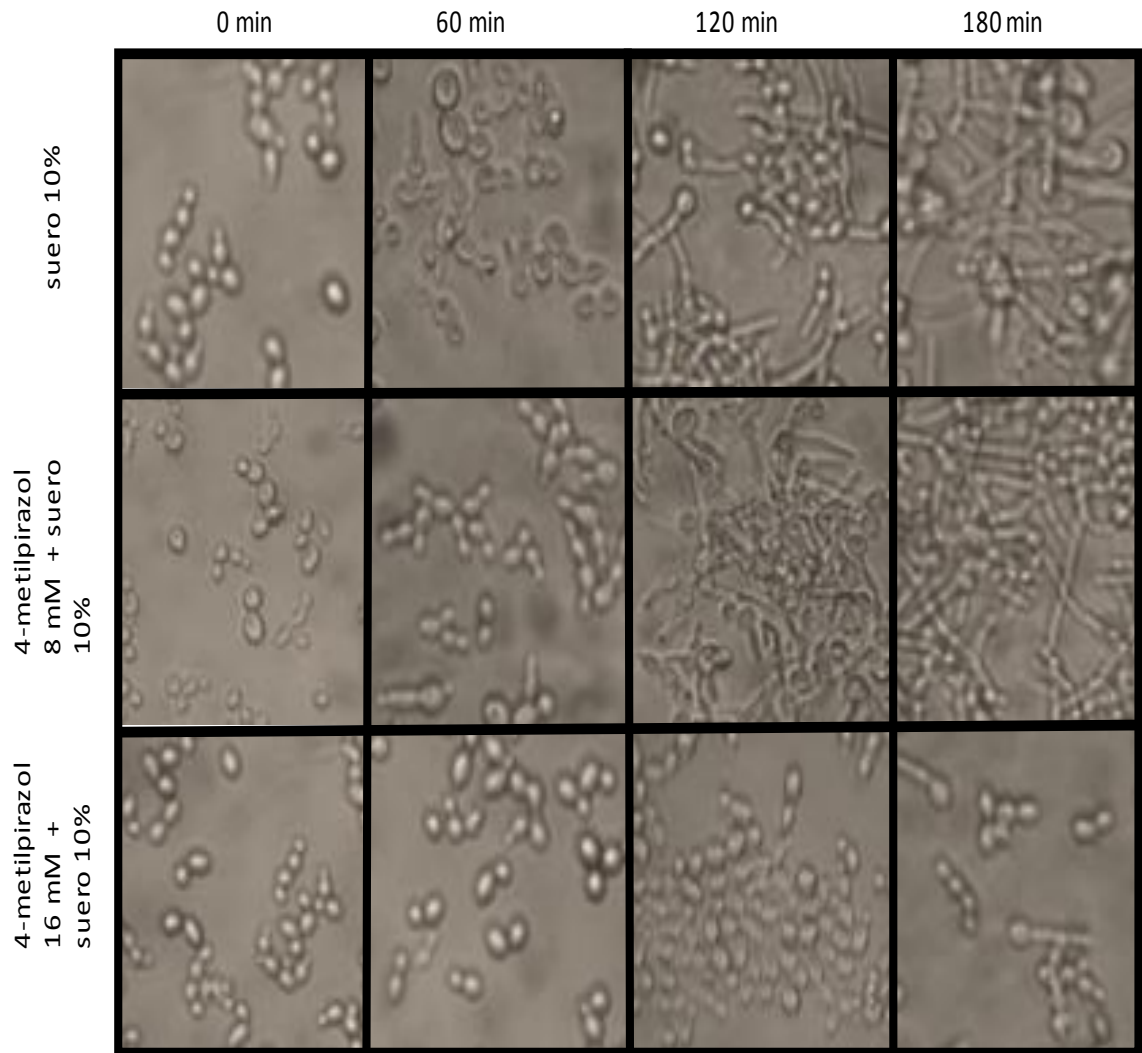


Figura 11-A. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. Observación al microscopio óptico, aumento 40X.

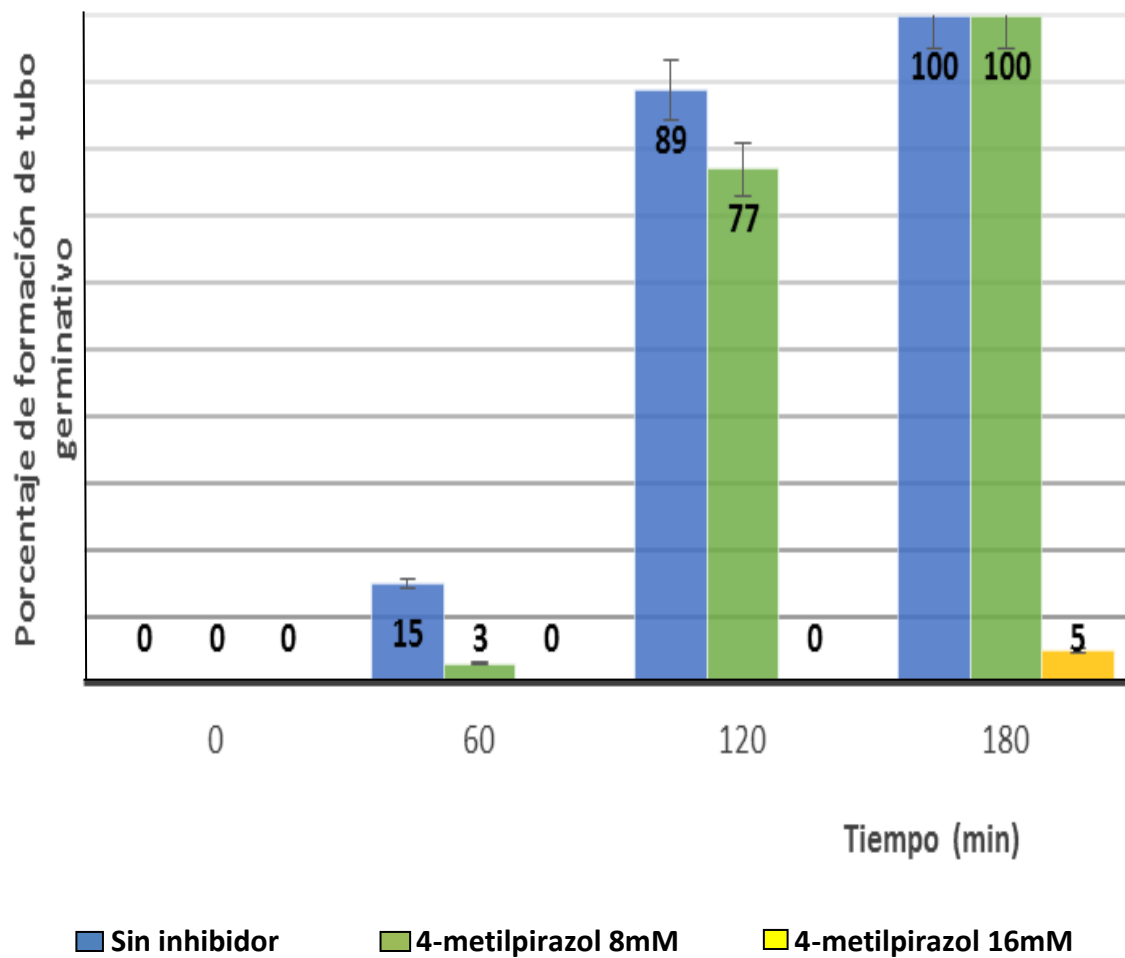


Figura 11-B. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. A. Cuantificación del porcentaje de formación de tubo germinativo

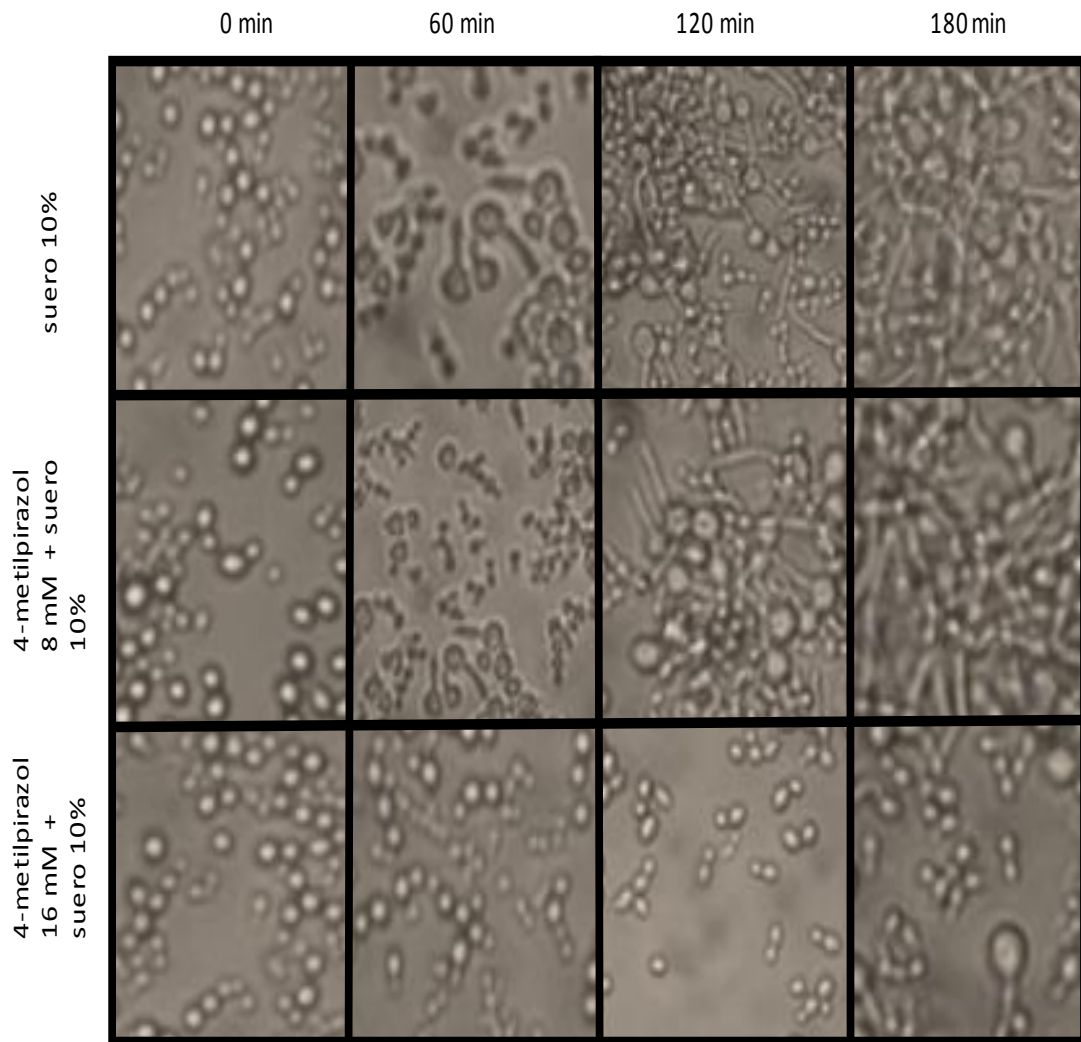


Figura 12-A. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 520. Observación al microscopio óptico, aumento 40X

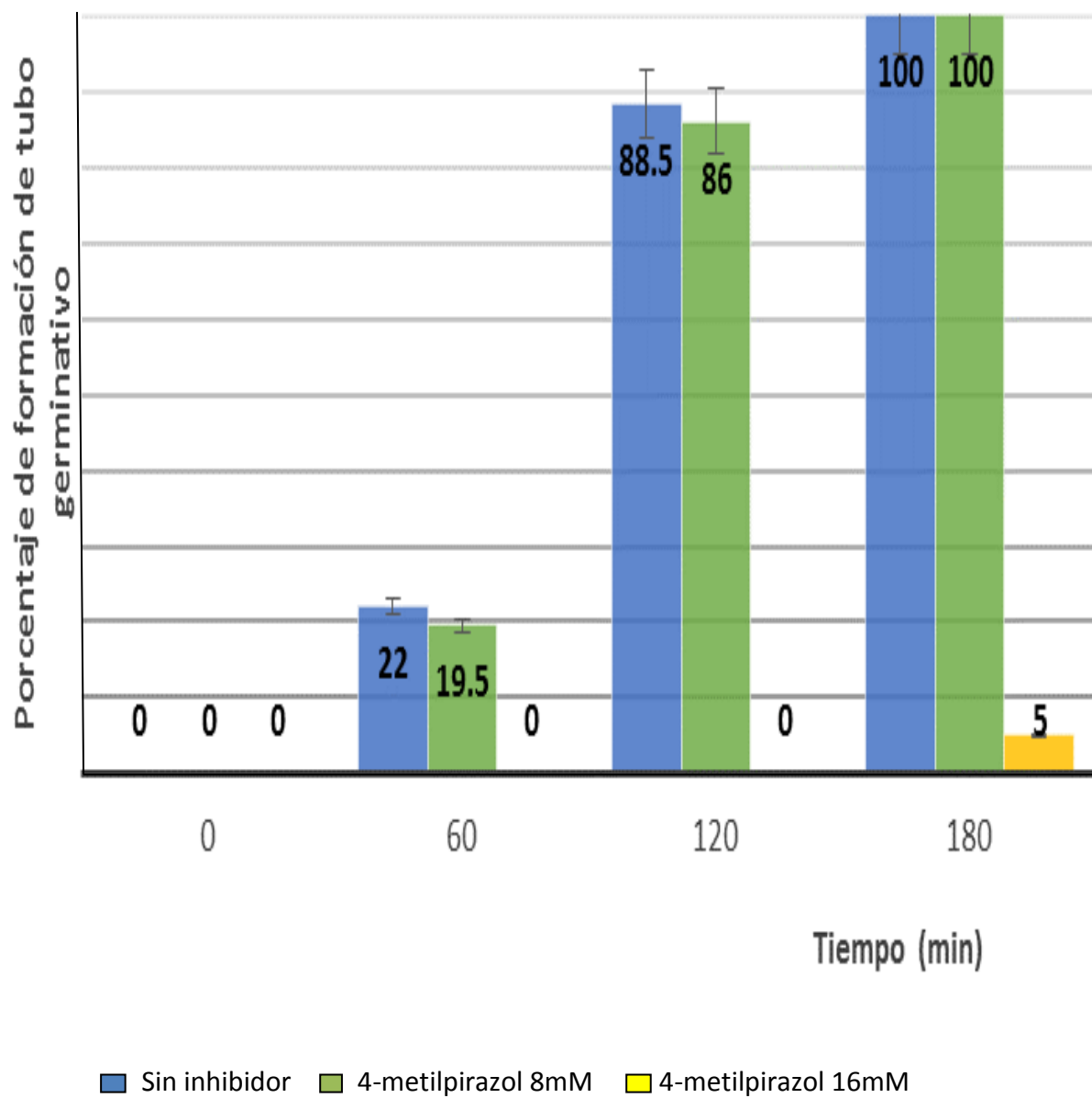


Figura 12-B. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 520. Cuantificación del porcentaje de formación de tubo germinativo.

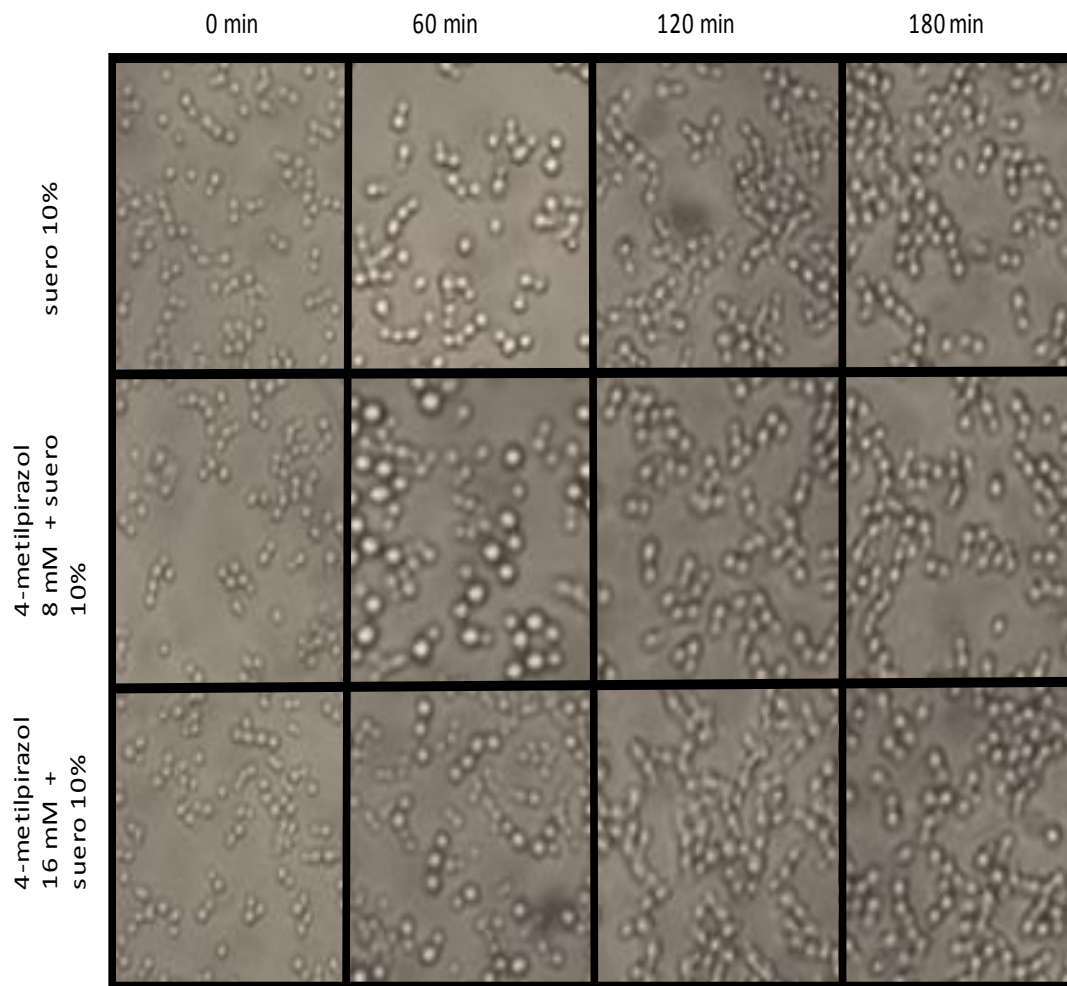


Figura 13. Efecto del 4-metilpirazol en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 112U. Observación al microscopio óptico, aumento 40X.

Para evaluar el efecto de la daidzina (inhibidor de la aldehído deshidrogenasa) se emplearon concentraciones desde 0.3 mM y hasta 1.5 mM, encontrando efecto únicamente en esta última y los resultados de las observaciones al microscopio se aprecian en las figuras 14, 15 y 16. La daidzina inhibió al 100% la formación de tubo germinativo en las cepas 520 y 10231 a los 120 min, sin embargo, a los 180 min ya se alcanzan a ver algunas células que presentan hifas, en la cepa 10231 el 15% y en la 520 el 7.5%. En la cepa 112U al ser incapaz de presentar cambio morfogénético no hubo ningún efecto como se puede apreciar en la figura 16.

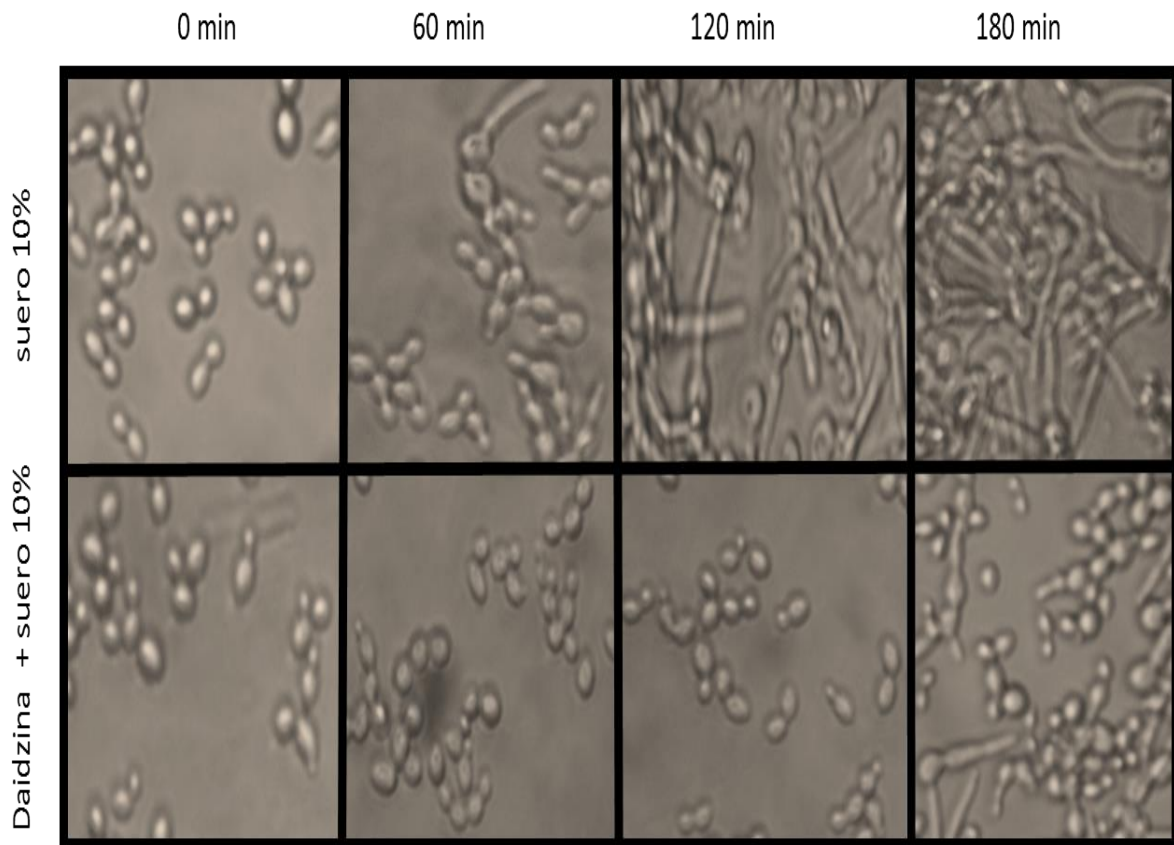


Figura 14-A. Efecto de la daidzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 10231. Observación al microscopio óptico, aumento 40X.

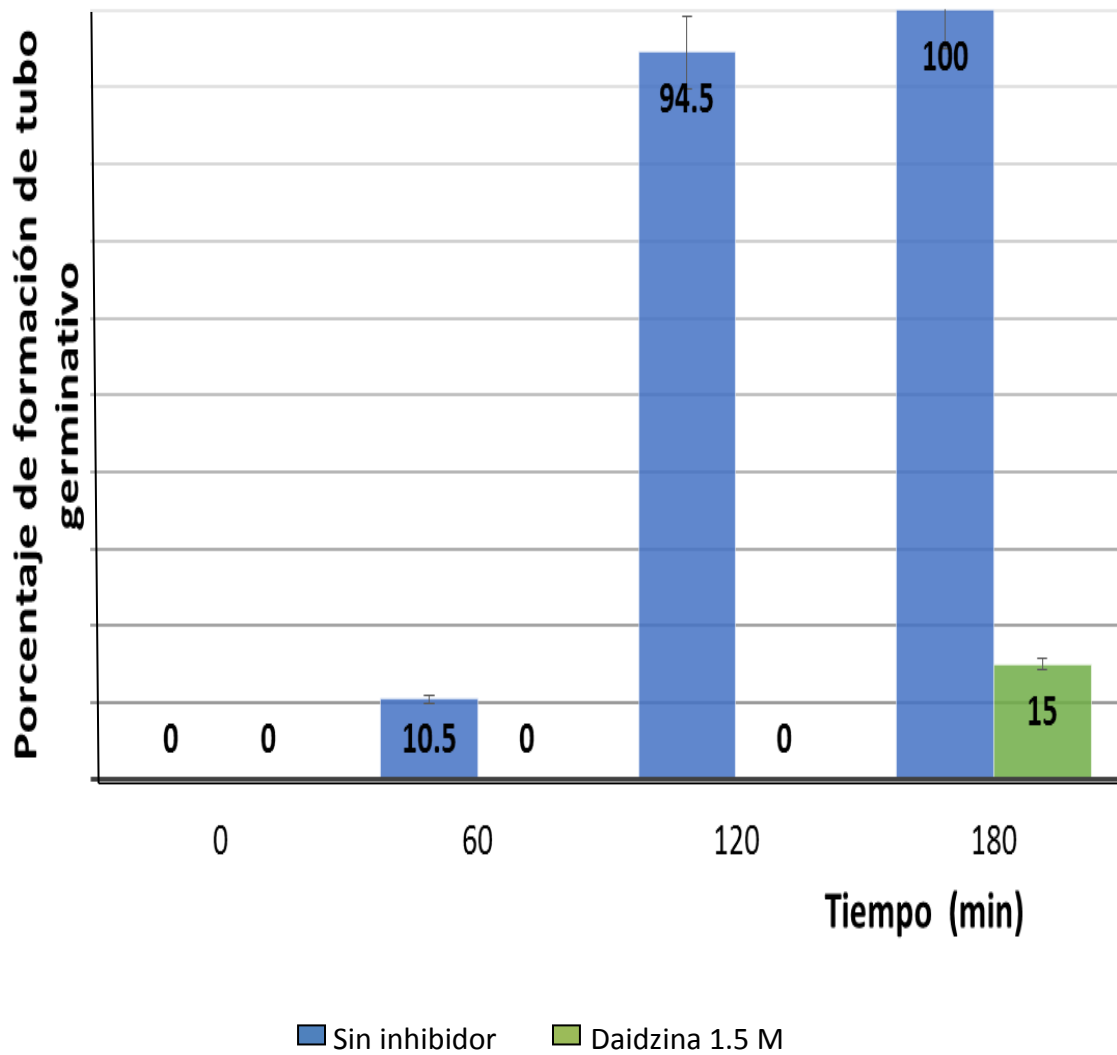


Figura 14-B. Efecto de la daidzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 10231. Cuantificación del porcentaje de formación de tubo germinativo.

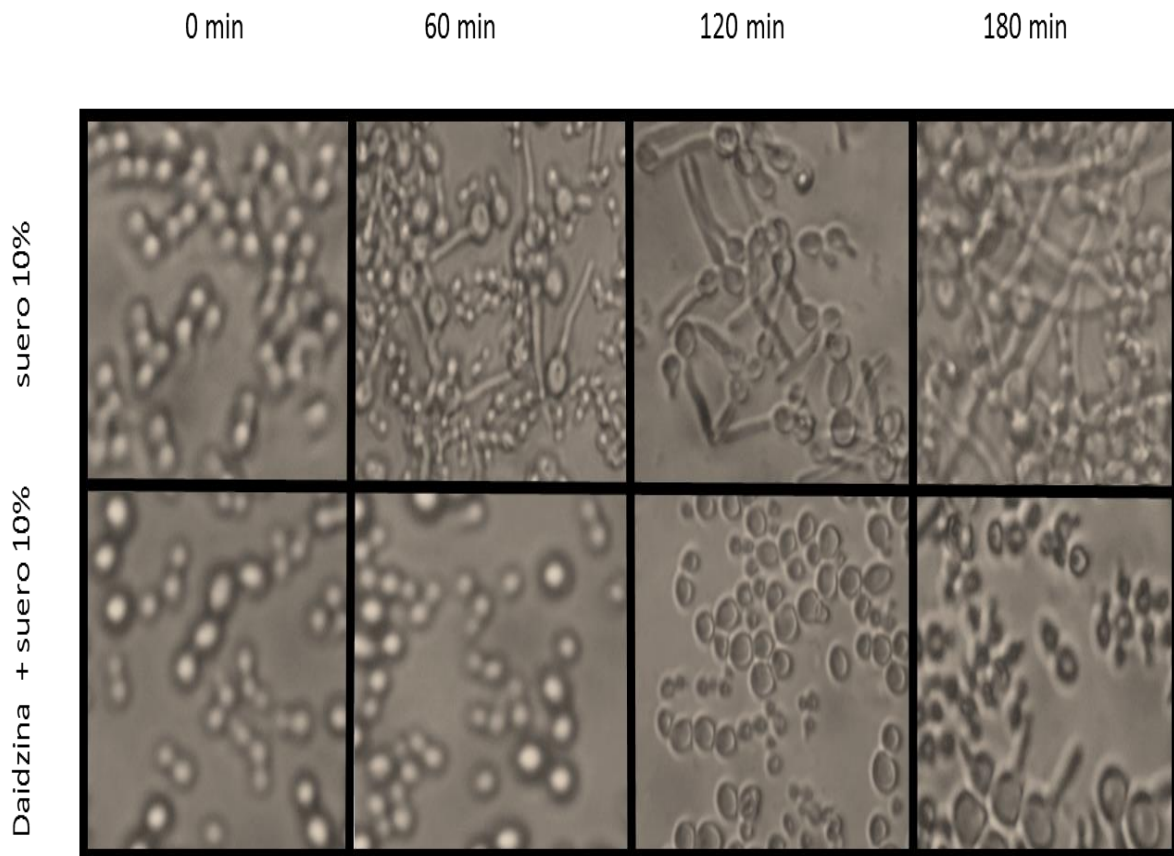


Figura 15-A. Efecto de la daidzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 520. Observación al microscopio óptico, aumento 40X.

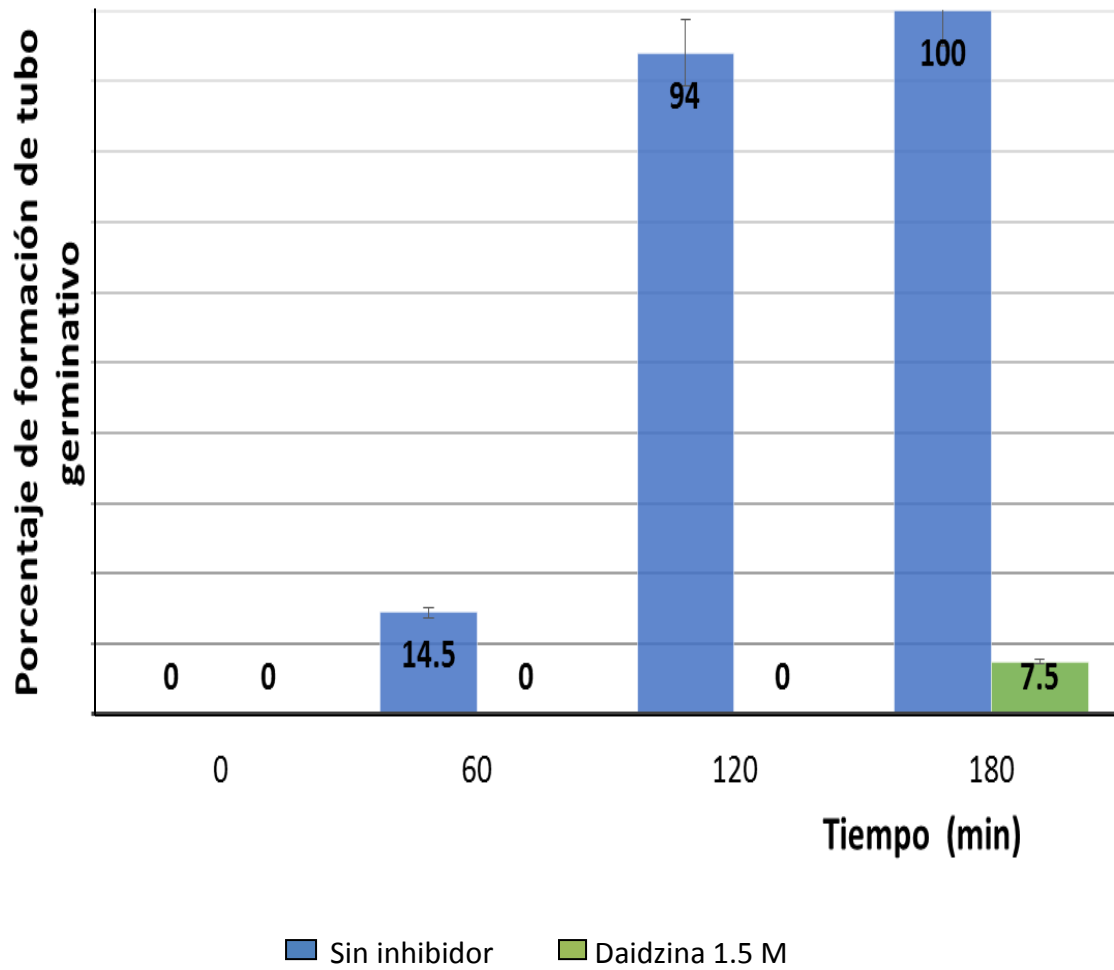


Figura 15-B. Efecto de la daidzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 520. Cuantificación del porcentaje de formación de tubo germinativo.

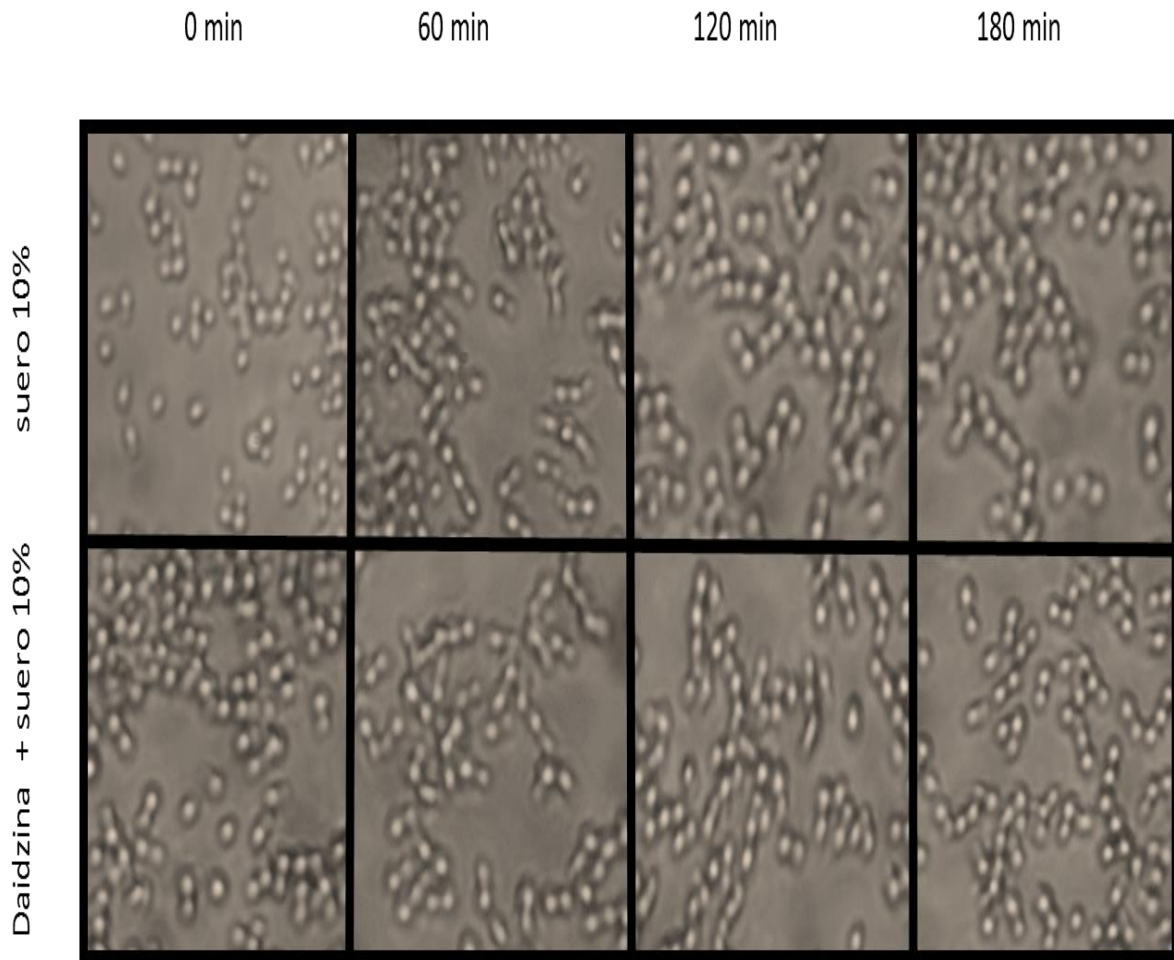


Figura 16. Efecto de la daidzina en la formación de tubo germinativo de la cepa de *C. albicans* 112U. A. Observación al microscopio óptico, aumento 40X.

De los anteriores resultados podemos decir que tanto el inhibidor de la alcohol deshidrogenasa (4-metilpirazol) como el inhibidor de la aldehído deshidrogenasa (daidzina) inhiben la formación del tubo germinativo de forma dependiente de la concentración, aunque este efecto parece ser únicamente un retraso y no una inhibición total.

Discusión

Candida albicans es la levadura que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales. Dentro de sus principales factores de virulencia se encuentran la secreción de proteasas, adhesinas, el cambio fenotípico y la capacidad de realizar el cambio morfológico de levadura a hifa (Kruppa 2008).

Este último también es conocido como dimorfismo o cambio morfogénico y es uno de los factores de virulencia de *C. albicans* más discutidos y mejor investigados aunque aún falta mucho por esclarecer. Ambas formas de crecimiento, levaduras e hifas, parecen ser importantes para la virulencia y tienen diversas funciones durante diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad incluyendo adhesión, invasión, daño, diseminación, evasión del sistema inmune y la respuesta del hospedero.

Resulta interesante pensar que en un futuro se pueda emplear el cambio morfogénico como blanco para controlar las infecciones de *C. albicans* tanto de forma profiláctica como en un tratamiento. Al inhibir este cambio podemos prevenir la adhesión, la invasión y el daño de células epiteliales y endoteliales, podríamos prevenir también el escape de los macrófagos y del torrente circulatorio y reducir la capacidad de adquisición de hierro del hongo. Sin embargo, para ello es necesario entender todos los genes, factores y procesos involucrados en este cambio morfológico (Jacobsen 2012). La inhibición de la filamentación puede reducir la patogénesis y la formación de biopelículas en *C. albicans* (Lo 1997, Baillie 1999, López-Ribot 2005).

Hasta la fecha ya se conocen algunos de los reguladores de este cambio, pero muchos de los genes blanco de estos reguladores aún no se conocen. Recientemente se ha descrito al *quorum sensing* como un fenómeno que contribuye a este cambio en *C. albicans*.

Algunos de los compuestos secretados por *C. albicans* que afectan la morfogénesis son el farnesol, el tirosol y alcoholes como el alcohol feniletílico, triptofol, alcohol isoamílico y el dodecanol (Kruppa 2008).

Smith y colaboradores (2004) reportaron que el alcohol etílico sirve como molécula señalizadora en algunas bacterias. De forma interesante, a muy bajas concentraciones (0.001-0.1%) de alcohol etílico, este induce el crecimiento de *C. albicans* en forma filamentosa (Pollack 1998). Algo similar ocurre en *S. cerevisiae* donde se ha reportado que en concentraciones del 1% afecta el control del ciclo celular de la levadura y favorece el crecimiento en forma de pseudohifas (Martínez 2003).

En este trabajo evaluamos el efecto del etanol en la formación del tubo germinativo de *C. albicans* ATCC 10231 y encontramos que el alcohol etílico inhibe de forma proporcional a la concentración empleada y alcanzó un 100% de inhibición a partir de la concentración del 5%. Chauhan y colaboradores (2011a) encontraron que el alcohol etílico al 4% inhibe la formación y alargamiento del tubo germinativo de *C. albicans* pero a diferencia de lo que obtuvimos ellos encontraron que no tiene efecto sobre su crecimiento ni viabilidad. Nuestros resultados mostraron que en la misma concentración en la que el etanol inhibe la formación de tubo germinativo también disminuye el crecimiento celular (medido por espectrofotometría) y la actividad metabólica general (evaluada por reducción de la sal de tetrazolio MTS).

El mecanismo exacto de cómo actúa el etanol no ha quedado claro hasta el momento, sin embargo Chauhan y colaboradores (2011a) proponen que podría ser por una desestabilización a nivel de la membrana, donde se encuentran proteínas involucradas en la transducción de señales, y que de esta forma podría interferir en la señalización requerida para pasar de levadura a hifa afectando genes específicos de estas últimas.

A partir de lo anterior, queda claro que la concentración del etanol puede regular la morfogénesis en *C. albicans*, pero quien se encarga de controlar los niveles de etanol en *C. albicans* es la alcohol deshidrogenasa, la cual es la responsable de producir etanol a partir de acetaldehído, aunque se ha propuesto que esta reacción es bidireccional.

En la literatura hay reportes de que la alcohol deshidrogenasa regula la formación de biopelículas de *C. albicans* por un mecanismo dependiente de alcohol inhibiendo su formación significativamente a partir de una concentración del 10% y con el 20% alcanza

el 100% de inhibición (Mukherjee 2006). Sin embargo, estos mismos autores mencionan que la inhibición de la alcohol deshidrogenasa, ya sea por inhibidores bioquímicos o por eliminación del gen, favorece una mayor producción de biopelículas, observándose con mayor grosor y densidad que las que forma la cepa clínica crecida en presencia o ausencia de inhibidores.

En el laboratorio hemos observado lo opuesto (Velázquez 2014), ya que al analizar seis cepas provenientes de diferentes aislados clínicos y que presentaban diferente capacidad de formación de biopelícula encontramos que a mayor expresión del gen ADH1 las cepas eran más adherentes, formaban mayor número de hifas y formaban biopelículas más estructuradas. Observamos además que el etanol inhibió la formación de las biopelículas a partir de una concentración de 4%.

Estos resultados estuvieron de acuerdo con otros autores como Swoboda (1994) que encontró que los niveles de mRNA de ADH1 son mayores en hifa que en levadura y Thomas (2006), Ebanks (2006) y Martínez Gomariz (2009) que demostraron que los niveles de alcohol deshidrogenasa son mayores en biopelículas e hifas que en levaduras.

Con base en estos resultados nosotros sugerimos que al inhibir la actividad de la alcohol deshidrogenasa podríamos inhibir el cambio morfo genético, aunque como se mencionó anteriormente sería lo opuesto a lo reportado por Mukherjee (2006) que encontró mayor formación de biopelícula con el 4-metilpirazol a una concentración de 10 mM.

Empleando este mismo inhibidor de la alcohol deshidrogenasa (4-metilpirazol), observamos la inhibición de la formación de tubo germinativo en tres cepas de *C. albicans* aunque a la concentración de 8 mM fue ligeramente menor que lo observado en las células que fueron incubadas en ausencia del inhibidor, sin embargo, a 16 mM la inhibición en las cepas 10231 y 520 fue del 95% con respecto a las células sin inhibidor. La cepa 112U fue un control, ya que no forma biopelícula ni presenta cambio morfo genético en presencia de suero y ninguno de los inhibidores tuvo efecto alguno sobre ella.

De acuerdo a estos resultados el 4-metilpirazol, inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, inhibe la formación de tubo germinativo en una concentración de 16mM.

Dentro de la vía fermentativa de *C. albicans*, a partir del piruvato se obtiene acetaldehído, pero la alcohol deshidrogenasa se encarga de oxidarlo a etanol. Conforme aumenta la concentración de etanol se inhibe la formación de tubo germinativo, al inhibir a la alcohol deshidrogenasa con 4-metilpirazol también se presenta inhibición, y debido a que esta enzima es bidireccional, esto debe afectar los niveles de acetaldehído en la célula aunque fue algo que no evaluamos en este trabajo.

Las mutaciones en el gen ADH resultan en un incremento en los niveles de acetaldehído producidos *in vitro* e *in vivo*, y Chauhan y su equipo (2011b) demostraron que el acetaldehído en concentraciones de 7 y 14 mM inhiben el cambio morfogénico de *C. albicans* empleando cuatro inductores distintos y aunque no queda claro el mecanismo, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto que el acetaldehído inhibe la progresión del ciclo celular, la replicación del DNA y la biosíntesis de proteínas con efectos adversos sobre la viabilidad celular (Aranda y Del Olmo 2004), por lo que pudiera ocurrir algo parecido en *C. albicans*.

Tomando en cuenta que el nivel de acetaldehído no sólo es regulado por la alcohol deshidrogenasa, sino por la aldehído deshidrogenasa (Marttila 2013), en este trabajo decidí evaluar si esta enzima también desempeña algún papel en la formación del tubo germinativo, para lo cual se empleo un inhibidor específico, la daidzina.

A partir de los resultados encontré que la daidzina inhibe la formación de tubo germinativo en las cepas de *C. albicans* 10231 y 520 a partir de una concentración de 1.5 mM.

Este es el primer trabajo en el que se demuestra que la aldehído deshidrogenasa también participa en el cambio morfogénico de *C. albicans*.

En conjunto todos estos resultados demuestran que en el cambio morfogénico están involucrados los niveles de etanol y acetaldehído que rodean a la célula y las enzimas que

mantienen estos niveles, la alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. Entender estas relaciones puede ayudar a entender la patogénesis de *C. albicans*, a plantear nuevas medidas profilácticas y de tratamiento. Los resultados obtenidos son una primera aproximación, pero podría profundizarse en mediciones de la expresión génica de la aldehído deshidrogenasa, evaluar las actividades enzimáticas de ambas enzimas y cuantificar los niveles de etanol y acetaldehído producidos relacionando esto con la patogénesis de la levadura.

CONCLUSIONES

- El etanol inhibe la formación de tubo germinativo de *C. albicans* 10231 en concentraciones del 5 al 8%.
- El etanol disminuye la actividad metabólica de *C. albicans* 10231 de forma proporcional a la concentración a partir del 1 al 8%.
- El etanol inhibe el crecimiento de *C. albicans* 10231 de forma proporcional a la concentración a partir del 1 al 8%..
- El 4-metilpirazol, inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, inhibe temporalmente la formación de tubo germinativo en dos cepas de *C. albicans* al usar una concentración de 16 mM.
- La daidzina, inhibidor de la aldehído deshidrogenasa, inhibe temporalmente la formación de tubo germinativo en dos cepas de *C. albicans* al usar una concentración de 1.5 mM.
- Este es el primer trabajo que demuestra que la aldehído deshidrogenasa participa también en el cambio morfofenético de *C. albicans*.
- De acuerdo al efecto mostrado, el 4-metilpirazol y la diadzina podrían ser utilizados como medicamentos antimicóticos.

REFERENCIAS

ARANDA A., Del Olmo M.L., "Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to acetaldehyde induces sulfur amino acid metabolism and polyamine transporter genes, which depend on Met4p and Haa1p transcription factors, respectively". *Appl. Environ. Microbiol.*, Apr 2004, 70(4), p.1913-1922.

BAILLIE G.S., and Douglas L.J., "Role of dimorphism in the development of *Candida albicans*", *J. Med. Microbiol.*, Jul 1999, 48(7), p.671-679.

BERTRAM G., Swoboda R.K., Gooday G.W., Gow N.A., Brown A.J., "Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase". *Yeast*, 1996, 12(2), p.115-127.

BLOMSTRAND Rolf, Ellin Äke, Löf Acneta and Östling-Wintzell Helene, "Biological Effects and Metabolic Interactions after Chronic and Acute Administration of 4-Methylpirazole and ethanol to Rats". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Feb 1983, 99(2), p.591-605.

CALDERONE R. *Candida and Candidiasis*. American Society of Microbiology Press. Washington, DC. 2002, pp 472.

CASTAÑON Olivares Laura Rosio, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, 2012, Ircastao@unam.mx

CHANG J, Kollman SE. "The effect of temperature on the formation of ethanol by *Candida albicans* in blood". *J. Forensic Sci.*, 1989, 34(1), p.105-109.

CHAUHAN Nitin M., Raut Jayant S. and Karuppayil S. Mohan, "A morphogenetic regulatory role for ethyl alcohol in *Candida albicans*". *Mycoses*, 2011 a, 54, p.e697-e703.

CHAUHAN Nitin M., Raut Jayant S., Karuppayil S., "Acetaldehyde inhibits the yeast-to-hypha conversion and biofilm formation in *Candida albicans*". *Myco. science*, 2011 b, 52, p.356-360.

CHAUHAN Nitin M., Shinde B. Ravikumar and Karuppayil S. Mohan., "Effects of alcohol on filamentation, growth, viability and biofilm formation in *Candida albicans*". *Braz. J. Microbiol.*, Dec 2013, 44(4), p.1315-320.

CHOU J.Y., Richardson K.E., "The effect of pyrazole toxicity of ethylene glycol and the metabolism in rat". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Jan 1978, 43(1), p.33-44.

CORONADO-CASTELLOTE L., Jimenez-Soriano Y., "Clinical and microbiological diagnosis of oral candidosis". *J. Clin. Exp. Dent.*, 2013, 5(5), p.279-286.

DAVIS-HANNA A, Piispanen AE, Stateva LI, Hogan DA., "Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis". *Mol Microbiol.*, Jan 2008, 67(1), p.47-62.

EBANKS RO, Chisholm K, McKinnon S, Whiteway M, Pinto DM., "Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins". *Proteomics*, Apr 2006,pr;6(7):2147-56.

HJELMQVIST Lars, Lundgren Robert, Norin Annika, Jörnvall Hans, Vallee Bert, Klyosov Anatole, Ming Keung Wing, "Class II aldehyde dehydrogenase. Characterization of the hamster enzyme, sensitive to daidzin and conserved within the family of multiple forms". *FEBS Letters*, 1997, 416, p.99-102.

JACOBSEN Ilse D, Wilson Duncan, Wächtler Betty, Brunke Sascha, Naglik Julian R. and Hube Bernhard, "*Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target". *Expert Reviews, Anti Infect. Ther.*, 2012, 10(1), p.85-93.

KELLY M.T., Mac Callum Donna , Clancy Susane D., Odds Frank C., Brown Alistair J.P. and Butler Geraldine., "The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence". *Mol. Microbiol.* Aug 2004, 53(3), p. 969-983.

KLOTS S. A., M. L. Pendrak, et al.. "Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase." *Microbiology*, 2001, 147(Pt 11), p.3159-3164.

KRUPPA Michael, "Quorum sensing and candida albicans". *Mycoses* 2008, 52, p.1-10

LI Wei, Zhang Ming, Zhang Jin-Li, Li Hui-qing, Zhang Xiao-chen, Sun Qian, Qiu Chun-mei, "Interactions of Daidzin with intramolecular G-quadruplex". *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) letters*, 2006, 580, p.4905-4910.

LO H.J., Köhler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G.R., "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent". *Cell*, Sep 1997, 90(5), p.939-949.

LÓPEZ Martínez R., Méndez Tovar L.J., Hernández Hernández F., Castañon Olivares Rocío., *Micología Médica Procedimiento para el diagnóstico de laboratorio*. Editorial Trillas, México 2004, p.99-105.

LÓPEZ-RIBOT J.L., "Candida albicans biofilms: more than filamentation". *Curr. Biol.*, Jun 2005, 15(12), p.453-455.

MAKAR A.B., Tephly T.R., "The inhibition of alcohol dehydrogenase monkey liver by 4-methylpyrazole", *Biochem. Med.*, Aug 1975, 13(4), p.334-342.

MARTÍNEZ-Anaya Claudia, Dickinson J. Richard and Sudbery Peter E., "In yeast, the pseudohyphal phenotype induced by isoamil alcohol results from the operation of morphogenesis checkpoint". *Journal of Cell Science*, 2003, 116, p.3423-3431.

MARTINEZ-GOMARIZ, M., Perumal P., Mekala S., Nombela C, Chaffin W.L., Gil C., "Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*". *Proteomics*, April 2009, 9(8), p.2230-2252.

MARTINS Margarida, Henriques Mariana, Azeredo Joana, Rocha Sílvia M., Coimbra Manuel A. and Oliveira Rosário, "Morphogenesis Control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through Signaling Molecules Produced By Planktonic and Biofilm Cells". *La célula Eukariot.*, Dec 2007, 6(12), p.2429-2436.

MARTTILA E., Bowyer P., Sanglard D., Uittamo J., Kaihovaara P., Salaspuro M., Richardson M. and Rautemaa R., "Fermentative 2-carbon metabolism produces carcinogenic levels of acetaldehyde in *Candida albicans*". *Molecular Oral Microbiology*, 2013, 28, p.281-291.

MAYER F., Hube B., "Candida albicans pathogenicity mechanisms". *Virulence*, 2013, 4(2), p.119-128.

MCMARTIN Kenneth E., Göran Heström Karl, Tolf Bo.Ragnar, Östling Wintzell Helene and Blomstrand Rolf, "Studies on the Metabolic Interactions between 4-Methylpirazole and Methanol Using the Monkey as an Animal Model", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Feb 1980, 199(2), p.606-614.

MOON Ji-Hyun, Lee Hyun-Ju, Park Suk-Youl, Song Jung-Mi, Park Mi-Young, Park Hye-Mi, Sun Jiali, Park Jeong-Hoh, Kim Bo Yeon and Kim Jeong-Sun, "Structures of Iron-Dependent Alcohol Dehydrogenase 2 from *Zimomonas mobilis* ZM4 with and without NAD⁺ Cofactor". *Journal of Molecular Biology*, 2011, 407, p.413-424.

MUKHERJEE Pranab K., Mohamed Sotohy, Chandra Jyotsna, et al., "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*, 2006, 74(7), p.3804-3816.

NELSON David L. And Cox, Michael M.Lehninger, "Principles of Biochemistry". W.H. Freeman and Company, New York, 2000, p.180.

OGASAWARA A, Odahara K, Toume M, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T. "Change in the respiration system of *Candida albicans* in the lag and log growth phase". *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, 29(3), p.448-450.

PATHURI Priyadarshini Pathuri Indira, E. Reitberger Ines, Hückelhoven Ralph and Proels Reinhard K., "Alcohol Dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*". *Journal of Experimental Botany*, Feb 2011, 62(10), p.3449-3457.

PITARCH A., R. Diez-Orejas Molero G, Pardo M, Sánchez M, Gil C, Nombela C. "Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model". *Proteomics* 2001, 1(4), p.550-559.

POLLACK Jordan and Hashimoto Tadayo, "Ethanol induced Germ Tube Formation in *Candida albicans*". *Journal of General Microbiology*, 1985, 131(12), p.3303-3310.

ROGERS P.David and Barker Katherine S., "Evaluation of differential Gene Expression in Fluconazole-Susceptible and Resistant Isolates of *Candida albicans* by cDNA Microarray Analysis". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(11), p.3412-3417.

SAINT PRIX F, Bonquist L, Dequin S . "Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation". *Microbiology* 2004, 150(Pt 7); p.2209-2220.

SAMARANAYA L.P., Geddes D.A., Weetman D.A., MacFarlane T.W., "Growth and acid production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media". *Microbios* 1983, 37(148), p.105-115.

SAVILLE Stephen P., Lazzell Anna L., Monteagudo Carlos and Lopez-Ribot Jose L., "Engineered Control of Cell Morphology In vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during infection". *Eukariotic Cell*, Oct 2003, 2(5), p.1053-1060.

SHEN HD, Choo KB, Lee HH, Hsieh JC, Lin WL, Lee WR, Han SH . "The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies". *Clin. Exp. Allergy*, 1991, 21(6), p.675-81.

SHEPHERD M.G., Yin C.Y., Ram S.P., Sullivan P.A., "Germ tube induction in *Candida albicans*". *Can J Microbiol.*, Jan 1980, 26(1), p.21-26.

SMITH Michael G., Des Etages Shelley G. and Snyder Michael, "Microbial Sinergy via an Ethanol-Triggered Pathway". *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(9), p.3874-3884.

SPINUCCI G., Guidetti M., Lanzoni E., Pironi L., "Endogenous ethanol production in a patient with chronic intestinal pseudo-obstruction and small intestinal bacterial overgrowth". *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Jul 2006, 18(7), p.799-802.

STRIJBIS K, Distel B. "Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism." *Eukaryot Cell* 2010, 9(12), p.1809-15.

SUDBERY P., Gow N., Berman J., "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*". *Trends Microbiology*, July 2004, 12, p.317–324.

SWOBODA, R. K., Bertram, G., Delbruck, S., "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*, Aug 1994, 13(4), p.663-672.

THOMAS, Derek P., Bachmann Stefano P. and Lopez-Ribot Jose L., "Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle". *Proteomics* 2006, 6(21), p.5795-5804.

TIAN Feifei, Zhu Yomgxin, Long Hong, Cregor Meloney, Xie Fuming, Kissinger Candice B., Kissinger Peter T., "Liquid chromatography coupled with multi-channel electrochemical detection for the determination of daidzin in rat blood sampled by an automated blood sampling system". *Journal of chromatography B*, 2002, 772, p.173-177.

TILLONEN J., Homann N., Rautio M., Jousimies-Somer H., Salaspuro M., "Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer". *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Aug. 1999, 23(8), p.1409-1415.

UITTAMO J, Siikala E, Kaihovaara P, Salaspuro M, Rautemaa R. "Chronic candidosis and oral cancer in APECED-patients: Production of carcinogenic acetaldehyde from glucose and ethanol by *Candida albicans*". *Int. J. Cancer*, 2009, 124(3), p.754-756.

UITTAMO J, Nieminen MT, Kaihovaara P, Bowyer P, Salaspuro M, Rautemaa R (2010). "Xylitol inhibits carcinogenic acetaldehyde production by *Candida* species" . *Int. J. Cancer*, 2010, NIL.

VALLEJO J.A., Sánchez-Pérez A., Martínez José P. and Villa T.G., "Cell aggregations in yeast and their applications". *Appl. Microbiol. Biotechnology*, Mar 2013, 97(6), p.2305-2318.

VAZQUEZ JA, Sobel JD. *Candidiasis Essentials of Clinical Mycology*, 2011, Part 3, P.167-206, DOI: 10.1007/978-1-4419-6640-7_11

VELÁZQUEZ Gómez Miguel. Tesis de licenciatura: "Análisis de la expresión del gen ADH1 en cepas de aislados clínicos de *Candida albicans* con diferente capacidad de formación de biopelícula". 2014. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM

XIE C.I., Lin R.C., Antony V., Lumeng L., Li T.K., Mai K., Liu C., Wang Q.D., Zhao Z.H., Wang G.F., "Daidzin, an antioxidant isoflavonoid, decreases blood alcohol levels and shortens sleep time induced by ethanol intoxication". Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis 46202.

ZEUTHEN Marie L., Dabrowa Nina, Aniebo Chiaka M. and Howard D.H., "Ethanol Tolerance and the Induction of Stress Proteins by Ethanol in *Candida albicans*". *Journal of General Microbiology*, 1988, 134, p.1375-1384.