



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES QUE
CODIFICAN LIPASAS Y FOSFOLIPASAS EN CEPAS DE
Candida albicans DE ORIGEN VAGINAL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

PAMELA RODRÍGUEZ PURATA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

Proyecto financiado por la UNAM-DGAPA-PAPIME PE203714.



Tlalneantla Edo. De México, 2016



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.

*...Y me dediqué a buscar e investigar con sabiduría
todo lo que se hace bajo el cielo:
Dura ocupación la que Dios ha dado
a los hombres para que se dediquen a ella... Eclesiastés 1:13.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Luz Paniagua contreras por haberme brindado la oportunidad, el honor y el placer de trabajar a su lado, porque me tendió siempre su mano para dar este paso tan importante y sobre todo por sus enseñanzas y valiosos conocimientos, es usted para mí un gran ejemplo de vida. GRACIAS.

Al Dr. Eric Monroy Pérez por ser un gran profesor, gracias por todos sus conocimientos, por el gran apoyo académico, dedicación y paciencia para poder realizar este trabajo de tesis, gracias por compartir conmigo su sabiduría.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco por su amabilidad, paciencia y alegría que lo caracteriza como un gran dibujante de sonrisas.

Al Dr. Felipe Vaca Paniagua y su laboratorio, por todas las aportaciones y colaboraciones para enriquecer este trabajo.

DEDICATORIAS

Este trabajo de tesis va dedicado para las personas que más amo, a quienes les agradezco infinitamente el apoyo brindado durante esta etapa de mi vida. Primeramente a mi Dios y a mi Señor Jesucristo que nunca me dejaron y sostuvieron mi mano en los momentos más difíciles y porque a través de esta hermosa carrera fui testigo de las maravillas de Dios y de su creación.

A Adela Purata Chávez, mi madre, por ser el ser más maravilloso del mundo, mi inspiración, un gran ejemplo para mí, por ser el pilar para que yo siguiera adelante y por inculcarme que todo se obtiene trabajando duro y con gran sentido de responsabilidad, gracias por ser simplemente mi todo, trabaje muy duro pensando en ti, quiero que sientas que este logro es también tuyo. Muchas gracias por formarme y educarme, todo te lo debo a ti. Te amo mamita.

A Ramón Rodríguez Martínez, mi padre, porque siempre estuviste a mi lado, que llevas toda una vida de lucha y trabajo siempre para buscar el bienestar de nuestra familia y sobre todo porque nunca me negaste absolutamente nada sino por el contrario todo el apoyo me fue dado con todo el amor del mundo por parte tuya sin esperar nada a cambio. Te amo papá, soy bendecida por tenerlos como padres.

A mis hombres favoritos, mis hermanos Erick, Sergio y Rogelio, siempre estuvieron en mi mente, por ser mis primeros maestros de vida, ya que cada uno de ustedes me enseñan cada día algo distinto. Soy gracias por tu consejo, enseñanza y guía para que yo lograra alcanzar esta meta académica, tú más que nadie comprendió esta gran travesía.

A mi tía Cony Purata por ser simplemente maravillosa y por estar pendiente de mí siempre consintiéndome y siendo tan amorosa conmigo es usted una gran guerrera, gracias por endulzarme la vida tía, esto también es para mi tío Luis Ríos que siempre sintió gran admiración por mí haciendo mi vida tan divertida.

A mi tía Amalia Purata que siempre está pendiente de nosotros al igual que el tío Beto, saben lo que ustedes significan para mí queridos tíos, gracias por su amabilidad, cariño, apoyo y por ser un gran ejemplo de trabajo y esfuerzo los admiro mucho.

Y a mi David que me acompañó en mis momentos difíciles así como en los felices, por ser mi conejillo de indias, un gran cómplice, eres un ser humano excepcional, por tus palabras de aliento siempre de tu mano y tú en mi corazón. Gracias por nunca dejar de creer en mí. Te amo güero.

INDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 Características de <i>C. albicans</i>	9
2.2 Candidosis vulvovaginal.....	10
2.3 Factores de virulencia.....	11
2.4 Genes de la familia <i>SAP</i>	11
2.5 Genes de la familia <i>ALS</i>	11
2.6 Enzimas degradativas Lipasas (<i>LIP</i>) y Fosfolipasas (<i>PLB</i>).....	12
3. ANTECEDENTES.....	14
4. JUSTIFICACIÓN.....	14
5. OBJETIVO GENERAL.....	15
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7.1 Obtención de las cepas.....	16
7.2 Extracción del DNA.....	16
7.3 Identificación de la especie <i>C. albicans</i>	16
7.4 Detección de los genes de Lipasas y Fosfolipasas en las cepas de <i>C. albicans</i>	18
7.5 Análisis de amplicones por electroforesis en geles de agarosa.....	20

7.6 Expresión de los genotipos de Lipasas y Fosfolipasas de *C. albicans* por PCR en tiempo real.

Preparación del inóculo de *C. albicans* para la determinación de la expresión de los genes de Lipasas y Fosfolipasas por PCR en Tiempo Real.....20

7.7 Inoculación del Epitelio Vaginal Humano (Proceso infeccioso).....21

7.8 Extracción de RNA21

7.9 Reversotranscripción.....23

7.10 Eliminación del DNA genómico.....23

7.11 Preparación de la Master mix para la reversotranscripción.....23

7.12 PCR en tiempo real.....24

8. RESULTADOS.....26

8.1 Identificación de la especie *C. albicans* mediante PCR en Tiempo Real..26

8.2 Detección de los genes de la Familia *LIP* y *PLB* mediante PCR convencional.....27

8.3 Expresión de los genes que codifican para Lipasas y Fosfolipasas en cepas de *Candida albicans* por PCR en tiempo real utilizando un modelo de infección In vitro de epitelio vaginal humano.....32

8.4 Patrones de expresión de los genes que codifican Lipasas (*LIP*) y Fosfolipasas (*PLB*) en las cepas de *C. albicans*.....46

9. DISCUSIÓN.....47

9.1 Identificación de la especie *C. albicans*.....47

9.2 Detección de los genes de la familia *LIP* y *PLB* mediante PCR convencional.....47

9.3 Expresión de los genes *LIP1-LIP10*, *PLB1* y *PLB2* en las cepas de *Candida albicans* por PCR en tiempo Real.....49

9.4 Patrones de expresión de los genes que codifican Lipasas (*LIP*) y Fosfolipasas (*PLB*) en las cepas de *C. albicans*.....50

10. CONCLUSIONES.....51
11. BIBLIOGRAFÍA.....52

➤ 1. RESUMEN

Entre los factores de virulencia involucrados en la patogénesis de la candidosis vulvovaginal por *Candida albicans* se encuentran los genes de las familias *LIP* (Lipasas) y *PLB* (Fosfolipasas) responsables del daño tisular. El objetivo de este trabajo fue determinar los diferentes patrones de expresión de los genes que codifican para lipasas (*LIP1-LIP10*) y fosfolipasas (*PLB1-PLB2*) en un grupo de cepas de *Candida albicans* de origen vaginal. Se analizaron un total de 39 cepas del género *Candida* aisladas de pacientes con candidosis vaginal. Las cepas de *C. albicans* fueron identificadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) mediante el gen rRNA. La expresión de los genes que codifican lipasas (*LIP1-LIP10*) y fosfolipasas (*PLB1-PLB2*) en las cepas de *C. albicans* fue realizada por PCR en Tiempo Real después de la infección en un modelo *In vitro* de cultivo de células epiteliales vaginales reconstituidas humanas (RHVE, A431). El 100% de las cepas (n=39) expresó los genotipos *LIP1*, *LIP2*, *LIP4*, *LIP6*, *LIP7*, *LIP9*, *PLB1* y *PLB2*, el 97.4% *LIP3* y *LIP8*, y el 89.7% *LIP5*. Se identificaron 5 patrones diferentes de expresión de los genotipos de lipasas y fosfolipasas, dentro de los cuales el patrón constituido por los 12 genes estudiados se encontró en el 89.7% de las cepas (n=35). Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la mayoría de las cepas de *C. albicans* expresó los genes de las familias *LIP* y *PLB* después de la infección *In vitro* del cultivo de células epiteliales vaginales reconstituidas humanas, por lo que los transcritos de estos genotipos podrían contribuir de manera importante a la colonización, infección y degradación de los componentes de la membrana celular del epitelio durante el desarrollo de la candidosis vaginal.

➤ 2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características de *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo dimórfico, levaduriforme, Grampositivo, que puede formar pseudohifas, hifas y blastoconidios (Kravents *et al.*, 2010). Estas levaduras similan y fermentan los azúcares (Jawetz *et al.*, 1996) y presentan numerosas clamidosporas unicelulares redondas u ovaladas con una pared gruesa (8-16 μm de diámetro) (Odds, 1998).

Las células en forma de levadura son redondas u ovoides, se reproducen por gemación y las células madre e hija se separan rápidamente. Las células que crecen en forma de hifas son más grandes y alargadas, tienen lados paralelos y no muestran constricciones obvias entre célula y célula. Se originan por crecimiento de un tubo germinativo en la célula madre, en el que se forma un septo a 2 μm del cuello. El septo está constituido por una proteína, llamada septina, que forma el anillo filamentoso de 10 nm asociado a la membrana (Sudbery, 2001)

La fase filamentosa es esencial para su patogenicidad, ya que en cepas mutantes incapaces de formar hifas no son virulentas (Lo *et al.*, 1997). Los filamentos recién formados se adhieren más que las levaduras a células de mamífero y las levaduras fagocitadas por macrófagos forman micelio y los lisan (Mitchel, 1998)

C. albicans forma parte de la flora microbiana comensal en muchos individuos humanos sanos. Cuando se deterioran las defensas inmunitarias del hospedero, o bien si se altera la flora microbiana normal, el hongo puede causar daño superficial en el tegumento y mucosas hasta infecciones sistémicas graves (Odds, 1998). *C. albicans* es el agente causal más frecuente como colonizador y responsable de la mayor parte de infecciones vulvovaginales en mujeres en edad reproductiva. (Benavides *et al.*, 2007).

2.2 Candidosis vulvovaginal

La candidosis vulvovaginal aguda afecta a un gran número de mujeres en edad fértil, cerca del 75% cursará al menos un episodio de candidosis durante su vida. Es la segunda causa de vulvovaginitis aguda después de la vaginosis bacteriana inespecífica por el complejo GAM (*Gardnerella vaginalis*–*Anaerobios*- *Mycoplasma*) (Moreira & Paula, 2006).

En México según las estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se ha descrito que la vulvovaginitis se encuentra entre los 12 principales motivos de consulta en medicina familiar (Oviedo *et al.*, 2004)

La especie que se aísla con más frecuencia de las secreciones vaginales continúa siendo *C. albicans*, con un porcentaje del 80-90% de los casos en cuadros de candidosis vulvovaginal, mientras que el 20% restante de los casos son ocasionados por otras especies, como *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida africana* e incluso, dos o más especies en un solo proceso infeccioso (Furneri *et al.*, 2008).

La diabetes, el uso de anticonceptivos orales y los tratamientos con antibióticos de amplio espectro son factores predisponentes, así como los altos niveles de estrógenos especialmente durante el embarazo (Dorko *et al.*, 2005). En ausencia de estos factores de riesgo, la candidosis vulvovaginal ocurre frecuentemente en la fase lútea del ciclo menstrual, la cual se caracteriza por los altos niveles de estrógeno. En contraste las mujeres postmenopáusicas que generalmente poseen niveles inferiores de estrógenos en comparación con una mujer en edad reproductiva raramente sufren de candidosis vulvovaginal (Fidel *et al.*, 2000). Los estrógenos favorecen la transición de células epiteliales de columna a células escamosas estratificadas, facilitando la adherencia y crecimiento de *C. albicans*, además de que las células levaduriformes poseen receptores para los estrógenos que permiten la formación de micelio (Nas *et al.*, 2008). De esta manera la asociación entre los altos niveles de estrógenos y la incidencia de colonización o de

candidosis vulvovaginal por *Candida albicans* puede deberse a los efectos de los estrógenos en el hospedero (Cheng *et al.*, 2006).

2.3 Factores de virulencia

La virulencia de *C. albicans* es multifactorial, entre los factores más importantes se encuentran: el cambio fenotípico, la secreción de enzimas hidrolíticas y adhesión celular (Hoyer 2008).

El cambio fenotípico (phenotypic switching) consiste en que algunas subpoblaciones de las células de *C. albicans* modifican su morfología microscópica o colonial, sus propiedades superficiales, bioquímicas, o su metabolismo, de manera espontánea o en respuesta a un cambio ambiental (Soll *et al.*, 1989). Uno de estos cambios, la filamentación, ocurre en respuesta a la temperatura fisiológica de 37° C, pH mayor o igual a 7, concentración de CO₂ de 5.5% o presencia de suero, condiciones que estimulan la formación de hifas, más invasivas que la forma de levadura (Eckert *et al.*, 2007).

2.4 Genes de la familia SAP

Entre las enzimas secretadas por *C. albicans* se encuentran las Saps (secreted aspartyl proteases) codificadas por una familia de 10 genes: *SAP1-SAP10* (Hube *et al.*, 2005), siendo *SAP5* y *SAP9* los que muestran mayores niveles de expresión *in vivo* en las infecciones de mucosas humanas y son responsables de la colonización e invasión (Naglick *et al.*, 2008).

2.5 Genes de la familia ALS

Durante la formación de la biopelícula por *C. albicans* se induce la expresión de los genes de la familia ALS (agglutinin-like sequence) (Green *et al.*, 2004). Los ocho genes ALS (*ALS1* a *ALS7* y *ALS9*) codifican para glucoproteínas localizadas en la superficie celular, las cuales participan en la adhesión de *C. albicans* a las superficie del hospedero (Fu *et al.*, 1998).

2.6 Enzimas degradativas Lipasas (LIP) y fosfolipasas (PLB)

Las enzimas son determinantes de virulencia en *Candida* que tienen la capacidad de romper polímeros para proporcionar nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas. (Castrillón *et al.*, 2005).

Las Lipasas y fosfolipasas son enzimas secretadas por *C. albicans* que contribuyen a la colonización y la infección al degradar los componentes de las membranas celulares (Hoyer, 2008).

Las lipasas de *Candida albicans* son codificadas por una familia de genes formada por 10 miembros (*LIP1-LIP10*). El patrón de expresión se ha investigado en infecciones experimentales y en pacientes que sufren candidiasis oral. Se ha demostrado que la expresión de esos genes depende del estado de infección, más que de la localización del órgano (Sther *et al* 2004).

Otras enzimas hidrolíticas secretadas, en particular las fosfolipasas, se han relacionado con la patobiología de *Candida albicans* (Ghannoum 2000). Las cepas mutantes deficientes en fosfolipasa B1 han demostrado ser menos virulentas en modelos de infección en ratón (Leidich, 1998).

Se ha demostrado en modelos de embriones de pollo que la producción extracelular de fosfolipasas, cambia drásticamente la composición del tejido, lo cual se ve demostrado por el aclaramiento de la yema de huevo, estas fosfolipasas extracelulares se encuentran en varias especies del género *Candida* como: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. krusei*. Mediante la técnica de análisis de Southern blot, se ha demostrado la presencia de homólogos de fosfolipasa intracelular (*CAPLC1*) en *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Ghannoum, 2000).

La familia de las fosfolipasas se han agrupado en cuatro clases diferentes (A, B, C y D). Sólo los cinco miembros de la clase B (*PLB1-5*) son extracelulares y pueden

contribuir a la patogenicidad a través de la degradación de las membranas del epitelio vaginal. Únicamente en el gen *PLB1* se ha demostrado la virulencia e invasión en modelo murino de candidosis, ya que hidroliza las uniones de éster de glicerofosfolípidos de la membrana celular del hospedero. Una cepa con la delección de este gen (con menor producción de esta enzima) reduce su virulencia hasta en 60%, comparada con la cepa silvestre. La *PLB1A* es una glucoproteína de 84 kDa, que tiene actividad de hidrolasa y lisofosfolipasa-transacilasa. Se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos. (Calderone *et al.*, 2001)

➤ 3. ANTECEDENTES

Stherf *et al.*, en el 2004 investigaron mediante la técnica de PCR RT (transcriptasa reversa) los patrones de expresión de la familia *LIP* utilizando un modelo de ratón. Los resultados demostraron que los genes de lipasa son regulados diferencialmente, con algunos miembros que muestran expresión sostenida y otros que se expresan de forma transitoria o incluso son silenciados.

Ghannoum *et al.*, en el año 2000 determinaron el papel de las fosfolipasas a nivel extracelular como un factor de virulencia potencial en hongos patógenos, tipificando molecularmente tres genes de distintas familias de fosfolipasas (*PLP1*, *PLB2* y *PLD*) en *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus*.

Leidich *et al.*, en el año 1998 clonaron el gen *PLB1*, lo analizaron en un modelo de ratón y determinaron que las cepas que presentaban el gen *PLB1* producían efectos detectables sobre la adherencia y daño grave en células epiteliales.

➤ 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que existe poca información sobre las diferentes combinaciones de los genes de lipasas y fosfolipasas en cepas de *C. albicans* de origen vaginal, en el presente estudio se determinaron los diferentes patrones de expresión de los genes de la familia *LIP* (*LIP1-10*) y *PLB1* y *PLB2* en cepas de *C. albicans* utilizando en un modelo *in vitro* de cultivo de células epiteliales vaginales.

➤ 5. OBJETIVO GENERAL

Caracterización molecular de los genes de las familias *LIP* y *PLB* en un grupo de cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con candidosis vulvovaginal.

➤ 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los genotipos de la familia *LIP* y *PLB* en las cepas de *Candida albicans* por PCR de punto final.
- Determinar la expresión de los genotipos *LIP1-LIP10* y *PLB1- PLB2* de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando un modelo de infección *in vitro* en un cultivo de células epiteliales vaginales humanas (A431).
- Establecer los diferentes patrones de expresión de los genotipos en las cepas de *C. albicans*.

➤ 7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de las Cepas.

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 39 cepas de *C. albicans* donadas por el cepario del Laboratorio Clínico de la CUSI, FESI. El origen de las cepas fueron de pacientes con candidosis vulvovaginal del Hospital General Regional no. 72 del IMSS, ubicado en el Municipio de Tlalnepantla del Estado de México.

7.2 Extracción del DNA.

Las cepas del género *Candida* fueron sembradas en agar Sabouraud y se incubaron a 37°C durante 24 horas. El DNA de las cepas fue extraído por el método de ebullición, para lo cual se tomaron varias colonias del crecimiento y se depositaron en tubos de rosca de 16 x 150 ml, que contenían 2 ml de agua desionizada estéril. Posteriormente los tubos fueron llevados a ebullición por 20 minutos, e incubados a 0 ° C durante 10 minutos. Al término los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm/ 10 minutos. El sobrenadante que contenía el DNA fue transferido a otro tubo y guardado a -20° C hasta su utilización para PCR.

7.3 Identificación de la especie *C. albicans*

La identificación de la especie de *C. albicans* se realizó por PCR en tiempo real utilizando un par de oligonucleótidos (Tabla1) para amplificar ITS1 e ITS2 (internal transcribed spacers) del gen *rRNA* (Guizhen & Mitchell 2002), mediante el equipo comercial PCR Rotor-Gene™ SYBR® Green (Cat. No. 204074) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados fueron los descritos por para un volumen final de 25 µl, el DNA templado de cada una de las cepas del género *Candida* y los oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *rRNA*.

Espece	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')
<i>Candida albicans</i>	<i>CALB1</i>	TTTATCAACTTGTACACACCAGA
	<i>CALB2</i>	ATCCCGCCTTACCACTAC GC

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de ITS1 e ITS2 del gen *rRNA* de *C. albicans*.

El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μ l. En la tabla 2 se observan los componentes de la mezcla de reacción.

Componente/ Reactivo	Volumen
Primer FW <i>CALB1</i>	1 μ L
Primer RV <i>CALB2</i>	1 μ L
Master mix SYBR Green	12.5 μ L
DNA templado	2 μ L
Agua libre de nucleasa	8.5 μ L

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción para la detección de la especie *C. albicans* por PCR en Tiempo Real.

Al termino cada tubo eppendorf (0.2 ml) con la mezcla de reacción se colocaron en el interior del Rotor-Gene (Corbet), y posteriormente el equipo se programó bajo las condiciones que se aprecian en la Tabla 3. La lectura se realizó en el canal verde. La cepa utilizada como control positivo fue *C. albicans* ATCC32354 y como control negativo el NTC (No Control Templado).

Pasos	Tiempo	Temperatura	Nº. ciclos
Activación inicial de PCR	5 min.	95° C	1
Desnaturalización	5 s	95° C	40
Combinación alineación/ extensión	10 s	60° C	

Tabla 3. Condiciones para la amplificación de ITS1 e ITS2 del gen *rRNA* de *C. albicans* PCR en tiempo Real.

7.4 Detección de los genes de lipasas y fosfolipasas en las cepas de *C. albicans*.

La identificación de los diez genes de la familia *LIP* (LIP1-LIP10) y dos de la familia *PLB* (*PLB1* y *PLB2*) en las cepas de *C. albicans* se realizó por PCR sencillo, utilizando los oligonucleótidos descritos por (Nails et., al 2010). Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™). El volumen final por mezcla de reacción fue de 20 µl; 10 µl de Kapa Taq Ready Mix™, 1 µl de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies™) (Tabla 4) a la concentración de 10 pmol, 5 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl de DNA molde. La amplificación de ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60° C por 1 minuto y 72° C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos

Gen	orientación	secuencia 5' a 3'	tamaño de los amplicones
PLB1	FW	GGTGGAGAAAGATGGCCAAA	80 pb
	RV	AGCACTTACGTTACGATGCAACA	
PLB2	FW	TGAAACCTTTGGGCGACAAC	80 pb
	RV	GCCGCGCTCGTTGTTAA	
LIP1	FW	AGCCCAACCAGAAGCTAATGAA	80 pb
	RV	TGATGCAAAAGTCGCCATGT	
LIP2	FW	GGCCTGGATTGATGCAAGAT	80 pb
	RV	TTGTGTGCAGACATCCTTGGA	
LIP3	FW	TCTCACCGAGATTGTTGTTGGA	80 pb
	RV	GTTGGCCATCAAATCTTGCA	
LIP4	FW	GCGTCCTGTTGCTTTC	80 pb
	RV	ACACGGTTTGTTCATTGAA	
LIP5	FW	TGGTTCCAAAATACCGTGTT	80 pb
	RV	CGACAATAGGGACGATTTGATCA	
LIP6	FW	AAGAATCTTCCGACCTGACCAA	80 pb
	RV	ATATGCACCTGTTGACGTTCAA	
LIP7	FW	AACTGATATTTGCCATGCATTAGAAA	80 pb
	RV	CCATTCCCGGTAAGTAGCATGT	
LIP8	FW	CAACAATTGCTAAAATCGTTGAAGA	80 pb
	RV	AGGGATTTTGGCACTAATTGTTT	
LIP9	FW	CGCAAGTTTGAAGTCAGGAAAA	80 pb
	RV	CCCACATTACAATTTGGCATCT	
LIP10	FW	CACCTGGCTTAGCAGTTGCA	80 pb
	RV	CCCAGCAAAGACTCATTATTCA	

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en la detección de los genes lipasas *LIP* y fosfolipasas *PLB* en *C. albicans*.

7.5 Análisis de amplicones por electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR (5 μ l) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Como agente intercalante de DNA se utilizó el Midori Green al 0.7%. Las condiciones de corrimiento fueron: 120 volts, 94 Miliampers por 30 minutos. Al término los geles fueron visualizados bajo Luz UV y fotografiados con ayuda del sistema de fotodocumentación KODAK® modelo GEL Logic 100.

7.6 Expresión de los genotipos de lipasas y fosfolipasas de *C. albicans* por PCR en tiempo real.

Preparación del inóculo de *C. albicans* para la determinación de la expresión de los genes de Lipasas y Fosfolipasas por PCR en Tiempo Real.

La expresión de los genes de *LIP* y *PLB* de *C. albicans* fue realizada de acuerdo a lo descrito por Green et., al 2004; para lo cual las cepas portadoras de los genes fueron crecidas en agar Sabouraud a 37°C por 24 horas. Posteriormente y por medio de un asa estéril se tomó una colonia de *C. albicans* y se depositó en 10 ml de YPD (extracto de levadura peptona dextrosa). El medio se incubó a 37° C por 24 horas. Al término, las células del cultivo se colectaron por centrifugación (2,000 rpm por 3 minutos), se lavaron tres veces con PBS y se contaron. Cuatro millones de células se inocularon en 10 ml de YPD y se incubaron a 37° C por 24 horas. Al término las células del cultivo se colectaron nuevamente por centrifugación (2,000 rpm por 3 minutos), se lavaron tres veces con PBS y se contaron por triplicado. Finalmente un inóculo de 2×10^6 células/ml se preparó para la infección del cultivo de células epiteliales vaginales humanas (RHVE, A431) (Figura 1).



Figura 1. Placa con el cultivo de células epiteliales vaginales humanas (A431). Fotografía: Laboratorio Clínico, FES-Iztacala, UNAM.

7.7 Inoculación del Epitelio Vaginal Humano (Proceso infeccioso)

Un inóculo de 25 μl de una dilución de *C. albicans* a la concentración de 2×10^6 células/ml en el Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) rico en glucosa fue depositado sobre la superficie de la monocapa de las células epiteliales vaginales humanas (A431). La placa que contenía los pozos con las monocapas de células epiteliales fue incubada a 37°C durante 72 h en 5% de CO_2 y humedad saturada.

7.8 Extracción de RNA

Para la extracción del RNA las levaduras de *C. albicans* fueron recolectadas de la superficie de la monocapa de las células epiteliales vaginales humanas (A431) y depositadas en tubos Eppendorf con 500 μl de PBS. A partir de este volumen, se prepararon diluciones en el mismo buffer, hasta obtener una concentración de 1×10^9 células/ml, que correspondió a una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.4$. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos, los sobrenadantes fueron decantados y

las pastillas celulares fueron utilizados para la extracción del RNA. El RNA de las levaduras de *C. albicans* fue extraído utilizando el kit RNeasy® (Quiagen®; N. de catálogo 74106) y con ayuda del equipo automatizado QIAcube (QIAGEN®). Para lo tubos con las pastillas de levaduras (12 muestras por corrida) fueron colocadas en la placa de agitación del Quiacube. Al mismo tiempo en la posición A de la sección correspondiente al bufer de lisis, se colocó un tubo Eppendorf con 2 ml de buffer Y1 con lyticasa (50 U por 1×10^7 células). Posteriormente en la sección de reactivos se colocaron botellas con 25 ml de bufer RPE, RW1, RLT, Etanol (100%) y agua libre de nucleasas. Es importante mencionar que el buffer RLT utilizado en esta etapa contenía 10 μ l de β -mercaptoethanol (β -ME) por cada mililitro de buffer. Posteriormente se llenó el contenedor con puntas de 1 ml, se depositaron los tubos de columna con los tubos de elución en el carrusel, se programó el equipo para la extracción de RNA con lisis celular y se inició la corrida. El primer paso que realizó el robot fue tomar 200 μ l del buffer de lisis y lo depositó en los tubos con la pastilla de las levaduras de *C. albicans*, lo incubó 20 minutos a 30°C en agitación suave para formar los esferoplastos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 300 g (375 rpm) durante 5 minutos para formar los esferoplastos y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 350 μ l de buffer RLT y el tubo se agitó en vigorosamente para lisar los esferoplastos. Al término se adicionaron 350 μ l de etanol al 70% para homogeneizar el lisado, se mezcló suavemente, se transfirieron 700 μ l a una columna contenida en un tubo de 2 ml, se centrifugó a ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos y el líquido de flujo se descartó. Posteriormente se adicionaron 700 μ l de buffer RW1 a la columna, se centrifugó a ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo se descartó. Al término se adicionaron 500 μ l de buffer RPE a la columna, se centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo se descartó. Nuevamente se adicionaron 500 μ l de buffer RPE a la columna, se centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 2 minutos para lavar la membrana y el líquido de flujo se descartó. Al término se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml, se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto. De nueva cuenta se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 1.5 ml, se adicionaron de 30-50 μ l

de agua libre de RNasas directamente sobre la membrana de la columna y se centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 1 minuto para obtener el ARN. La concentración y pureza total del ARN fue medida utilizando un spectrophotometer Nanodrop 2000. El ARN esperado debió de ser < 30 ng. El ARN es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a ADNc.

7.9 Reversotranscripción

Para realizar el proceso de la reversotranscripción de RNA a DNAc se utilizó el Kit Quantitect® Reverse Transcription (Quiagen ®; N. de catálogo 205311) siguiendo como se describe abajo las instrucciones del fabricante:

7.10 Eliminación del DNA genómico

Se descongelaron los componentes del Kit a temperatura ambiente (15-25°C). Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 microlitros se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 5).

Componente/ Reactivo	Volumen
gDna Wipeout buffer, 7X	2 μ L
ARN templado	5 μ L
Agua libre de RNasa	7 μ L

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para eliminación de DNA genómico.

Posteriormente se incubaron los tubos a 42° C por 2 minutos, e inmediatamente se colocaron en hielo.

7.11 Preparación de la Master mix para la reversotranscripción

La Master mix contenía todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de ADNc. Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 microlitros se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 6):

Componentes/ Reactivos	Volumen
Master mix para reversotranscripción Quantiscript Reverse Transcriptasa (Contiene inhibidor de RNasa)	1µL
Quantiscript Rt buffer, 5X (Incluye Mg²⁺ y Dntps)	4µL
Rt Primer Mix	1 µL
ARN Templado	14 µL

Tabla 6: Preparación de la *Master mix* para la Reversotranscripción.

7.12 PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos utilizados para determinar la expresión de los genotipos *LIP1-LIP10*, *PLB1* y *PLB2* de *C. albicans* fueron los mismos empleados en la detección de los genes por PCR convencional (Tabla 2). Para el ensayo de PCR en Tiempo Real se utilizó el kit Rotor Gene SYBR®Green PCR (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante como se aprecia en la Tabla 7. Las condiciones de amplificación se observan en la Tabla 8.

Componente/ Reactivo	Volumen
Primer FW	1µL
Primer RV	1µL
Master mix SYBR Green	12.5µL
DNAc	2µL
Agua libre de nucleasa	8.5µL

Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR en Tiempo Real.

Pasos	Tiempo	Temperatura	Nº. ciclos	Procedimiento
Activación inicial de PCR	5 min.	95° C	1	Activación de la Hot Star Taq Plus ADN polimerasa
Desnaturalización	5 s	95° C	40	Detección de fluorescencia y colección de datos.
Combinación alineación/ extensión	10 s	60° C		

Tabla 8. Perfil de condiciones para PCR en tiempo Real.

➤ 8. RESULTADOS:

8.1 Identificación de la especie *C. albicans* mediante PCR en Tiempo Real.

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 39 cepas del género *Candida* ssp. aisladas de mujeres con candidosis vulvovaginal del Hospital General Regional No. 72 del IMSS, ubicado en el Municipio de Tlalnepantla del Estado de México. El 100% (n=39) de las cepas fue identificada como *C. albicans* debido a la amplificación del gen rRNA mediante PCR en Tiempo Real (Figura 1 y 2).

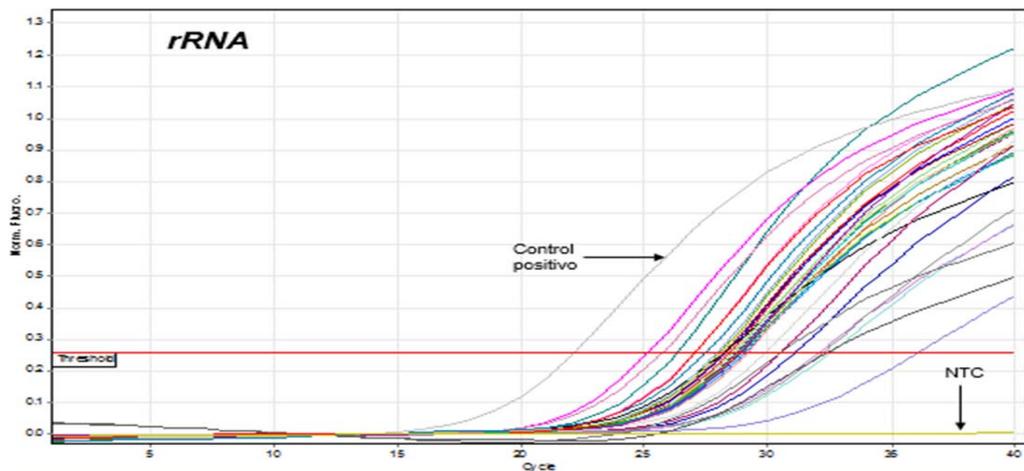


Figura 2. Detección de *Candida albicans* mediante la amplificación del gen rRNA por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC 32354, Control negativo = NTC (No Control Templado)

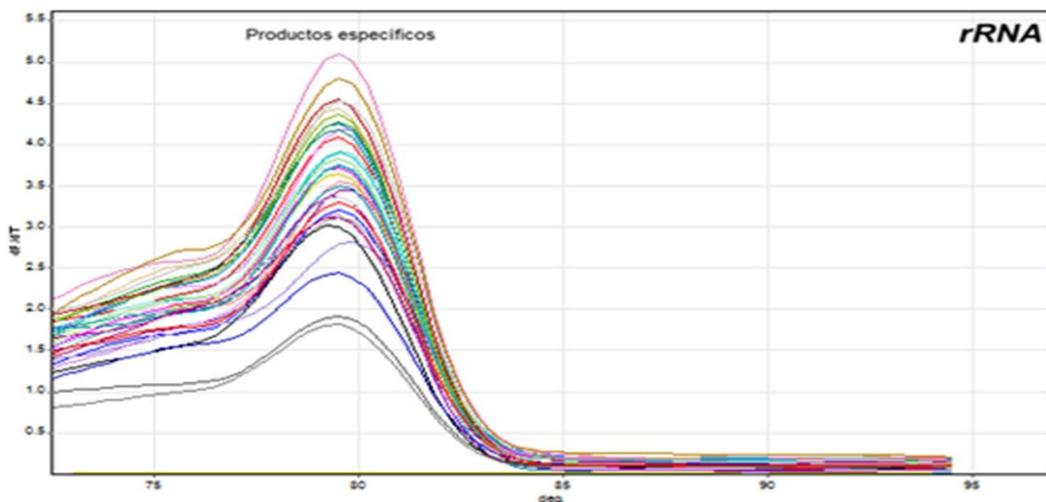


Figura 3. Curva de fusión (Melting point) del gen rRNA de las cepas de *C. albicans*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

8.2 Detección de los genes de la familia LIP y PLB mediante PCR convencional:

En la Tabla 9 se aprecia que el 100% de las cepas de *C. albicans* analizadas (n=39) fue portadora de los diez genes de la familia LIP (LIP1-LIP10) y los dos de familia PLB (PLB1-PLB2).

Gen	Número de cepas	Porcentaje
LIP1	39	100%
LIP2	39	
LIP3	39	
LIP4	39	
LIP5	39	
LIP6	39	
LIP7	39	
LIP8	39	
LIP9	39	
LIP10	39	
PLB1	39	
PLB2	39	

Tabla 9. Detección de los genes LIP y PLB en las cepas de *C. albicans*.

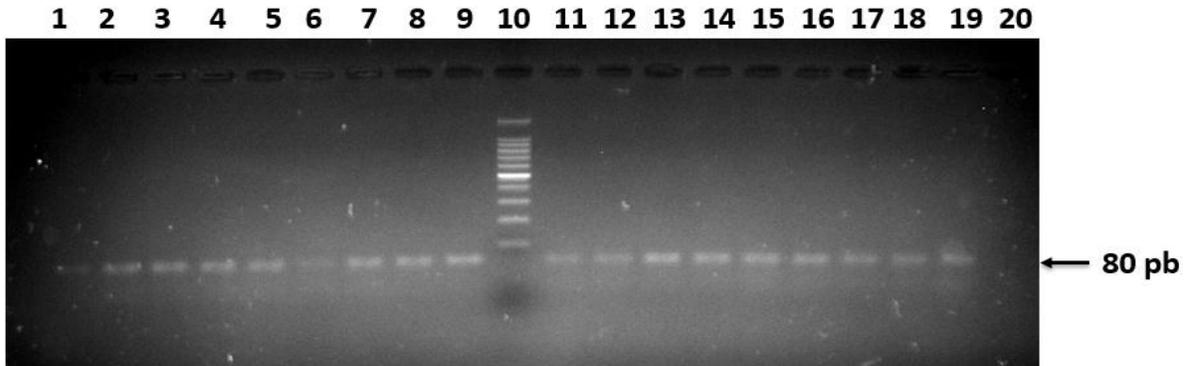


Figura.4. Detección por PCR de *LIP1* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 11-19, *LIP1* en cepas de *C. albicans* (80 pb el tamaño del amplicón). Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 20, Control negativo; sin DNA molde.

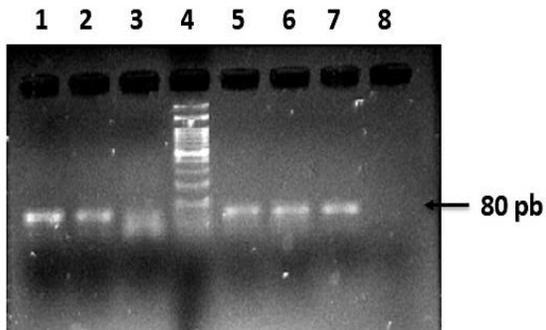


Figura 5. Detección por PCR de *LIP2* en *C. albicans*. Líneas 1-3 y 5-6, *LIP2* en *C. albicans* (80 pb el tamaño del amplicón). Línea 7, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 4, MWM 100 pb. Línea 8, control negativo sin DNA molde.

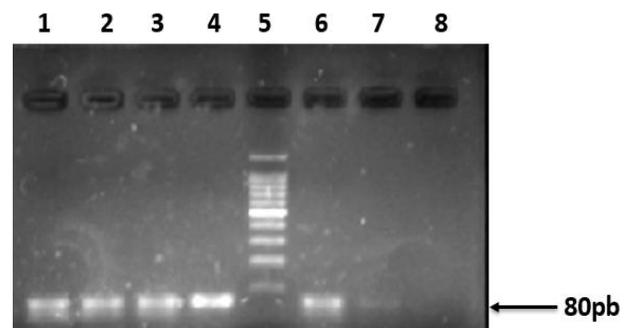


Figura 6. Detección por PCR de *LIP3* en *C. albicans*. Líneas 1-4 y 6, *LIP3* en *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 7, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 4, MWM 100 pb. Línea 8, control negativo sin DNA molde.

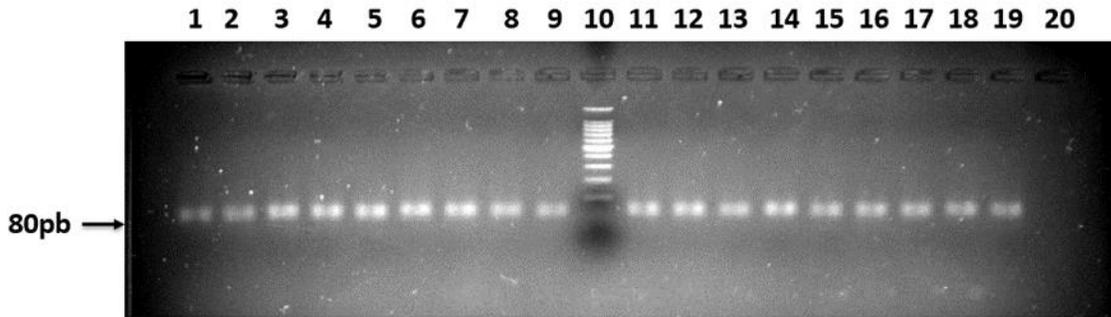


Figura 7. Detección por PCR de *LIP4* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 12-20, *LIP4* en cepas de *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 20, Control negativo sin DNA molde.

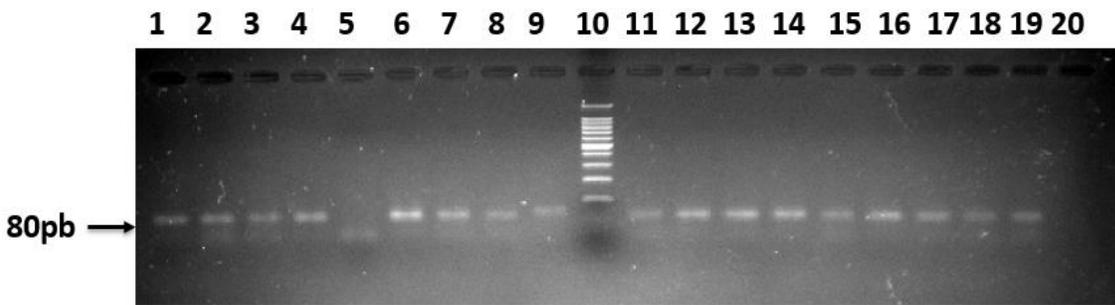


Figura 8. Detección por PCR de *LIP5* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 11-20, *LIP5* en cepas de *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 20, Control negativo sin DNA molde.

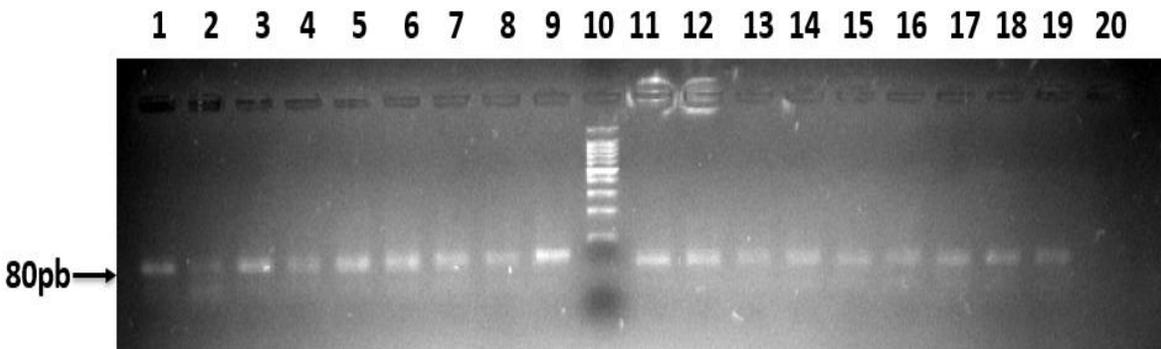


Figura 9. Detección por PCR de *LIP6* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 12-19, *LIP6* en cepas de *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 20, Control negativo sin DNA molde.

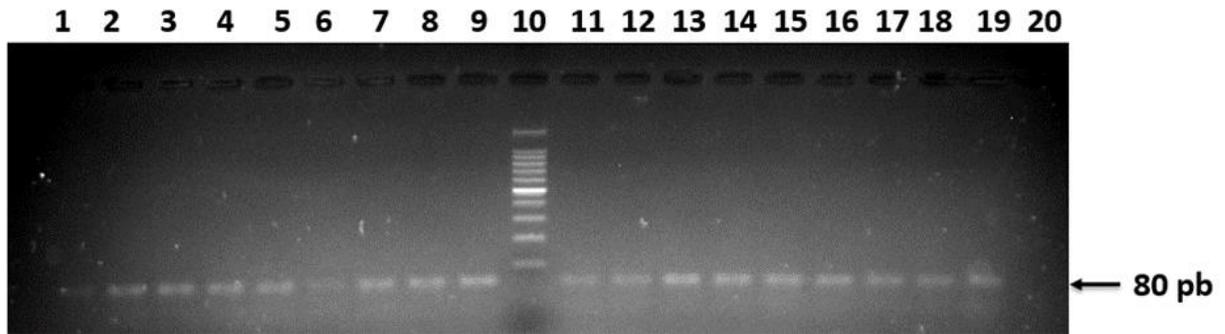


Figura 10. Detección por PCR de *LIP7* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 12-19, *LIP7* en cepas de *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb, Línea 20, control negativo sin DNA molde.

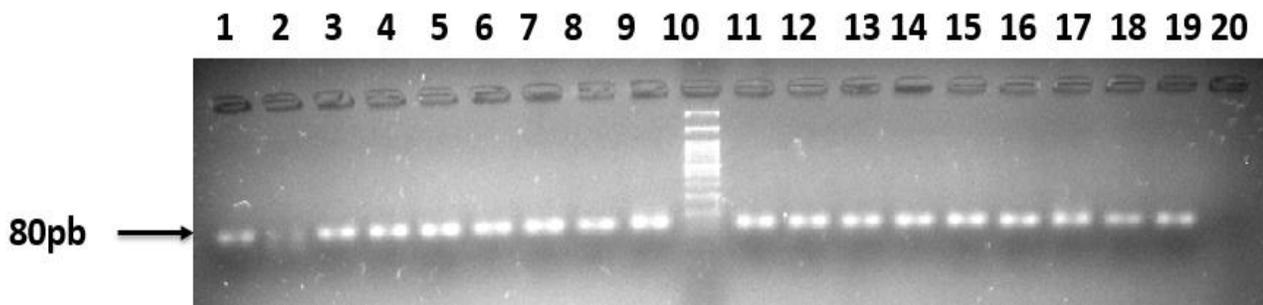


Figura 11. Detección por PCR de *LIP8* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 12-19, *LIP8* en cepas de *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 20, control negativo sin DNA molde.

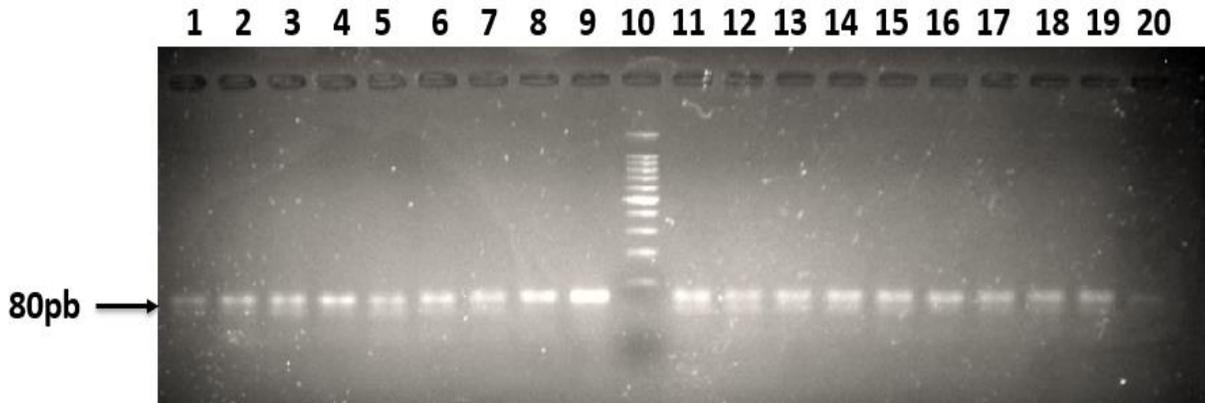


Figura 12. Detección por PCR de *LIP9* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 12-19, *LIP9* en cepas de *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 20, control negativo sin DNA molde.

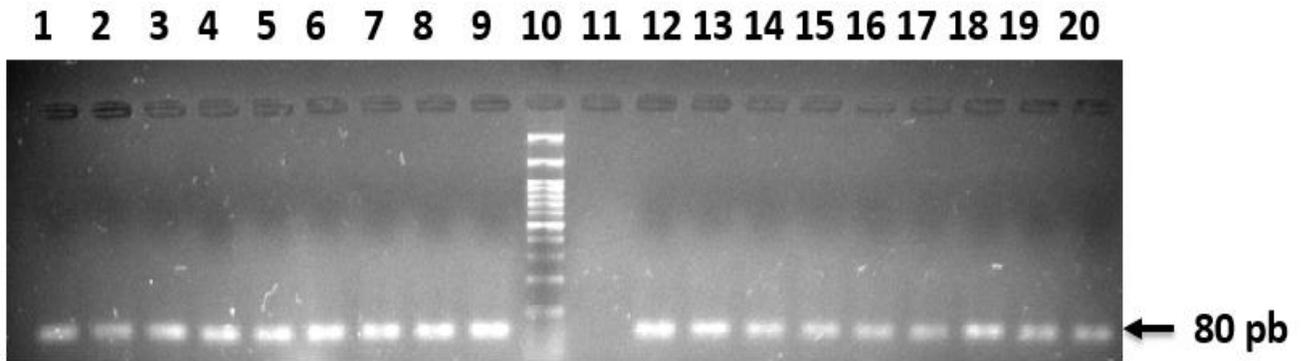


Figura 13. Detección por PCR de *LIP10* en *C. albicans*. Líneas 1-8 y 12-20, *LIP10* (80 pb tamaño del amplicón) en cepas de *C. albicans*. Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 11 control negativo, sin DNA molde.

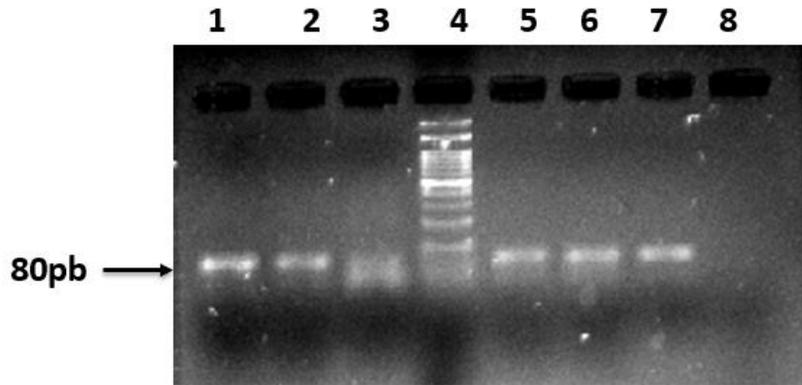


Figura 14. Detección por PCR de *PLB1* en *C. albicans*. Líneas 1-3 y 5-6 *PLB1* en cepas de *C. albicans* (80 pb tamaño del amplicón). Línea 7, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 4, MWM 100 pb. Línea 8, control negativo sin DNA molde.

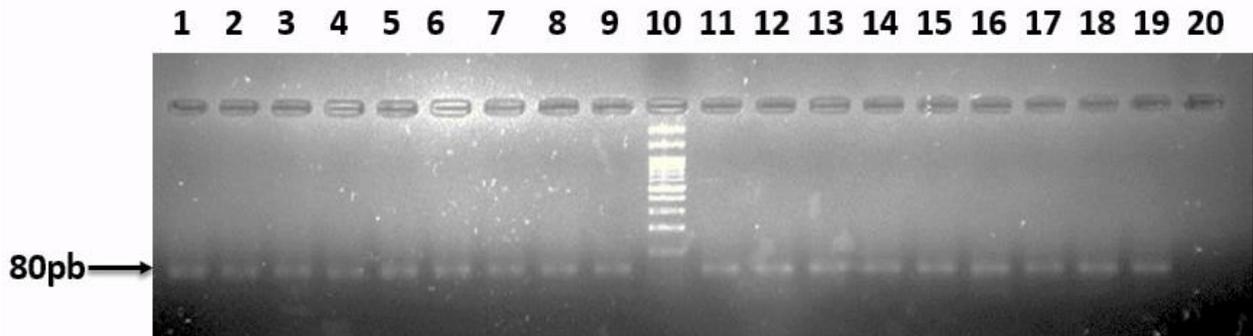


Figura 15. Detección por PCR de *PLB2* en *C. albicans*. Línea 1-8, *PLB2* (80pb tamaño del amplicón) en cepas de *C. albicans*. Línea 9, control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Línea 10, MWM 100 pb. Línea 20, control negativo sin DNA molde.

8.3 Expresión de los genes que codifican para Lipasas y fosfolipasas en cepas de *Candida albicans* por PCR en tiempo real utilizando un modelo de infección *In vitro* de epitelio vaginal humano.

Durante la infección *In vitro* en el Epitelio Vaginal Reconstruido Humano, el 100% de las cepas (n=39) de *C. albicans* expresó los genes *LIP1*, *LIP2*, *LIP4*, *LIP6*, *LIP7*, *LIP9*, *LIP10*, *PLB1* y *PLB2*, el 97.4% (n=38) *LIP3* y *LIP8* y el 89.7% (n=3) expresó el gen *LIP5* (Tabla 10).

Gen	No. de cepas	% de expresión
LIP1	39	100%
LIP2	39	100%
LIP3	38	97.4%
LIP4	39	100%
LIP5	35	89.7%
LIP6	39	100%
LIP7	39	100%
LIP8	38	97.4%
LIP9	39	100%
LIP10	39	100%
PLB1	39	100%
PLB2	39	100%

Tabla 10. Porcentaje de la expresión de los genes que codifican para Lipasas *LIP* y fosfolipasas *PLB* en las cepas de *C. albicans*.

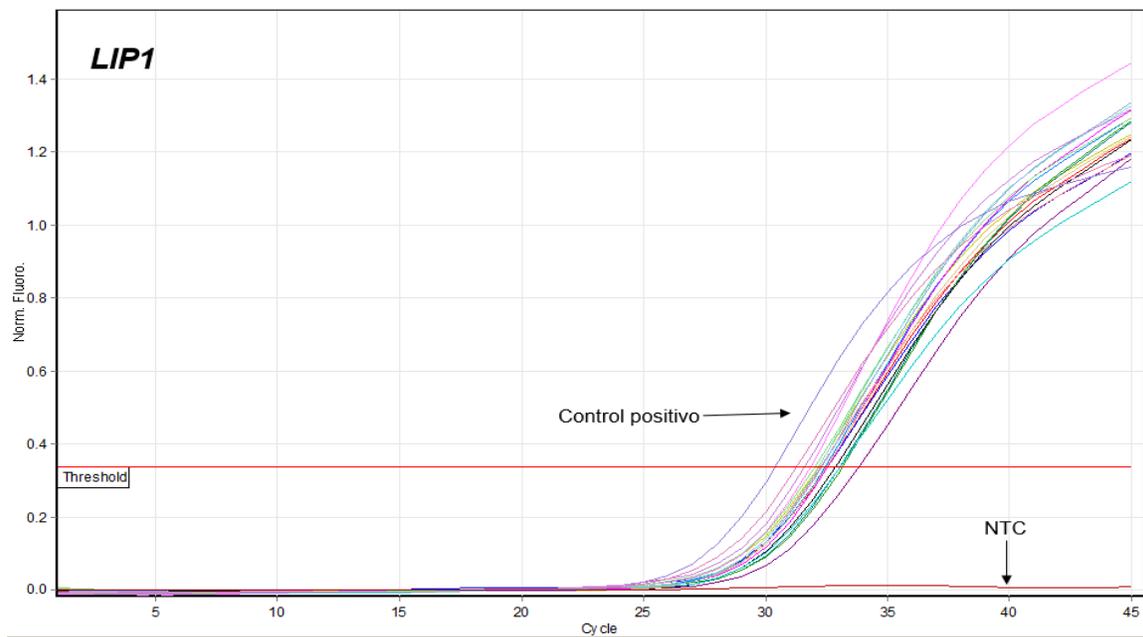


Figura 16. Expresión de *LIP1* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354; NTC= No Control Templado.

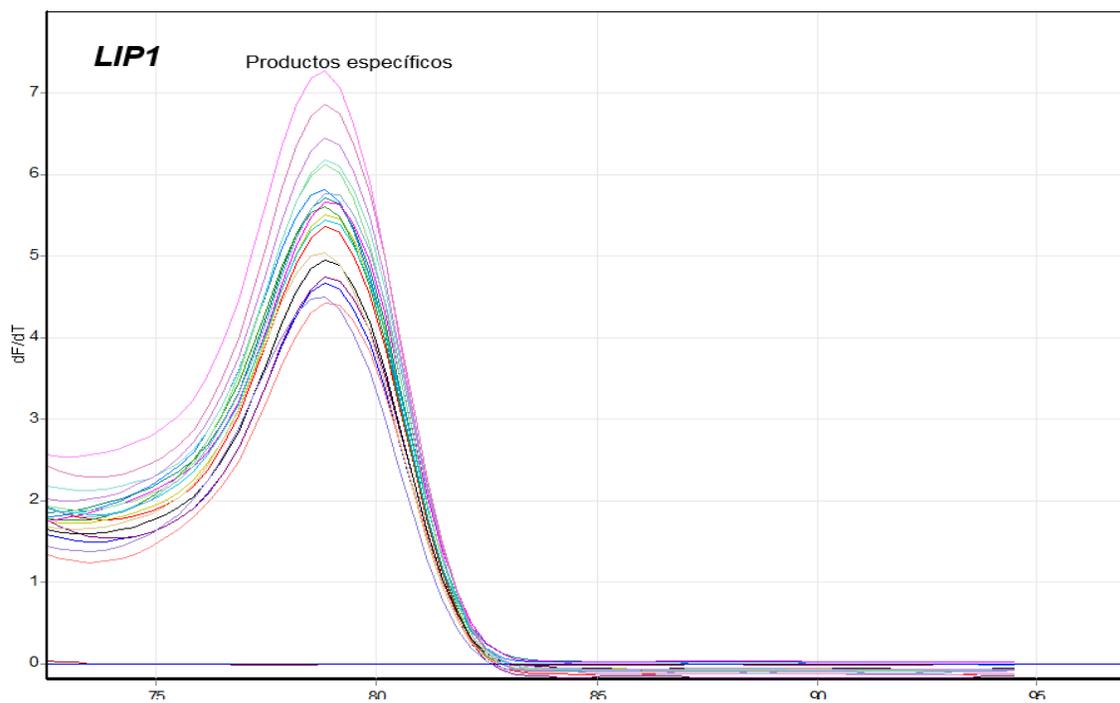


Figura 17. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP1*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

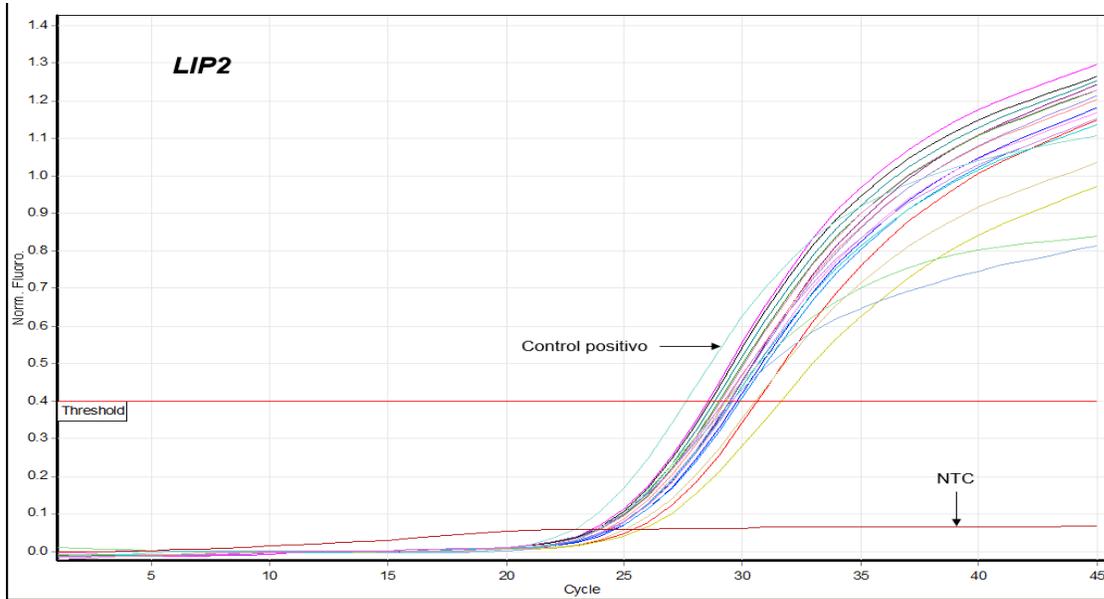


Figura 18. Expresión de *LIP2* en las cepas de *C.albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

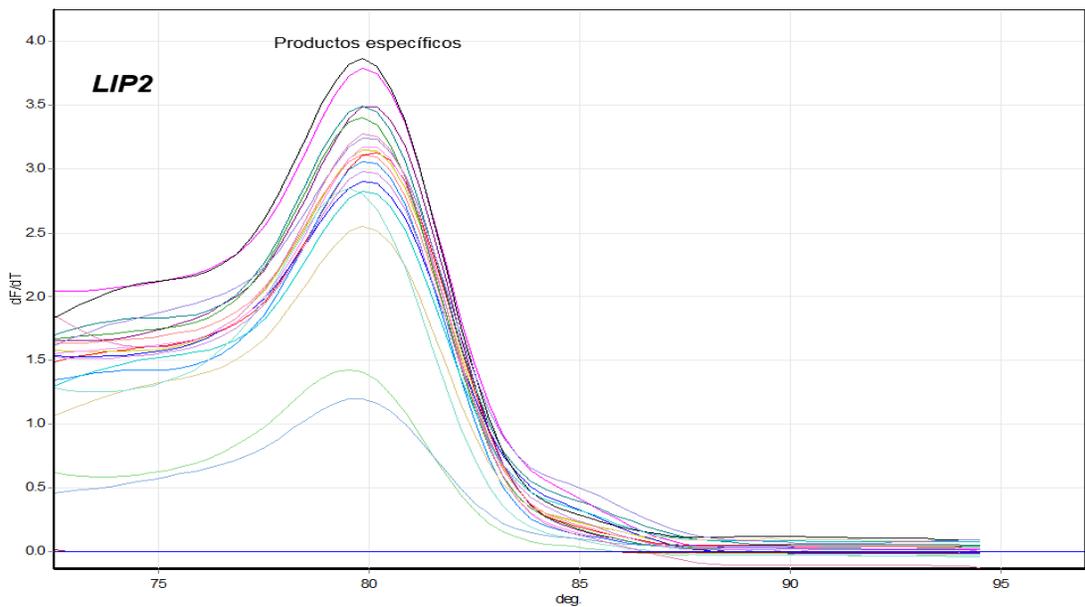


Figura 19. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP2*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más alta que los productos inespecíficos.

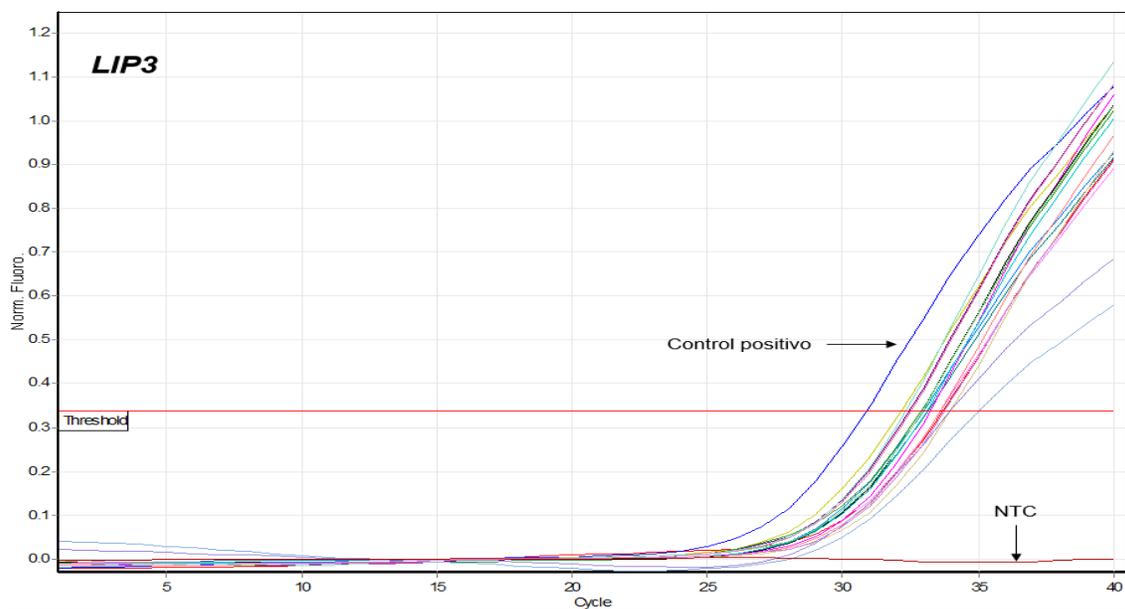


Figura 20. Expresión de *LIP3* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

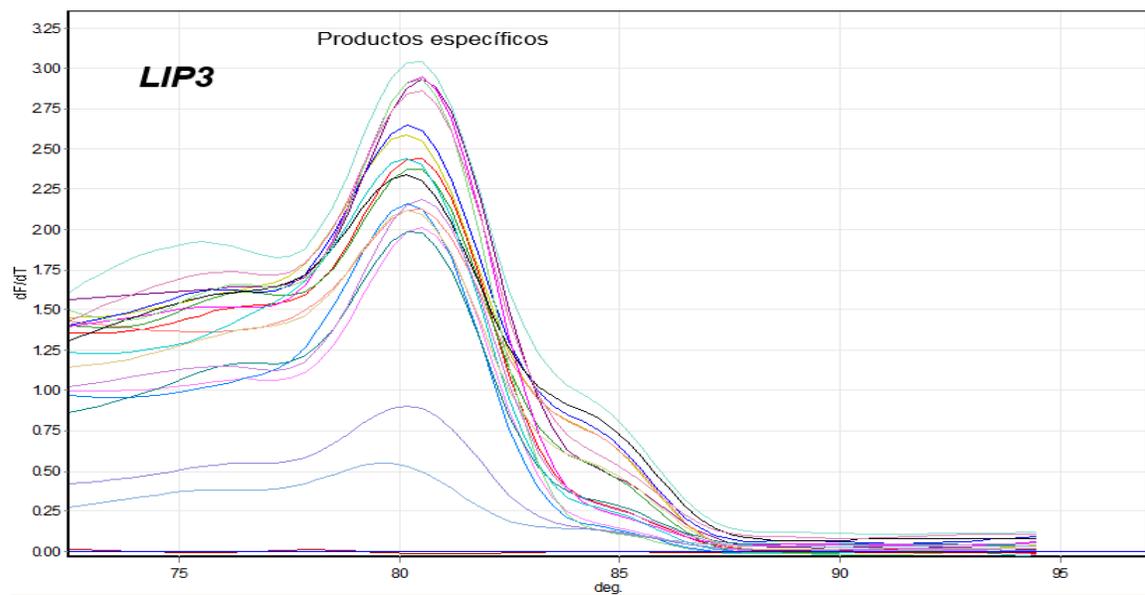


Figura 21. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP3*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

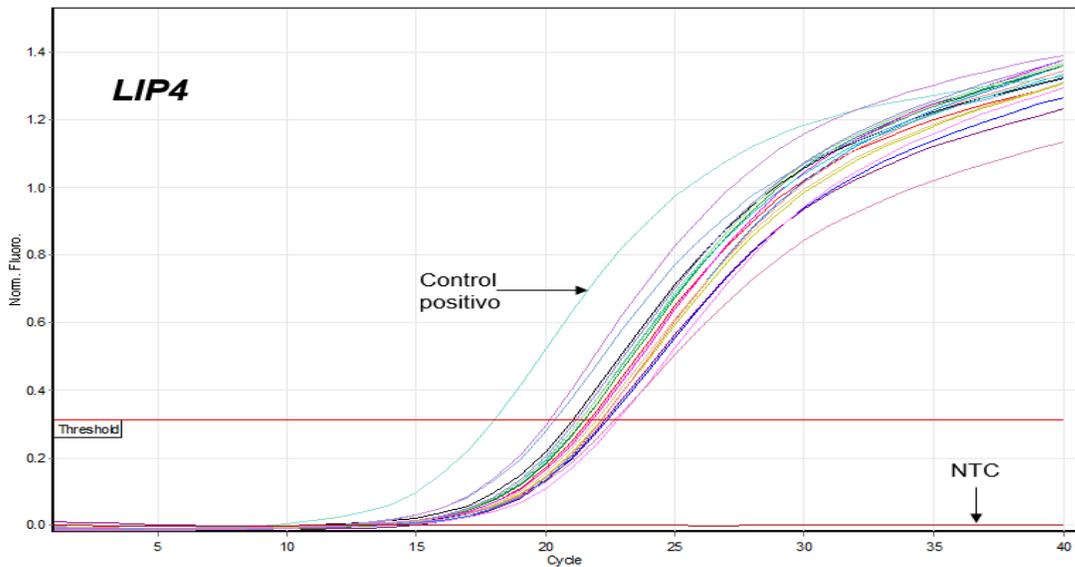


Figura 22. Expresión de *LIP4* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

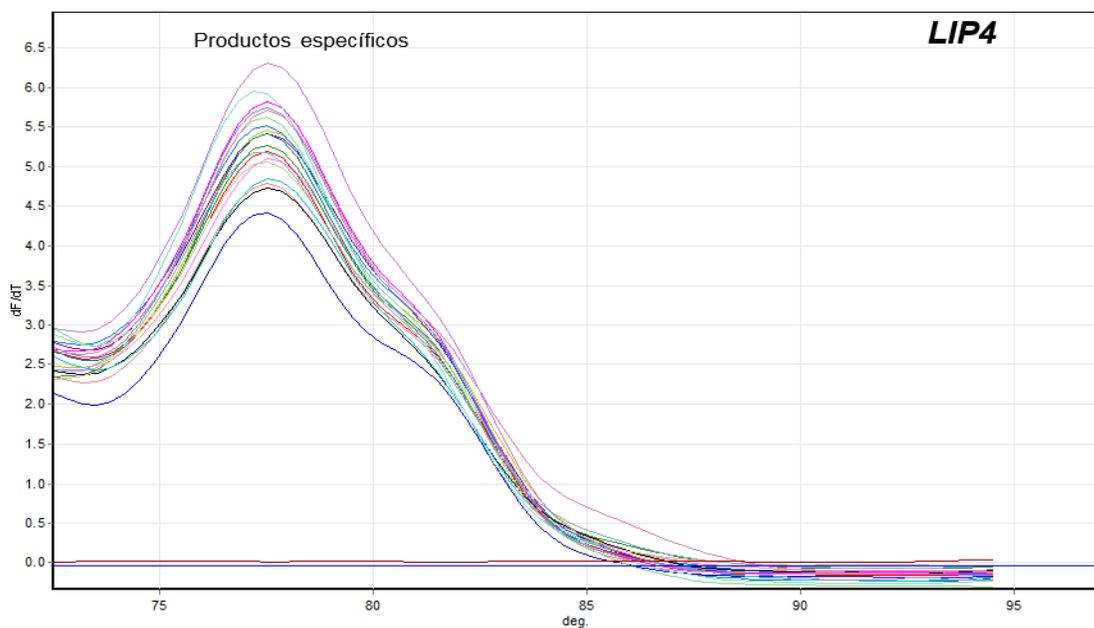


Figura 23: Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP4*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

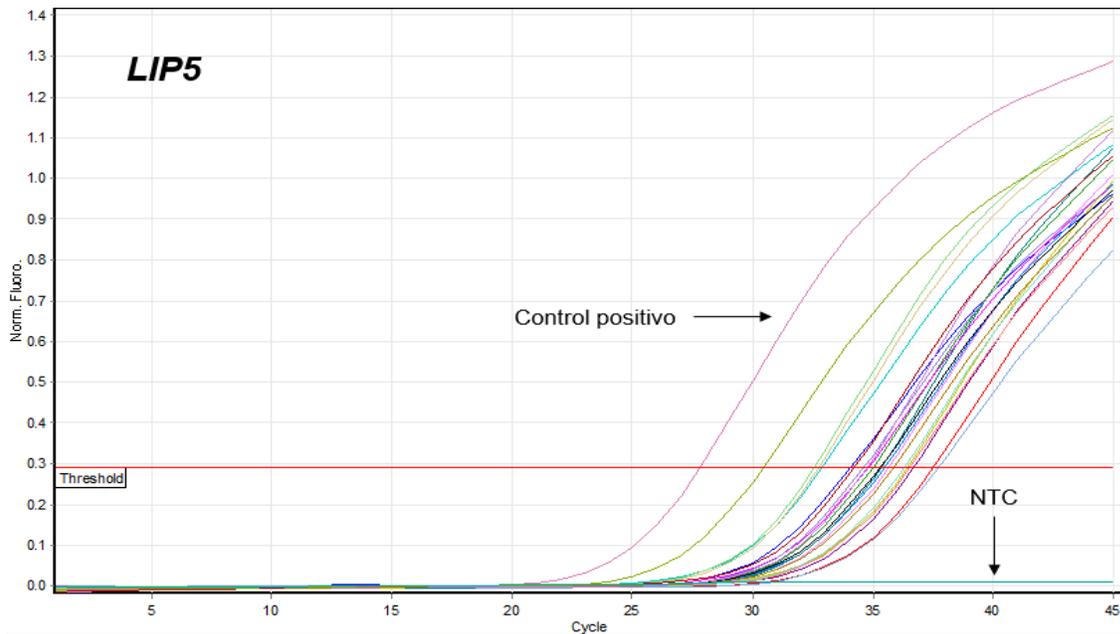


Figura 24. Expresión de *LIP5* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

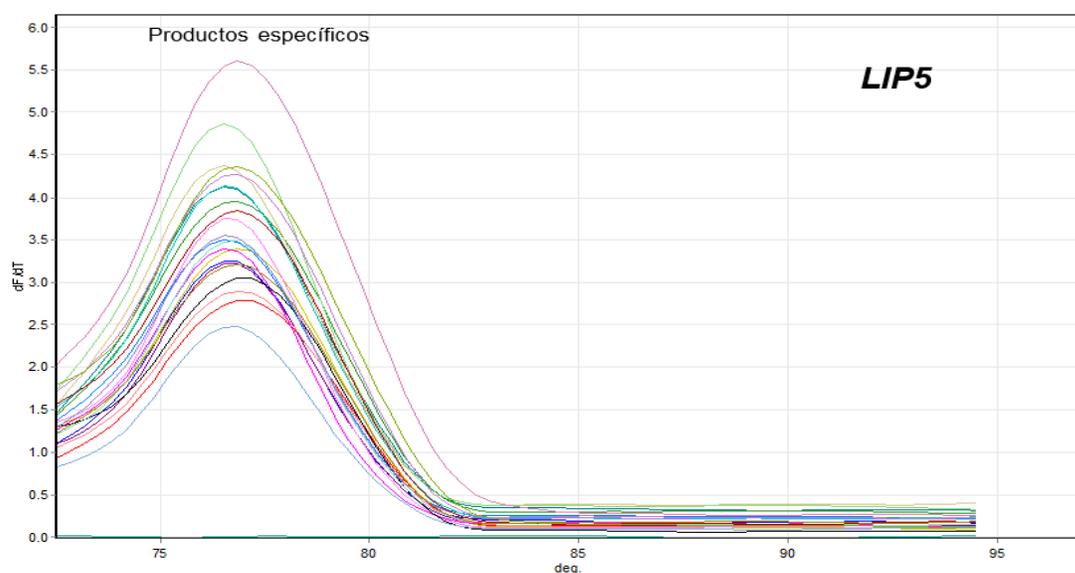


Figura 25. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP5*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más alta que los productos inespecíficos.

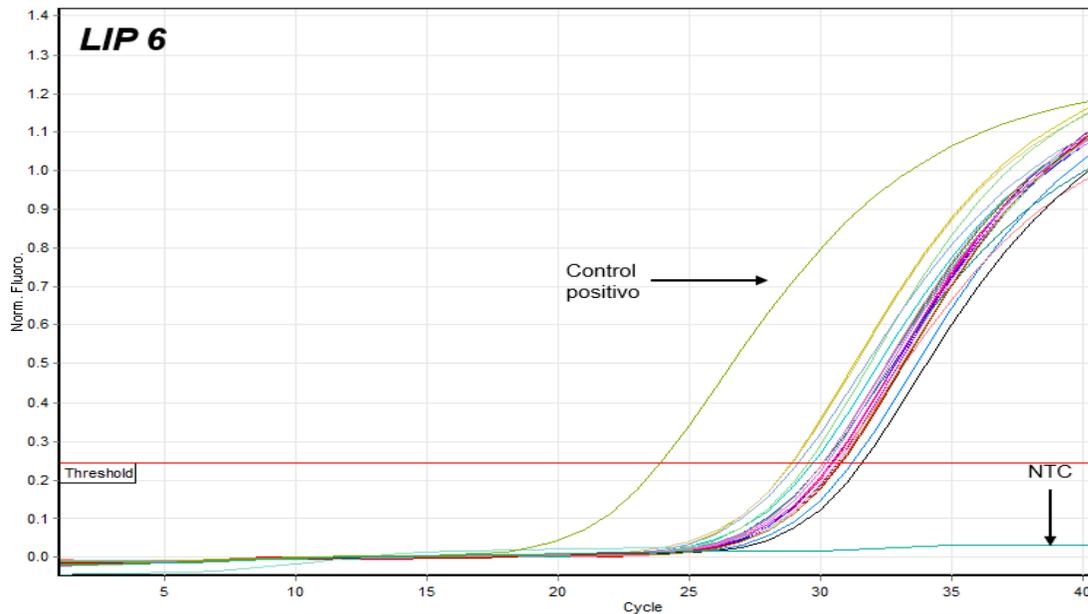


Figura 26. Expresión de *LIP6* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

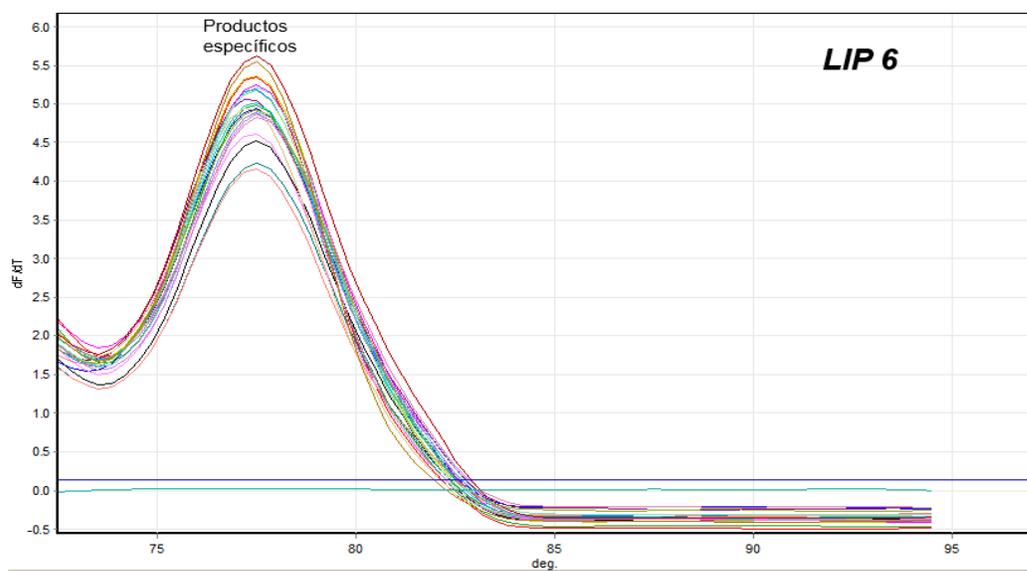


Figura 27. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP6*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

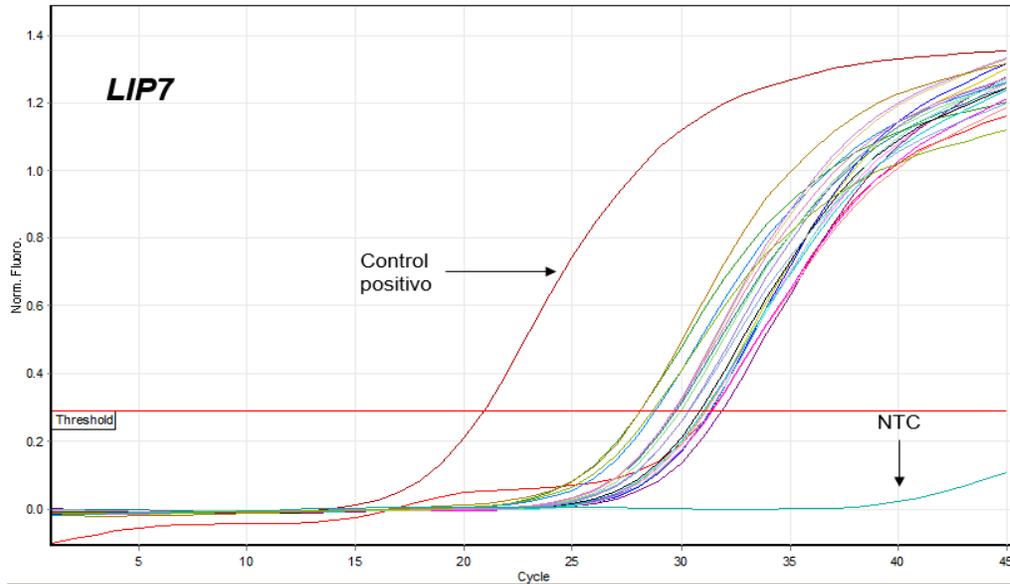


Figura 28. Expresión de *LIP7* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

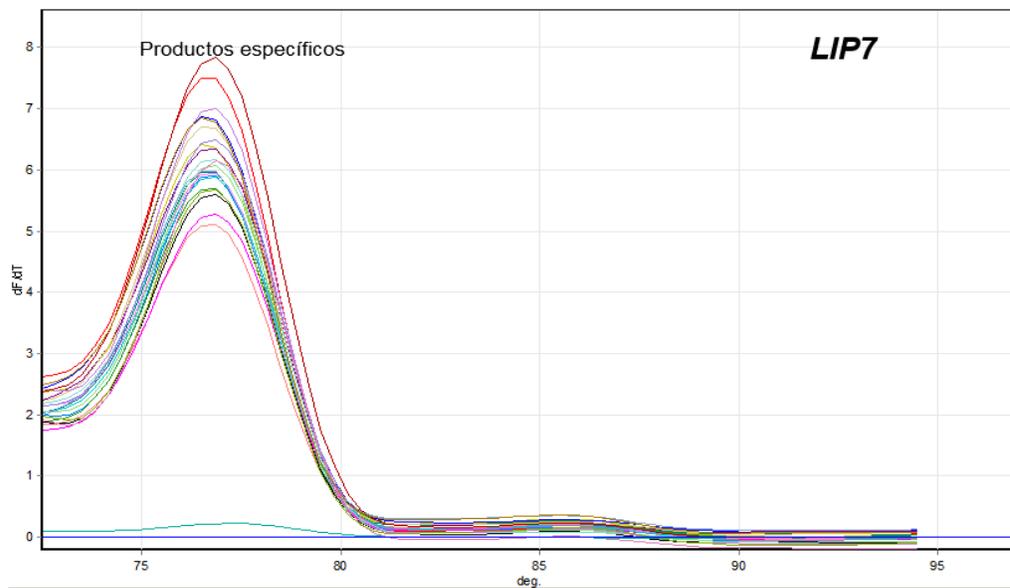


Figura 29. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP7*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

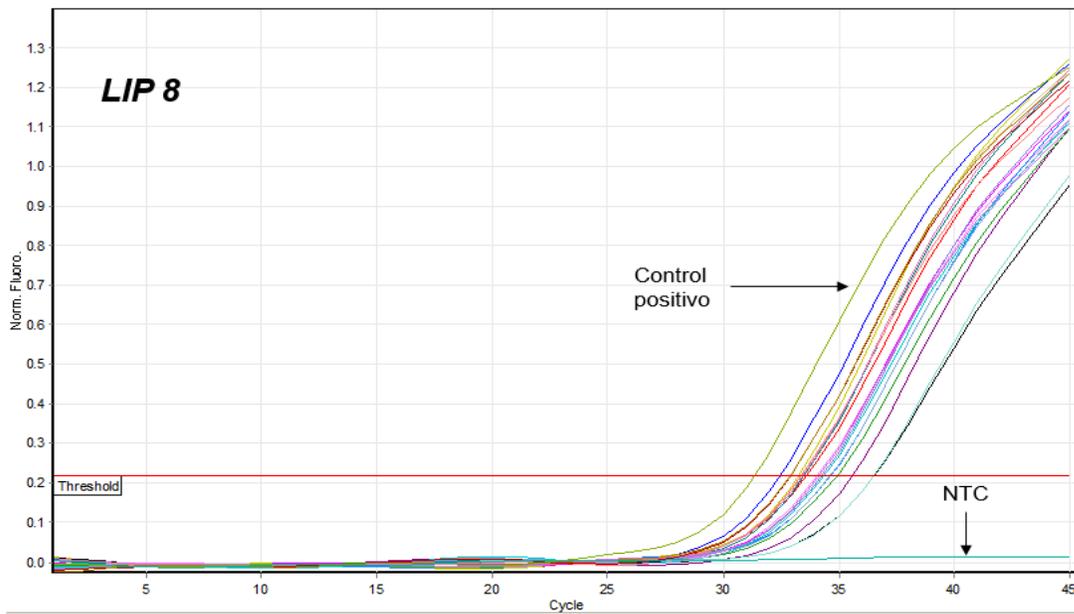


Figura 30. Expresión de *LIP8* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

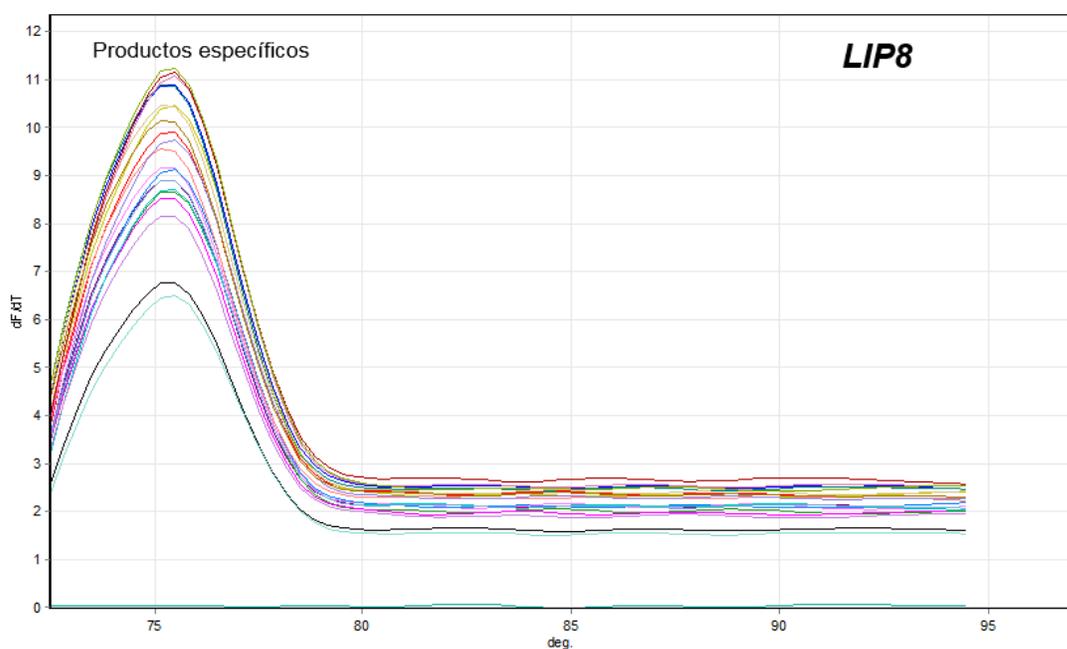


Figura 31. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP8*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

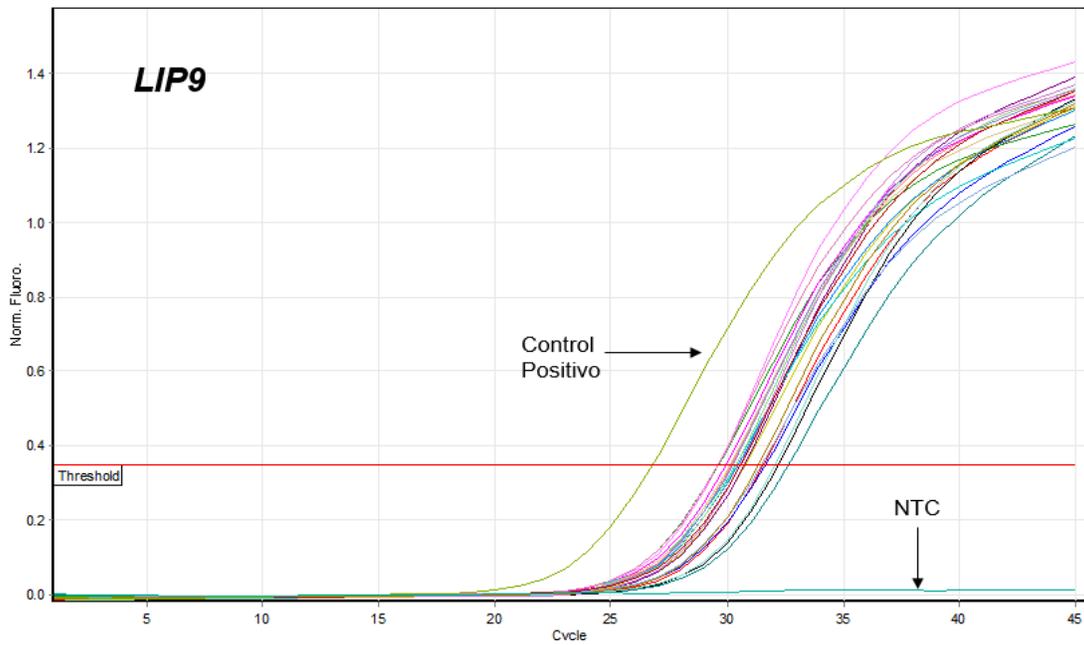


Figura 32. Expresión de *LIP9* en las cepas de *C.albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

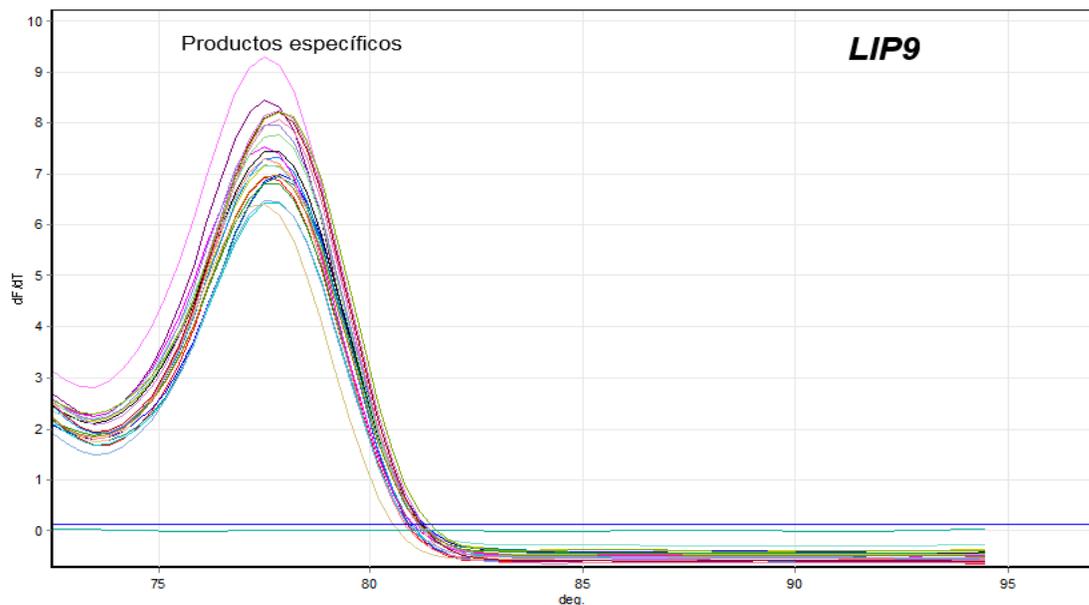


Figura 33. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP9*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más alta que los productos inespecíficos.

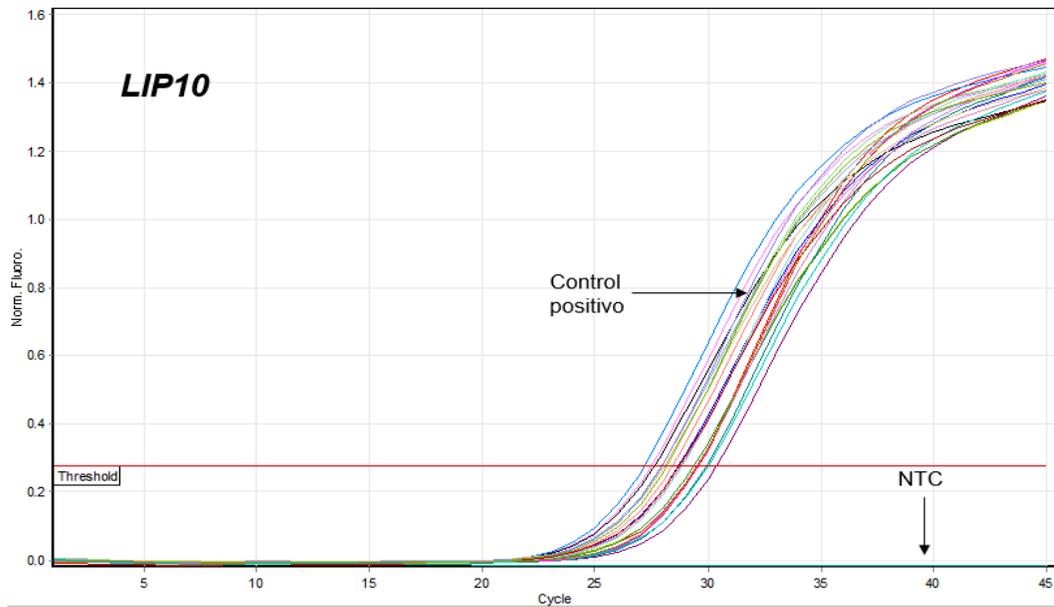


Figura 34. Expresión de *LIP10* en las cepas de *C.albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

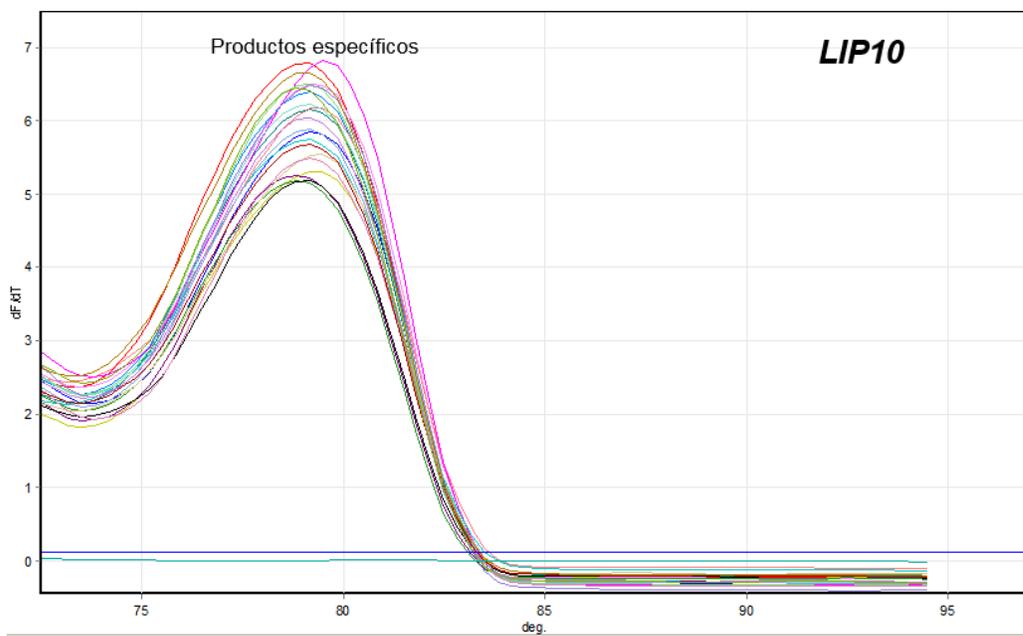


Figura 35. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *LIP10*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más alta que los productos inespecíficos.

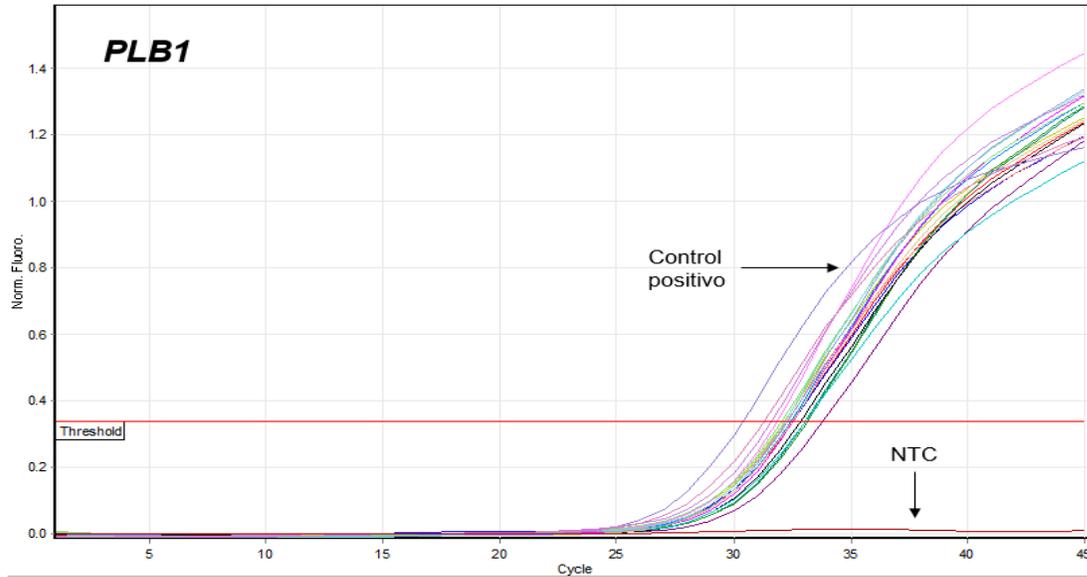


Figura 36. Expresión de *PLB1* en las cepas de *C.albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

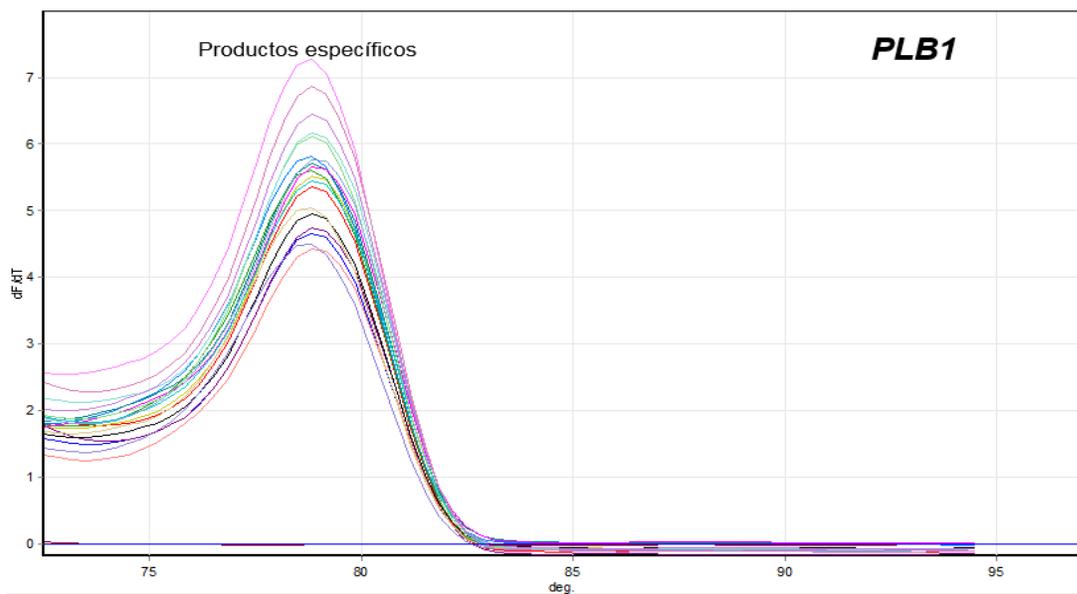


Fig. 37: Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *PLB1*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

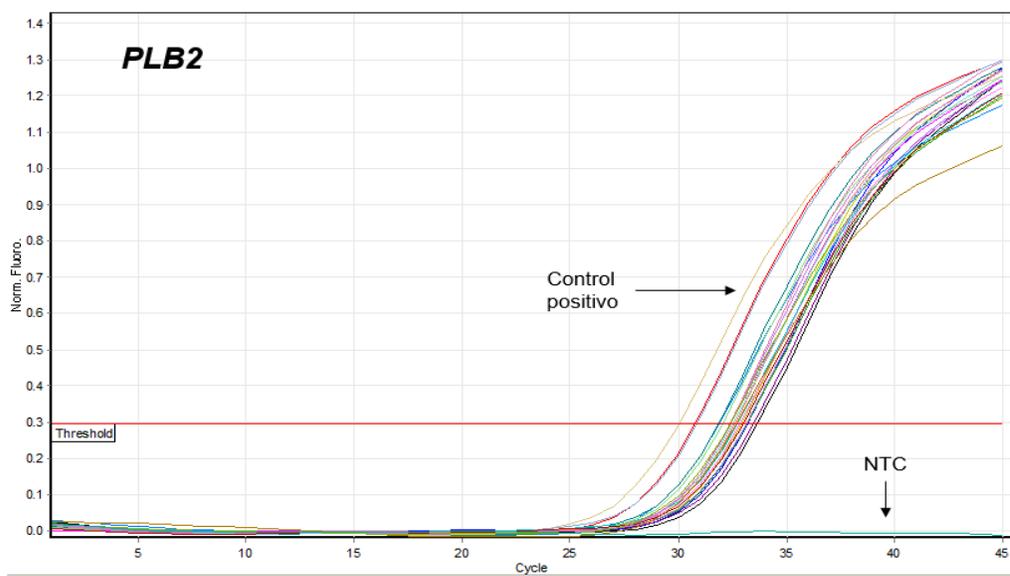


Figura 38. Expresión de *PLB2* en las cepas de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *C. albicans* ATCC32354. NTC= No Control Templado.

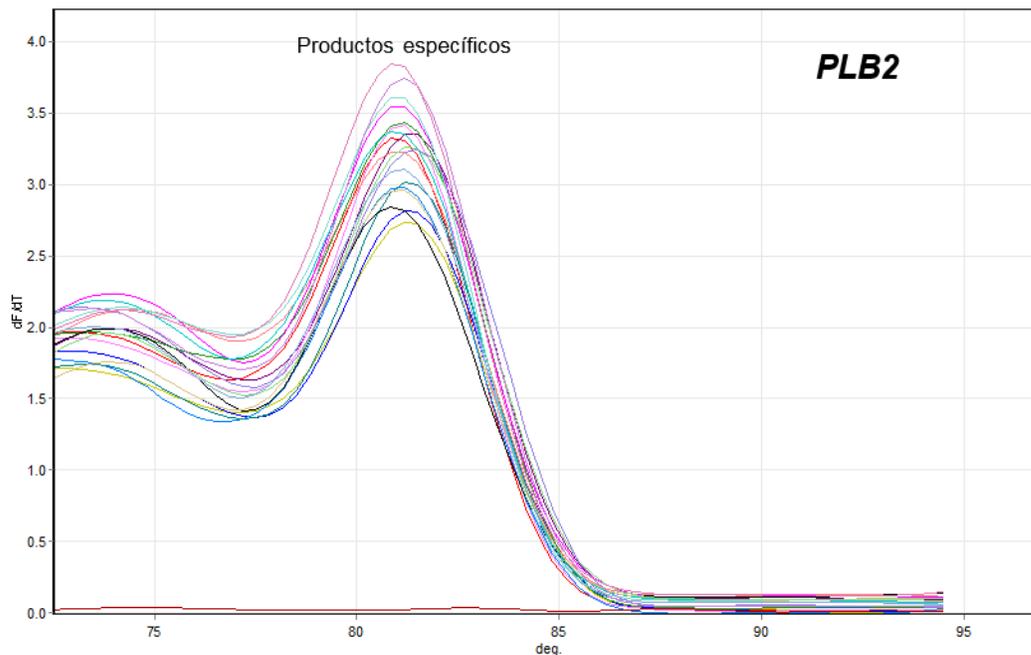


Figura 39. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *PLB2*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación que los productos inespecíficos.

8.4 Patrones de expresión de los genes que codifican lipasas (LIP) y fosfolipasas (PLB) en las cepas de *C. albicans*.

En este estudio se identificaron 4 patrones distintos de la expresión de los genotipos que codifican para Lipasas y Fosfolipasas en las cepas de *C. albicans* (Tabla 11). El patrón número 1 constituido por los 12 genes estudiados se expresó en el 87% (n=34) de las cepas (Tabla 11), mientras que el patrón número 2 constituido por 11 genes (ausente *LIP5*) se expresó en el 7.6% (n=3) de las cepas. Los patrones menos frecuentes fueron el número 3 y 4 con el 2.5% (n=1), en cada caso.

No. De patrón	Patrón	No. De cepas que lo expresaron	%
1	<i>LIP1/LIP2/LIP3/LIP4/LIP5/LIP6/LIP7/LIP8/LIP9/LIP10/PLB1/PLB2</i>	34	87%
2	<i>LIP1/LIP2/LIP3/LIP4/LIP6/LIP7/LIP8/LIP9/LIP10/PLB1/PLB2</i>	3	7.6%
3	<i>LIP1/LIP2/LIP3/LIP4/LIP6/LIP7/LIP9/LIP10/PLB1/PLB2</i>	1	2.5%
4	<i>LIP1/LIP2/LIP4/LIP5/LIP6/LIP7/LIP8/LIP9/LIP10/PLB1/PLB2</i>	1	2.5%

Tabla 11. Patrones de expresión identificados en las cepas de *C. albicans*.

➤ DISCUSIÓN.

Identificación de la especie de *C. albicans*.

En este trabajo se estudiaron 39 cepas del género *Candida* spp. aisladas previamente de pacientes no inmunocomprometidas (18 a 59 años) con candidosis vulvovaginal que acudieron al laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala. El 100% (n=39) de las cepas fue identificada como *C. albicans* mediante la amplificación por PCR del gen *rRNA* (Figura 1 y Figura 2). Se ha descrito que *C. albicans* es la especie de hongos que ocasiona del 80% al 90% de las candidosis vulvovaginales en mujeres de edad reproductiva (Furneri *et al.*, 2008), ocupando el segundo lugar después de la vaginosis bacteriana inespecífica por el complejo GAM (*Gardnerella vaginalis*–*Anaerobios*- *Mycoplasma*) (Moreira & Paula, 2006). Existen varios factores que predisponen a la candidosis vulvovaginal como el embarazo, la diabetes mellitus, el uso de anticonceptivos orales o de antibióticos (Sobel 1985; Sobel *et al.*, 1998). Se ha descrito que cuando no se presentan estos factores de riesgo, la candidosis vulvovaginal ocurre frecuentemente en la fase lútea del ciclo menstrual, en la cual los niveles de estrógenos se encuentran elevados (Kalo-Klein & Witkin, 1989). Por otro lado se ha reportado que mujeres premenopáusicas o postmenopáusicas que no reciben terapia de reemplazamiento hormonal raramente sufren de candidosis vaginal (Sobel *et al.*, 1998).

Detección de los genes de la familia *LIP* y *PLB* mediante PCR convencional.

En este trabajo se encontró que el 100% de las cepas de *Candida albicans* (n=39) aisladas de las mujeres con candidosis vulvovaginal fue portadora de todos los genes *LIP* (*LIP1-LIP10*) (Tabla 9 y Figuras 4-15), en asociación con *PLB1* y *PLB2*. *Candida albicans* secreta una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que contribuyen de manera importante a la patogénesis (Schaller *et al.*, 2005), dentro de estas se encuentran las fosfolipasas que ya han sido bien caracterizadas (Ghannoum 2000; Naglik *et al.*, 2003), sin embargo el papel de las lipasas todavía no es claro, ni tampoco se han establecido los efectos directos de estas enzimas durante la

interacción hospedero-patógeno (Schaller *et al.*, 2005; Schofield *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la actividad de las lipasas podrían contribuir de la misma manera que lo hacen las enzimas aspartil proteasas (Sap) y las fosfolipasas (Plb), las cuales son importantes para la colonización e infección mediante la degradación de los componentes de las membranas de las células del hospedero (Schaller *et al.*, 2005). La presencia de todos los genes *LIP* encontrada en las cepas de *C. albicans* estudiadas hace suponer que esta familia es indispensable para la patogénesis de las infecciones vulvovaginales. Las lipasas catalizan la hidrólisis de triglicéridos a altas temperaturas en disolventes orgánicos, debido a su elevada resistencia a la proteólisis, por lo que se ha demostrado que cuando se inhibe la actividad de las lipasas se reduce el daño tisular en infecciones en humanos (Sther *et al.*, 2004).

La elevada frecuencia de los genes *PLB1* y *PLB2* (Tabla 9) en las cepas de *C. albicans* analizadas evidencia la probable participación de estos marcadores durante el desarrollo de las infecciones vulvovaginales. Se ha demostrado la participación del genotipo *PLB1* como factor de virulencia durante la invasión en un modelo murino de candidosis, debido a la hidrólisis de las uniones éster de glicerofosfolípidos de la membrana celular del hospedero (Ghannoum, 2000), en donde cepas de *C. albicans* con la delección de *PBL1* redujó su virulencia hasta en 60%, comparada con la cepa silvestre (Ghannoum, 2000). Por otro lado el gen *PLB1A* codifica para una glucoproteína de 84 kDa, que tiene actividad de hidrolasa y lisofosfolipasa-transacilasa, y se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos (Calderone *et al.*, 2001)

Expresión de los genes *LIP1-LIP10*, *PLB1* y *PLB2* en las cepas de *Candida albicans* por PCR en Tiempo Real.

En este estudio se utilizó un modelo de infección *in vitro* de células epiteliales vaginales humanas para establecer los diferentes patrones de expresión de los genes de la familia de lipasas (*LIP1-LIP10*) y los genes *PLB1* y *PLB2* en cepas de *C. albicans* de origen vaginal. Todas las cepas de *C. albicans* (n=39) estudiadas expresaron los genes *LIP1-LIP2*, *LIP4*, *LIP6*, *LIP7* y *LIP10* (Tabla 10), mientras que más del 97% (n=38) de las cepas expresaron los genes *LIP3* y *LIP8*, en cada caso. La expresión constante de los genes de la familia *LIP* encontrada en este estudio corrobora lo descrito por Stehr *et al.*, (2004) en su modelo de infección oral *In vitro* de epitelio humano reconstituido (RHE), en donde los genes *LIP1* y *LIP4-LIP8* fueron expresados constantemente, mientras que en las muestras de pacientes con candidosis oral los genes expresados con más del 50% de las muestras (n=8) fueron *LIP4*, *LIP5* y *LIP8*. Se ha descrito que la actividad de las lipasas codificada por los genes de la familia *LIP* es importante para la colonización y la subsecuente infección en diferentes sitios de mucosas (Schofield *et al.*, 2004). Probablemente el papel de las lipasas en los hongos podría ser semejante al de las bacterias, en donde la actividad extracelular de las lipasas bacterianas permite la degradación de los tejidos del hospedero y promueve la disponibilidad de nutrientes, también juegan un rol importante durante la infección por modulación de la respuesta inmune (Konig *et al.*, 1996) y la inhibición de la quimiotaxis y de la actividad fagocítica de los monocitos, macrófagos y granulocitos (Jaeger *et al.*, 1991; Straus *et al.*, 1992). Paraje *et al.*, (2009) demostraron que la lipase de *C. albicans* (CaLip) puede modular la respuesta inmune del hospedero al inducir activación de NADPH oxidasa y la activación de los macrófagos.

Todas las cepas de *C. albicans* (n=39) de origen vaginal analizadas en este estudio expresaron los genes *PLB1* y *PLB2* (Tabla 10). Recientes estudios han demostrado la actividad de las fosfolipasas en cepas de *Candida albicans* y de otras especies en mujeres con candidosis vulvovaginal (Fule *et al.*, 2015) y en mujeres con infecciones vulvovaginales asociadas a diabetes tipo 2 (Bassyouni *et al.*, 2015).

Las fosfolipasas de *Candida albicans* juegan un rol importante en la invasión de los tejidos, en la degradación de las membranas de las células epiteliales y por consiguiente en la penetración de las hifas al citoplasma (Ghannoum *et al.*, 2000).

Patrones de expresión de los genes que codifican lipasas (LIP) y fosfolipasas (PLB) en las cepas de C. albicans.

En este trabajo se identificaron 4 patrones diferentes de expresión de los genes estudiados (Tabla 11), dentro de los cuales el patrón No. 1 conformado por los diez genes de lipasas (*LIP1-LIP10*) y los dos de fosfolipasas (*PLB1* y *PLB2*) se expresaron conjuntamente durante la infección del modelo *In vitro* de células epiteliales vaginales. La detección de los transcritos de los genes de lipasas y fosfolipasas en las cepas de *C. albicans* analizadas nos hace suponer que durante la patogénesis de la candidosis vulvovaginal es indispensable la expresión múltiple de estos marcadores de virulencia. Se ha descrito que los genes de la familia *LIP* se expresaron durante la infección sistémica en ratón, en candidosis oral humana y en modelos *In vitro* de infección de epitelio reconstituido humano (RHE), en donde algunos de estos genes se expresaron durante todo el proceso infeccioso, mientras que la expresión de otros fue transitoria (Stehr *et al.*, 2004). Recientemente se ha estudiado que la expresión de los genes de lipasas participan con los genes *ALS*, *SAP* y *HW1* en la formación de la biopelícula (Nailis *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que las cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres con candidosis vulvovaginal, presentaron diferentes perfiles de expresión de los genes la familia *LIP* y *PLB1* y *PLB2* durante la infección del RHVE, por lo que estos datos contribuyen en comprender mejor la participación colectiva de estos marcadores de virulencia durante la patogénesis de las infecciones vulvovaginales.

➤ CONCLUSIONES

1. En este estudio se comprobó que *Candida albicans* es la especie de levaduras asociada con más frecuencia a las infecciones vulvovaginales.
2. Todas las cepas de *Candida albicans* estudiadas fueron portadoras de los diez genes de la familia *LIP*, en asociación con *PLB1* y *PLB2*.
3. Los transcritos de los genotipos *LIP1-LIP2*, *LIP4*, *LIP6-LIP7*, *LIP9-LIP10* y *PLB1* y *PLB2* fueron encontrados en todas las cepas de *C. albicans* después de la infección *In vitro* del cultivo de células epiteliales vaginales humanas.
4. En este estudio se encontraron cuatro diferentes patrones de expresión de los genes *LIP* y *PLB*, dentro de los cuales el patrón número 1 constituido por los 12 genes estudiados lo expresaron la mayoría de las cepas de *C. albicans*.
5. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que durante la patogénesis del modelo *In vitro* de cultivos de células epiteliales fue indispensable la expresión de la mayoría de los genes de la familia *LIP* en combinación con los genes *PLB1* y *PLB2*.

➤ **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Bassyouni RH, Wegdan AA, Abdelmoneim A, Said W, AboElnaga F 2015. Phospholipase and aspartyl proteinase activities of *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis in patients with type 2 diabetes mellitus. J Microbiol Biotechnol. En prensa.
2. Calderone RA, Fonzi WA. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 9:327-335.
3. Castrillón LA, Ramos A, Padilla C. 2005. Factores de virulencia en *Candida* spp. Dermatol Rev Mex. 49:12-27.
4. Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. 2006. Celular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. Eucariotic Cell. 5: 180-191.
5. Dorko E, Baranová Z, Jenca A, Kizek P, Pilipcinec E, Tracikova L. 2005. Diabetes mellitus and candidiasis. Folia Microbiol. 50:255-262.
6. Eckert SE, Sheth CC, Muhlschlegel FA. Regulation of morphogenesis in *Candida* species. 2007 En: denfert Ch, Hube B (eds). *Candida*. Comparative and functional genomics. Norfolk: Caister Academic Press. 263–291.
7. Fidel PL, Cutrigh J, Steele C. 2000. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. Infect Immun. 68:651-657.
8. Fu Y, Rieg G, Fonzi WA, Belanger PH, Edwards JE Jr, Filler SG. 1998. Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. Infect Immun 66:1783-1786.
9. Fule SR, Das D, Fule RP. 2015. Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non albicans isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area. Indian J Med Microbiol.;33:92-95.
10. Furneri PM, Corsello S, Masellis G, Salvatori M, Cammarata E, Roccasalva LS Mangiafico A, Tempera. 2008. Econazole polycarbophil, a new delivery system for tropical therapy: microbiological and clinical results on vagina candidiasis. J Chemother. 20:336-340.
11. Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Reviews. 13:122-143.

12. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. 2004. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiol.* 150:267-275.
13. Guizhen Luo and Thomas G. Mitchell. 2002. Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 40(8): 2860–2865.
14. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. 2008. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol.* 46:1-15.
15. Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. 2001. *Trends Microbiol* 9:176-180.
16. Hube B, Naglik J. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol.* 147:1997–2005.
17. Hube B. 2004. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 7:336-341.
18. Jaeger KE, Kharazmi A, Hoiby N. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function in vitro. *Microb Pathog* 10:173–182.
19. Jawetz E, Melnick JL, Alberg EA; Brooks GF, Batel J, Ornston LN. 1996. *Microbiología Médica*. Ed. Manual Moderno, 20ª edición. 675-677.
20. Kalo-Klein A, Witkin SS. 1989. *Candida albicans*: cellular immune system interactions during different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 161:1132–1136.
21. König B, Jaeger KE, Sage AE, Vasil ML, König W. 1996. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun.* 64:3252–3258.
22. Kravents A, Quin H, Ahmad A, Bethlenny G, Gao Q. 2010. Widespread Occurrence OF dogase Compensation in *Candida albicans*. *PLoS One*: 5 (6): e 10856.

23. Leidich S. 1998. Cloning and disruption of *CaPLB1*, a phospholipase B gene involved in pathogenicity of *Candida albicans*. J Biol Chem. 73:26078-26086.
24. Lo HJ, Kholer JR, DiDomenico B, Loenberg D, Cacciapuotti A, Finink GR 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are virulent. Cell. 90:939-949.
25. Mitchel PA 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 1:687-692.
26. Moreira D, Paula CR. 2006. Vulvovaginal Candidiasis. Internat J Gynecol Obstet. 92:266-267
27. Nails Hellen Patrick Van Dijck,, Dieter Deforce, Hans Nelis and Tom Coenye. 2010. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. BMC Microbiology. 10:114.
28. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol 67:400-428.
29. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. 2008. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. Microbiol 154: 3266-3280.
30. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ. 2010. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. BMC Microbiol. 10:114.
31. Nas T, Kalkanci, Fidan I, Hizek, Bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E. 2008. Expression of *ALS 1*, *HWP1* and *SAP4* genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. Folia Microbiol. 2:179-183.
32. Odds FC. 1988. Meeting *Candida* and Candidosis. 2nd edition. Bailliere Tindall London UK.

33. Oviedo MMA, Reyes MH, Flores P CR. 2004. Fundamentos de las guías clínicas basadas en evidencia. En Reyes MH, Pérez Cuevas R, Trejo y Pérez J, Editor. Guías de práctica clínica para medicina familiar. México: El Manual Moderno. 9-13.
34. Paniagua CGL, Monroy PE, Negrete AE, VacanPS. 2002. Susceptibility to 5 fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from the throat of non-AIDS Patients. Rev Lat. Microbiol. 44:65-68.
35. Paraje MG, Correa SG, Albesa I, Sotomayor CE. 2009. Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 390:263-268.
36. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses. 48:365-377.
37. Schofield DA, Westwater C, Warner T, Balish E. 2005. Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. FEMS Microbiol Lett. 244:359–365.
38. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR. 1998. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol. 178:203–211.
39. Sobel JD. 1985. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol. 152:924-395.
40. Soll DR, Galask R, Isley S, Gopala Rao TV, Stone D, Hicks J, Schmid J, Mac K, Hanna C. 1989. Switching of *Candida albicans* during successive episodes of recurrent vaginitis. J Clin Microbiol. 27: 681-690
41. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* *Hwp1*. Science. 283:1535-1538.
42. Sther F, Felk A, Gacser A, Kretschmar M, Mahnss B, Neuber K. 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. FEMS Yeast Res 4:401-408.

43. Straus DC, Lonon MK Hutson JC. 1992. Inhibition of rat alveolar macrophage phagocytic function by a *Pseudomonas cepacia* lipase. *J Med Microbiol.* 37:335–340.
44. Sudbery PE. 2001. The Germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septing ring localization. *Mol Microbiol.* 41:19-31.