



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Expresión de marcadores de virulencia en cepas de

***Candida glabrata* de origen oral”**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

Ericka Hernández Tapia

DIRECTORADE TESIS:

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras



Agradecimiento al programa UNAM-DGAPA-PAPIME PE203714.

Los Reyes, Iztacala, Edo. de México 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi madre; Silvia Hernández Tapia por su gran amor, apoyo incondicional, por darme animo cuantas veces fue necesario a lo largo de mi trayectoria escolar, por estar a mi lado en esas noches de desvelo, por darme la calma y paciencia cuando sentí que no podía más, por todo el esfuerzo que realizó para que yo pudiera llegar hasta el final de este logro, y por demostrar que todo lo que hizo por mí no fue en vano y por dejarme la herencia más grande y valiosa, por todo eso y más, Gracias mamá. Mi eterna compañera de vida, mi mejor amiga, simplemente, mi Mamá. Te amo inmensamente.

A mi novio Alan Gómez por su compañía y apoyo incondicional, por tenerme paciencia y pos su gran ayuda para que pudiera terminar este ciclo, que siempre estuvo a mi lado, y que gracias a su amor y comprensión pude lograrlo, sin ti no podría ser lo mismo, gracias por depositar tu confianza y por creer en mí. Te amo, mi amor Alan.

A mi familia, a mis tías, Lulú y Estela por apoyarme y escucharme, a mi prima la Arq. Mónica por siempre darme su apoyo, y por guiarme con su ejemplo para llegar al final de este logro. Y a mis tíos por su apoyo.

A mi amiga Wendoly, por su compañía a lo largo de toda la carrera, por ser mi confidente en todos los aspectos, por trasmitirme su entusiasmo y alegría cada día y por el gran cariño que me brindo para seguir adelante. A mi amiga Leslie por acompañarme en parte de la carrera y por compartir conmigo un sin fín de risas, locuras y alegrías. Gracias niñas por sus valiosos consejos porque sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras y al Dr. Eric Monroy Pérez, por abrirme las puertas del laboratorio de análisis clínicos, por trasmitirme sus conocimientos a través de su enseñanza y por su confianza y paciencia.

A la Biol. Susana Almazán y a la Biol. Patricia Yáñez por su apoyo, enseñanza y paciencia en el laboratorio.

I. INTRODUCCION.....	6
1.1 CARACTERÍSTICAS DE <i>CANDIDA GLABRATA</i>	7
1.2 FACTORES DE VIRULENCIA	8
1.3 CANDIDOSIS ORAL	10
1.4 RESISTENCIA A LOS ANTIMICÓTICOS.....	11
II. ANTECEDENTES	12
III. JUSTIFICACION	13
IV. OBJETIVO GENERAL	14
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
VI. MATERIAL Y METODOS.....	15
6.1 OBTENCIÓN Y SIEMBRA DE LAS MUESTRAS	15
6.2 EXTRACCIÓN DEL DNA POR EBULLICIÓN.	15
6.3 IDENTIFICACIÓN DE <i>CANDIDA GLABRATA</i> POR PCR MULTIPLEX.....	15
6.4 DETECCIÓN DE GENES DE LA FAMILIA <i>EPA</i> DE <i>CANDIDA GLABRATA</i> POR PCR.	16
6.5 DETECCIÓN DE LOS GENES <i>AED1</i> , <i>SLN1</i> Y <i>ACT1</i>	17
6.6 DETECCIÓN DE LOS GENES DE LOS GENES <i>CgCDR1</i> Y <i>CgSNQ2</i> QUE CODIFICAN LA RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS DE <i>C. GLABRATA</i>	18
6.7 ANÁLISIS DE LOS AMPLÍCONES MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.	19
6.8 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE <i>C. GLABRATA</i>	19
6.8.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE <i>C. GLABRATA</i> PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL.	19
6.8.2 INOCULACIÓN EN EL EPITELIO ORAL HUMANO.....	20
6.8.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN PARA LA PCR EN TIEMPO REAL.	20
6.8.4 REVERSOTRANSCRIPCIÓN CON ELIMINACIÓN DE ADN GENÓMICO.....	21
6.8.5 ELIMINACIÓN DEL ADN GENÓMICO.	21
6.8.6 PREPARACIÓN DE LA MASTER MIX PARA LA REVERSOTRANSCRIPCIÓN	22
6.8.7 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR EN TIEMPO REAL UTILIZANDO SYBR®GREEN.	23
VII. RESULTADOS	24
7.1 PACIENTES ESTUDIADOS	24
7.2 IDENTIFICACIÓN DE <i>CANDIDA GLABRATA</i> POR PCR MULTIPLEX.....	25
7.3 DETECCIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN POR PCR CONVENCIONAL EN LAS CEPAS DE <i>C. GLABRATA</i>	26
7.4 DETECCIÓN DE LOS GENES <i>SLN1</i> Y <i>ACT1</i> POR PCR CONVENCIONAL EN LAS CEPAS DE <i>C. GLABRATA</i> . ..	29
7.5 DETECCIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA RESISTENCIA A LOS AZOLES POR PCR CONVENCIONAL EN LAS CEPAS DE <i>C. GLABRATA</i>	29
7.6 PATRONES DE ASOCIACIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN Y DE RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS DE <i>C. GLABRATA</i>	31
7.7 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE LOS GENES DE ADHESIÓN EN LAS CEPAS DE <i>C. GLABRATA</i> UTILIZANDO UN MODELO DE INFECCIÓN IN VITRO DE EPITELIO ORAL HUMANO.....	32
VIII. DISCUSIÓN	40

8.1 PACIENTES ESTUDIADOS	40
8.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.	41
8.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA	42
8.4 PATRONES DE ASOCIACIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN Y DE RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.	42
8.5 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA UTILIZANDO UN MODELO IN VITRO DE EPITELIO ORAL HUMANO.	43
IX. CONCLUSIONES	44
X. BIBLIOGRAFIA	45

RESUMEN

La candidosis oral es causada por diferentes hongos oportunistas pertenecientes al género *Candida*, dentro de los cuales se encuentra la especie de *Candida glabrata*. La virulencia de *C. glabrata* se debe principalmente a la familia de genes de adhesión *EPA* (Epithelial Adhesin) y *AED1* (adherence to endothelial cells). El tratamiento de las candidosis causadas por *C. glabrata* se ha complicado en los últimos años debido a la selección de cepas resistentes a los azoles, la cual se encuentra codificada por los genes *CgSNQ2* y *CgCDR1*. Para el desarrollo de este estudio se analizaron 41 cepas de *Candida* spp. aisladas de pacientes no inmunocomprometidos con candidosis oral, de los cuales el 54% (n=22) de los pacientes fueron mujeres y el 46% (n=19) hombres, la edad de los pacientes se encontró entre los 22 a 57 años. La identificación de las distintas especies del género *Candida* se realizó por el método de PCR multiplex. La detección de los genes de adhesión y de resistencia a los antimicóticos se realizó mediante PCR convencional. Los niveles de expresión de los genes *EPA2, 4/5, 6, 8, 12, 14* y *16* y *AED1* en las cepas de *C. glabrata* fueron medidos por PCR en Tiempo Real después de la infección en un modelo *in vitro* de epitelio oral reconstituido humano (TR146). El 95.1% (n=39) de las cepas correspondió a la especie de *C. glabrata*. El 100% (n= 39) de las cepas fue portadora del gen *EPA 16* y 97.4% (n= 38) de *EPA 14*, los genes menos frecuentes fueron *EPA 2* y *EPA 12* con el 79.4% (n= 31), en cada caso. *AED1* se detectó en un 69.2% (n=27). Otros genes detectados en *C. glabrata* fueron *SLN1* (79.4%, n= 31) y *ACT1* (92.3%, n=36). El 100% (n=39) de las cepas fue portadora de los genes de resistencia a los azoles *CgCDR1* y *CgSNQ2*. Los genes *EPA 6, EPA 8, EPA 12, EPA 14, AED1, SLN1* se expresaron en el 100% (n=26) de las cepas y *ACT1* en el 34.6% (n=9). Los resultados encontrados en este estudio reflejaron que la cronicidad de las candidosis orales de los pacientes estudiados podría deberse a la presencia de los diferentes marcadores de virulencia asociados a los genes que codifican para la resistencia a los azoles en las cepas de *C. glabrata*.

I. INTRODUCCION

Las infecciones micóticas en los humanos son consideradas un serio problema de salud en nuestro país y en el mundo. Dentro de los hongos que causan infecciones en el hombre se encuentran las levaduras del género *Candida*. Algunas de las especies del género *Candida* son habitantes de la flora normal del ser humano, sin embargo pueden actuar como oportunistas y ocasionar infección cuando existe inmunosupresión del hospedero (Monroy, 1993) en enfermedades como la diabetes mellitus, SIDA, carcinomas, leucemia, trasplantes de órganos, intervenciones quirúrgicas, terapias inmunosupresoras, anticonceptivos orales, drogadicción, etc. (Loaiza, 2008) (Tabla 1).

Las candidosis sistémicas por el género *Candida* son más comunes en unidades de cuidados intensivos en hospitales tanto de Estados Unidos como en Europa y en México. Este género es el causante del 11% de todas las infecciones sistémicas hospitalarias, de las cuales más de la mitad se deben a la especie *C. albicans* y el 15% de todas las candidosis se deben a *C. glabrata*. (Almirante *et al.*, 2005).

Candida glabrata es actualmente el segundo patógeno más común que causa infecciones en humanos. Esta levadura está filogenéticamente más relacionada con *Saccharomyces cerevisiae* que con *Candida albicans*. Muchas infecciones sistémicas han sido recientemente relacionadas con *C. glabrata* (Mohamed, 2014).

En México se ha reportado que el 12% de las candidosis vulvovaginales y el 13% de las candidosis sistémicas son causadas por *C. glabrata* (Castaño, *et al.* 2006).

Se ha descrito que *C. glabrata* frecuentemente causa patologías en los pacientes ancianos (27%) y con estomatitis debida a prótesis dental (22 a 25%). *C. glabrata* también se ha aislado en un 5 a 25% de las muestras de estómago y en 5 a 30% de las de origen ginecológico u obstétrico en mujeres sin vaginitis. Esta especie se aísla con muy baja frecuencia de la piel normal (1 a 2 %) y, por el contrario se ha aislado hasta en un 36% de las muestras de orina de pacientes hospitalizados (García, *et al.* 2009).

Causas u origen	Condiciones patológicas	Estado fisiológico con alta susceptibilidad infecciosa
Antibióticos Problemas de la piel (ej. Quemaduras o heridas) Dispositivos (ej. Catéter permanente y dentaduras) Anticonceptivos Inmunosupresión Radiación	SIDA Cáncer Trasplantes de órganos Diabetes mellitus Desordenes hormonales	Neonatos y ancianos Embarazo y menopausia

Tabla 1. Factores predisponentes para infecciones por *Candida* (Mohamed, 2014).

1.1 CARACTERÍSTICAS DE CANDIDA GLABRATA

C. glabrata pertenece al Reino: Fungi, Division: Ascomycota, Subdivision: Ascomycotina, Clase: Ascomycetes, Subclase: Hemiascomycetes, Orden: Saccharomycetales, Familia: Saccharomycetaceae y Genero: *Candida*. (Sherman, *et al.* 2004).

C. glabrata es una levadura haploide y presenta únicamente un ciclo de vida asexual, es la única especie del género *Candida* que es incapaz de formar hifas o pseudohifas, no es polimórfica y crece como gemación (blastoconidios) bajo condiciones entandares. Crece con facilidad a 37° C de 24- 48 h en el medio de agar glucosado Sabouraud, las colonias de *C. glabrata* son pastosas de color blanco a crema y brillantes. Las blastoconidias de *C. glabrata* son de forma oval miden de 1-4 µm de diámetro, no hay deferencia entre la forma comensal y la patogénica. (Bialkova, *et al.* 2006). Asimila únicamente la glucosa y la trehalosa representando así un número limitado de azucares en comparación con *S. cerevisiae* o *C. albicans* (Hazen, 1995).

El genoma de *C. glabrata* consiste de Cromosomas en el núcleo y DNA mitocondrial. Posee 13 cromosomas y el tamaño total del DNA cromosomal es de 12.3 Mb. y debido a su carácter haploide, se considera que *C. glabrata* tiene mayores posibilidades de presentar mutaciones que otras especies diploides como *C.albicans*. (Muller, *et al.* 2009).

1.2 FACTORES DE VIRULENCIA

En humanos, las infecciones por *C. glabrata* se asocian frecuentemente con otras especies de *Candida* y comúnmente se aíslan de infecciones orales con *C. albicans*. Este tipo de infecciones pueden causar severos síntomas y son más difíciles de tratar.

Las infecciones causadas por especies de *Candida* son mediadas por diversos factores de virulencia como la adherencia, la formación de biopelícula y producción de enzimas hidrolíticas principalmente, que facilitan el daño tisular (Mohamed, 2014).

C. glabrata carece de algunos factores de virulencia que si se encuentran en otras especies, por ejemplo, la producción de pseudohifas, consideradas estructuras que incrementan la adherencia y penetración del hongo en los tejidos, por lo cual se considera que *C. glabrata* es menos virulenta que *C. albicans* y *C. tropicalis*. (Garcia *et al.*, 2009). Sin embargo *C. glabrata* posee otros marcadores de virulencia que le brindan la capacidad para adherirse con avidez a las células epiteliales. Esta capacidad de adhesión depende de la familia de genes *EPA* (Epithelial Adhesin) que codifican para proteínas de la pared celular. El principal gen involucrado en la adhesión celular es *EPA1*, sin embargo el genoma de *C. glabrata* tiene más de 20 genes homólogos a *EPA1*. Gran parte de los genes *EPA* se hayan en regiones subteloméricas del genoma, en donde el lugar de su ubicación tiene repercusiones importantes para su expresión ya que están regulados negativamente mediante silenciamiento subtelomérico, y se ha descrito en modelos *in vitro*, que todos los genes son silenciados excepto *EPA1* (Castaño *et al.*, 2005; De Las Peñas *et al.*, 2003). Se ha descrito en *S. cerevisiae* que el silenciamiento subtelomérico, por posición cercana al telómero (TPE) se debe a las proteínas Sir2p, Sir3p, Sir4p, Rap1p, Ku70p), Ku80p y Rif1p (Rusche *et al.*, 2003). Se ha descrito que el silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae* ocurre cuando la proteína Rap1p se une a una serie de sitios de reconocimiento en los telómeros. Rap1p recluta a su vez el complejo formado por Sir3p y Sir4p que a su vez reclutan a Sir2p. La proteína Sir2p es una desacetilasa de histonas que utiliza como cofactor NAD⁺. Esta desacetilasa quita grupos acetilo de las histonas H3 y H4 que se encuentran en los nucleosomas aledaños a los telómeros y favorece la formación de una estructura cerrada de la cromatina que no es favorable para

la transcripción (cromatina silenciosa). Se ha descrito que al menos 4 telómeros en *C. glabrata* (los genes *EPA1-7*), están sujetos a silenciamiento subtelomérico controlado por los genes *SIR*, *RAP1* y *RIF1* (Castaño *et al.*, 2005; De Las Peñas *et al.*, 2003). Mutantes en estos genes eliminan el silenciamiento subtelomérico, y las células se tornan hiperadherentes debido a que se expresan varios genes *EPA*. La expresión de adhesinas es importante para la virulencia *in vivo*, porque una cepa que lleva una delección de *sir3*, presenta un incremento de aproximadamente 3 veces en la colonización del riñón en un modelo de infección sistémica en ratones (Castaño *et al.*, 2005). Mutaciones en *EPA1*, ocasionan la pérdida de adhesión de *C. glabrata* a células epiteliales *in vitro*. Una cepa que no contiene ninguno de los genes *EPA1*, *EPA6*, y *EPA7*, no coloniza eficientemente el riñón y la vejiga en un modelo de infección de vías urinarias del ratón (Domergue *et al.*, 2005). Estos datos apuntan a la importancia de las adhesinas Epa1p, Epa6p y Epa7p en la virulencia de *C. glabrata*. Se ha demostrado que *EPA6* se induce en la vejiga y el riñón durante una infección de vías urinarias del ratón. En este caso, la señal importante para la desrepresión de *EPA6*, es la deficiencia de niacina o ácido nicotínico (AN) en orina (Domergue *et al.*, 2005). Otra característica importante de *C. glabrata* es que presenta una alta capacidad de formar biofilms en superficies de plástico, y la adhesina más importante para este fenómeno es *EPA6*. Así mismo, mutaciones en *SIR4* (que afectan silenciamiento), forman biofilms con una mayor eficiencia, presumiblemente debido a la sobreexpresión de *EPA6* (Iraqi *et al.*, 2005). Estos resultados pueden tener importantes implicaciones clínicas ya que muchas de las infecciones están asociadas con catéteres implantados.

Existen otros genes involucrados en la adhesión a las células endoteliales como *AED1* (adherence to endothelial cells), *AED2* y *Pwp7p* (PA14 domain containing Wall Protein) (Desai *et al.*, 2011).

1.3 CANDIDOSIS ORAL

La cavidad bucal constituye un ambiente favorable para la colonización de microorganismos oportunistas como los hongos del género *Candida*, sin embargo, no siempre son patógenos para el hombre debido a que la flora normal bacteriana y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así un equilibrio (Rueda *et al.*, 2008). Las candidosis orales son las infecciones micóticas más frecuentes ocasionadas por especies del género *Candida*. Entre los factores que ocasionan las candidosis orales se encuentran el uso de prótesis dentales, la xerostomía, las múltiples terapias con antibióticos, inmunosupresores, antineoplásicos y las inmunodeficiencias (Aguirre, 2002).

Las candidosis orales ocasionan dolor durante la ingesta de alimentos, lo que lleva a una disminución del apetito y la emaciación del paciente, sobre todo en infecciones crónicas, lo cual puede provocar candidosis más graves, como la esofágica o sistémica.

La presencia de cepas del género *Candida* en la cavidad oral es frecuente y oscila entre un 20% a un 70%. *C.albicans* es la especie aislada más comúnmente, otras como *C.glabrata* o *C.tropicalis* se identifican hasta en un 7% de las personas, mientras que otras especies como *C. krusei* o *C. parapsilosis* son menos frecuentes (Aguirre, 2002).

La patogénesis de la candidiasis oral es compleja e implica a diferentes factores y mecanismos de los hongos y del hospedador. La posibilidad de que *Candida* colonice las superficies orales depende de la efectividad de los mecanismos defensivos del hospedador, como de la capacidad de adhesión del hongo y de su poder de crecimiento.

Existen diversos factores locales y sistémicos del hospedador que facilitan el desarrollo de la candidosis oral. Los factores locales son alteraciones de la barrera mucosa, cambios del epitelio oral y alteraciones en la saliva. Los factores sistémicos pueden ser por periodos extremos de la vida, alteraciones hormonales, alteraciones nutricionales y alteraciones inmunológicas.

La mucosa oral presenta propiedades antifúngicas por lo tanto la alteración de la mucosa mediante traumatismos, maceración u oclusión (como ocurre en los portadores de prótesis dentales) favorecen la adhesión del hongo y la invasión mucosa. (Aguirre, 2002).

1.4 RESISTENCIA A LOS ANTIMICÓTICOS

Candida glabrata frecuentemente presenta sensibilidad a los derivados poliénicos, nistatina y anfotericina B, sin embargo y desde la comercialización y el uso indiscriminado del fluconazol e itraconazol, con el tiempo se han seleccionado cepas resistentes a estos azoles, lo que ha dificultado el tratamiento de los enfermos con candidosis que han sido tratados con estos antifungicos (Garcia, et al.2009).

En *C. glabrata* se ha demostrado que la resistencia a los azoles se debe a un incremento en la síntesis del ergosterol dependiente del citocromo P-450 y a la existencia de bombas de eflujo ABC (ATP-binding cassette) codificada por los genes *CDR1 (CgCDR1)*, *CgPDH1*, y *CgSNQ2* (Miyazaki, H., et al. 1998., Redding, S. W., et al. 2003., Sanglard, D., et al. 1999., Torelli, R., et al. 2008., Vermitsky, J. P., et al. 2004). Los transportadores ABC son regulados por el factor de transcripción binuclear de zinc del operón *CgPdr1*, un gen homólogo al de *Saccharomyces cerevisiae Pdr1 (ScPdr1)* y al de los factores de transcripción *ScPdr3* (Vermitsky, et al. 2006, Vermitsky, et al. 2004), *CgPDR1*, *CgCDR1*, *CgPDH1* y *CgSNQ2* (Caudle, et al., 2011). Recientemente se ha reportado que Pdr1 de *C. glabrata* (y Pdr1 de *S. cerevisiae*) se unen directamente a fluconazol, lo que resulta en la activación de las bombas de eflujo de las drogas, un mecanismo similar de regulación de la resistencia a multidrogas (MDR) por el receptor pregnane X (PXR), un receptor nuclear en vertebrados (Thakur, J. K., et al. 2008).

II. ANTECEDENTES

En los últimos años se han realizados estudios para entender mejor la patología de las candidosis por *C. glabrata*, así como los mecanismos moleculares que participan en la adhesión celular durante las infecciones. Para lo cual se estudiaron los genes EPA de *Candida glabrata* involucrados con la adhesión celular (De Las Peñas, *et al.* 2003). Estos autores demostraron que EPA1 de *C. glabrata* se expresa en modelos *in vitro* y que el silenciamiento de la región subtelo mérica de los otros genes EPA, depende de Sir3p y Rap1p.

Con el propósito de estudiar la transcripción de los genes de adhesión a células epiteliales, Castaño, *et al.*; en el 2005 analizaron la regulación transcripcional y el control de la longitud de los telómeros de las adhesinas subtelo méricas EPA de *Candida glabrata*. En este estudio se demostró la existencia de múltiples genes EPA que codifican para adhesinas y se demostró que la transcripción de al menos dos de estas adhesinas son regulados por silenciamiento subtelo mérico.

Además de las proteínas de adhesión a células epiteliales (EPA) de *C. glabrata* también se han estudiado otras adhesinas involucradas en la adhesión a células endoteliales, así Desai, *et al.*; en el 2005 analizaron las adhesinas Pwp7p y Aed1p ancladas a la pared celular de *C. glabrata* y demostraron que la delección de los genes PWP7 y AED1, que codifican para estas proteínas, resultó en una significativa reducción en la adherencia a las células endoteliales *in vitro*.

Recientemente Samaranayake y colaboradores en el 2013, realizaron un análisis cuantitativo mediante RT-PCR de diferentes genes de *C. glabrata* asociados a la resistencia a los azoles. Los resultados demostraron que la resistencia se encuentra relacionada con diferentes genes reguladores de la transcripción, como CDR1, CDR2, SNQ2 y ERG11, entre otros, además de otros genes, expresados diferencialmente a un nivel inferior, también asociados a factores de virulencia, además de que sus resultados reflejaron que la resistencia está asociada a la formación de colonias de levaduras, lo cual puede influir importantemente en la colonización del hospedero.

III. JUSTIFICACION

Es bien conocido que *C. albicans* es la especie aislada con más frecuencia en los diferentes tipos de candidosis, sin embargo actualmente está ocurriendo un incremento de las infecciones causadas por *C. glabrata*. Debido a que no se han estudiado las diferentes combinaciones de los genes de adhesión de *C. glabrata* durante la patogénesis, es importante conocer los diferentes perfiles de expresión de los genes de adhesión en un grupo de cepas de *C. glabrata* aisladas de pacientes no inmunodeprimidos con candidosis oral utilizando un modelo *in vitro* de epitelio oral humano. También es importante determinar la frecuencia de los genes que codifican la resistencia a los azoles en las cepas de *C. glabrata*.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Caracterización molecular de los genotipos involucrados en la adhesión celular, y de los genes que codifican para la resistencia a los azoles en cepas de *Candida glabrata* aisladas de pacientes con candidosis oral.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificación de *Candida glabrata* por la técnica de la PCR.
- Detección por PCR de los genes *EPA2*, *4/5*, *6*, *8*, *12*, *14* y *16* que codifican para adhesión a células epiteliales en las cepas de *C. glabrata*.
- Identificación del gen *AED1* que codifica para adhesión a células endoteliales.
- Detección de los genes *CgCDR1* y *CgSNQ2* que confieren resistencia a los azoles en las cepas de *Candida glabrata*.
- Determinación de la expresión de los genotipos de adhesión a células epiteliales y endoteliales cepas de *C. glabrata* utilizando un modelo *in vitro* de epitelio reconstituido humano (RHE).
- Identificación de los diferentes patrones de expresión de los genes de adhesión en las cepas de *C. glabrata*

VI. MATERIAL Y METODOS

6.1 OBTENCIÓN Y SIEMBRA DE LAS MUESTRAS

Las cepas del género *Candida* fueron aisladas a partir de exudados faríngeos de pacientes no inmunocomprometidos con infecciones de la cavidad oral, que acudieron al laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM. Para lo cual y por medio de hisopos estériles se tomaron muestras faríngeas, se sembraron por el método de estría cruzada en el medio de cultivo de Sabouraud (Bioxon, México) a 37° C/ 24 horas. Al término las cepas del género *Candida* fueron identificadas por morfología colonial y microscópica utilizando la tinción de Gram.

6.2 EXTRACCIÓN DEL DNA POR EBULLICIÓN.

Después de obtener el crecimiento visible de las colonias de *Candida* en el agar sabouraud, se tomaron por medio de asas estériles varias colonias y se depositaron en un tubo de rosca de 16 x 150 que contenía 2 ml de agua desionizada estéril. La muestra se mezcló en un vortex por 20 segundos y se colocó a baño maria por 20 minutos. Al terminó la muestra se depositó en contenedores con hielo por 10 minutos y se centrifugó en tubos eppendorf a 12,000 rpm por 10 minutos. Finalmente se separó el sobrenadante (que contenía el DNA templado) a otro tubo estéril y se guardó a – 20° C para su posterior utilización.

6.3 IDENTIFICACIÓN DE CANDIDA GLABRATA POR PCR MULTIPLEX.

La identificación de *Candida glabrata* se realizó por PCR multiplex de acuerdo al método descrito por Luo & Mitchel (2002). Para lo cual se realizó primero un PCR sencillo de punto final con los oligonucleótidos universales para el grupo de hongos ITS1 e ITS4 (5 pmol) (Tabla 2). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 microlitros; 1 microlitro de cada oligonucleótido (TS1 y TS4), 20 microlitros de H₂O libre de nucleasa, 3 microlitros de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA se

realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96°C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión de 72°C por 15 minutos. Posteriormente se realizó la PCR multiplex con los oligonucleótidos CALB1 y CALB2 (5 pmol), CGL1 y CGL2 (7 pmol), CPA1e, CPA3f y CPA2 (6 pmol), y CTR1 y CTR2 (4 pmol). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 microlitros; 1 microlitro de cada primer, 15 microlitros de H₂O libre de nucleasa, 3 microlitros de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del ADN se realizó bajo las mismas condiciones que para ITS1 e ITS4.

Especie	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' - 3')	Tamaños del amplicon (pb)
Todos los hongos	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Variable
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>Candida albicans</i>	CALB1	TTTATCAACTGTACACCAGA	273
	CALB2	ATCCCGCCTTACCACTACCG	
<i>Candida glabrata</i>	CGL1	TTATCACACGACTCGACT	423
	CGL2	CCCACATACTGATATGGCTACAA	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPA1e	TTGGTAGGCCTTCTATATGGG	320
	CPA3f	GCCAGAGATTAA ACTCAACCAA	
	CPA2	CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC	
<i>Candida tropicalis</i>	CTR1	CAATCCTACCGCCAGAGTTAT	357
	CTR2	TGGCCACTAGCAAATAAGCGT	

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la detección de las distintas especies del género *Candida*.

6.4 DETECCIÓN DE GENES DE LA FAMILIA EPA DE CANDIDA GLABRATA POR PCR

La identificación de los genes *EPA 2*, *EPA 4/5*, *EPA 6*, *EPA 8*, *EPA 12*, *EPA 14* y *EPA 16* se realizó mediante PCR sencillito conforme a lo descrito por (Castaño, et al. 2005). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 microlitros; 1 microlitro de cada oligonucleótido (Tabla 3), 20 microlitros de H₂O libre de nucleasa, 3 microlitros de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones para EPA (4/5, 6, 8 y 12) :

desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión de 72°C por 7 minutos. Para EPA (2, 14 y 16) se utilizaron las siguientes condiciones : desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión de 72°C por 7 minutos.

Nombre del gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
EPA 2	GAATGATTCCTTATTAAT	143 pb
	GGGATCAGATTATGCAAAAG	
EPA 4/5	GTCAAATTCTGTAGTGAAAG	143 pb
	GCTAACATTACTGTATTTCT	
EPA 6	TTACAGGGTTCGGATCTGAC	143 pb
	GGGTTCTCAAACAGCTAAGG	
EPA 8	TTCCTGGTCCGTCGCACCA	143 pb
	GGGCGGGTACCAGAAAAGAC	
EPA 12	TTATGCGCTCTGATCCATGT	143 pb
	GGGAAGGCGAATAGTGCCTA	
EPA 14	TGATACGTGTAGGCGCACCA	143 pb
	GCATGTTGACCATTCCAAGA	
EPA 16	TAACAATTTCTTCACTAAAT	143 pb
	GGGGCTCAAAAAATGCAAAAA	

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la detección de los genes de la familia *EPA*.

6.5 DETECCIÓN DE LOS GENES *AED1*, *SLN1* Y *ACT1*.

La detección de los genes *AED1*, *SLN1* y *ACT1* se realizó por PCR de acuerdo a lo descrito por (Desai, *et al.* 2011). En la tabla 4 se aprecian los oligonucleótidos utilizados para la PCR. Las condiciones de amplificación de los genes *AED1*, *SLN1* y *ACT1* fueron las mismas utilizadas para los genes *EPA*.

Nombre del gen	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>AED1</i>	TGCTTGGGTACTTTCGTGGAGTGT	1075
	ATGCCGATCGCTGTAATAGGTAGC	
<i>SLN1</i>	TGCTCTCGACCAACTACGC	571
	CGGCTTTAGTTGCTTCTCG3	
<i>ACT1</i>	GGCTTTCGATTTCTCACC	124
	GTGGCAACGGTTTGATGC	

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la detección de otros genes.

6.6 DETECCIÓN DE LOS GENES DE LOS GENES *CgCDR1* Y *CgSNQ2* QUE CODIFICAN LA RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS DE *C. GLABRATA*.

La identificación de los genes *CgCDR1* y *CgSNQ2* se realizó por PCR de acuerdo a lo descrito por (Caudle, *et al.* 2010). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 microlitros; 1 microlitro de cada oligonucleótido (Tabla 5), 20 microlitros de H₂O libre de nucleasa, 3 microlitros de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión de 72°C por 7 minutos.

Nombre del gen	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Tamaño del primer (pb)
<i>CgCDR1</i>	TTGACTCTGTTATGAGCGATTACG	51
	TTCGGATTTTTCTGTGACAATGG	
<i>CgSNQ2</i>	CGTCCTATGTCTTCTTACACCATT	63
	TTTGAACCGCTTTTGTCTCTGA	

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la detección de los genes que codifican para la resistencia a los azoles en las cepas de *C. glabrata*.

6.7 ANÁLISIS DE LOS AMPLÍCONES MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Después de la amplificación del ADN, 5 µl de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% que incluía 0.3 µl de MidoriGreen, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Finalmente los geles fueron fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

6.8 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE C. GLABRATA.

6.8.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE C. GLABRATA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL.

Para promover la expresión de los genes, las cepas de *C. glabrata* (con presencia de los marcadores de virulencia) 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. glabrata* 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 (Green *et al.*, 2004). Un inóculo de 4×10^7 células/ml se preparó para usarse en el epitelio oral humano (TR146), de Laboratorio SkinEthic, Francia (Figura 1).



Figura 1. Placa con epitelio oral humano (TR146). Fotografía: Laboratorio Clínico, FES-Iztacala, UNAM.

6.8.2 INOCULACIÓN EN EL EPITELIO ORAL HUMANO

50 μ l de una suspensión de *C. glabrata*/PBS (2×10^6 células en total) se depositó en la superficie del epitelio oral humano (TR146), y se incubaron a 37°C x 24 h, en 5% de CO_2 y humedad saturada

6.8.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN PARA LA PCR EN TIEMPO REAL.

El ARN total de *C. glabrata* fue extraído utilizando el kit RNeasy (Qiagen; No. de catálogo 74104) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y utilizando el equipo Quiacube, para lo cual las levaduras se recolectaron del epitelio oral humano (TR146) y en un tubo Eppendorf se preparó una dilución en PBS para tener 7.5×10^8 células. El equipo Quiacube realizó lo siguiente: El tubo fue centrifugado a 1000 g durante 4°C por 5 minutos. Se decantó totalmente el sobrenadante, se resuspendieron las células del hongo en 2 ml de buffer Y1 con lyticasa (50 U por 1×10^7 células) y se incubó de 10-30 minutos a 30°C en agitación suave. Posteriormente se centrifugó a 300 g (375 rpm) durante 5 minutos para formar el pellet de esferoplastos y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 350 μ l de

buffer RLT y el tubo se agitó en un vortex vigorosamente para lisar los esferoplastos si el material insoluble no fue visible, se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad, y se usó el sobrenadante en los pasos siguientes. Al término se adicionaron 350 µl de etanol al 70% para homogeneizar el lisado, se mezcló suavemente, se transfirieron 700 µl 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 µl de buffer EW1 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 µl 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 µl de buffer RPE a la columna, se centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 2 minutos para lavar la membrana y 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 µl 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 µg. El ARN es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a ADNc.

6.8.4 REVERSOTRANScripción CON ELIMINACIÓN DE ADN GENÓMICO.

Para realizar el proceso de la reversotranscripción de ARN a ADNc se utilizó el kit Quantitec Revere Transcription (Qiagen; No. de catálogo 205311) con las instrucciones del fabricante de la siguiente manera:

6.8.5 ELIMINACIÓN DEL ADN GENÓMICO.

Se descongelaron los componentes del Kit a temperatura ambiente (15-25°C). Para un volumen final por reacción de 14 microlitros se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 6):

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
gADN Wipeout buffer, 7x	2 microlitros	1x
ARN templado	1 microgramos	-
Agua libre de RNasa	11 microlitros	-
Volumen total	14 microlitros	-

Tabla 6. Componentes de reacción utilizados para eliminar el ADN genómico.

Posteriormente se incubó el tubo a 42^o C por 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo.

6.8.6 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 reacción de 20 microlitros se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 7):

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
Master mix para reversotranscripción		
Quantiscript Reverse Transcriptasa (contiene inhibidor de RNasas)	1 microlitro	
Quantiscript RT buffer, 5x (incluye Mg ²⁺ y dNTPs)	4 microlitros	1x
RT Primer Mix	1 microlitro	-
ARN Templado (obtenido en la reacción anterior)	14 microlitros	-
Volumen total	20 microlitros	-

Tabla 7. Componentes de reacción utilizados para la reversotranscripción.

Al término se mezcló el tubo y se mantuvo en hielo hasta incubarlo a 42°C por 15 minutos. Posteriormente se incubó a 95°C por 3 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. Finalmente se guardó la reacción (ADNc) a -20° C hasta su utilización en PCR en Tiempo Real.

6.8.7 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR EN TIEMPO REAL UTILIZANDO SYBR®GREEN.

Los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión de los genes *EPA*, *AED 1* y *SLN1* de *C. glabrata albicans* fueron los mismos utilizados en la PCR convencional (Tablas 3 y 4, respectivamente). Para el ensayo de PCR en Tiempo Real se utilizó el kit Rotor Gene SYBR®Green PCR (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µl; 10 µl Master Mix SYBR Green, 1 µl del primer Forward (1 µM), 1 µl del primer Reverse (1 µM), 2 µl (20 ng de ADNc) y 11 µl de RNasa-Free-Water. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 5 minutos (activación de la HotStart), 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y la combinación de alineación/extensión de 60°C por 10 segundos

El gen rARNde *C. glabrata* se utilizó como gen de referencia. La cepa de *C. C. glabrata* ATCC 90030 fue utilizada como control positivo.

VII. RESULTADOS

7.1 PACIENTES ESTUDIADOS

Para el desarrollo de este estudio se analizaron 41 cepas de *Candida* spp. aisladas previamente de pacientes no inmunocomprometidos con candidosis oral que acudieron al laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, por estudios de exudados faríngeos. El 54% (n=22) de los pacientes fueron mujeres y el 46% (n=19) hombres (Figura 2). La edad de los pacientes se encontró entre el intervalo de 22-57 años (Figura 3). La frecuencia de edad más alta fue para el rango de 30- 39 años con un 39.0% (n=16), seguida del intervalo de 40-49 años con el 29.2% (n=12), de 20-29 años con 19.5% (n=8). Finalmente la frecuencia más baja fue para el rango de 50-59 años con el 12.2% (n=5).

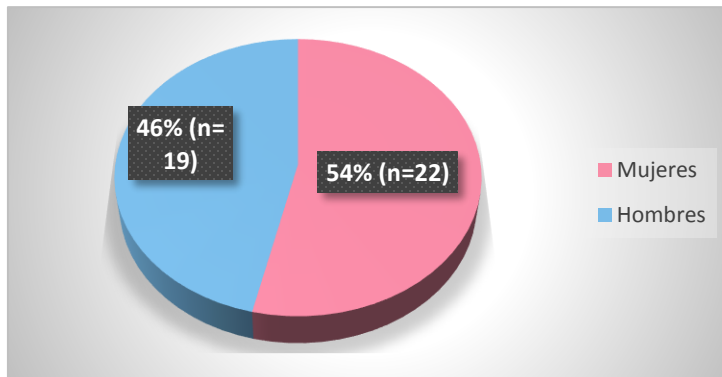


Figura 2. Distribución de los pacientes estudiados por sexo.

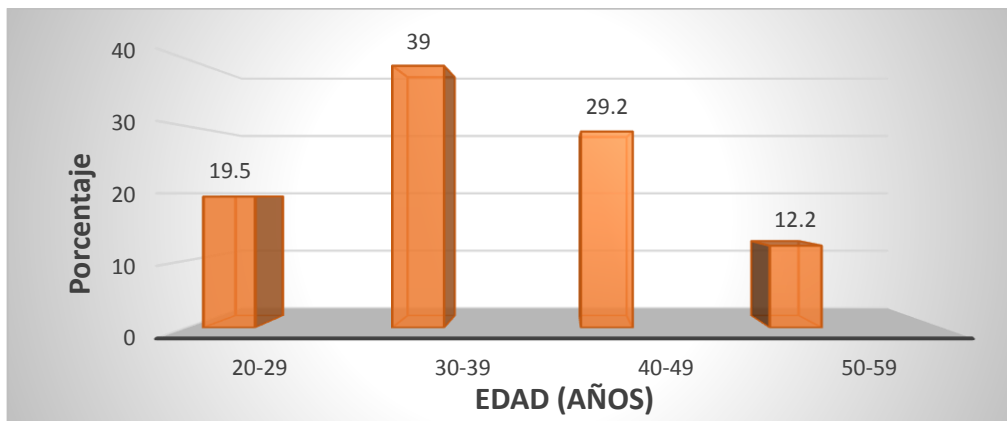


Figura 3. Edad de los pacientes estudiados.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE CANDIDA GLABRATA POR PCR MULTIPLEX.

La identificación de las distintas especies del género *Candida* se realizó por el método de PCR multiplex. El 95.1% (n=39) de las cepas correspondió a la especie de *C. glabrata* y el 2.4% (n=1) a *C. albicans* y *C. tropicalis*, en cada caso (Figuras 4, 5 y 6).

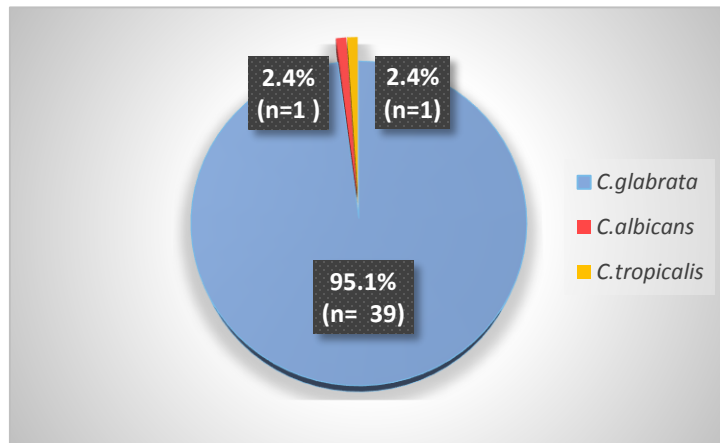


Figura 4. Porcentaje de las especies de *Candida* spp. identificadas en los pacientes.

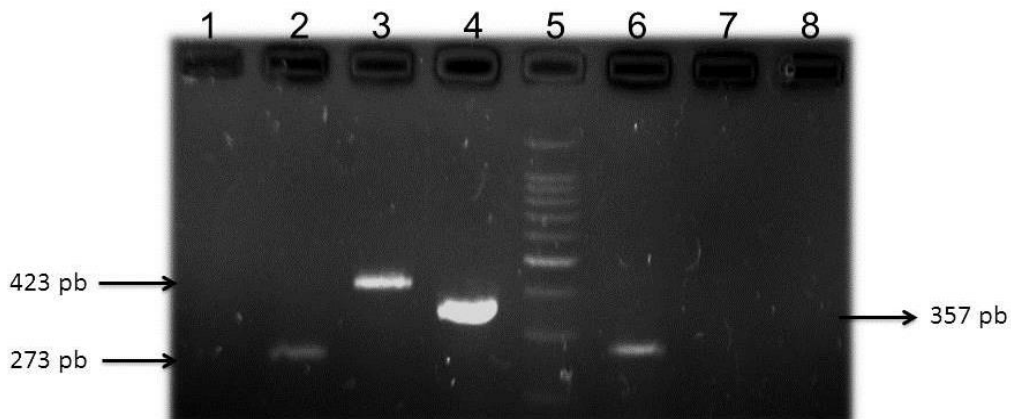


Figura 5. Identificación de las diferentes especies del género *Candida* mediante amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 (internal transcribed spacer) del gen rRNA por PCR multiplex. Líneas 1 y 8, muestras negativas. Línea 2, *C. albicans* (273 pb el amplicón). Línea 3, *C. glabrata* (423 pb el amplicón). Línea 4, *C. tropicalis* (357 pb el amplicón). Línea 5, MWM 100 pb. Línea 6, Control positivo (*C. albicans* ATCC 32254). Línea 7, Control negativo (sin DNA molde).

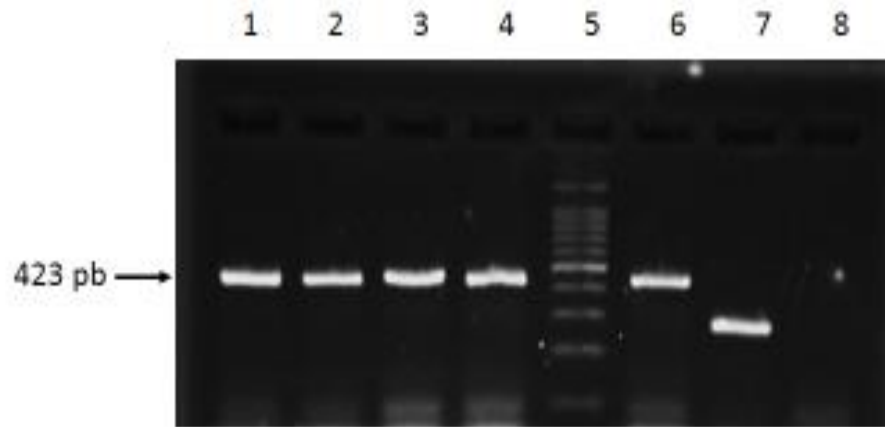


Figura 6. Identificación de *C. glabrata* por PCR multiplex. Líneas 1-4, cepas de *C. glabrata* (423 pb el amplicón). Línea 5, MWM 100pb. Línea 6 Control positivo, *C. glabrata* ATCC 90030 Línea 7 Control positivo, *C. albicans* ATCC 32254 (273 pb el amplicón). Línea 8, Control negativo (sin DNA molde).

7.3 DETECCIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN POR PCR CONVENCIONAL EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.

En la Tabla 8 se aprecia que el 100% (n=39) de las cepas fue portadora del gen *EPA 16* (Figura 13), seguido por *EPA 14* (Figura 12) con el 97.4% (n=38) y *EPA 4/5* (Figura 8) y 6 (Figura 9) con el 94.8% (n=37), en cada caso. Los genes *EPA* menos frecuentes fueron *EPA 2* (Figura 7) y *EPA 12* (Figura 11) con el 79.4% (n=31), mientras que el porcentaje para el gen de adhesión al endotelio *AED1* (Figura 14) fue del 69.2% (n=27).

GEN	NÚM. DE CEPAS	DETECCION EN %
<i>EPA 2</i>	31	79.4%
<i>EPA 4/5</i>	37	94.8 %
<i>EPA 6</i>	37	94.8 %
<i>EPA 8</i>	35	89.7 %
<i>EPA 12</i>	31	79.4 %
<i>EPA 14</i>	38	97.4 %
<i>EPA 16</i>	39	100 %
<i>AED1</i>	27	69.2 %

Tabla 8. Porcentaje de los genes *EPA* en las cepas de *C. glabrata*.

EPA 2

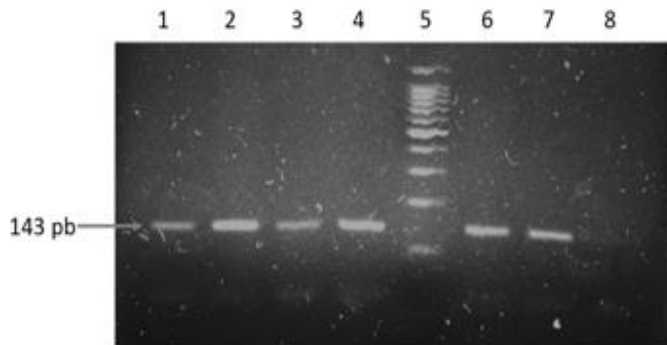


Figura 7. EPA 2: Líneas 1-4 y 6, EPA 2 en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

EPA 4/5

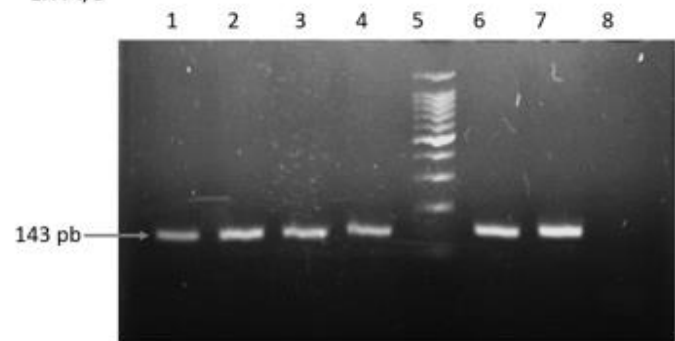


Figura 8. EPA 4/5: Líneas 1-4 y 6, EPA 4/5 en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

EPA 6

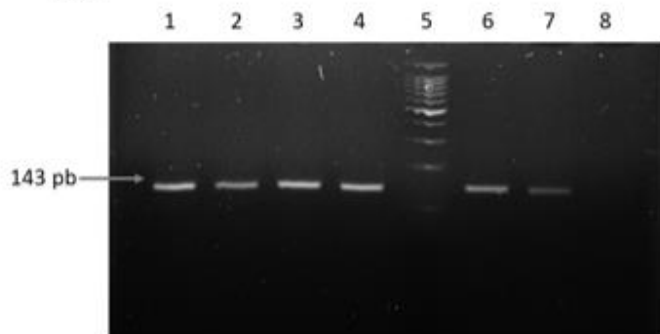


Figura 9. EPA 6: Líneas 1-4 y 6, EPA 6 en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

EPA 8

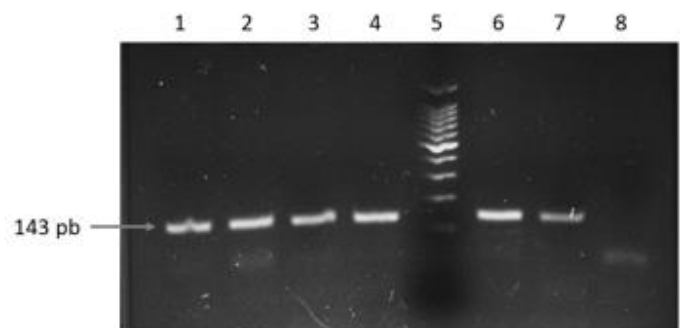


Figura 10. EPA 8: Líneas 1-4 y 6, EPA 8 en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

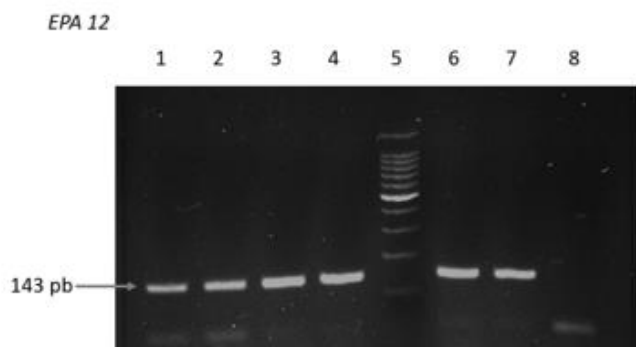


Figura 11. EPA 12: Líneas 1-4 y 6, EPA 12 en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

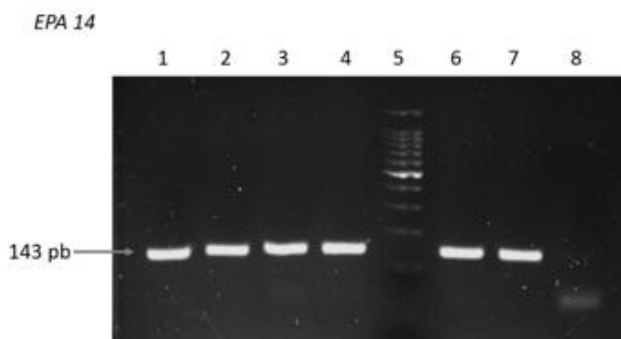


Figura 12. EPA 14: Líneas 1-4 y 6, EPA 14 en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

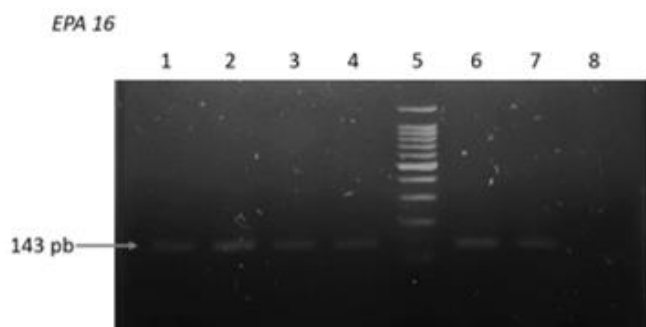


Figura 13. EPA 16: Líneas 1-4 y 6, EPA 16 en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

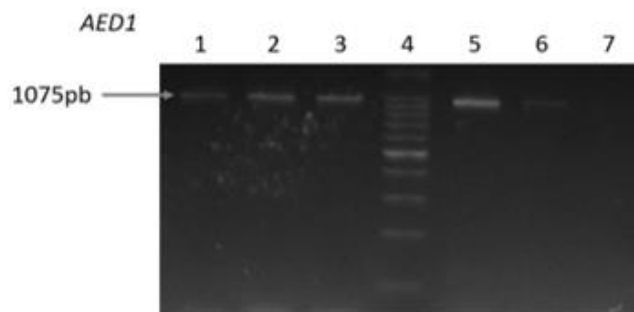


Figura 14. AED1: Líneas 1-3 y 5, AED1 en cepas de *C. glabrata*. Línea 4, MWM 100 pb. Línea 6, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 7 Control negativo (sin DNA molde).

7.4 DETECCIÓN DE LOS GENES SLN1 Y ACT1 POR PCR CONVENCIONAL EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.

En la tabla 9 (Figura 15) se aprecia que el 92.3% (n=36) de las cepas fue portadora del gen *ACT1* y el 79.4% (n=31) del gen *SLN1* (Figura 16).

7.5 DETECCIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA RESISTENCIA A LOS AZOLES POR PCR CONVENCIONAL EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.

En la Tabla 9 se aprecia que el 100% (n=39) de las cepas fue portadora de los genes *CgCDR1* (Figura 17) y *CgSNQ2* (Figura 18) que le confieren a *C. glabrata* resistencia a los antimicóticos.

Gen	N° de Cepas	Detección en %
<i>SLN1</i>	31	79.4
<i>ACT1</i>	36	92.3
<i>CgCDR1</i>	39	100
<i>CgSNQ2</i>	39	100

Tabla 9. Porcentaje de los genes detectados en las cepas de *C. glabrata*.

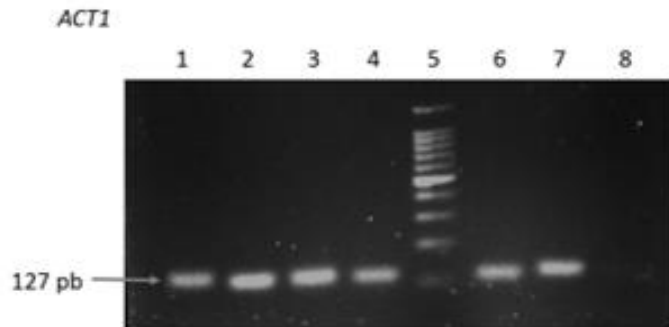


Figura 15. *ACT1*: Líneas 1-4 y 6, *ACT1* en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 7, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 8 Control negativo (sin DNA molde).

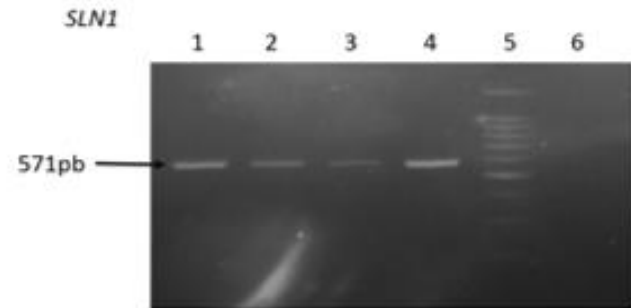


Figura 16. *SLN1*: Líneas 1-3, *ACT1* en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 4, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 6 Control negativo (sin DNA molde).

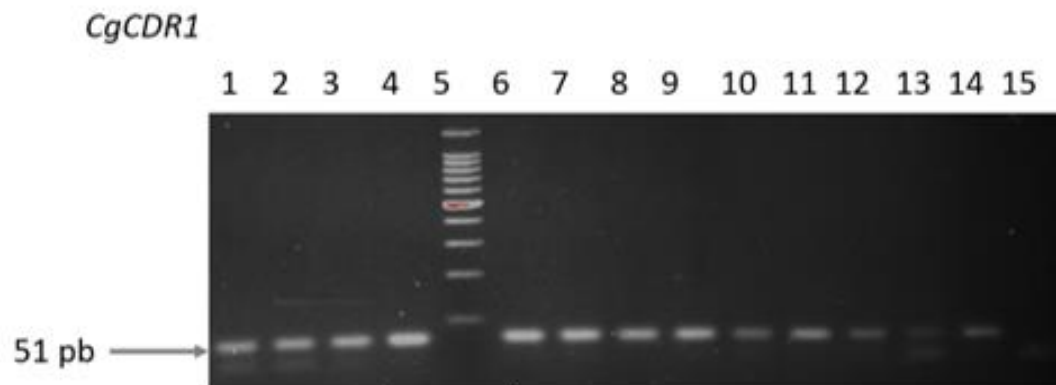


Figura 17. *CgCDR1*: Líneas 1-4 y 6-13, *CgCDR1* en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 14, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 15 Control negativo (sin DNA molde).

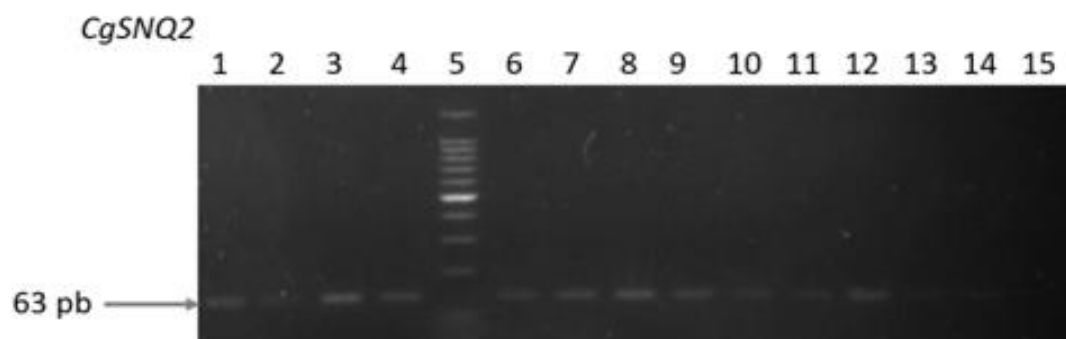


Figura 18. *CgSNQ2*: Líneas 1-4 y 6-13, *CgSNQ2* en cepas de *C. glabrata*. Línea 5, MWM 100 pb. Línea 14, Control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030). Línea 15 Control negativo (sin DNA molde).

7.6 PATRONES DE ASOCIACIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN Y DE RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.

En este estudio se identificaron 21 patrones diferentes de combinaciones de los marcadores de virulencia y de resistencia a los azoles en las cepas de *C. glabrata* (Tabla 9), dentro de los cuales el patrón No. 1 constituido por 12 genes (*EPA 2/ EPA 4/5 / EPA 6/ EPA8/ EPA 12/ EPA 14/ EPA 16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CGSNQ2/CGCDR1*) se encontró en el 33.3% (n=13) de las cepas, mientras que el patrón No. 2 conformado por 11 GENES (*EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ SLN1/ CGSNQ2 / CGCDR1*) se encontró en 3 cepas. Los patrones 3-6 se encontraron conformados por 2 cepas, en cada caso (Tabla 9). Los 15 patrones restantes (7-21) estuvieron representados por una cepa en cada caso.

N° patrón	Genes	N° cepas	%
1	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	13	33.33
2	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	3	7.69
3	<i>EPA2/ EPA4/5/ EPA6/ EPA8/ EPA14/ EPA16/ SLN1/ ACT1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	2	5.72
4	<i>EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2/ CgCDR1</i>	2	5.72
5	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA14/ EPA16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	2	5.72
6	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ AED1/ ACT1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	2	5.72
7	<i>EPA4/5 / EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
8	<i>EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
9	<i>EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
10	<i>EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
11	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6 / EPA12/ EPA14/ EPA16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
12	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
13	<i>EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
14	<i>EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
15	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ AED1/ ACT1/ CgSNQ2/ CgCDR1</i>	1	2.50
16	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA14/ EPA16/ AED1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
17	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
18	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
19	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ AED1/ SLN1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
20	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50
21	<i>EPA2 / EPA4/5 / EPA6/ EPA8/ EPA12/ EPA14/ EPA16/ ACT1/ CgSNQ2 / CgCDR1</i>	1	2.50

Tabla 9. Patrones de asociación de los genotipos en las cepas de *C. glabrata*.

7.7 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE LOS GENES DE ADHESIÓN EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA UTILIZANDO UN MODELO DE INFECCIÓN IN VITRO DE EPITELIO ORAL HUMANO.

Para determinar la expresión de los 12 genes previamente detectados en las cepas de *C.glabrata* se seleccionaron 25 cepas (Patrones 1-7) con presencia de los marcadores de virulencia (Tabla 9), más la cepa de *C. glabrata* ATCC 90030. El 100% (n=26) de las cepas expresó *EPA6* (Tabla 10 y Figuras 8 y 9), *EPA 8* (Figuras 10 y 11), *Epa 12* (Figuras 12 y 13), *Epa14* (Figuras 14 y 15), *AED1* (Figuras 16 y 17) y *SLN1* (Figuras 18 y 19), mientras que el 34.61% (n=9) de las cepas expresó el gen *ACT1* (Tabla 10 y Figuras 20 y 21), mientras que los genes *EPA 2*, *EPA 4/5*, y *EPA 16* no se expresaron.

Gen	N° cepas	Expresión (%)
<i>EPA 6</i>	26	100
<i>EPA 8</i>	26	100
<i>EPA 12</i>	26	100
<i>EPA 14</i>	26	100
<i>AED1</i>	26	100
<i>SLN1</i>	26	100
<i>ACT1</i>	9	34.61

Tabla 10. Expresión de los marcadores de adhesión en las cepas de *C.glabrata* de origen oral.

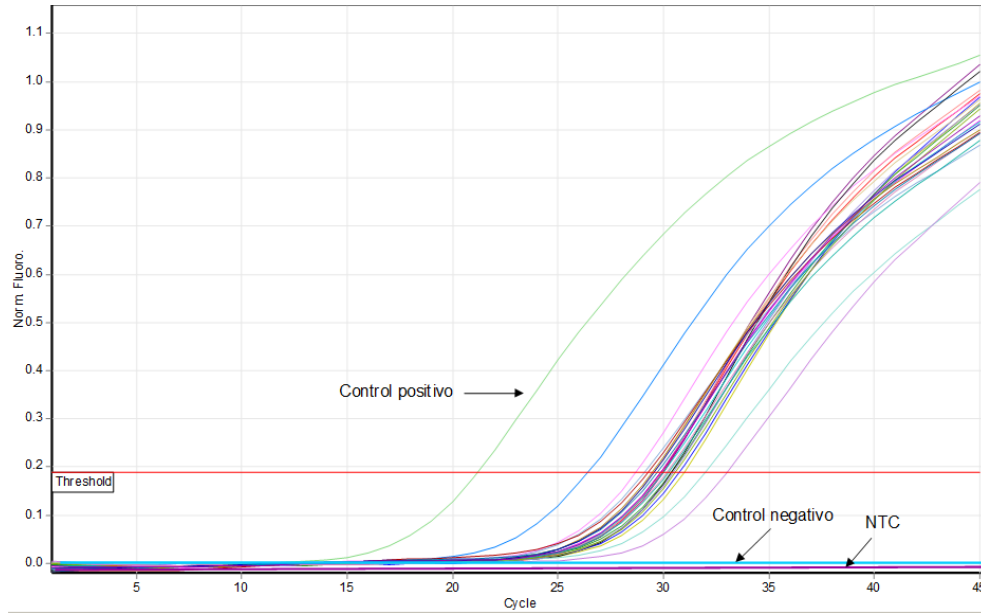


Figura 8. Detección de la expresión de *EPA 6* en las cepas de *C.glabrata* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en un canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo = *C. glabrata* ATCC 90030; Control negativo= Sin cDNA.

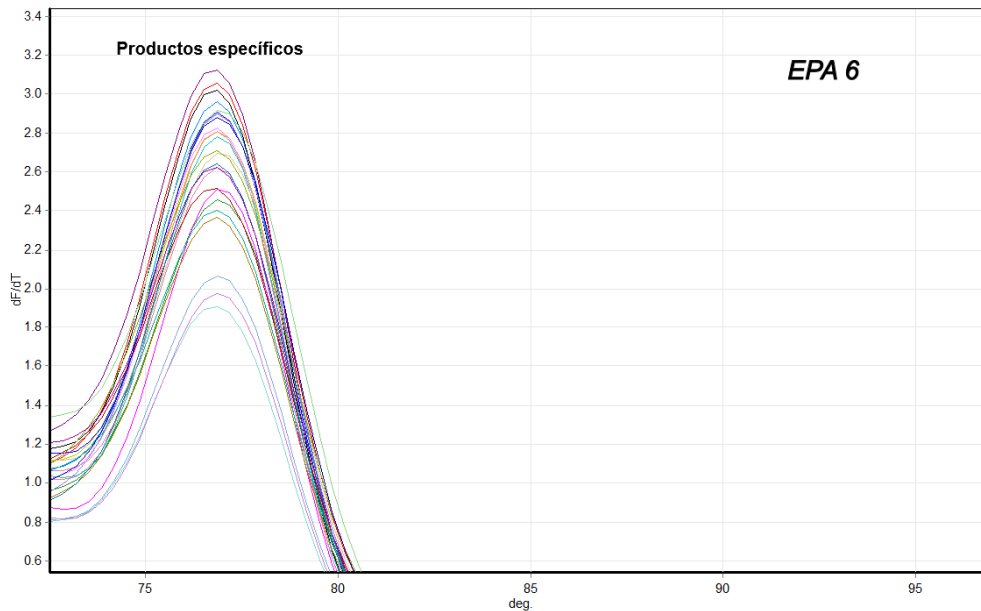


Figura 9. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *EPA 6*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

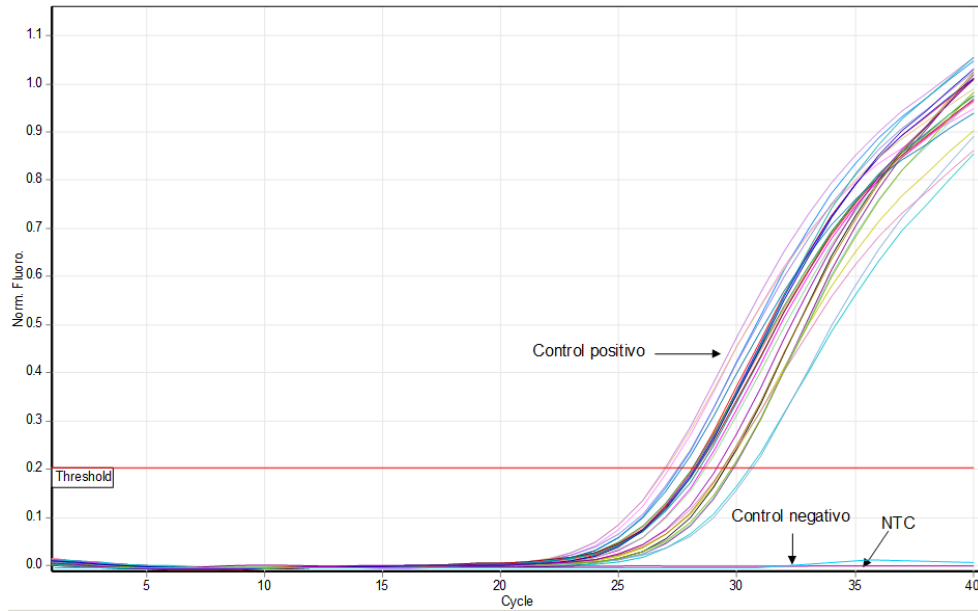


Figura 10. Detección de la expresión de *EPA 8* en las cepas de *C. glabrata* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en un canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo = *C. glabrata* ATCC 90030; Control negativo= Sin cDNA.

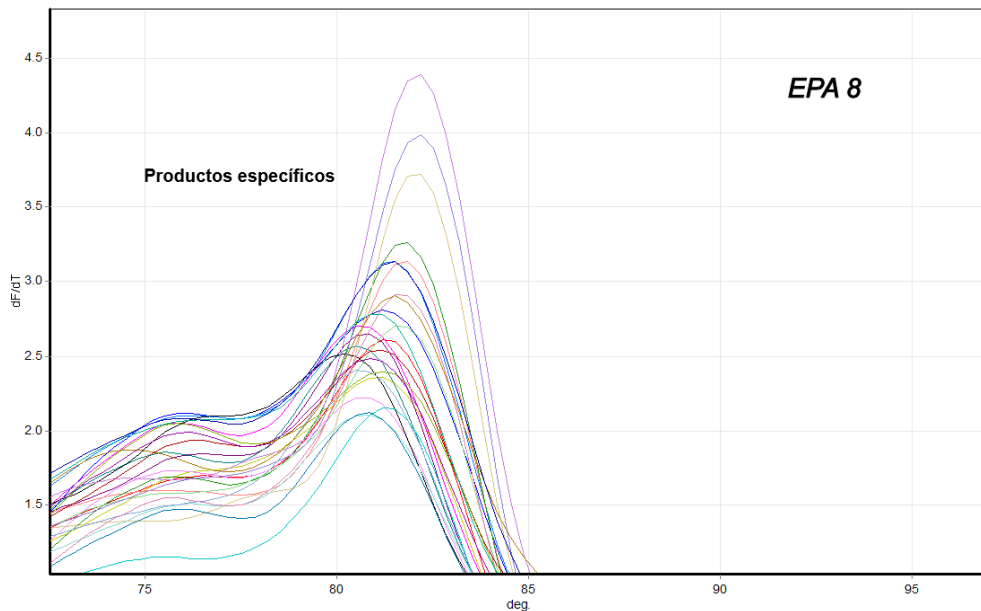


Figura 11. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *EPA 8*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

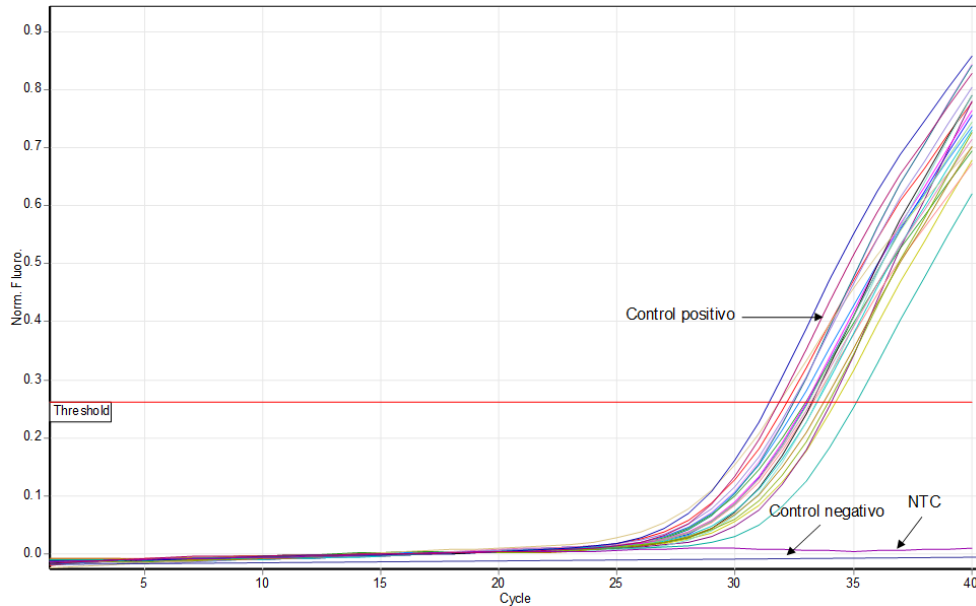


Figura 12. Detección de la expresión de *EPA 12* en las cepas de *C.glabrata* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en un canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo = *C. glabrata* ATCC 90030; Control negativo= Sin cDNA

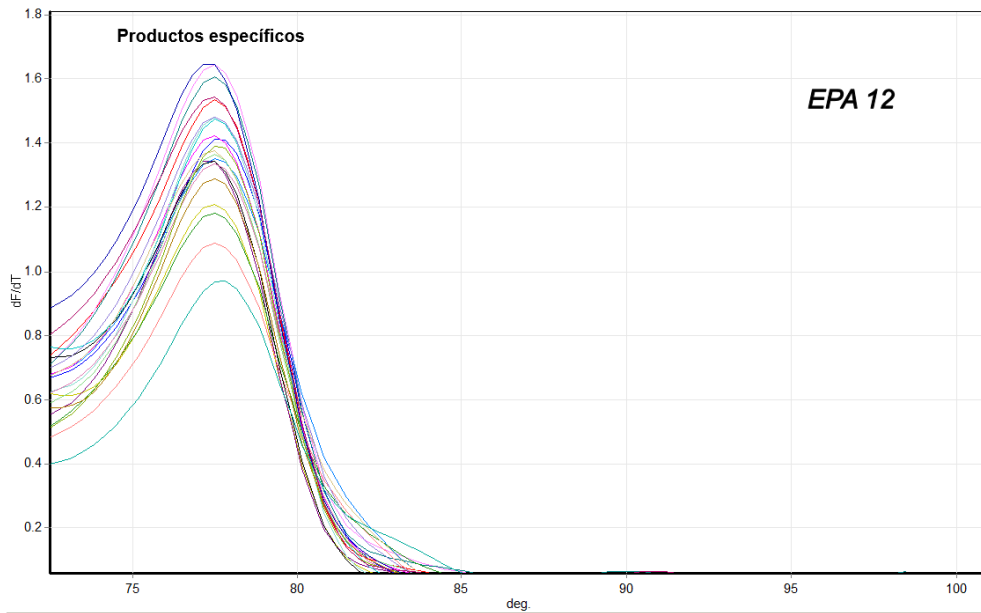


Figura 13. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *EPA12*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

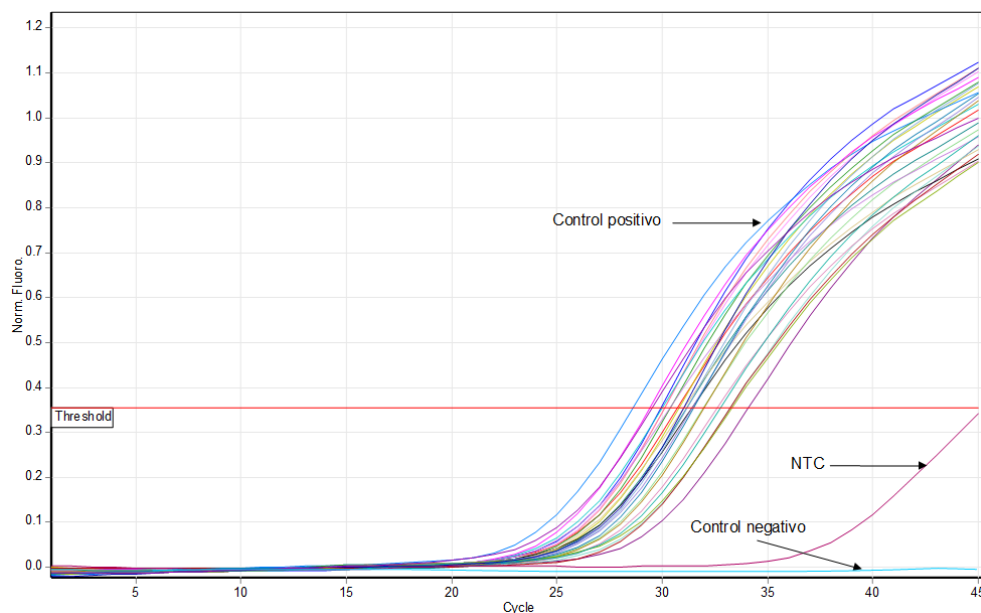


Figura 14. Detección de la expresión de *EPA 14* en las cepas de *C.glabrata* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en un canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo = *C. glabrata* ATCC 90030; Control negativo= Sin cDNA.

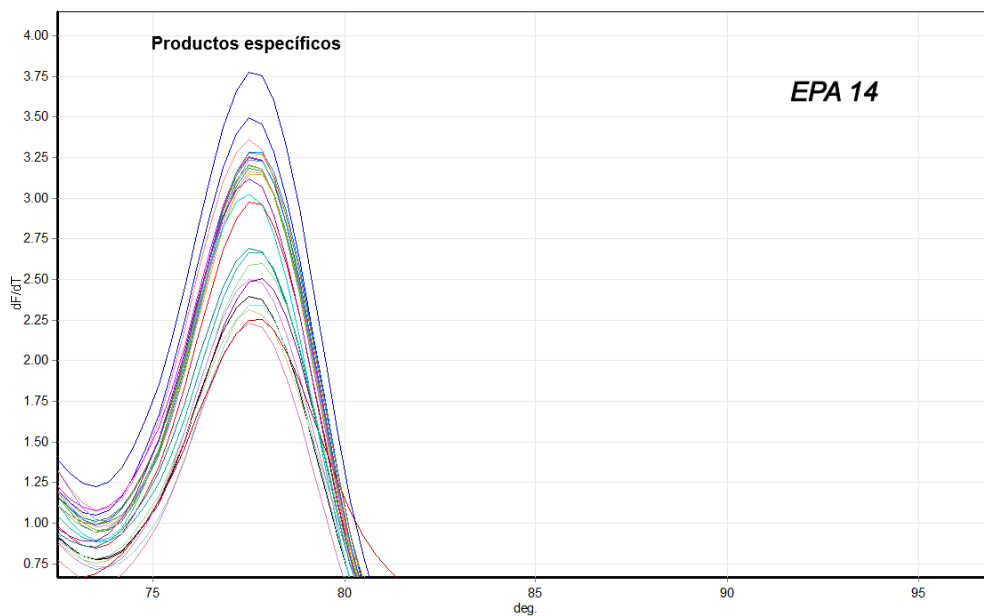


Figura 15. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *EPA 14*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

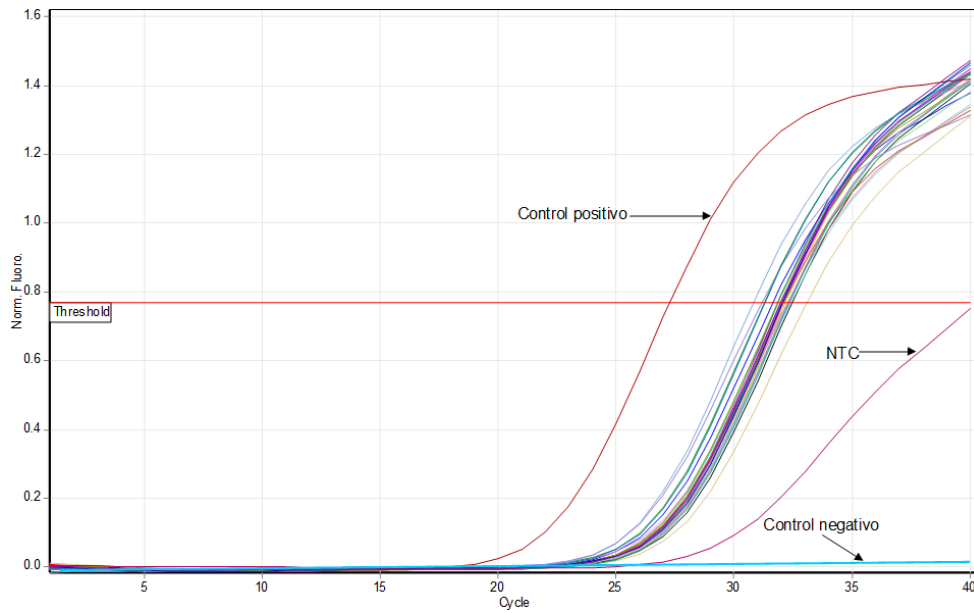


Figura 16. Detección de la expresión de *AED1* en las cepas de *C.glabrata* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en un canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo = *C. glabrata* ATCC 90030; Control negativo= cSin DNA.

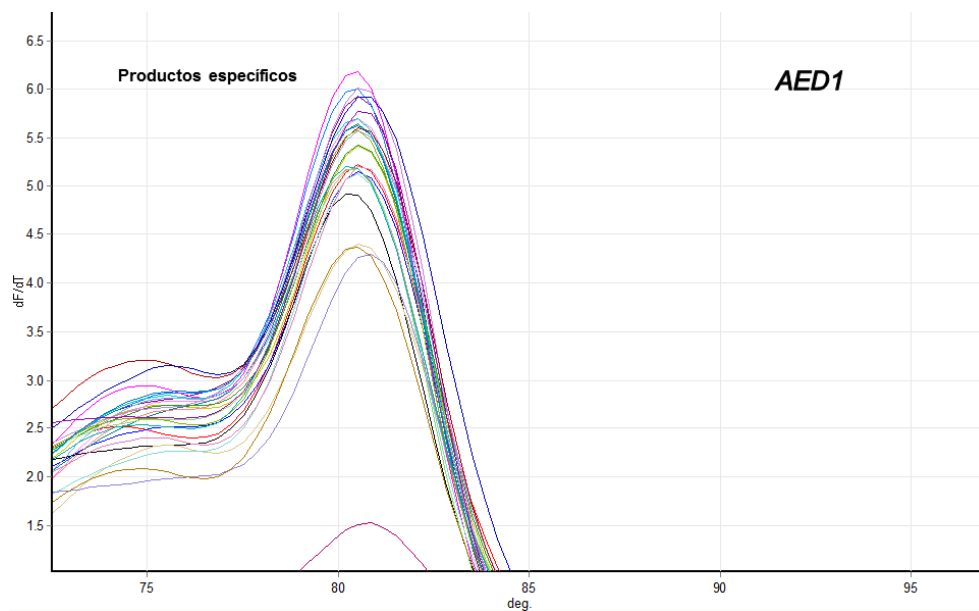


Figura 17. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *AED1*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

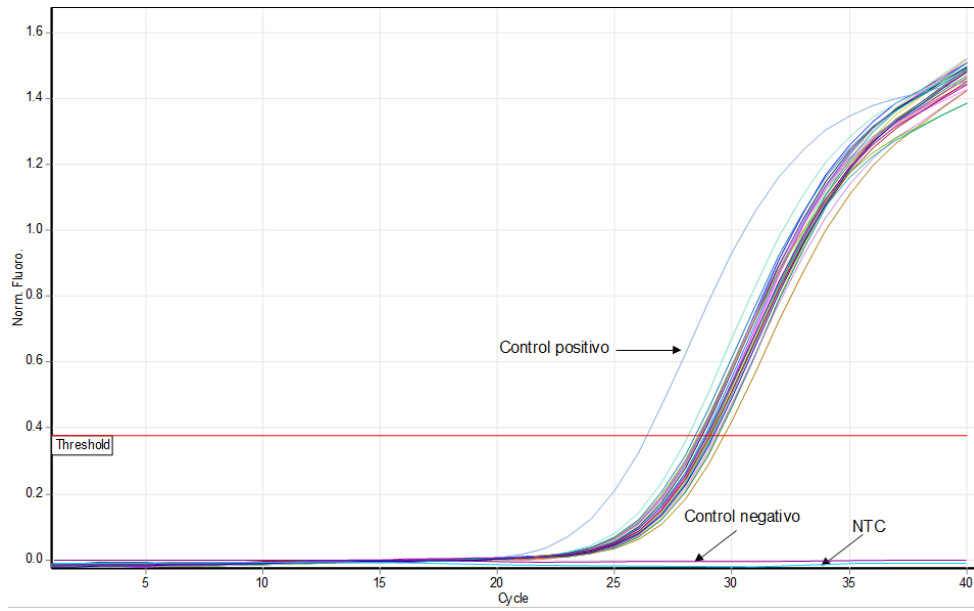


Figura 18. Detección de la expresión de *SLN1* en las cepas de *C. glabrata* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en un canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo = *C. glabrata* ATCC 90030; Control negativo= Sin cDNA.

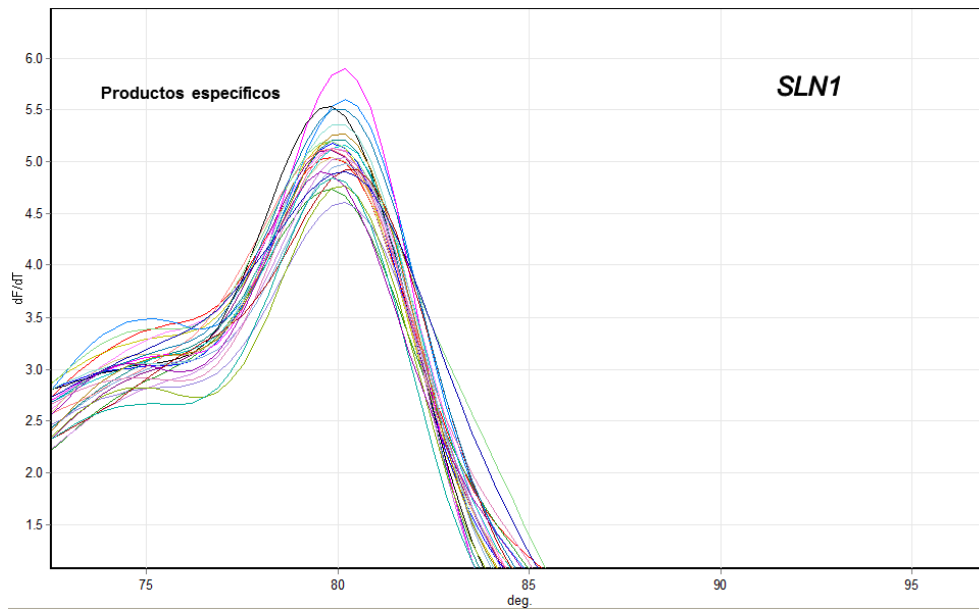


Figura 19. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *SLN 1*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

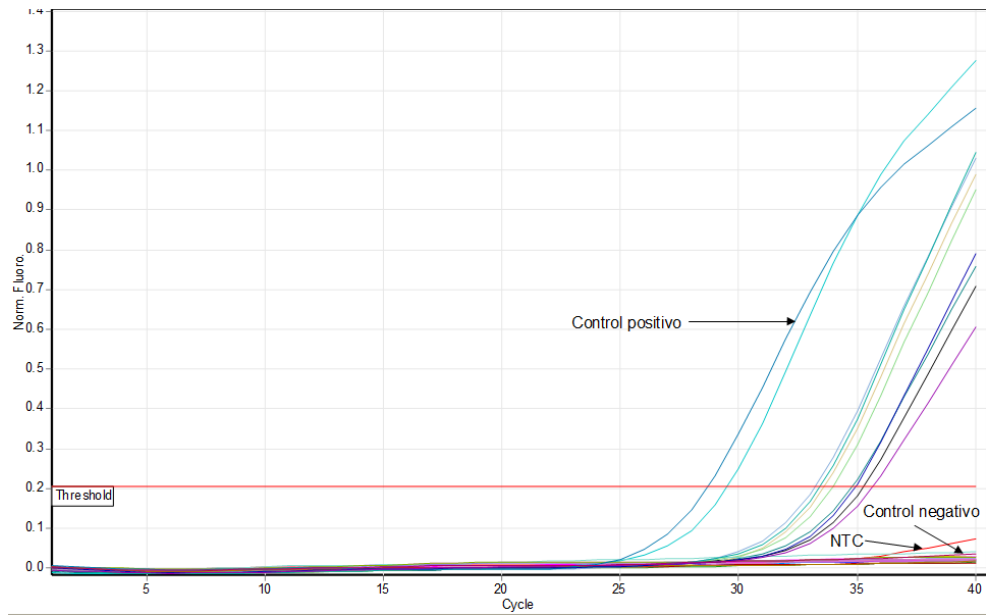


Figura 20. Detección de la expresión de *ACT1* en las cepas de *C.glabrata* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en un canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo = *C. glabrata* ATCC 90030; Control negativo= cSin DNA.

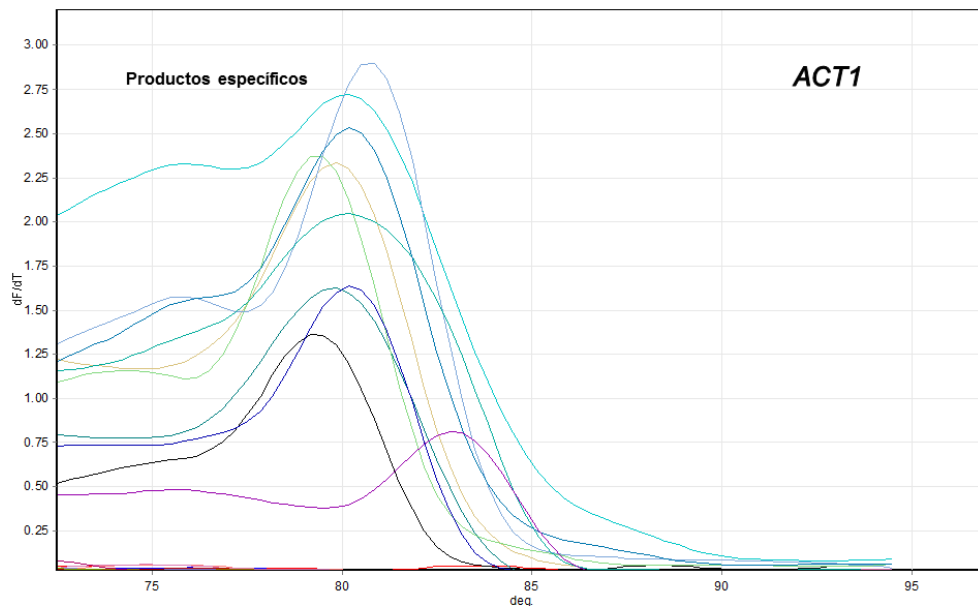


Figura 21. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *ACT1*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

VIII. Discusión

8.1 PACIENTES ESTUDIADOS

En este trabajo se estudiaron 41 cepas de *Candida* spp. aisladas previamente de pacientes no inmunocomprometidos con candidosis orales que acudieron al laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, dentro de las cuales el 95.1% (n=39) de las cepas correspondió a la especie de *C. glabrata* y el 2.4% (n=1) a *C. albicans* y *C. tropicalis*, en cada caso (Figuras 4, 5 y 6). Las candidosis orales en el pasado eran ocasionadas frecuentemente por *Candida albicans* (Rueda *et al.*, 2008). Sin embargo en los últimos años se han incrementado las candidosis orales por *C. glabrata*, así como en otros tipos candidosis, por ejemplo en un estudio realizado en pacientes con cáncer, en donde el 76.8% correspondió a mujeres con promedio de edad de 48.2 año y el 23.2% a hombres con promedio de edad de 57.2 años, se encontró que el 10% de los pacientes fue infectado por *C. glabrata* se (Rueda *et al.*, 2008).

En otro estudio realizado en pacientes con vulvovaginitis aguda en pacientes con edades entre los 17 y 52 años, se obtuvo que el 17.4% fue causado por candidosis de las cuales las especies que se aislaron fueron, *Candida albicans* 76.8%, *Candida glabrata* 15.9%, *Candida parapsilosis* 2.9%, *Candida tropicalis* 1.5% y *Candida krusei* 0.7%. observandose una alta incidencia de *C. glabrata* y un 6.2% de candidosis fue producido por *C. albicans* y *C. glabrata*. La mayor parte de las cepas de *C. albicans* fueron sensibles a fluconazol (CMI90 = 0,5 µg/ml), mientras que por el contrario *C. glabrata* fueron mucho menos sensibles (CMI50 y CMI90 = 32 µg/ml). Esto justifica los frecuentes fracasos terapéuticos del fluconazol en las infecciones vaginales por *C. glabrata*. (Buscemi *et al.*, 2004.)

8.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.

En este trabajo se encontró que el 100% (n=39) de las cepas fue portadora del gen *EPA 16*, seguido por *EPA 14* con el 97.4% (n=38), *EPA 4/5* y *6* con el 94.8% (n=37), en cada caso y *EPA 2* y *EPA 12* con el 79.4% (n=31) (Tablas 8). A diferencia de *Candida albicans* en donde la adhesión a las células epiteliales se encuentra conferida por una familia de 8 genes *ALS* (agglutinin-like-secuence), en *Candida glabrata* los genes de adhesión a las células epiteliales se encuentran codificados por la familia de 20 genes *EPA* (Epithelial Adhesin), que incluye al principal gen de adhesión *EPA1* y al gen *EPA 6* que participa en la formación de la biopelícula. Esta no solamente le permite al hongo evadir la respuesta inmune del hospedero, sino también lo protege contra la actividad de los antimicóticos (Kaur, *et al.*, 2005; Maestre, *et al.*, 2012). Recientemente se ha tratado de elucidar la participación de los genes de la familia *EPA*, en donde se ha descrito que la adhesina *Epa1* participa principalmente en la adhesión a las células epiteliales, mientras que los otros genes que codifican para las otras adhesinas se encuentran bajo el silenciamiento de la región subtelomérica (De Las Peñas, *et al.*, 2003). Se ha descrito que *EPA1* media en un 95% la adherencia a cultivos de células epiteliales *in vitro*, la delección de *EPA1* no resulta significativa para el fenotipo de virulencia en modelos en ratón de candidosis sistémica o vaginal (Cormack *et al.* 1999), por lo que probablemente los otros genes *EPA*, entre los cuales se encuentran *EPA2*, *4-5*, *6*, *12* *14* y *15* (Tablas 8) podrían encontrarse involucrados en la adhesión celular.

En este estudio se describió que el gen *AED1* (Adherence to Endothelial cells) fue identificado en 27 cepas con un 69.2% (Tabla 8. Fig. 14) y el gen *SLN1* (histidin cinasa) fue identificado en el 79.4% con 31 cepas (Tabla 9. Fig. 16). Se ha descrito recientemente que el gen *AED1* es muy importante para la adhesión de las células endoteliales en humanos, lo que constituye un importante factor de patogenicidad para las infecciones sistémicas ocasionadas por *C. glabrata* (Desai *et al.*, 2011). Por otro lado el gen *SLN1* que codifica para las proteínas histidín cinasas se encuentran relacionadas directamente con la

diferenciación celular, sensibilidad o resistencia a antifúngicos y la expresión de los principales factores de virulencia. Lo que sugiere que la patogenicidad de muchos hongos puede ser regulada por el sistema de señales de transducción de dos componentes (Yoshimi *et al.*, 2005; Bahn *et al.*, 2006; Viaud *et al.*, 2006).

8.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS

DE C. GLABRATA

En este trabajo se encontró que el 100% (n=39) de las cepas de *C. glabrata* fue portadora de los genes *CgSNQ2* y *CgCDR1* que codifican para la resistencia a los azoles (Tabla 9. Figuras 17 y 18). Estos genes son responsables de codificar para las bombas de eflujo ABC (ATP-binding cassette) que generan energía para expulsar del citoplasma al exterior los azoles, lo que nos hace suponer que esta elevada resistencia a los antimicóticos podría encontrarse relacionada directamente con la cronicidad de las candidosis orales en los pacientes no inmunocomprometido (Caudle, *et al.* 2011). La elevada frecuencia de los genes que confieren la resistencia a los azoles encontrada en las cepas de *C. glabrata* analizadas podría deberse al uso indiscriminado de estos antifúngicos por largos periodos de tiempo, en cuyo caso las cepas se han seleccionado como resistentes a estos agentes.

8.4 PATRONES DE ASOCIACIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN Y DE RESISTENCIA A LOS AZOLES EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA.

En este estudio se identificaron 21 patrones diferentes de combinaciones de los marcadores de virulencia y de resistencia a los azoles en las cepas de *C. glabrata* (Tabla 9), dentro de los cuales el patrón No. 1 constituido por 12 genes (*EPA 2/ EPA 4/5 / EPA 6/ EPA8/ EPA 12/ EPA 14/ EPA 16/ AED1/ ACT1/ SLN1/ CGSNQ2/CGCDR1*) fue el más frecuente (n=13) entre las cepas, (Tabla 9). Estos resultados hacen suponer que las cepas de *C. glabrata* podrían presentar diferentes perfiles de expresión durante la patogenésis de las candidosis orales, por lo que que las cepas portadoras de más marcadores genéticos aunados a los genes de resistencia a los azoles podrían ser más virulentas para los

pacientes, en cuyo caso las infecciones podrían volverse crónicas debido a la probable expresión de los genes que codifican para la resistencia a los antimicóticos.

8.5 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ADHESIÓN EN LAS CEPAS DE C. GLABRATA UTILIZANDO UN MODELO IN VITRO DE EPITELIO ORAL HUMANO.

Para la expresión de los genotipos de adhesión en las cepas de *C. glabrata* se seleccionaron 25 cepas (Patrones 1-7) con presencia de los marcadores de virulencia (Tabla 9) más el control positivo (*C. glabrata* ATCC 90030) y posteriormente se realizó la infección del epitelio oral. El 100% (n=26) de las cepas expresó *EPA6* (Tabla 10 y Figuras 8 y 9), *EPA 8* (Figuras 10 y 11), *Epa 12* (Figuras 12 y 13), *Epa14* (Figuras 14 y 15), *AED1* (Figuras 16 y 17) y *SLN1* (Figuras 18 y 19), mientras que los genes *EPA2* y *4/5* no se expresaron en ninguna de las cepas de *C. glabrata*. Se ha descrito que el gen *EPA1* es transcrito en la fase estacionaria de crecimiento, como resultado las células de *C. glabrata* en esta fase no son adherentes a una variedad de células epiteliales (Castaño *et al.*, 2005). También se ha descrito que *EPA1* es el principal gen que se expresa *in vitro*, mientras que otros genes como *EPA4/5* son transcripcionalmente reprimidos. Esta represión es debido a silenciamiento subtelomérico (De las peñas *et al.*, 2003). Estos datos demuestran el porqué en este estudio no se expresaron los genes *EPA4/5*, sin embargo la expresión de los genes *EPA8*, *12*, *14* y *16* refleja que estos genes son necesarios para la adhesión después de las 48 horas de infección del epitelio oral, en cuyo caso *EPA1* que es el principal gen de adhesión únicamente se expresa en la fase exponencial.

Los resultados obtenidos en este estudio también demostraron que el gen *AED1* que codifica para el fenotipo de adhesión a células endoteliales, también fue capaz de expresarse durante la infección *in vitro* a las células epiteliales, mientras que el gen *SLN1* también fue necesario para la infección del epitelio, en cuyo caso se ha demostrado que este gen se encuentra involucrado para la expresión de otros factores de virulencia (Yoshimi *et al.*, 2005).

IX. CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas aisladas de las infecciones orales de los pacientes no inmunocomprometidos correspondió a la especie de *C. glabrata*, seguido por *C. albicans* y *C. tropicalis*.
2. Los genotipos de adhesión *EPA 4/5*, *6 14* y *16* fueron identificados en la mayoría de las cepas de *C. glabrata*.
3. En este estudio se identificaron diferentes combinaciones de los marcadores de virulencia asociados a los genes que codifican la resistencia a los azoles en las cepas de *C. glabrata*.
4. Todas las cepas de *C. glabrata* fueron capaces de expresar los genotipos *EPA6*, *EPA 8*, *Epa 12*, *Epa14*, *AED1* y *SLN1* durante la infección *in vitro* del epitelio oral humano.
5. Los resultados encontrados en este estudio reflejaron que la cronicidad de las candidosis orales de los pacientes estudiados podría deberse a la presencia de los diferentes marcadores de virulencia asociados a los genes que codifican para la resistencia a los azoles en las cepas de *C. glabrata*.

X. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, J. (2002). Candidiasis orales. *Rev Iberoamer Micol.* 19:17-21.
- Almirante, B., Rodriguez, D., Park, B.J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A.M., Almela, M., Mensa, J., Sanchez, F., Ayats, J., Gimenez, M., Saballs, P., Fridkin, S.K., Morgan, J., Rodriguez- Tudela, J.L., Warnock, D.W., and Pahissa, A. (2005). Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* 43:1829-1835.
- Bahn, Y.S., Kojima, K., Cox, G.M. and Heitman, J. (2006). A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell.* 17: 3122–3135.
- Bialkova, A., Subík, J. *Biology of the Pathogenic Yeast Candida glabrata.* (2006). *Folia Microbiol.* 51, 3-20.
- Buscemi, L., Arechavala, A., Negroni, R. (2004). Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev. Iberoam. Micol* 21: 177- 181.
- Castaño, I., Jung Pan, S., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., Comark, B. (2005). Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol. Mricobiol.* 55: 1246-1258.

- Castaño, I., Cormack, B., De Las Peñas, A. (2006). Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*. Rev. Lat. Microbiol. 48: 66-69.
- Castrillón, R.L, Palma, R.A, Padilla, D. C. (2005). Factores de virulencia en *Candida sp.* Derm Rev Mex. 49 (2):12-27.
- Cui HL, Wei DL. (2007). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartylproteinase in human vulvovaginal candidiasis. Mycoses. 50:383–390.
- Cormack, B.P., Ghori, N., and Falkow, S. (1999). An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. Science. 285:578–582.
- De Las Peñas, A., Jung Pan,S., Alder, J., Cregg, R., Cormack,B. (2003). Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. Genes & Development. 17:2245-2258.
- Desai, C., Mavrianos, J., Chauhan, N. (2011). *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for Adherence to Human Endothelial Cells. FEMS Yeast Res. 11 (7):595-601.
- García, R., Araiza, J., Basurto, E., Bonifaz, A. (2009). *Candida glabrata*: un oportunistae emergente en vulvovaginitis. Cirujia y cirujanos. 77:455-460.
- Green, C.B., Cheng, G., Chandra, J., Mukherjee, P., Ghannoum, M.A., Hoyer, L.L. (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.

- Hazen, K.C. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:462-478.
- Loaiza, L.M. (2008). Expresión de genes *SAP* (codificantes de aspartil proteasas) de *Candida dubliniensis* en diferentes condiciones fisiológicas y durante la infección experimental de queratinocitos. (Tesis doctoral). Escuela nacional de ciencias biológicas. México. 75 p.
- López, C., Giro, L., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L. (2005). Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev. Argent. Microbiol.* 37: 16-21.
- Luo, G., Mitchel, G.T. (2002). Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2860-2865.
- Maestre, M., Diderrich, R., Stefan, M., Eulenburg, G., Kalugin, V., Brückner, Peta Keller, Rupp, S., Ulrich, H., Oliver. (2012). Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. Biomedical Research Center, Department of Chemistry, Germany. *PNAS.* 109:1864 – 1869.
- Miyazaki, H., Miyazaki, Y., Geber, A., Parkinson, T., Hitchcock, C., Falconer, D.J., Ward, D.J., Marsden, K., Bennett, J.E. (1998). Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDH1*, in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1695–1701.
- Mohamed, K. (2014). Genome dynamics and virulence in the human pathogen *Candida Glabrata*. Lund University. Suecia. 67 p.
- Monroy, R.P. 1993. *Microbiología medica*. Ed. Mosby year book. España. 341-344.

- Muller, H., Thierry, A., Coppée, J. Y., Gouyette, C., Hennequin, C., Sismeiro, O., Talla, E., Dujon, B., Fairhead, C. (2009). Genomic polymorphism in the population of *Candida glabrata*: gene copy-number variation and chromosomal translocations. *Fungal Genet Biol.* 46:264-76.
- Pemán, J., Aparisi, N., García, C., Gobernado, M. (2004). Utilidad de una nueva técnica comercial, GLABRATA RTT, para la identificación rápida de *Candida glabrata*. *Rev. Iberoam. Micol.* 21:82-84.
- Redding, S. W., Kirkpatrick, W.R., Saville, S., Coco, B.J., White, W., Fothergill, A., Rinaldi, M., Eng, T., Patterson, T.F., Lopez-Ribot, J. (2003). Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation. *J. Clin. Microbiol.* 41:619–622.
- Reuss, O., A. Vik, R. Kolter, and J. Morschhauser. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene.* 341:119–127.
- Rueda, F., Hernández, S.E. (2008). Prevalencia de *Candida albicans* aislada de la cavidad oral de pacientes con cancer. *Rev. Odont. Lat.* 0:38-41.
- Samaranayake, Y., Cheung, B., Wang, Y., Yau, J., Yeung, K., Samaranayake, L. (2013) Fluconazole resistance in *Candida glabrata* is associated with increased bud formation and metallothionein production. *J. Med. Microbiol.* 62:303–318.
- Sanglard, D., F. Ischer, D. Calabrese, P. A. Majcherczyk, and J. Bille. (1999). The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2753–2765.

- Sherman, D., Durrens, P., Beyne, E., Nokolski, M., Souciet, J.L. (2004). Génolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeast. *Nucl. Acids Res.* 32:D315- D318.
- Thakur, J. K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S. J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D.P., Gulshan, K., Li, D.K., Mylonakis, E., Struhl, K., Moye-Rowley, W.S., Cormack, B.P., Wagner, G., Näär, A.M. (2008). A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature.* 452:604–609.
- Torelli, R., Posteraro, B., Ferrari, S., La Sorda, M., Fadda, G., Sanglard, D., Sanguinetti, M. (2008). The ATP-binding cassette transporter-encoding gene *CgSNQ2* is contributing to the *CgPDR1*-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* 68:186–201.
- Vermitsky, J. P., Earhart, K.D., Smith, W.L., Homayouni, R., Edlind, T.D., Rogers, P.D. (2006). Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol. Microbiol.* 61:704–722.
- Vermitsky, J. P., Edlind T. D. (2004). Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3773–3781.
- Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J.S., Le Pecheur, P., Kunduru, A.R., Leroux, P. and Legendre, L. (2006). A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 19: 1042–1050.
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y. and Tanaka, C. (2005). Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryot. Cell*, 4:1820–1828.