



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA

TESIS

Expresión de genes de la familia *ALS* en cepas clínicas de
Candida albicans

Que para obtener el título de

Biólogo

Presenta:

Eduardo Delgado Armenta

Laboratorio de Análisis Clínicos CUSI Iztacala

Director de Tesis: Dr. Eric Monroy Pérez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023





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.

Índice

ÍNDICE	1
RESUMEN	2
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
ORIGEN DE LAS CEPAS	15
RESIEMBRA DE LAS CEPAS Y EXTRACCIÓN DE DNA	15
DETECCIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)	15
DETECCIÓN DE LOS GENES <i>ALS</i> POR PCR	16
CULTIVO DEL HONGO PARA LA EXTRACCIÓN DE RNAM DE BACTERIAS Y LEVADURAS	18
EXTRACCIÓN DE RNA DE LAS CEPAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	18
REVERSOTRANSCRIPCIÓN	20
EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL	20
RESULTADOS	23
ORIGEN DE LAS CEPAS	23
IDENTIFICACIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> POR PCR	25
FRECUENCIA DE LOS GENES DE ADHESIÓN	25
EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL	31
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS	43
REFERENCIAS	44

Resumen

Candida albicans es un hongo oportunista frecuentemente asociado con candidiasis oral o cérvico-vaginal. La patogenicidad de *C. albicans* se debe a los numerosos genes de virulencia que posee, entre los que se encuentran los genes de adhesión (*ALS* y *HWPI*), de proteinasas aspartil secretoras (*SAP*), lipasas (*LIP*) y fosfolipasas (*PLB*). Debido a que existe muy poca información en nuestro país sobre la patogénesis de *C. albicans* asociada a la candidiasis oral y cérvico-vaginal, el objetivo de este trabajo fue analizar la frecuencia de los genes de virulencia que codifican para la familia de genes de adhesión *ALS1-ALS7* y *ALS9* en cepas periodontales y cérvico-vaginales de *C. albicans*. Se analizó un grupo de cepas de *C. albicans* previamente aisladas de pacientes con enfermedad periodontal (n=3) y de mujeres con infecciones cérvico-vaginales (n=2) atendidos en la clínica de Endoperiodontología y en el laboratorio de Análisis Clínicos, respectivamente, ambos de la FES Iztacala. La identificación de *C. albicans* se realizó mediante la amplificación de la región ITS 1 y 2 (internal transcribed spacers) del gen *rRNA* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los genes de adhesión de la familia *ALS* se detectaron por PCR de punto final. Para promover la expresión de los genes *ALS*, las cepas de *C. albicans* fueron crecidas en los caldos BHI (infusión cerebro corazón) y de soya tripticaseína (ST) a 37°C x 24 h en agitación constante. El RNA bacteriano fue extraído utilizando el equipo robotizado QIAcube alimentado con el Kit comercial RNeasy (QIAGEN). La síntesis de la cadena complementaria del DNA se realizó utilizando el Kit Reverse Transcription QuantiTect (QIAGEN). La determinación de la expresión de los genes de virulencia fue realizada por PCR de tiempo real. El 100% de las cepas cérvico-vaginales (n=2) y periodontales (n=3) de *C. albicans* fue portadora de los genes *ALS1*, *ALS7* y *ALS9*, mientras que la frecuencia de *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6* fue del 80% (n=4) en las cepas de ambos diagnósticos. Para las cepas aisladas de pacientes con gingivitis (n=1), Periodontitis moderada (n=1) y P. crónica (n=1) el 100% (n=3) de las cepas expresó los genes *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, y *ALS9*. El gen *ALS3* fue expresado en el 100% de las cepas con gingivitis (n=1) y P. crónica (n=1), mientras que en la cepa de P. moderada *ALS3* solo se expresó bajo crecimiento en BH. El 100 % de las cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (n=2) indistintamente del crecimiento en BHI o ST expresó *ALS1*, mientras que el 50% (n=1) expresó los genes *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, y *ALS9*. Los resultados demostraron la amplia distribución y expresión de los genes de adhesión *ALS* en las cepas de *C. albicans* periodontales y cérvico-vaginales, lo que podría incrementar la cronicidad y/o agudeza de las infecciones periodontales o infecciones cérvico-vaginales de los pacientes

Introducción

Levaduras de interés médico

Las levaduras son organismos eucariotas que se les considera hongos unicelulares; se pueden encontrar en forma ovalada, cilíndrica o elíptica, y pueden llegar a tener un diámetro de entre 4 o 5 micras (Suárez-Machín *et al.*, 2016). Algunas levaduras son consideradas de importancia médica, como la especie *Candida albicans* de la división Ascomiceta que frecuentemente es causante de patologías que afectan a los humanos (Zhang and Wiederhold, 2016). A pesar de que hay más de 1000 millones de personas afectadas cada año por patógenos fúngicos son relativamente poco estudiados en comparación con otros patógenos como las bacterias, la importancia de estudiar y comprender los mecanismos por los cuales infectan y afectan la salud pública mundial es de gran importancia para diagnosticar, prevenir y tratar las enfermedades causadas por infecciones fúngicas (Denning, 2017; Fisher *et al.*, 2020).

Características de *C. albicans*

Candida albicans se caracteriza por ser un hongo comensal en forma de levadura o hifa (Figura 1) que forma parte de la microbiota normal de las mucosas del humano, (Mayer *et al.*, 2013). La morfología celular que presenta *C. albicans* en forma de levadura es redonda u ovalada, las células hifales son delgadas en forma de tubo, y miden de 4 a 6 μm ; por otro lado, es considerado como el patógeno fúngico más frecuente en humanos (Noble *et al.*, 2017; Walsh *et al.*, 2018; Arkowitz and Bassilana, 2019). *Candida albicans* crece bien en cultivos con agar glucosado de Sabouroud, las colonias presentan coloración blanca o cremosa, además pueden crecer en agar chocolate, presentando una morfología más estrellada (Cooke *et al.*, 2002).

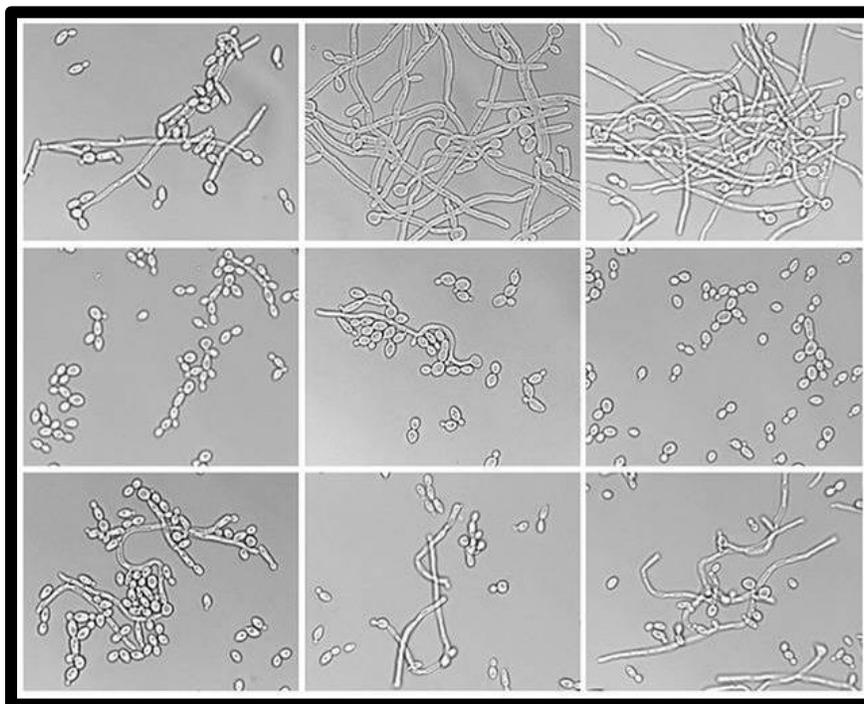


Figura 1. Morfología de *Candida albicans* presenta formas de levadura e hifa

Patología

Las infecciones fúngicas son una amenaza creciente para la salud pública mundial. Actualmente, hay más de seis millones de especies de hongos en todo el mundo, pero se sabe que menos del 1% infecta a los humanos. La mayoría de las infecciones por hongos son superficiales y afectan el cabello, la piel y las uñas, pero algunas especies son capaces de causar enfermedades potencialmente mortales (Strickland and Shi, 2021). *Candida albicans* es el hongo patógeno más frecuente en humanos; que representa una fuente importante de enfermedades y genera altos costos de atención médica en todo el mundo (Dadar *et al.*, 2018). En determinadas circunstancias puede actuar como patógeno oportunista y causar infecciones superficiales en la piel, hasta infecciones sistémicas (candidiasis sistémica) que pueden ser mortales, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (cáncer, SIDA, diabetes mellitus, entre otras enfermedades) (Mayer *et al.*, 2013). Como comensal *C. albicans* coloniza el tracto gastrointestinal, la boca, la piel y el tracto reproductivo femenino de al menos el 70% de personas sanas (Noble *et al.*, 2017). Además, *C. albicans* desarrolla resistencia a ciertos fármacos antifúngicos lo que hace de importancia su estudio, especialmente su actividad fúngica, así como sus factores de virulencia (Zida *et al.*, 2017). Generalmente las infecciones por *C. albicans* ocasionan candidiasis orofaríngea y candidiasis vulvovaginal (Peters *et al.*, 2020). Además, *C. albicans* también se ha asociado a infecciones periodontales (Monroy-Pérez *et al.*, 2020a).

Candidiasis vulvovaginal

La candidiasis vulvovaginal es una vaginitis comúnmente causada por *Candida albicans* (Figura 2), los síntomas son inespecíficos lo que dificulta un diagnóstico preciso, pero comúnmente se incluyen flujo vaginal, dolor, irritación y ardor (Willems *et al.*, 2020; Dermendzhiev *et al.*, 2022), la candidiasis vulvovaginal es relativamente común: el 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio en su vida y aproximadamente el 5% desarrolla candidiasis vulvovaginal recurrente (Boahen *et al.*, 2022). En México, aproximadamente el 30% de las consultas ginecológicas que se brindan se debe a infecciones vaginales (Salud, 2018).

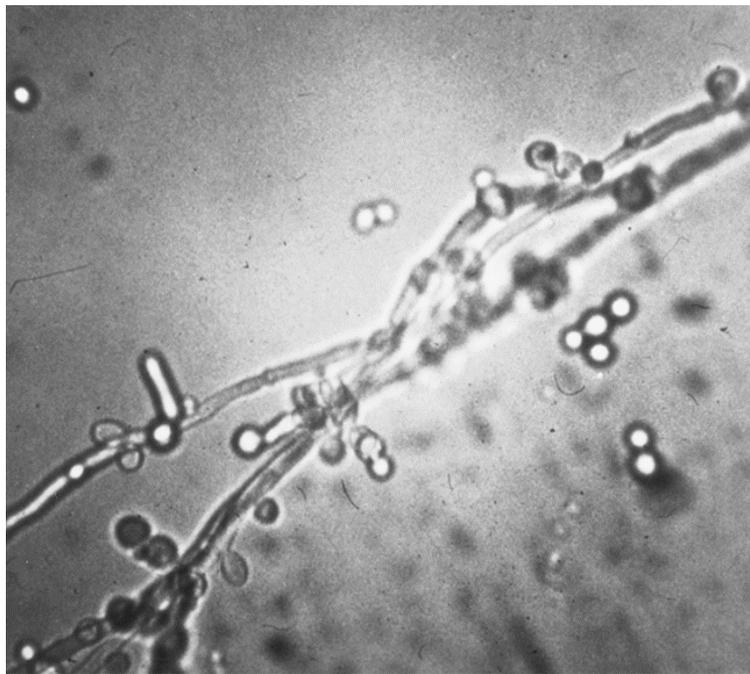


Figura 2. Levaduras, hifas y pseudohifas de *C. albicans* en un caso de candidiasis vulvovaginal (Nyirjesy, 2001)

Infecciones periodontales asociados a *C. albicans*

Las infecciones periodontales son un conjunto de enfermedades localizadas en la encía y en las estructuras de soporte del diente (ligamento y hueso alveolar), principalmente son producidas por microorganismos provenientes de la placa subgingival (Bascones Martínez and Figuero Ruiz, 2005). En la cavidad bucal las levaduras colonizan la lengua, el paladar, la mucosa oral y la saliva, hay estudios que sugieren que *Candida albicans* tiene una participación importante en el desarrollo de la periodontitis (Figura 3) (Ardila, 2014; Jabri *et*

al., 2021). Se ha reportado que *C. albicans* puede contribuir al desarrollo de enfermedades periodontales en pacientes inmunocomprometidos (Pg, 2002).

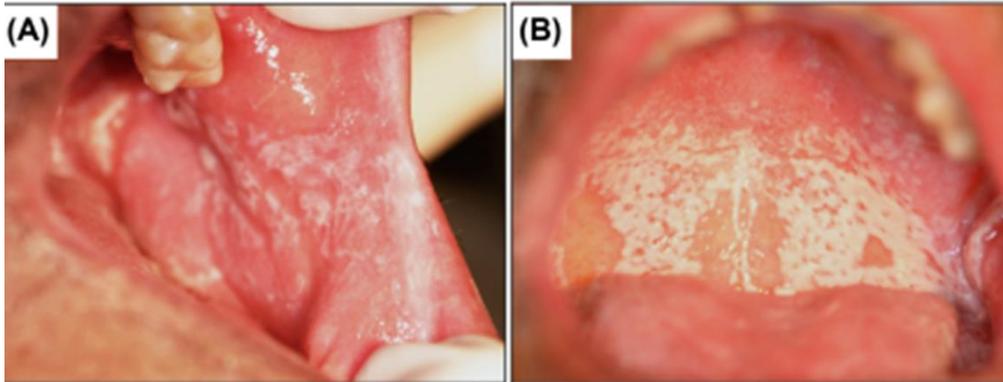


Figura 3. Candidiasis oral (A) Infección en mucosa. (B) Infección en paladar. Modificado de (Tsui *et al.*, 2016).

Factores de virulencia de *C. albicans*

C. albicans posee una gran variedad de factores de virulencia que le proporcionan la adherencia a los tejidos del huésped y a los dispositivos médicos; mediante la formación de biopelículas, la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares (p. ej., proteasas, lipasas, fosfolipasas, esterases y fosfatasas), toxinas, receptores del complemento y cambios fenotípicos (Singh *et al.*, 2021)

El gran número de factores de virulencia que posee *C. albicans* le permiten invadir las células del hospedero, principalmente proteínas y enzimas de la membrana que desempeñan una función fundamental en la adhesión y la internalización de las células (Lim *et al.*, 2021). *C. albicans* posee un factor que le permite cambiar de morfología de levadura a hifa, de esta forma facilita la infección a las células (Berman, 2006). Las hifas verdaderas regularmente se observan en infecciones, ya que facilitan la invasión dentro de las células del hospedero, mientras que las formas de levadura se encuentran en superficies abióticas formando una biopelícula (Figura 4) (Sudbery *et al.*, 2004; Liu and Filler, 2011).

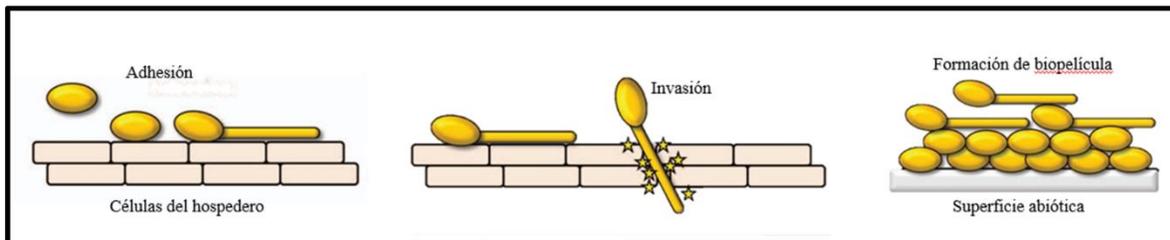


Figura 4. Adhesión de *Candida albicans* en células del hospedero y formación de biopelícula en superficies abióticas (Mayer *et al.*, 2013).

Genes *ALS*

La adhesión de *Candida albicans* es esencial para la colonización estable en las superficies de las células del hospedero, por lo que *C. albicans* posee factores de virulencia que facilitan su adhesión, uno de ellos son las adhesinas formadas por un complejo de glucoproteínas que permiten la adhesión a las células del hospedero. Entre las principales adhesinas se encuentran las proteínas Als (*agglutinin like sequence*; por sus siglas en Inglés) (Hoyer, 2001) (Lombardi *et al.*, 2019). Las proteínas Als facilitan la adherencia de *Candida albicans* a las mucosas del hospedero y a superficies abióticas. Las proteínas Als son codificadas por la familia de genes *ALS* (Mayer *et al.*, 2013). Los genes *ALS* (*agglutinin like sequence*) fueron descritos por primera vez hace más de dos décadas (Hoyer *et al.*, 1995). Se han descrito ocho genes *ALS* que codifican para proteínas de adherencia; *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7*, *ALS9* (Zhao *et al.*, 2007a). En un principio se consideraba la existencia del gen *ALS8*, pero posteriormente se confirmó que era una repetición del gen *ALS3* (Zhao *et al.*, 2004). Los genes *ALS* se caracterizan por tener una estructura similar que consta de tres dominios: un dominio 5' con aproximadamente 1299-1308 pb; es el dominio más conservado en toda la familia de genes *ALS*, un dominio central de repeticiones en tándem con 108 pb y un dominio 3' que es más variable en cuanto a longitud y secuencia a lo largo de la familia (Figura 5) (Hoyer, 2001). Los genes *ALS* se expresan de manera diferente dependiendo las condiciones en que se encuentra *Candida albicans* (Hoyer y Cota, 2016), sin embargo, hay genes que se expresan en la mayoría de procesos de adherencia a células endoteliales humanas y células epiteliales orales cuando se encuentra en forma de hifa (Nobbs *et al.*, 2010; Liu and Filler, 2011). Se han hecho estudios donde cepas de *Candida albicans* mutantes (sin el gen *ALS3*) pierden adherencia significativamente en infecciones a células de mamíferos (Zhao *et al.*, 2004; Lyon *et al.*, 2010). La regulación diferencial y variabilidad de los genes *ALS* son un ejemplo de los mecanismos de patogenicidad que posee *Candida albicans* (Hoyer, 2001).

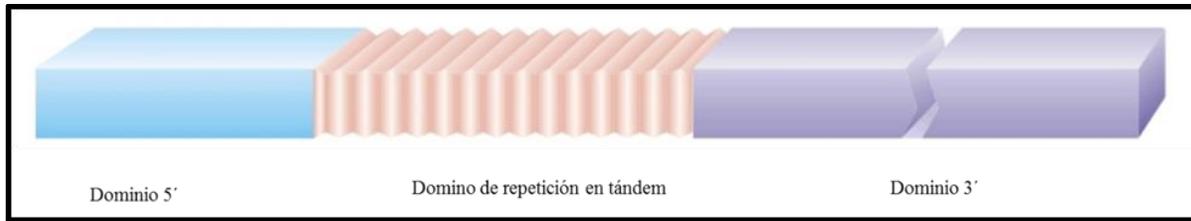


Figura 5. Estructura de los tres dominios en la familia de genes *ALS* (Hoyer, 2001).

Otros factores de virulencia de *C. albicans*

Además de las adhesinas als; *C. albicans* posee otros factores de virulencia importantes para la patogenicidad, principalmente aspartil proteasas que son enzimas hidrolíticas, el pleomorfismo y otras adhesinas para la adherencia (Staniszewska *et al.*, 2012). Entre los más importantes están:

HWPI

La proteína Hwp1 (*Hyphal wall protein 1*) es necesaria para el desarrollo de las hifas y la adhesión en *C. albicans* (Sharkey *et al.*, 2005), el gen *HWPI* se expresa en la forma hifal y se encuentra en la pared celular de *C. albicans* (Staab *et al.*, 2013), participa en la adherencia a las células del hospedero y en la formación de biopelículas (Oh *et al.*, 2022). La poca expresión del gen *HWPI* puede alterar la virulencia de *C. albicans* ya que es una adhesina importante en la adhesión del hongo (Harun *et al.*, 2013).

SAP

Las aspartil proteinasas secretadas (*SAP*) son enzimas hidrolíticas que degradan proteínas y facilitan la invasión en células del hospedero, también participan en la degradación de células del sistema inmune y en la formación de biopelículas de *C. albicans*. Las *SAP* son codificadas por una familia de 10 genes (*SAP 1-10*) (Naglik *et al.*, 2003; Dhanasekaran *et al.*, 2022).

Fosfolipasas y Lipasas

C. albicans posee lipasas y fosfolipasas extracelulares que le permiten degradar fosfolípidos y lípidos de las células del hospedero; destruyendo o alterando las membranas celulares facilitando la virulencia (Fu *et al.*, 1997; Ghannoum, 1998, 2000; Park *et al.*, 2013).

Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan enlaces éster de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos libres, *C. albicans* posee fosfolipasas para facilitar la virulencia; penetrando y alterando las membranas celulares del hospedero (Ghannoum, 2000). *C. albicans* codifica fosfolipasas tipo A, B, C y D, sin embargo, las de tipo B son las que tienen mayor participación en la virulencia, estas enzimas corresponden a la familia de genes *PLB* (Knechtle *et al.*, 2005; Theiss *et al.*, 2006).

Lipasas

Las lipasas son enzimas capaces de degradar lípidos, los microorganismos patógenos pueden utilizar estas enzimas para interactuar con el sistema inmune, facilitar la adhesión u obtener nutrientes proporcionando fuente de carbono o energía, la familia de genes *LIP* codifica para lipasas en *C. albicans* (Hube *et al.*, 2000).

Biopelículas (*Biofilms*)

C. albicans frecuentemente se ha asociado a la formación de biopelículas (Figura 6) donde las adhesinas y el cambio morfológico juegan un papel importante en su formación (Wall *et al.*, 2019). Las biopelículas son conjuntos de comunidades microbianas organizadas, pueden ser formaciones de diferentes especies, el uso de biopelículas proporciona protección y supervivencia en superficies biológicas o artificiales mediante tasas de crecimiento reducidas, regulación en expresión génica y la formación de una sustancia polimérica extracelular (Donlan, 2002). Las biopelículas pueden ser un problema para el tratamiento ya que *C. albicans* puede tener mayor resistencia a fármacos específicos, además, las biopelículas se encuentran frecuentemente en dispositivos médicos los cuales pueden ser permanentes y aumentan la morbilidad de una infección y provocando una fuente importante de nuevas infecciones por *C. albicans* (Tsui *et al.*, 2016; Winter *et al.*, 2016).

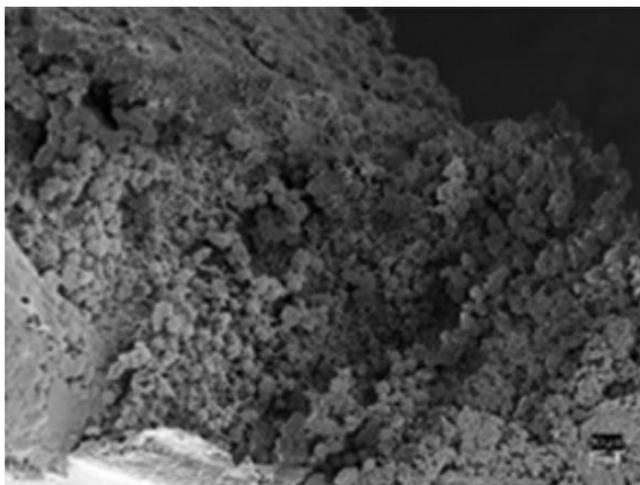


Figura 6. Catéter con biopelícula de *C. albicans* por microscopia electrónica de barrido.
Modificado de (Winter *et al.*, 2016)

Resistencia a fármacos

En cuanto a la resistencia de fármacos *C. albicans* puede presentar resistencia a los azoles, que son los principales fármacos para tratar infecciones causadas por hongos (Gao *et al.*,

2018; Pristov and Ghannoum, 2019). Los azoles son fármacos especiales que evitan o alteran la síntesis de ergosterol que es un componente necesario para las membranas celulares de los hongos (Ferreira *et al.*, 2005). En *C. albicans* la enzima Erg11 se encuentra involucrada en la biosíntesis de ergosterol y se ha reportado que las mutaciones en el gen (*ERG11*) que codifica a la enzima produce resistencia al fluconazol (Henry *et al.*, 2000; Prakash *et al.*, 2020).

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis y colegas en 1983, permite la amplificación de una secuencia de DNA, mediante la producción de millones de copias de la secuencia que se desea amplificar. Para que se lleve a cabo la reacción es necesario un DNA molde, los cebadores específicos de la secuencia que se desea amplificar, desoxirribonucleótidos que se utilizan como sustrato para generar las cadenas nuevas a partir del molde, la enzima DNA polimerasa termoestable como la enzima aislada de *Thermus aquaticus* y un amortiguador que estabiliza la reacción (Zhu *et al.*, 2020). El proceso ocurre a través de tres reacciones repetidas cíclicamente estas son: desnaturalización del DNA, hibridación de cebadores y elongación, cada reacción tiene su respectivo tiempo y temperatura (Figura 7) (Gupta, 2019).

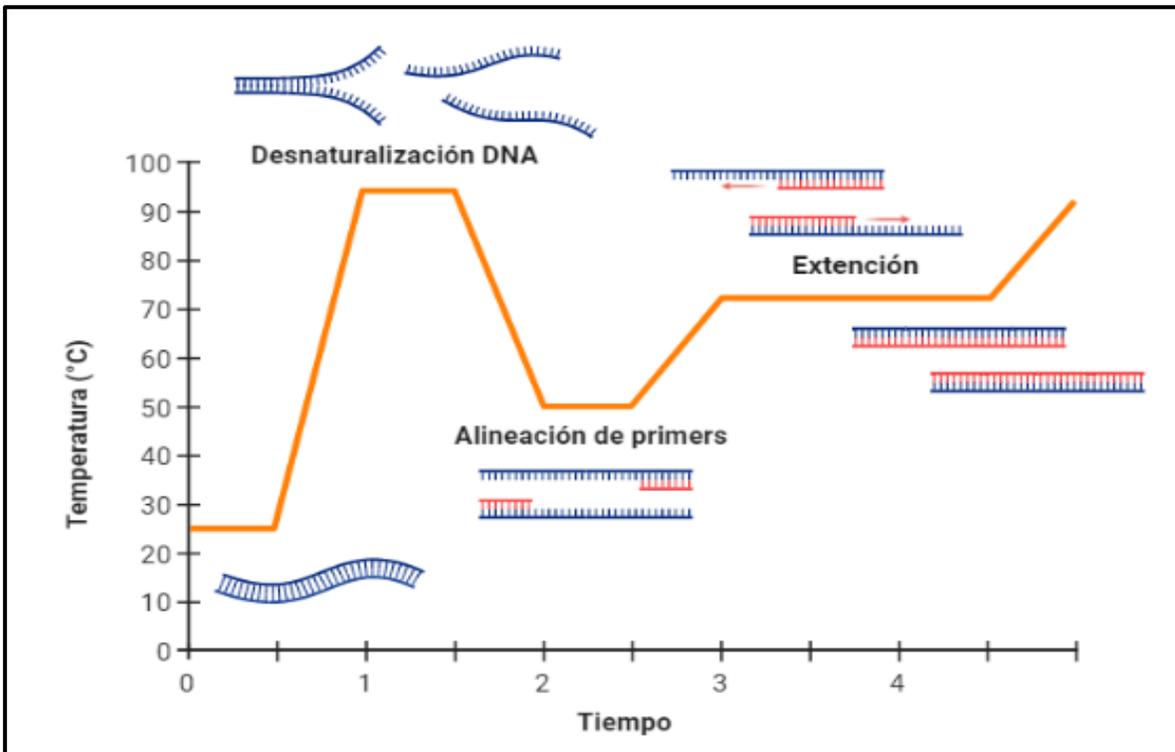


Figura 7. Proceso de las tres reacciones necesarias para la PCR El proceso de PCR cuando se tiene una muestra de RNA se ajusta con otra enzima, la transcriptasa inversa, extraída del genoma de algunos virus. Las transcriptasas inversas son DNA polimerasas, pero tienen la capacidad de utilizar una cadena de RNA como molde para sintetizar DNA, sin embargo, la eficacia catalítica no soporta múltiples ciclos, por lo que las transcriptasas inversas solo se utilizan al principio de las reacciones especialmente en las RT-PCR (PCR de reverso transcripción) donde se busca amplificar y detectar la expresión de un gen mediante el RNAm, una vez sintetizada una hebra de DNA se podrá realizar la PCR (Green and Sambrook, 2018a).

PCR en Tiempo Real

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, la amplificación del ADN se controla mediante la detección y cuantificación de una señal indicadora fluorescente, que aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción. El indicador fluorescente se excita con la luz de la máquina de PCR en tiempo real, un termociclador que detecta fluorescencia. Al registrar la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, la PCR se puede monitorear durante la fase exponencial cuando el primer aumento significativo en la cantidad de producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de DNA (Green and Sambrook, 2018b).

Antecedentes

- ° En 2012 se realizó un estudio, en donde se analizaron 50 cepas de *C. albicans* de las cuales se realizó PCR para determinar el genotipo de la familia de genes *ALS* y PCR en tiempo real para determinar la expresión de los mismos (Monroy-Pérez *et al.*, 2012).
- ° En 2019 se analizó la actividad de la adhesina *Alsp1* codificada por el gen *ALS1*, el estudio consistió en evaluar la actividad de unión de una adhesina *Alsp1* normal, y una adhesina *Alsp1* con una mutación en el gen *ALS1*, los resultados mostraron una mayor unión de la adhesina *Alsp1* normal en comparación con la adhesina *Alsp1* mutada, por lo que se concluyó que *ALS1* es importante para unión célula-célula (Ho *et al.*, 2019).
- ° En 2020 se analizaron 80 cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal, de las cuales realizó PCR en tiempo real a genes de adhesión de los cuales se analizaron *ALS1* y *ALS3* (Monroy-Pérez *et al.*, 2020).
- ° En 2020 se llevó a cabo un estudio en donde se analizaron 114 cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones por candidiasis vulvovaginal, a las cuales se les realizó PCR en tiempo real para determinar la frecuencia de los genes *ALS2* y *ALS9*, el estudio se realizó con respecto al inicio de los síntomas de la enfermedad por la información de los pacientes. El gen *ALS9* tuvo un decremento en las muestras de la enfermedad ya avanzada, mientras que en las muestras de pacientes con síntomas recientes la frecuencia de *ALS9* fue mayor. Se concluyó que el gen *ALS9* puede tener una participación importante al inicio de infecciones vulvovaginales por *C. albicans* (Razavi *et al.*, 2020).
- ° En 2021 se realizó un estudio en donde se determinó la expresión de genes *ALS* en cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes mujeres con candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) y asintomática (CVVAS), los resultados mostraron que las cepas aisladas de mujeres con CVVR tuvieron una gran cantidad de genes *ALS* expresados en comparación con las cepas de CVVAS, concluyeron que la infección de CVVR expresó significativamente genes importantes para la invasión (Ps *et al.*, 2021).
- ° En 2021 se diseñó un modelo de 144 cepas mutantes de *C. albicans* con genes de adhesión bloqueados, incluidos algunos genes *ALS* (*ALS1*, *ALS3*, *ALS5*, *ALS7*, *ALS9*), utilizaron un modelo para infectar a una especie de nematodo *Caenorhabditis elegans* con las cepas de *C. albicans* mutantes y de tipo salvaje para evaluar la virulencia de los genes de adhesión. Los resultados mostraron que los genes *ALS1* y *ALS5* fueron significativamente importantes para la virulencia de *C. albicans* hacia el nematodo *C. elegans*, además, los genes con mayor expresión en cepas mutantes y de tipo salvaje fueron *ALS1* y *ALS5* (Rosiana *et al.*, 2021).

Justificación

En México los estudios sobre las características moleculares de *Candida albicans* asociadas a infecciones cérvico-vaginales o periodontales son escasos, por lo que el propósito de este trabajo será determinar la expresión de los genes de la familia *ALS* (*ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7*, *ALS9*) en cepas de *Candida albicans* de origen vaginal y periodontal.

Objetivos

Objetivo General:

Caracterización molecular de genes de adhesión en cepas periodontales y cérvico-vaginales de *C. albicans*.

Objetivos particulares:

Determinar la frecuencia de los genes *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS6*, *ALS7* y *ALS9* en cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones periodontales y cervico-vaginales.

Comparar la expresión de los genes de la familia *ALS* en las cepas periodontales y cervico-vaginales de *C. albicans* utilizando dos diferentes caldos nutritivos de cultivo.

Material y Métodos

Origen de las cepas

Las cepas de *Candida albicans* fueron previamente aisladas de infecciones cérvico-vaginales (n=2) y de infecciones periodontales (n=3) de pacientes que acudieron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI Iztacala, y a la clínica de Endoperiodontología de la FES-I UNAM, respectivamente. Las cepas de *Candida albicans* y la cepa control (ATCC32354) se encontraban almacenadas en el medio BHI (Infusión-cerebro-corazón) más glicerol en el laboratorio de Análisis Clínicos.

Resiembra de las cepas y extracción de DNA

A partir del medio de cultivo de BHI más glicerol se tomó un inóculo por medio de un asa estéril de las cepas y del control por separado, se sembraron en 2 mL de BHI y se incubaron a 37° C por 24 horas en agitación constante. Al término se tomó un inóculo de las muestras por medio de un asa estéril y se sembraron por el método de estría cruzada en el agar Mueller Hinton (MH), y se incubaron a 37° C por 24 horas en agitación constante. A partir del crecimiento del hongo se tomaron varias colonias con un asa estéril y se depositaron en un tubo con tapón de rosca de 16x150 que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. El inóculo se agitó en un vortex por 30 segundos y se llevó a ebullición durante 20 min. Al término las muestras se colocaron en hielo por 10 min. y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contenía el DNA se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

Detección de *Candida albicans* por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La detección de *Candida albicans* (Tabla 1) se realizó amplificando las secuencias ITS (internal transcribed spacers) 1 y 2 del gen rRNA de *C. albicans* por PCR de acuerdo con el método descrito por Luo & Mitchell, (2002). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 20 microlitros (Tabla 1); 1 microlitro de cada oligonucleótido (CALB1 y CALB2 10pmol), 12 µL de Taq DNA polimerase 2x Master mix Red (AMPLIQON), 3 microlitros de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de ADN templado. 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, alineamiento a 58°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos. Finalmente, para terminar la fase de extensión se prolongó a 72°C por 15 minutos.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la detección de *Candida albicans*.

Especie	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>Candida albicans</i>	CALB1	TTTATCAACTTGTCACACCAGA	273
	CALB2	ATCCCGCCTTACCACTACCG	

DetECCIÓN DE LOS GENES *ALS* POR PCR

Los primers y las condiciones de PCR para la detección de los genes de la familia *ALS* (*ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* y *ALS9*) fueron descritos previamente por *Green et al.*, (2004) (Tabla 2). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 20 microlitros, 1 microlitro de cada oligonucleótido (forward y reverse; 10 pmol), 12 μ L de Taq DNA polimerase 2x Master mix Red (AMPLIQON), 3 microlitros de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de ADN templado. 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 y una extensión de 72°C por 15 minutos.

Tabla 2. Oligonucleótidos que se utilizaron para la detección de genes *ALS* en *C. albicans*

Nombre del Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>ALS1</i>	RTALS1F	(GAC TAG TGA ACC AAC AAA TAC CAG A)	318
	RTALS1R	(CCA GAA GAA ACA GCA GGT GA)	
<i>ALS2</i>	RTALS2F	(CCA GAA GAA ACA GCA GGT GA)	366
	RTALS2R	(TCT CAA TCT TAA ATT GAA CGG CTT AC)	
<i>ALS3</i>	RTALS3F	(CCA CTT CAC AAT CCC CAT C)	342
	RTALS3R	(CAG CAG TAG TAG TAA CAG TAG TAG TTT CAT C)	
<i>ALS4</i>	RTALS4F	(CCC AGT CTT TCA CAA GCA GTA AAT)	356
	RTALS4R	(GTA AAT GAG TCA TCA ACA GAA GCC)	
<i>ALS5</i>	RTALS5F ALT	(TGA CTA CTT CCA GAT TTA TGC CGA G)	318
	RTALS5R ALT	(ATT GAT ACT GGT TAT TAT CTG AGG GAG AAA)	
<i>ALS6</i>	RTALS6F	(GAC TCC ACA ATC ATC TAG TAG CTT GGT TT)	152
	RTALS6R2	(CAA TTG TCA CAT CAT CTT TTG TTG C)	
<i>ALS7</i>	RTALS7F	(GAA GAG AAC TAG CGT TTG GTC TAG TTG T)	206
	RTALS7R2	(TGG CAT ACT CCA ATC ATT TAT TTC A)	
<i>ALS9</i>	RTALS9F2	(CCA TAT TCA GAA ACA AAG GGT TC)	198
	RTALS9R2	(AAC TGA AAC TGC TGG ATT TGG)	

Análisis de los amplicones por electroforesis en gel de agarosa

Se preparó una solución stock concentrada 10X de Tris-borato (TBE) que contenía: 108 gr. Tris base, 40 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0), 55 gr. de ácido bórico y se aforó a 1 L con agua destilada. Para llevar a cabo la electroforesis se necesitó de TBE 1X por lo que la solución stock se diluyó 1:10 hasta tener una

concentración 10X. Posteriormente se preparó el gel de agarosa al 2%, por lo que se pesaron 2 g de agarosa y se depositó en 100 mL de TBE 10X para ser fundida hasta que quedó una solución transparente. Después se agregaron 0.7 microlitros de Midori Green por cada 100 mL de agarosa. La agarosa se depositó en un contenedor que contenía un peine para que se formarían los pozos. Una vez gelificada la agarosa se retiró el peine y el gel se introdujo a la cámara de electroforesis junto con el TBE 10X hasta cubrir el gel. Se colocaron 5 microlitros de los amplicones de PCR en los pozos y 1 microlitro del marcador de peso molecular (100 pb). Las condiciones para correr el gel fueron: 120 volts, 94 mA durante 30 min.

Cultivo del hongo para la extracción de RNAm de bacterias y levaduras

Para la extracción del RNAm de las cepas es fundamental promover la expresión de los genes de virulencia de interés (adhesinas), para lo cual las cepas de *C. albicans* se crecieron en 3mL de caldo BHI (infusión-cerebro-corazón), y caldo de soya tripticaseina (ST) a 37° C durante 24 h en agitación constante. Al término, se realizaron diluciones 1:10 en caldo BHI o ST estéril, según el caso, hasta obtener una DO600 nm= 0.4, lo que indicó una concentración de 1×10^9 células. Las células del hongo fueron recuperadas por centrifugación a 2000 rpm por 3 minutos, al término la pastilla fue resuspendida en 2 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS), posteriormente se agitaron en un vortex por 10 segundos y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se utilizó para la extracción del RNA.

Extracción de RNA de las cepas de *Candida albicans*

La extracción total de RNA se realizó con el kit comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el equipo robotizado QIAcube (Figura 8 y 9). Para lo cual, las pastillas bacterianas obtenidas de la infección celular fueron colocadas en la placa de agitación del equipo. Al mismo tiempo en la posición “A” de la sección correspondiente al buffer de lisis para levaduras se puso el buffer Y1; lyticasa/zymolasa (50 U por 1×10^7 células). Después de alimentar el equipo QIAcube con los diferentes reactivos del kit RNeasy, se llenó el contenedor con puntas de 1 mL y se depositaron tubos de columna y elución en el carrusel (centrifuga) del equipo. Finalmente, el QIAcube se programó para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida. El equipo robotizado adicionó 100 µl de buffer YT1 (Levaduras) a cada tubo con la pastilla celular de levadura cosechadas después del cultivo en los agares. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares. Posteriormente el robot QIAcube adicionó volúmenes de los distintos buffers del kit comercial RNeasy y realizó repetidos pasos de centrifugación y agitación para los diferentes procedimientos: Adicionó 350 µl de buffer RLT (amortiguador de pH de lisis con Isotiocianato de guanidina con 100

$\mu\text{l/ml}$ de β -mercaptoetanol) que permitió inactivar las RNAsas y favorecer la unión del RNA a la membrana de sílica de la columna utilizada en el QIAcube.

Al término el equipo adicionó 350 μl de etanol al 95% para homogeneizar el lisado, mezcló suavemente los tubos y transfirió 700 μl de la mezcla a la columna contenida en un tubo de 2 ml, centrifugó los tubos a 10 000 rpm durante 15 segundos y el líquido de flujo fue desechado. Después adicionó 700 μl del buffer de lavado RW1 (Cloruro de guanidina y etanol) a la columna, para la eliminación de biomoléculas no deseadas y centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos, nuevamente el líquido de flujo fue desechado. Al término el robot adicionó 500 μl de buffer RPE (amortiguador de pH de lavado con 4 volúmenes de etanol al 96%) a la columna que permite eliminar los rastros de sales, que todavía estaban en la columna debido a los buffers utilizados anteriormente en el protocolo y el equipo centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos para lavar la membrana, el líquido de flujo fue descartado. Nuevamente adicionó 500 μl de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos para volver a lavar la membrana y remover restos de sales, descartando nuevamente el líquido de flujo.

Finalmente, el robot movió y depositó la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml, centrifugó durante 1 minuto y el equipo adicionó 30 μl de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto para obtener el RNA. La concentración total del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Debido a la inestabilidad del RNA, se procedió inmediatamente a realizar la reversotranscripción a cDNA.

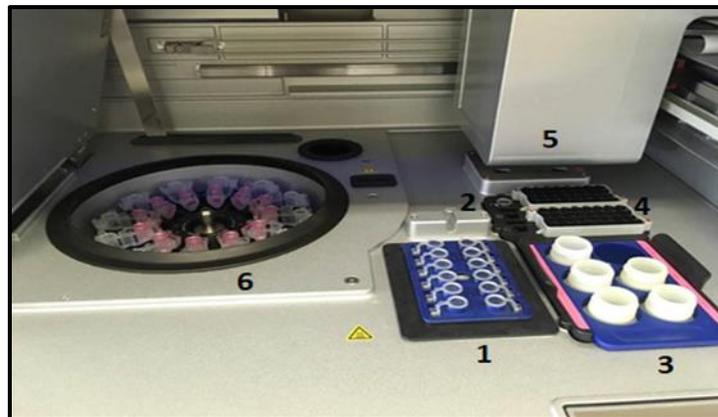


Figura 8. Interior del equipo QIAcube. 1. Placa de agitación, 2. Posición para buffer de lisis, 3. Posición para reactivos MiniKit RNeasy, 4. Sistema de pipeteo, 5. Brazo robótico, 6. Carrusel (centrifuga).

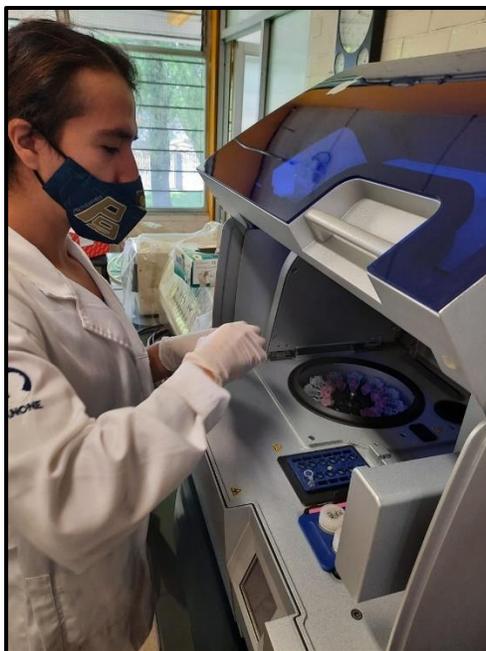


Figura 9. Equipo robotizado QIAcube para la extracción de RNA

Reversotranscripción

Para el proceso de la reversotranscripción de RNA a cDNA (DNA complementario) se utilizó el kit comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó la eliminación de DNA genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 μ l se agregaron cada uno de los siguientes componentes: Para cada muestra se depositó en un tubo eppendorf 2 μ l de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 μ l de H₂O libre de RNAsas y 5 μ l de RNA molde. Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo. Para la reversotranscripción se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA: 1 μ l de Quantiscript Reverse Transcriptasa®, 4 μ l Quantiscript RT buffer 5x®, 1 μ l RT Primer mix® y 14 μ l de RNA templado (obtenido de la reacción anterior) para un volumen final de reacción de 20 μ l. Posteriormente los tubos se incubaron a 42°C por 15 minutos. Para inactivar la transcriptasa reversa el tubo se incubó en un termoblock a 95°C durante 3 minutos. La concentración total del cDNA se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Finalmente, el cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización para PCR en tiempo real.

Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos utilizados para la expresión de los diferentes genes de virulencia fueron los mismos que se utilizaron para la identificación de los genotipos de virulencia por PCR convencional (Tabla 2). Para determinar la expresión de los diferentes genes de virulencia se utilizó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene) (Figura 10). El volumen

final por mezcla de reacción fue de 20 μ l: 10 μ l de mix SYBERGreen PCR (QIAGEN), 1 μ l del oligonucleótido Forward (10 pmol), 1 μ l del oligonucleótido Reverse (10 pmol), 7 μ l de agua libre de nucleasas y 1 μ l de cDNA templado (500 ng/ μ l). Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3. El control interno para cada ensayo fue el gen 16S rRNA. La melting point se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real. La cepa ATCC 11775 de *Candida albicans* se utilizó como control positivo en cada ensayo.



Figura 10. Termociclador para PCR en tiempo real

Tabla 3. Condiciones de PCR utilizadas para la expresión de los factores de virulencia en las cepas cérvico-vaginales y periodontales

	D1	C	D2	A	E1
PCR en Tiempo Real	95°C 15'	40	95°C 20''	55°C 30''	72°C 30''

D1: Desnaturalización 1; **C:** Ciclos; **D2:** Desnaturalización 2; **A:** Alineamiento; **E1:** Extensión 1. *Los ciclos incluyen únicamente D2, A y E1.

Resultados

Origen de las cepas

Se analizaron cinco cepas de *C. albicans* previamente aisladas de infecciones cérvico-vaginales (n=2) y de infecciones periodontales (n=3) de pacientes que acudieron al Laboratorio de Análisis Clínicos y a la clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala UNAM. Se encontró que el 60% (n=3) de los pacientes fueron mujeres y el 40% (n=2) hombres (Figura 11). El rango de edad más frecuente entre los pacientes estudiados fue de 35-50 años con el 40% (n=2), seguido de los rangos 0-28, 29-34 y 51-53 años con un 20% (n=1) en cada caso (Figura 12).

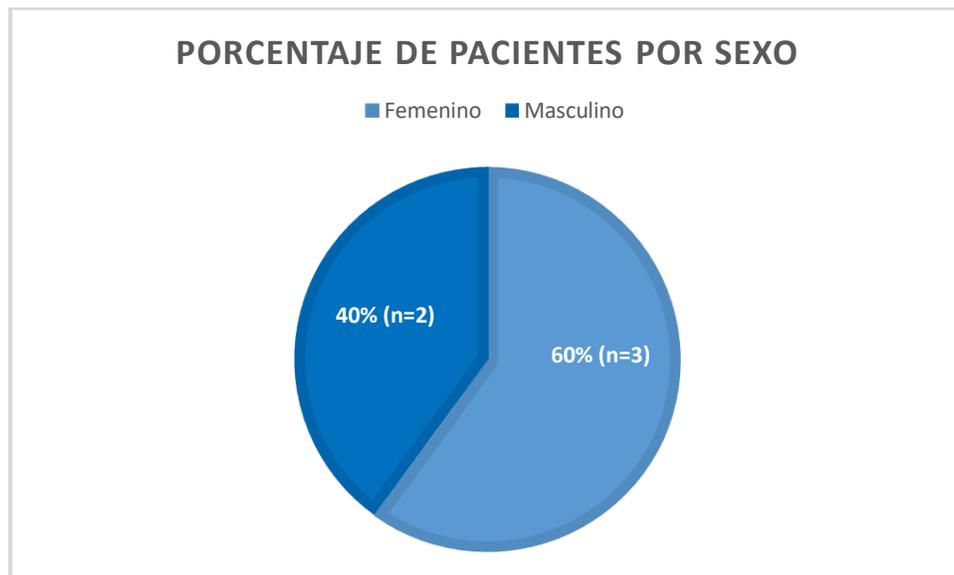


Figura 11. Porcentaje de los pacientes estudiados por sexo.

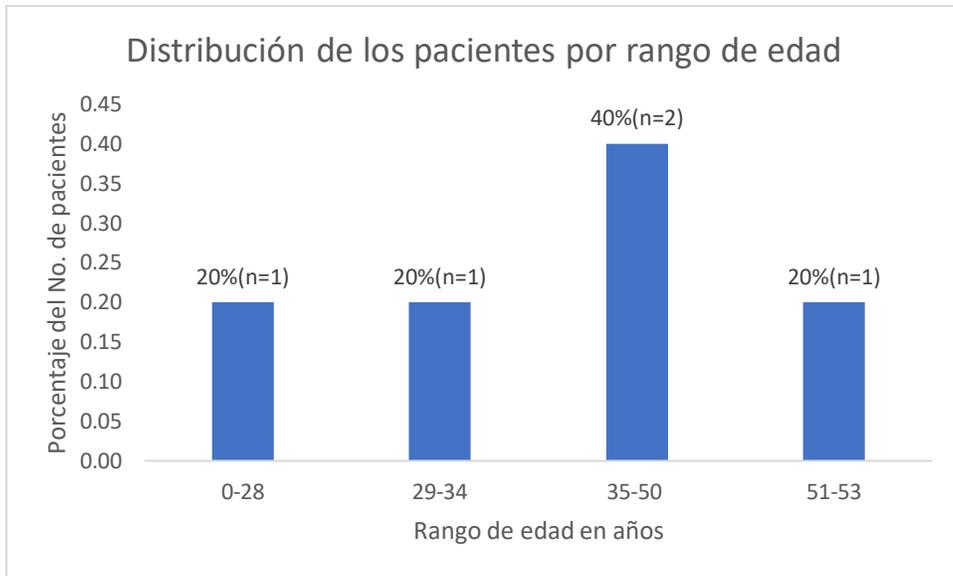


Figura 12. Distribución de los pacientes por rango de edad.

Identificación de *Candida albicans* por PCR

Las cinco cepas de *C. albicans* fueron identificadas molecularmente por el método de PCR convencional mediante la amplificación de la secuencia ITS del gen *rRNA* (Figura 13).

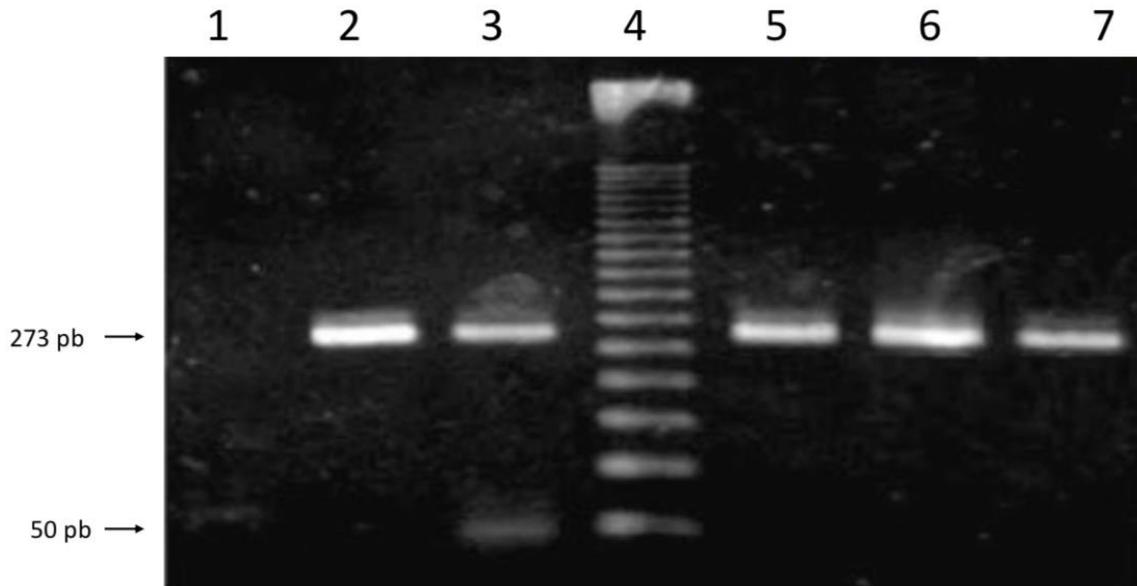


Figura 13. Amplificación de la secuencia ITS del gen *rRNA* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 2 y 3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (273 pb el amplicon). Carriles 5 y 6: cepas *C. albicans* de pacientes con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 7: Control positivo (ATCC32354). Carril 1: Control negativo (sin DNA molde).

Frecuencia de los genes de adhesión

En la Tabla 4, se presenta la frecuencia de los genes de virulencia *ALS*, en las cepas de *C. albicans* aisladas de infecciones cérvico-vaginales (n=2) y de infecciones periodontales (n=3). Los genes *ALS1* (Figura 14), *ALS7* (Figura 20) y *ALS9* (Figura 21) se detectaron en el 100% (n=5) de las cepas periodontales y vaginales, mientras que la frecuencia de *ALS2* (Figura 15), *ALS3* (Figura 16), *ALS4* (Figura 17), *ALS5* (Figura 18), *ALS6* (Figura 19) fue del 80% (n=4) en las cepas de ambos diagnósticos.

Tabla 4. Frecuencia de los genes de adhesión

Gen	Función	Cérvico-vaginal (n=2) No. %	Gingivitis (n=1) No. %	Periodontitis moderada (n=1) No. %	Periodontitis crónica (n=1) No. %	Total (n=5) No. %
<i>ALS 1</i>	Adhesión	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>ALS 2</i>		1 (50)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	4 (80)
<i>ALS 3</i>		1 (50)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	4 (80)
<i>ALS 4</i>		1 (50)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	4 (80)
<i>ALS 5</i>		1 (50)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	4 (80)
<i>ALS 6</i>		1 (50)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	4 (80)
<i>ALS 7</i>		2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)
<i>ALS 9</i>		2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)

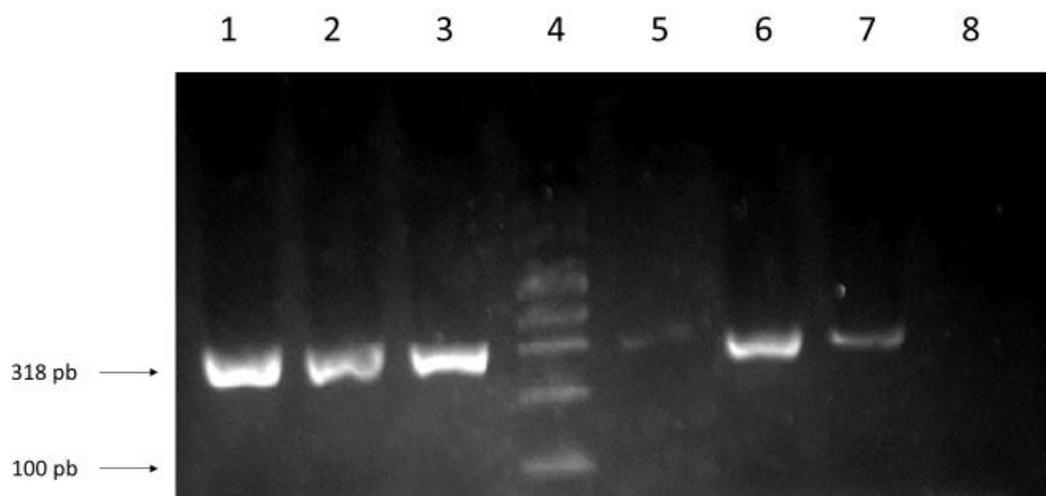


Figura 14. Amplificación del gen *ALS 1* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 1 y 3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (318 pb el amplicón). Carriles 5 y 6: cepas *C. albicans* de pacientes con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 7: cepa (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

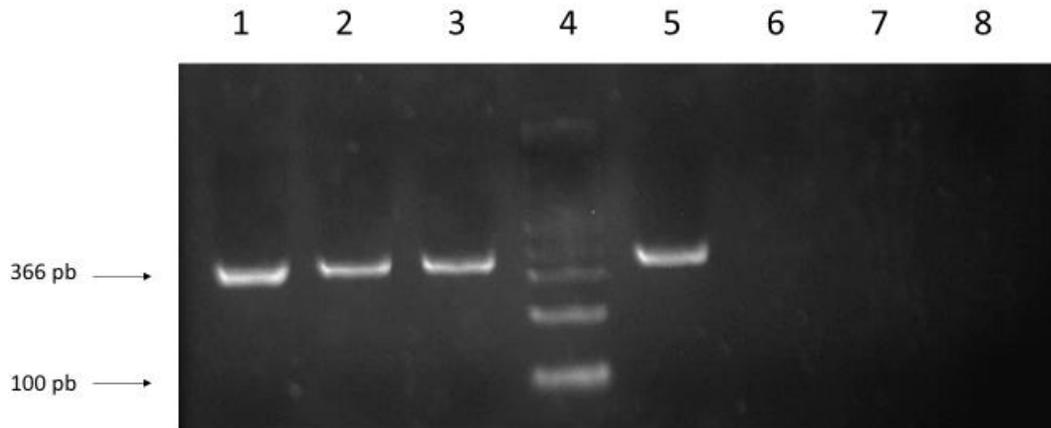


Figura 15. Amplificación del gen *ALS 2* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carril 1: cepa de *C. albicans* cérvico-vaginal (366 pb el amplicón). Carriles 2 y 3: cepas de *C. albicans* de pacientes con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 5: cepa (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

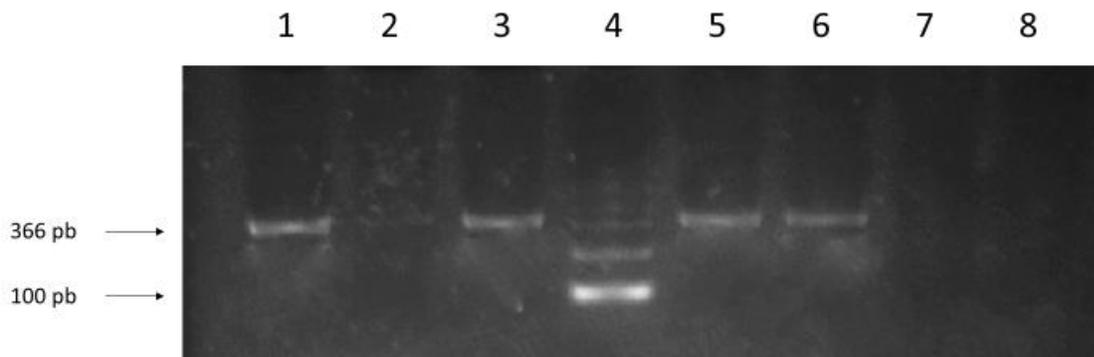


Figura 16. Amplificación del gen *ALS 3* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 1 - 3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (342 pb el amplicón). Carril 5: cepa de *C. albicans* de paciente con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 6: Control positivo (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

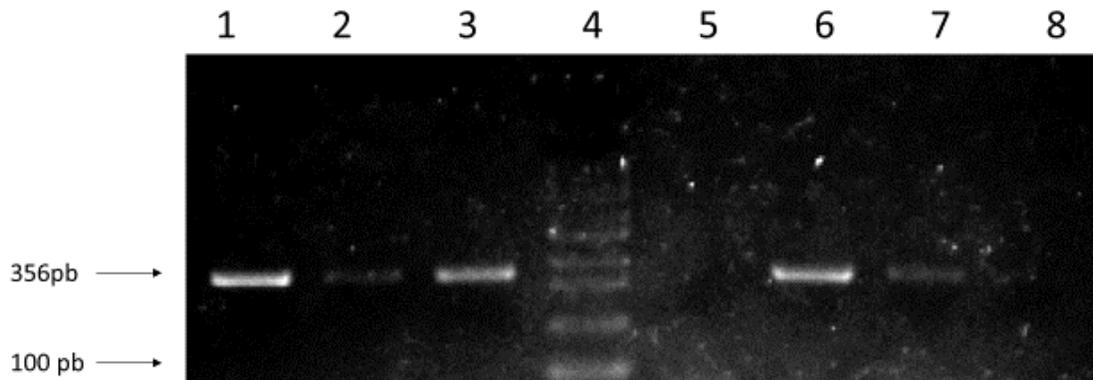


Figura 17. Amplificación del gen *ALS 4* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 1 y 3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (356 pb el amplicón). Carril 6: cepa de *C. albicans* de paciente con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 5: Control positivo (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

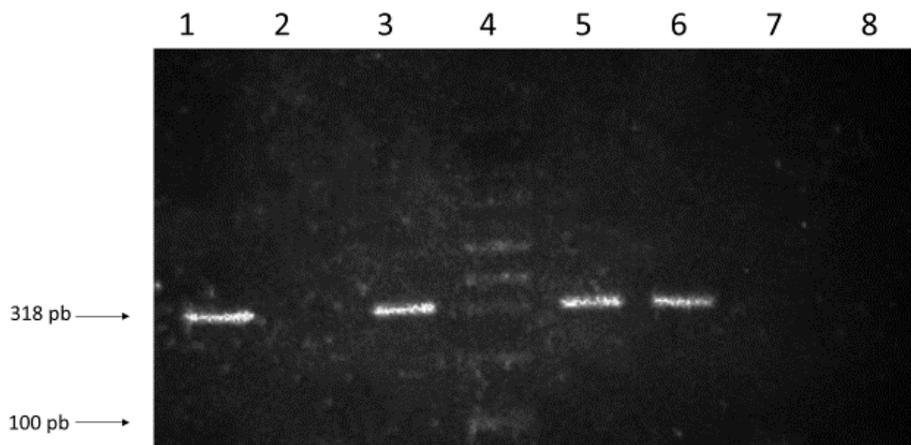


Figura 18. Amplificación del gen *ALS 5* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 1 y 3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (318 pb el amplicón). Carril 5: cepa *C. albicans* de paciente con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 6: Control positivo (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

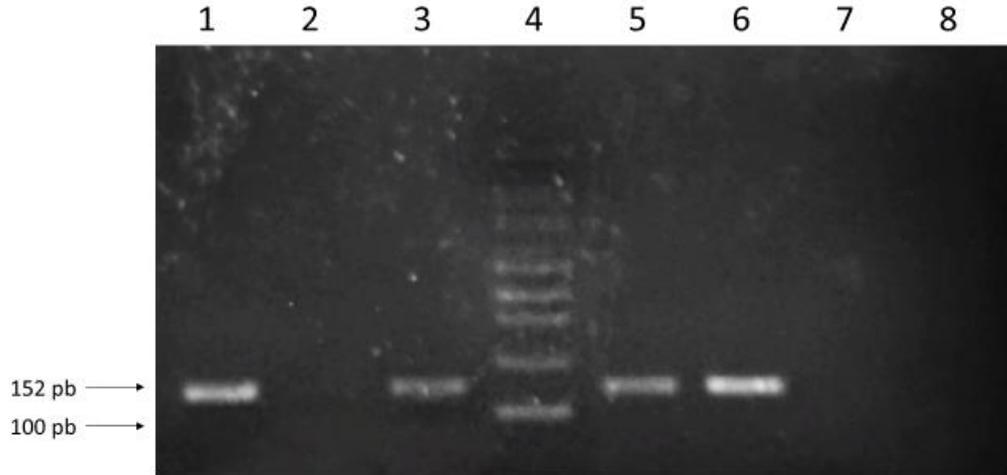


Figura 19. Amplificación del gen *ALS 6* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 1 y 3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (152 pb el amplicón). Carril 5: cepa de *C. albicans* de paciente con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 6: Control positivo (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

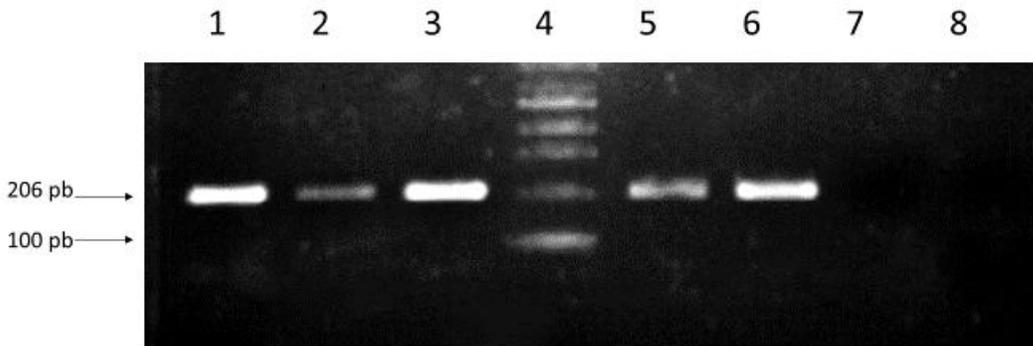


Figura 20. Amplificación del gen *ALS 7* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 1-3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (206 pb el amplicón). Carril 5: cepa de *C. albicans* de paciente con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 6: Control positivo (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

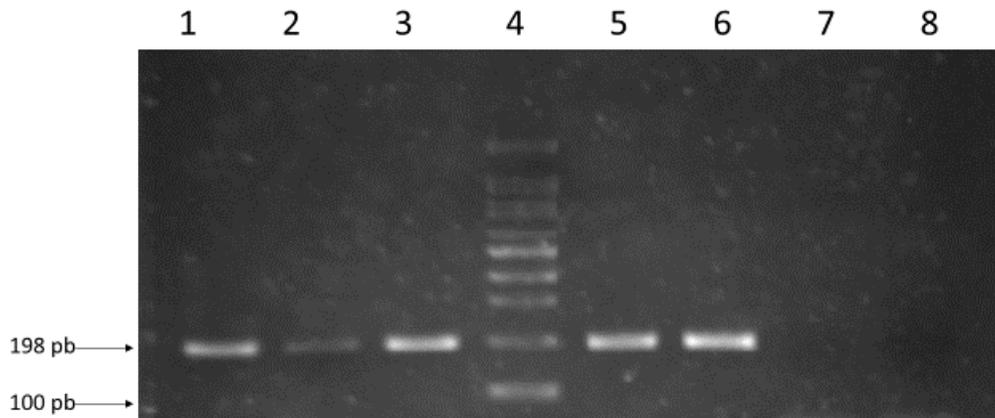


Figura 21. Amplificación del gen *ALS 9* por PCR convencional de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales (n=2), infecciones periodontales (n=3) y cepa control. Carriles 1 y 3: cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (198 pb el amplicón). Carril 5: cepa *C. albicans* de pacientes con enfermedad periodontal. Carril 4: Marcador molecular (100-pb). Carril 6: Control positivo (ATCC32354). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

Expresión de genes de virulencia por PCR en tiempo real

En la Tabla 5 se presenta la frecuencia de expresión de los genes *ALS* en cepas de *Candida albicans* crecidas en medio BHI y ST. El 100 % de las cepas de *C. albicans* cérvico-vaginales (n=2) indistintamente del crecimiento en BHI o ST expresó *ALS1* (Figura 22), mientras que el 50% (n=1) expresó los genes *ALS3* (Figura 23), *ALS4* (Figura 24), *ALS5* (Figura 25), *ALS6* (Figura 26), y *ALS9* (Figura 27). Para las cepas aisladas de pacientes con gingivitis (n=1), P. moderada (n=1) y P. crónica (n=1) el 100% (n=3) de las cepas expresó los genes *ALS4* (Figura 24), *ALS5* (Figura 25), *ALS6* (Figura 26), y *ALS9* (Figura 27). El gen *ALS3* (Figura 23) fue expresado en el 100% de las cepas con gingivitis (n=1) y P. crónica (n=1), mientras que en la cepa de P. moderada solo se expresó bajo crecimiento en BHA.

Tabla 5. Frecuencia de expresión de genes *ALS* en medio BHI y ST de las cepas de *C. albicans*

Gen	Cérvico-vaginal (n=2) No. %		Gingivitis (n=1) No. %		Periodontitis moderada (n=1) No. %		Periodontitis crónica (n=1) No. %		Total (n=5) No. %
	BH1	ST	BH1	ST	BH1	ST	BH1	ST	
<i>ALS 1</i>	2 (100)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	4 (80)
<i>ALS 2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ALS 3</i>	1 (50)	1 (50)	1 (100)	1(100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	3 (60)
<i>ALS 4</i>	1 (50)	1 (50)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	4 (80)
<i>ALS 5</i>	1 (50)	1 (50)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	4 (80)
<i>ALS 6</i>	1 (50)	1 (50)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	4 (80)
<i>ALS 7</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ALS 9</i>	1 (50)	1 (50)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	1 (100)	1(100)	4 (80)

ALS 1

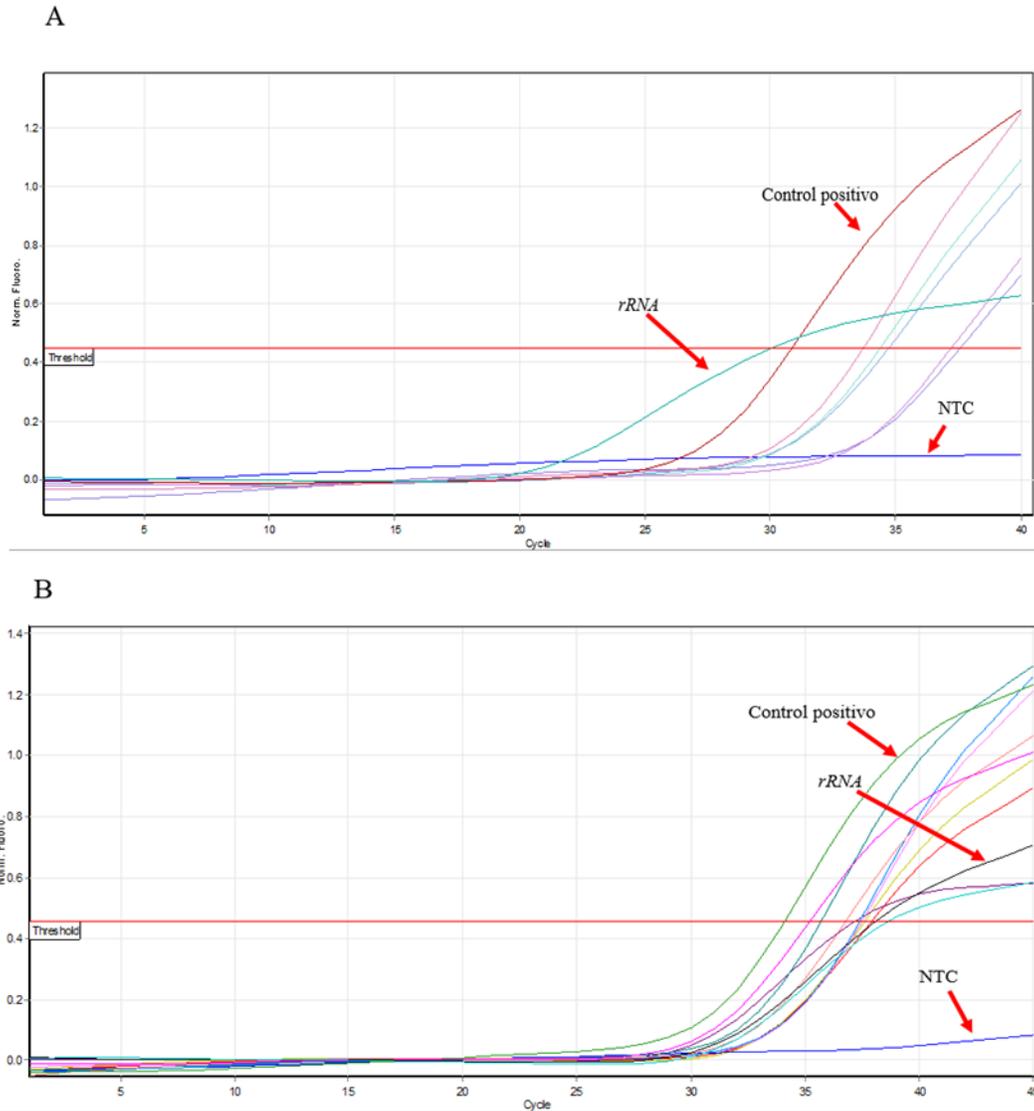


Figura 22. Expresión del gen *ALS 1* en cepas de *C. albicans* por PCR tiempo real después del crecimiento en medio Soya Trypticasa (**A**) y medio BHI (**B**). La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). NTC (No control template). Control interno (House Keeping; *rRNA*)

ALS 3

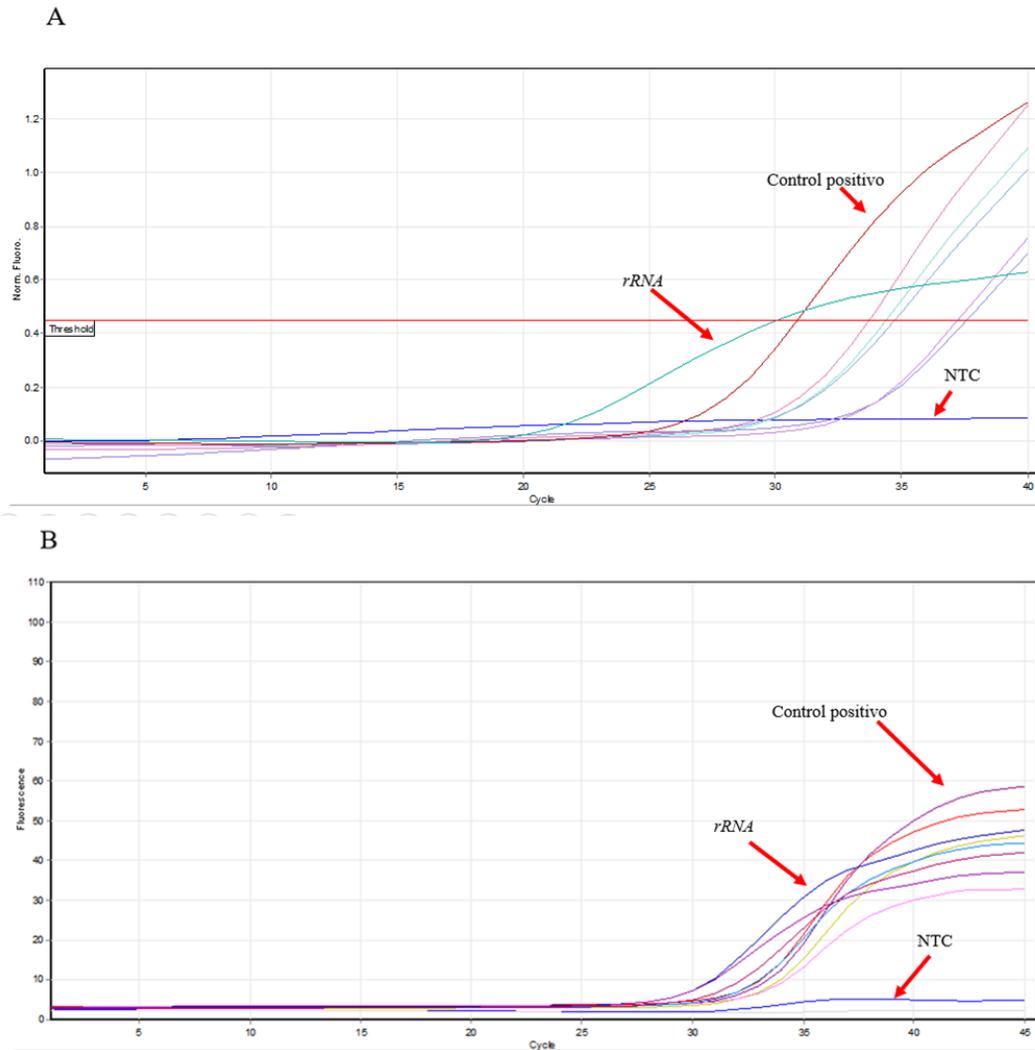


Figura 23. Expresión del gen *ALS 3* en cepas de *C. albicans* por PCR tiempo real después del crecimiento en medio Soya Trypticasa (**A**) y medio BHI (**B**). La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). NTC (No control template). Control interno (House Keeping; *rRNA*)

ALS 4

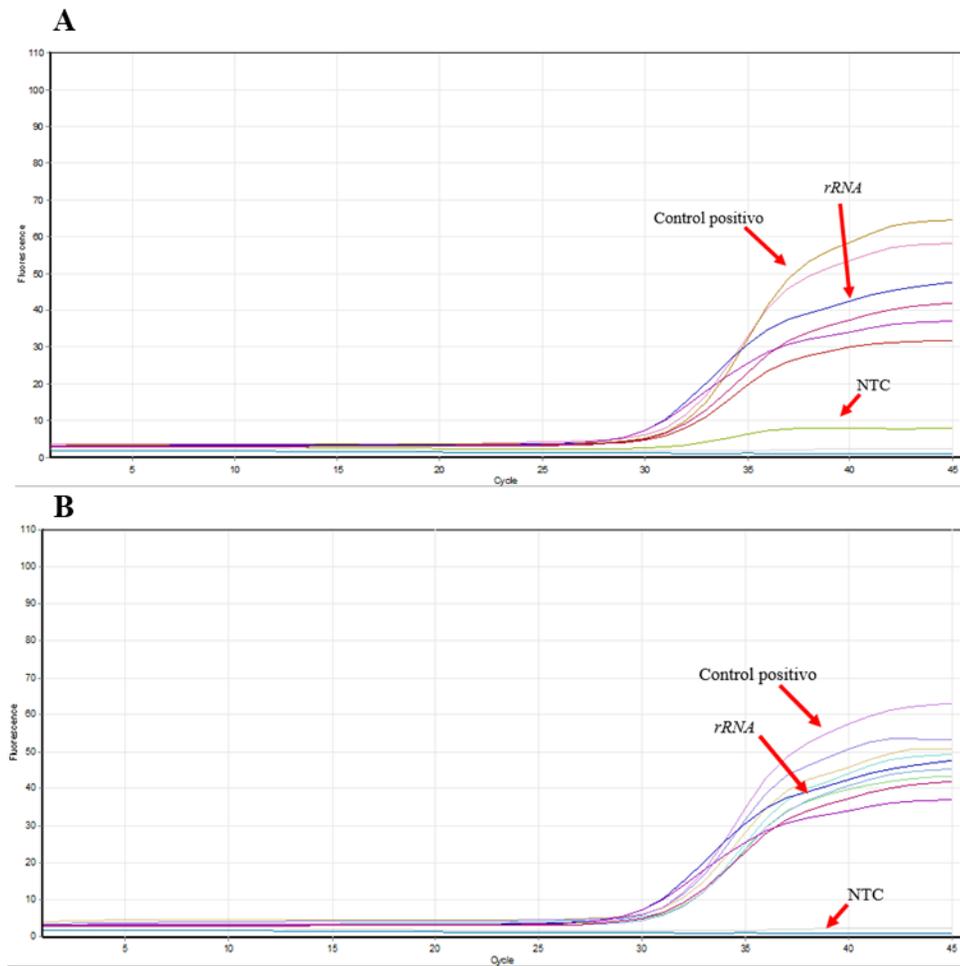


Figura 24. Expresión del gen *ALS 4* en cepas de *C. albicans* por PCR tiempo real después del crecimiento en medio Soya Tripticasa (**A**) y medio BHI (**B**). La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). NTC (No control template). Control interno (House Keeping; *rRNA*)

ALS 5

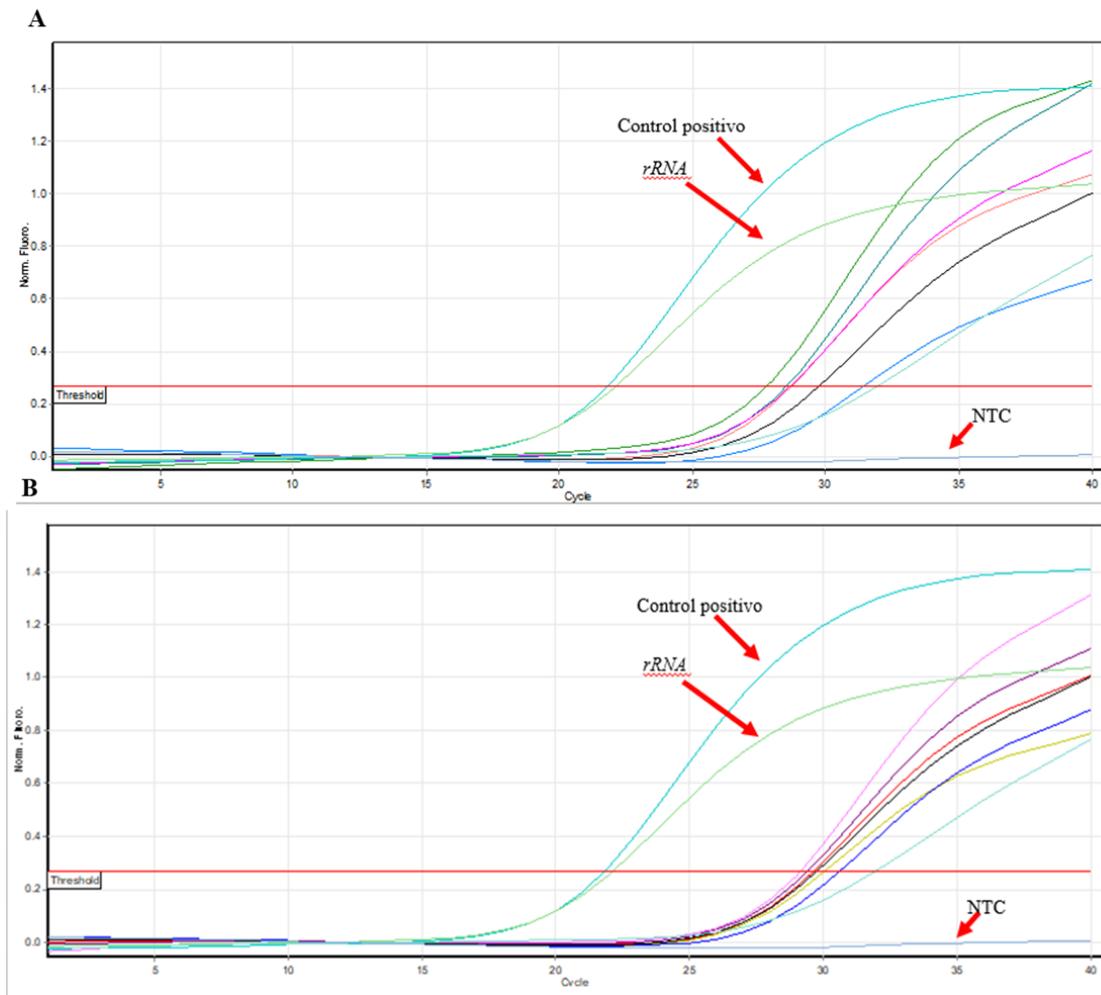


Figura 25. Expresión del gen *ALS 5* en cepas de *C. albicans* por PCR tiempo real después del crecimiento en medio Soya Trypticasa (**A**) y medio BHI (**B**). La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). NTC (No control template). Control interno (House Keeping; *rRNA*)

ALS 6

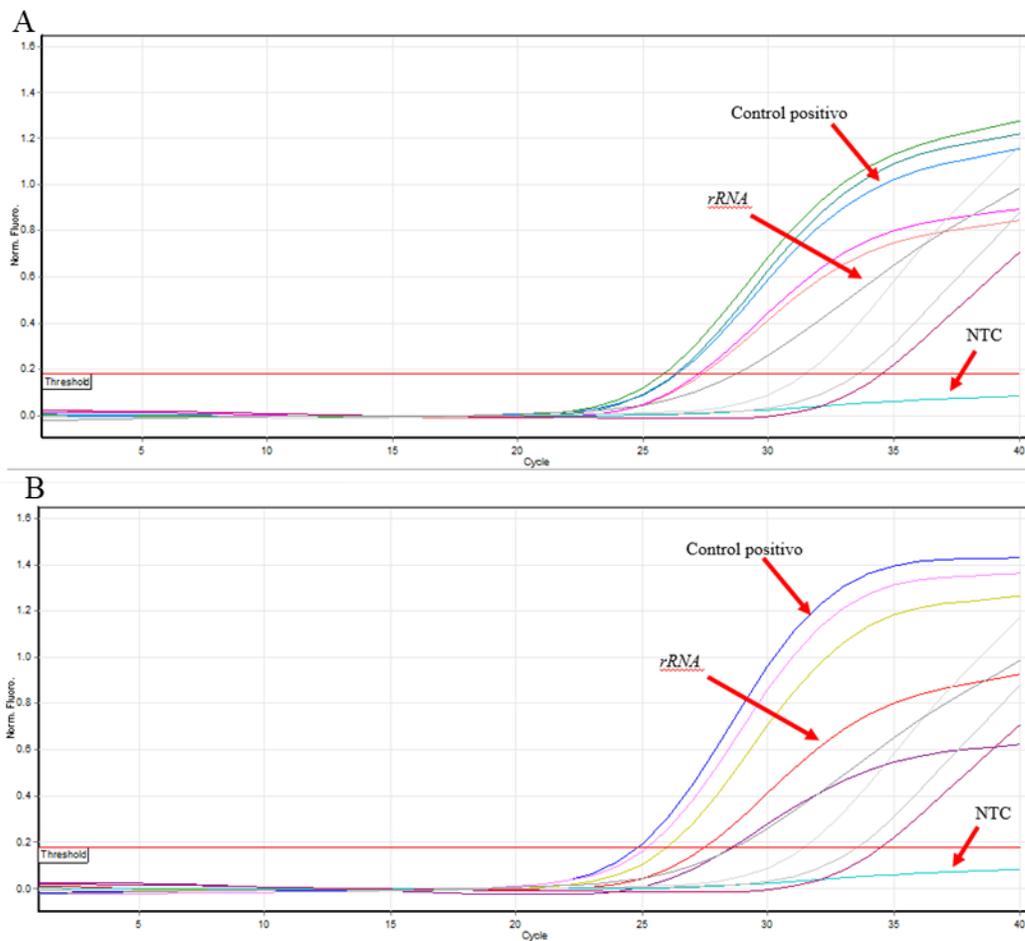


Figura 26. Expresión del gen *ALS 6* en cepas de *C. albicans* por PCR tiempo real después del crecimiento en medio Soya Trypticasa (**A**) y medio BHI (**B**). La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). NTC (No control template). Control interno (House Keeping; *rRNA*)

ALS 9

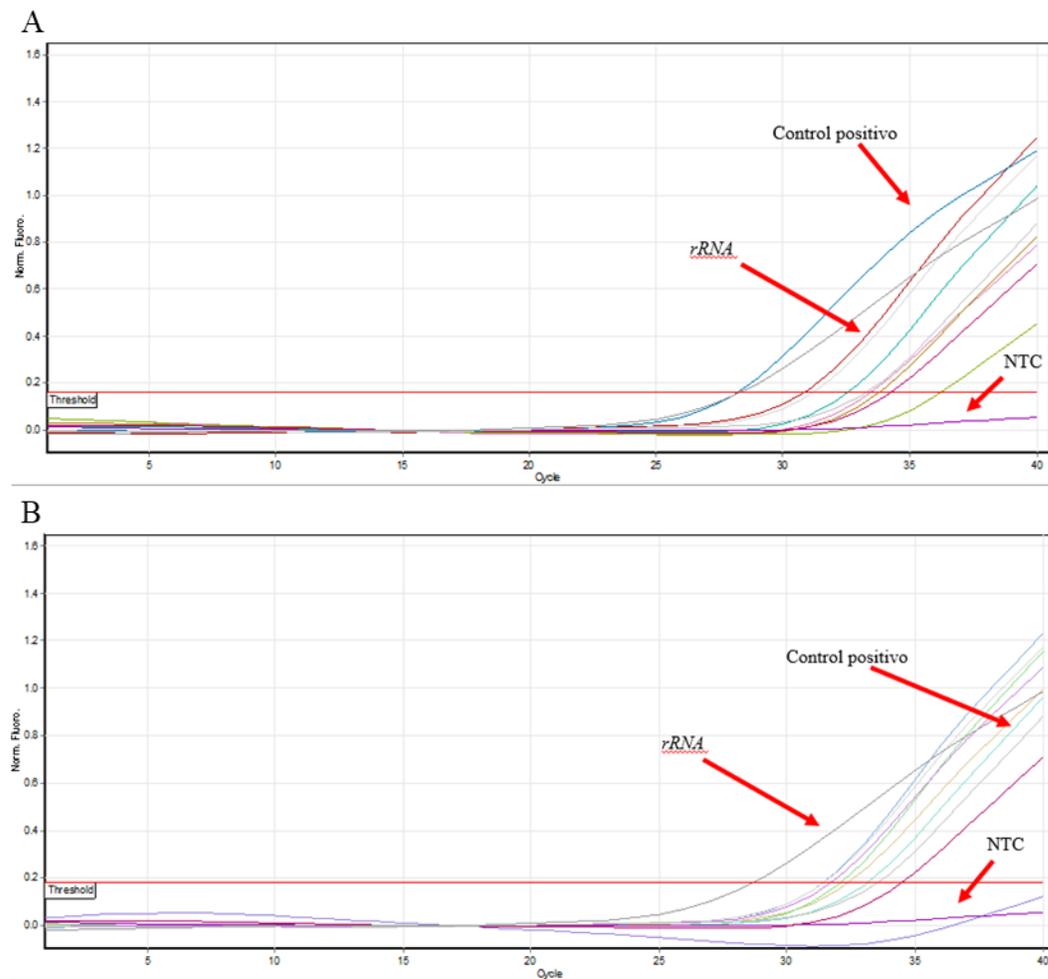


Figura 27. Expresión del gen *ALS 9* en cepas de *C. albicans* por PCR tiempo real después del crecimiento en medio Soya Trypticasa (**A**) y medio BHI (**B**). La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). NTC (No control template). Control interno (House Keeping; *rRNA*)

Discusión

Pacientes estudiados

En este estudio se analizaron cinco cepas de *C. albicans* de las cuales el 40% correspondió a infecciones cérvico-vaginales (n=2), mientras que el 60% (n=3) correspondió a infecciones periodontales (Tabla 4). Se estima que al menos el 75% de mujeres en el mundo presentarán candidiasis vulvovaginal una vez en su vida, ya que el 90% de infecciones cérvico-vaginales son causadas por *C. albicans* (Willems *et al.*, 2020). En este estudio todas las cepas aisladas de infecciones cervico-vaginales y periodontales fueron identificadas como *C. albicans* mediante la amplificación de la región ITS del gen ribosomal *rRNA* (Figura 13). Se ha descrito que el hongo *C. albicans* es la causa más común de infecciones vaginales, infecciones orales y en ocasiones pueden ingresar al torrente sanguíneo y ocasionar candidiasis sistémica al provocar infecciones de tejidos profundos (Conti *et al.*, 2014; Whaley *et al.*, 2016). Las infecciones vulvovaginales por *C. albicans* se caracterizan por ardor o picazón vulvar y flujo vaginal anormal "parecido al queso" (Anderson *et al.*, 2004). Existen numerosos factores de riesgo que favorecen la candidiasis vulvo-vaginal, entre los que se encuentran; la diabetes mellitus, el embarazo, y el consumo de antibióticos por tiempos prolongados. Después tratamiento con antimicóticos es frecuente las infecciones recurrentes (Foxman, 1990; Geiger *et al.*, 1995).

En este estudio se describió que el 60% de las cepas (n=3) analizadas fueron aisladas de pacientes con infecciones periodontales (Figura 13). Se ha reportado que *C. albicans* puede contribuir al desarrollo de la enfermedad periodontal, especialmente en la placa dental, formando biopelículas junto con otros microorganismos (Pg, 2002; Monroy-Pérez *et al.*, 2020). Por ejemplo se ha descrito que *Candida albicans* puede interactuar con *Streptococcus mutans* en biopelículas orales, lo que conduciría a la caries. Se ha demostrado que la interacción entre estos microorganismos se caracteriza por cambios en la organización de la matriz de polisacáridos extracelulares y la actividad metabólica de las biopelículas bacterianas y fúngicas, lo que favorecería evasión de la respuesta inmune del hospedero y la resistencia a los azoles (Negrini *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha documentado que la frecuencia de la candidiasis orofaríngea es variable, por ejemplo, la prevalencia para pacientes con cáncer del tracto digestivo se ha estimado en Francia del 19 %, y para pacientes con cáncer de próstata del 1.5 % mientras que en tumores va del 5 al 60%, en trasplantes de células madre del 20-80% y en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana del 20% (Davies *et al.*, 2006; Gligorov *et al.*, 2011).

No está claro cuál es el papel de *C. albicans* en la enfermedad periodontal, sin embargo, se ha descrito que este hongo produce una toxina peptídica citolítica (candidalisina) que es fundamental para la patogenia y la activación inmunitaria. Esta toxina desestabiliza la integridad estructural de las membranas plasmáticas de las células epiteliales, lo que causa la

liberación de alarminas y estrés celular, lo que lleva a la activación epitelial, provocando una respuesta inflamatoria (Moyes *et al.*, 2016; Naglik *et al.*, 2019).

Detección de genes *ALS*

En este estudio se encontró que los genes *ALS1*, *ALS7*, *ALS9* fueron detectados por PCR convencional en el 100% de las cepas aisladas de infecciones cérvico-vaginales (n=2) y de infecciones periodontales (n=3; Tabla 4), mientras que los genes *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6* se detectaron en el 80% de las mismas cepas (Tabla 4). La elevada frecuencia de los genes de la familia *ALS* entre las cepas vaginales y orales pone de manifiesto la capacidad de virulencia de las cepas para ocasionar infecciones crónicas, debido a que el primer paso para la colonización es la adhesión por estas proteínas, y como segundo paso, se ha descrito que la unión de las proteínas als1/als3 durante el crecimiento de las hifas favorece la formación de la biopelículas (Nobile *et al.*, 2008). La formación de las biopelículas por *C. albicans* durante los procesos infecciosos protege al hongo contra la respuesta inmune del hospedero y contra la acción de los antimicóticos (Pereira *et al.*, 2020), favoreciendo de esta manera la persistencia del microorganismo.

La frecuencia de *ALS1* (100%) identificada en este estudio coincide con la descrita en un amplio estudio realizado en grupo de cepas de *C. albicans* aisladas de infecciones cérvico-vaginales en mujeres mexicanas (Monroy *et al.*, 2012). *ALS1* está relacionado con la virulencia y la resistencia, tanto en mucosas orales y mucosa del aparato reproductor femenino (Kamai *et al.*, 2002; Roudbarmohammadi *et al.*, 2016). Se ha estudiado que la eliminación del gen *ALS1* retrasa el crecimiento del tubo germinativo de *C. albicans*, lo que podría disminuir o alterar la virulencia del hongo (Zhao *et al.*, 2022). Mientras que *ALS7* se ha reportado que es un gen de locus hipermutable, que puede proporcionar cambios en la proteína als7 y proporcionar evasión del sistema inmune a esta proteína (Zhang *et al.*, 2003). Por otro lado se ha mencionado que la eliminación de *ALS9* reduce significativamente la adhesión de *C. albicans* a células endoteliales vasculares en cultivos de monocapa (Zhao *et al.*, 2007b). La frecuencia de los genes *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7*, y *ALS9* detectada tanto en las cepas vaginales como en las orales es superior al descrito previamente en cepas aisladas de mujeres con candidiasis vaginal (Monroy *et al.*, 2012)

Expresión de los genes *ALS* en distintos medios (Soya tripticasa y BHI)

En este trabajo se encontró que más del 80% de las cepas cérvico-vaginales (n=2) y periodontales (n=3) expresaron los genes *ALS1*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6* y *ALS9*, indistintamente del medio de cultivo, ya sea en BHI o caldo Soya tripticasa (Tabla 5).

La elevada frecuencia de expresión de los genes *ALS* de las cepas periodontales y cérvico-vaginales detectada en este trabajo es superior a la descrita en un estudio realizado en un modelo de infección vaginal en ratón y en un modelo de epitelio vaginal humano reconstituido con un grupo de cepas ATCC (American Type Culture collection) (Cheng *et al.*, 2005).

La elevada frecuencia de expresión de los genes *ALS* identificada en las cepas de *C. albicans* periodontales y cérvico-vaginales pone de manifiesto la capacidad de adhesión, de colonización y de formación de biopelícula de las cepas, lo que conduciría a infecciones crónicas y/o recurrentes. Se ha descrito que *ALS1* se ha catalogado como una de las adhesinas con mayor frecuencia por su papel en la mediación de la unión de ligandos y las interacciones que presenta *C. albicans* hacia el hospedero (Zhao *et al.*, 2022). Además, la proteína als1 es considerada como una de las adhesinas más frecuentes que poseen las cepas de *Candida albicans*, ya que se ha demostrado que la participación de als1 es determinante en la adhesión a superficies epiteliales, participando también en la formación de biopelículas (Marc *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Por otra parte se ha descrito que la proteína als4 participó en la patogénesis en un modelo de ratón de candidiasis oral (Coleman *et al.*, 2012).

En este estudio todas las cepas de *C. albicans* provenientes de infecciones periodontales expresaron *ALS4*, *ALS5*, *ALS6* y *ALS9* lo que puede indicar una función relevante para las infecciones en la mucosa oral. Sin embargo, en otros estudios se ha reportado que *ALS5* y *ALS6* no son esenciales para la adhesión en la virulencia de *C. albicans*, ya que cepas carentes (mutantes) de *ALS5* y *ALS6* no perdieron la adhesión en modelos de infección con células endoteliales (Zhao *et al.*, 2007a; Zhao *et al.*, 2007c). Respecto a *ALS9* que fue expresado en todas las cepas periodontales y en la mitad de las cervico-vaginales, se ha demostrado que favorece la fijación e inicio de la patogenia (Razavi *et al.*, 2020).

Cada gen *ALS* puede tener una participación distinta en las etapas de virulencia por parte de *C. albicans*, hay estudios en donde se han bloqueado genes *ALS* selectivamente en cepas mutantes de *C. albicans* para así evaluar la virulencia y expresión de genes en modelos de infección (Halder *et al.*, 2019) (Rosiana *et al.*, 2021) (Shapiro *et al.*, 2018). Todos los estudios indican que hay genes que expresan en diferentes etapas de la virulencia y que no todos son esenciales para que se lleve a cabo la infección, sin embargo, hay genes que son significativamente importantes para la infección (Rosiana *et al.*, 2021). Por ejemplo, el caso de *ALS1* y *ALS3* se ha estudiado de manera considerable y en modelos se ha determinado que son importantes para el cambio de *C. albicans* del estadio de comensal a virulenta por medio de la invasión y filamentación para infectar células (Donohue *et al.*, 2011) (Cleary *et al.*, 2011) (Fu *et al.*, 1998).

En este estudio todos los genes *ALS* se detectaron en la mayoría de las cepas, sin embargo, hubo genes *ALS* que no se expresaron como fue el caso de *ALS2* y *ALS7*, esto pudo deberse a que los medios en los cuales se creció el hongo no presentaban las condiciones para que se llevara a cabo su expresión. Los genes *ALS* son muy diversos y su expresión depende de las condiciones en las cuales se encuentra *C. albicans*, hay ocasiones en las cuales solo expresan algunos genes de adhesión y cambiando las condiciones en las cuales se encuentra el hongo

cambia la frecuencia de expresión de los genes *ALS*, la investigación de estos genes sigue siendo de gran importancia por la gran diversidad que presentan al momento de participar en la virulencia de *C. albicans* (Hoyer and Cota, 2016).

Conclusiones

1. En este estudio el método de PCR fue eficaz para la identificación de *Candida albicans* mediante la amplificación de las secuencias ITS del gen *rRNA*.
2. La mayoría de los pacientes en este estudio fueron mayores de 30 años.
3. Los genes *ALS1*, *ALS7* y *ALS9* fueron detectados en la mayoría de las cepas de *Candida albicans* provenientes de infecciones cérvico-vaginales y periodontales lo que podría incrementar la agudeza o cronicidad de las infecciones.
4. Los genes *ALS2* y *ALS7* no se expresaron en ninguna de las cepas de *C. albicans*, lo cual pudo deberse probablemente a las condiciones ambientales utilizadas en este estudio.
5. *ALS1*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6* y *ALS9* de *C. albicans* se expresaron con mayor frecuencia durante el crecimiento en los caldos de cultivo de BHI y de Soya tripticasa.
6. Los resultados demostraron que durante los procesos infecciosos vaginales y periodontales por *C. albicans* podrían existir diferentes patrones de expresión de los genes de adhesión, que favorecería la persistencia de las infecciones vaginales o periodontales.

Perspectivas

Estudiar la patogenicidad de *C. albicans* es de gran importancia, ya que conocer y estudiar los distintos genes que participan y ayudan al desarrollo de la infección muestra un panorama más completo de los mecanismos que el hongo utiliza para infectar en diferentes condiciones. Los genes *ALS* que codifican a las proteínas *als* son necesarias para que *C. albicans* se adhiera en primera instancia a las células del hospedero, el conocimiento de que genes *ALS* se detectan y expresan en diferentes condiciones servirá para el desarrollo de nuevos tratamientos como la inhibición de ciertas proteínas específicas *als* ya que se podría evitar o reducir las infecciones por *C. albicans* en pacientes sanos e inmunodeprimidos.

Referencias

- Anderson MR, Klink K and Cohrsen A (2004) Evaluation of vaginal complaints. *JAMA* 291 1368–1379.
- Ardila C (2014) Prevalencia de Candida y asociación con periodontopatógenos presentes en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica. *Avances En Periodoncia e Implantología* 26 2014.
- Arkowitz RA and Bassilana M (2019) Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth. *F1000Research* 8 F1000 Faculty Rev-700.
- Bascones Martínez A and Figuro Ruiz E (2005) Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral* 17.
- Berman J (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* 9 595–601.
- Boahen A, Than LTL, Loke Y-L and Chew SY (2022) The Antibiofilm Role of Biotics Family in Vaginal Fungal Infections. *Frontiers in Microbiology* 13 787119.
- Chen H, Zhou X, Ren B and Cheng L (2020) The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence* 11 337–348.
- Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL, Trupin SR and Hoyer LL (2005) Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infection and Immunity* 73 1656–1663.
- Cleary IA, Reinhard SM, Miller CL, Murdoch C, Thornhill MH, Lazzell AL, Monteagudo C, Thomas DP and Saville SP (2011) *Candida albicans* adhesin Als3p is dispensable for virulence in the mouse model of disseminated candidiasis. *Microbiology (Reading, England)* 157 1806–1815.

- Coleman DA, Oh S-H, Manfra-Maretta SL and Hoyer LL (2012) A Monoclonal Antibody Specific for *Candida albicans* als4 Demonstrates Overlapping Localization of als Family Proteins on the Fungal Cell Surface and Highlights Differences between Als Localization in vitro and in vivo. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 64 321–333.
- Conti HR, Huppler AR, Whibley N and Gaffen SL (2014) Animal models for candidiasis. *Current Protocols in Immunology* 105 19.6.1-19.6.17.
- Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W and Richardson AC (2002) New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida spp.* *Applied and Environmental Microbiology* 68 3622–3627.
- Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y and Dhama K (2018) *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microbial Pathogenesis* 117 128–138.
- Denning DW (2017) Calling upon all public health mycologists : To accompany the country burden papers from 14 countries. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 36 923–924.
- Dermendzhiev T, Pehlivanov B, Petrova A, Stanev S and Murdjeva M (2022) Quantitative system for diagnosis of vulvovaginal candidiasis. *Journal De Mycologie Medicale* 32 101302.
- Dhanasekaran S, Selvados PP and Manoharan SS (2022) Anti-Fungal Potential of Structurally Diverse FDA-Approved Therapeutics Targeting Secreted Aspartyl Proteinase (SAP) of *Candida albicans*: an In Silico Drug Repurposing Approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8 881–890.
- Donohue DS, Ielasi FS, Goossens K V Y and Willaert RG (2011) The N-terminal part of als1 protein from *Candida albicans* specifically binds fucose-containing glycans. *Molecular Microbiology* 80 1667–1679.
- Ferreira ME da S, Colombo AL, Paulsen I, Ren Q, Wortman J, Huang J, Goldman MHS and Goldman GH (2005) The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* 43 Suppl 1 S313-319.
- Fisher MC, Gurr SJ, Cuomo CA, Blehert DS, Jin H, Stukenbrock EH, Stajich JE, Kahmann R, Boone C, Denning DW *et al.* (2020) Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. *MBio* 11 e00449-20.
- Foxman B (1990) The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: risk factors. *American Journal of Public Health* 80 329–331.

Fu Y, Ibrahim AS, Fonzi W, Zhou X, Ramos CF and Ghannoum MA (1997) Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* 143 (Pt 2) 331–340.

Fu Y, Rieg G, Fonzi WA, Belanger PH, Edwards JE and Filler SG (1998) Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infection and Immunity* 66 1783–1786.

Gao J, Wang H, Li Z, Wong AH-H, Wang Y-Z, Guo Y, Lin X, Zeng G, Liu H, Wang Y *et al.* (2018) *Candida albicans* gains azole resistance by altering sphingolipid composition. *Nature Communications* 9 4495.

Geiger AM, Foxman B and Sobel JD (1995) Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *C glabrata* and no candida. *Genitourinary Medicine* 71 304–307.

Ghannoum MA (1998) Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi = Japanese Journal of Medical Mycology* 39 55–59.

Ghannoum MA (2000) Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13 122–143.

Green MR and Sambrook J (2018a) The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* 2018.

Green MR and Sambrook J (2018b) Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018.

Gupta N (2019) DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology* 36 116–117.

Halder V, Porter CBM, Chavez A and Shapiro RS (2019) Design, execution, and analysis of CRISPR-Cas9-based deletions and genetic interaction networks in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Nature Protocols* 14 955–975.

Harun WHAW, Jamil NA, Jamaludin NH and Nordin M-A-F (2013) Effect of Piper betle and Brucea javanica on the Differential Expression of Hyphal Wall Protein (*HWPI*) in Non-*Candida albicans* Candida (NCAC) Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM* 2013.

Henry KW, Nickels JT and Edlind TD (2000) Upregulation of ERG Genes in Candida Species by Azoles and Other Sterol Biosynthesis Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 2693–2700.

Ho V, Herman-Bausier P, Shaw C, Conrad KA, Garcia-Sherman MC, Draghi J, Dufrene YF, Lipke PN and Rauceo JM (2019) An Amyloid Core Sequence in the Major *Candida albicans* Adhesin als1p Mediates Cell-Cell Adhesion. *MBio* 10 e01766-19.

Hoyer LL (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9 176–180.

Hoyer LL and Cota E (2016) *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Frontiers in Microbiology* 7 280.

Hoyer LL, Scherer S, Shatzman AR and Livi GP (1995) *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Molecular Microbiology* 15 39–54.

Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M and Schäfer W (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of Microbiology* 174 362–374.

Jabri B, Iken M, Achmit M, Rida S and Ennibi OK (2021) Occurrence of *Candida albicans* in Periodontitis. *International Journal of Dentistry* 2021 5589664.

Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T and Filler SG (2002) Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infection and Immunity* 70 5256–5258.

Knechtle P, Goyard S, Brachat S, Ibrahim-Granet O and d'Enfert C (2005) Phosphatidylinositol-dependent phospholipases C Plc2 and Plc3 of *Candida albicans* are dispensable for morphogenesis and host-pathogen interaction. *Research in Microbiology* 156 822–829.

Lim SJ, Mohamad Ali MS, Sabri S, Muhd Noor ND, Salleh AB and Oslan SN (2021) Opportunistic yeast pathogen *Candida spp.*: Secreted and membrane-bound virulence factors. *Medical Mycology* 59 1127–1144.

Liu Y and Filler SG (2011) *Candida albicans* als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. *Eukaryotic Cell* 10 168–173.

Lombardi L, Zoppo M, Rizzato C, Bottai D, Hernandez AG, Hoyer LL and Tavanti A (2019) Characterization of the *Candida orthopsilosis* agglutinin-like sequence (ALS) genes. *PLoS ONE* 14 e0215912.

Lyon JP, Moraes KCM, Moreira LM, Aimbire F and de Resende MA (2010) *Candida albicans*: genotyping methods and clade related phenotypic characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 41 841–849.

Marc G, Araniciu C, Oniga SD, Vlase L, Pîrnău A, Duma M, Măruțescu L, Chifiriuc MC and Oniga O (2018) New N-(oxazolylmethyl)-thiazolidinedione Active against *Candida albicans* Biofilm: Potential Als Proteins Inhibitors. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23 2522.

Mayer FL, Wilson D and Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4 119–128.

Monroy-Pérez E, Sáinz-Espuñes T, Paniagua-Contreras G, Negrete-Abascal E, Rodríguez-Moctezuma JR and Vaca S (2012) Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. *Mycoses* 55 e151-157.

Monroy-Pérez E, Rodríguez-Bedolla RM, Garzón J, Vaca-Paniagua F, Arturo-Rojas Jiménez E and Paniagua-Contreras GL (2020) Marked virulence and azole resistance in *Candida albicans* isolated from patients with periodontal disease. *Microbial Pathogenesis* 148 104436.

Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, Höfs S, Gratacap RL, Robbins J, Runglall M *et al.* (2016) Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* 532 64–68.

Naglik JR, Challacombe SJ and Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 67 400–428, table of contents.

Naglik JR, Gaffen SL and Hube B (2019) Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current Opinion in Microbiology* 52 100–109.

Negrini T de C, Koo H and Arthur RA (2019) Candida-Bacterial Biofilms and Host-Microbe Interactions in Oral Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1197 119–141.

Nobbs AH, Vickerman MM and Jenkinson HF (2010) Heterologous expression of *Candida albicans* cell wall-associated adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral *Streptococcus gordonii*. *Eukaryotic Cell* 9 1622–1634.

C.J. Nobile, H.A. Schneider, J.E. Nett, D.C. Sheppard, S.G. Filler, D.R. Andes, A. P. Mitchell, Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation, *Curr. Biol.* 18 (2008) 1017–1024.

Noble SM, Gianetti BA and Witchley JN (2017) *Candida albicans* cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews. Microbiology* 15 96–108.

Nyirjesy P (2001) Chronic Vulvovaginal Candidiasis. *American Family Physician* 63 697–703.

Oh S-H, Martin-Yken H, Coleman DA, Dague E and Hoyer LL (2022) Development and Use of a Monoclonal Antibody Specific for the *Candida albicans* Cell-Surface Protein Hwp1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 907453.

Park M, Do E and Jung WH (2013) Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Mycobiology* 41 67–72.

L.D. Pereira, T. Vila, L.P. Borba-Santos, W. de Souza, M. Navarro, S. Rozental, Activity of metal-azole complexes against biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*, *Curr. Pharmaceut. Des.* (2020);26(14):1524-1531

Peters BM, Coleman BM, Willems HME, Barker KS, Aggor FEY, Cipolla E, Verma AH, Bishu S, Huppler AH, Bruno VM *et al.* (2020) The Interleukin (IL) 17R/IL-22R Signaling Axis Is Dispensable for Vulvovaginal Candidiasis Regardless of Estrogen Status. *The Journal of Infectious Diseases* 221 1554–1563.

Pg R (2002) The significance and management of periodontal lesions in HIV infection. *Oral diseases* 8 Suppl 2.

Prakash SMU, Nazeer Y, Jayanthi S and Kabir MA (2020) Computational insights into fluconazole resistance by the suspected mutations in lanosterol 14 α -demethylase (Erg11p) of *Candida albicans*. *Molecular Biology Research Communications* 9 155–167.

Pristov KE and Ghannoum MA (2019) Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection* 25 792–798.

Ps B-M, Fk T-V, Ir C, Dr F, Km S, Gs A, M N, És K and Ti S (2021) Different expression levels of *ALS* and *SAP* genes contribute to recurrent vulvovaginal candidiasis by *Candida albicans*. *Future microbiology* 16.

Razavi T, Falahati M, Teimourian S, Farahyar S, Babaei V, Majdabadi N and Iraj E (2020) Investigating the expression of *ALS2* and *ALS9* genes along with allele frequency of *ALS9* in patients with vulvovaginal candidiasis. *Infection, Genetics and Evolution* 82 104253.

Rosiana S, Zhang L, Kim GH, Revtovich AV, Uthayakumar D, Sukumaran A, Geddes-McAlister J, Kirienko NV and Shapiro RS (2021) Comprehensive genetic analysis of adhesin proteins and their role in virulence of *Candida albicans*. *Genetics* 217 iyab003.

Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bakhshi B, Katirae F, Mohammadi R and Falahati M (2016) *ALS1* and *ALS3* gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. *Advanced Biomedical Research* 5 105.

Salud S de 181. Padecen mujeres infección vaginal al menos una vez en su vida. In *gob.mx*.

Shapiro RS, Chavez A, Porter CBM, Hamblin M, Kaas CS, DiCarlo JE, Zeng G, Xu X, Revtovich AV, Kirienko NV *et al.* (2018) A CRISPR-Cas9-based gene drive platform for genetic interaction analysis in *Candida albicans*. *Nature Microbiology* 3 73–82.

Sharkey LL, Liao W-L, Ghosh AK and Fonzi WA (2005) Flanking direct repeats of hisG alter URA3 marker expression at the HWP1 locus of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* 151 1061–1071.

- Singh DP, Kumar Verma R, Sarswat S and Saraswat S (2021) Non-*Candida albicans* *Candida* species: virulence factors and species identification in India. *Current Medical Mycology* 7 8–13.
- Staab JF, Datta K and Rhee P (2013) Niche-specific requirement for hyphal wall protein 1 in virulence of *Candida albicans*. *PLoS One* 8 e80842.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Piłat J, Siennicka K, Magda U and Kurzatkowski W (2012) [Virulence factors of *Candida albicans*]. *Przegląd Epidemiologiczny* 66 629–633.
- Strickland AB and Shi M (2021) Mechanisms of fungal dissemination. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 78 3219–3238.
- Suárez-Machín C, Garrido-Carralero NA and Guevara-Rodríguez CA (2016) Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. 10.
- Sudbery P, Gow N and Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 12 317–324.
- Theiss S, Ishdorj G, Brenot A, Kretschmar M, Lan C-Y, Nichterlein T, Hacker J, Nigam S, Agabian N and Köhler GA (2006) Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM* 296 405–420.
- Tsui C, Kong EF and Jabra-Rizk MA (2016) Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease* 74 ftw018.
- Wall G, Montelongo-Jauregui D, Bonifacio BV, Lopez-Ribot JoseL and Uppuluri P (2019) *Candida albicans* Biofilm growth and Dispersal: Contributions to Pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 52 1–6.
- Walsh TJ, Hayden RT and Larone DH (2018) *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. John Wiley & Sons.
- Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS and Rogers PD (2016) Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. *Frontiers in Microbiology* 7 2173.
- Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z and Peters BM (2020) Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *Journal of Fungi* 6 27.
- Winter MB, Salcedo EC, Lohse MB, Hartooni N, Gulati M, Sanchez H, Takagi J, Hube B, Andes DR, Johnson AD *et al.* (2016) Global Identification of Biofilm-Specific Proteolysis in *Candida albicans*. *MBio* 7 e01514-16.
- Zhang SX and Wiederhold NP (2016) Yeasts. *Microbiology Spectrum* 4 4.4.03.
- Zhang N, Harrex AL, Holland BR, Fenton LE, Cannon RD and Schmid J (2003) Sixty alleles of the *ALS7* open reading frame in *Candida albicans*: *ALS7* is a hypermutable contingency locus. *Genome Research* 13 2005–2017.

- Zhao X, Oh S-H, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, Leng RP, Brown AJP and Hoyer LL (2004) *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology (Reading, England)* 150 2415–2428.
- Zhao X, Oh S-H, Jajko R, Diekema DJ, Pfaller MA, Pujol C, Soll DR and Hoyer LL (2007a) Analysis of *ALS5* and *ALS6* allelic variability in a geographically diverse collection of *Candida albicans* isolates. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44 1298–1309.
- Zhao X, Oh S-H and Hoyer LL (2007b) Unequal contribution of *ALS9* alleles to adhesion between *Candida albicans* and human vascular endothelial cells. *Microbiology (Reading, England)* 153 2342–2350.
- Zhao X, Oh S-H and Hoyer LL (2007c) Deletion of *ALS5*, *ALS6* or *ALS7* increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 45 429–434.
- Zhao X, Oh S-H, Coleman DA and Hoyer LL (2022) *ALS1* Deletion Increases the Proportion of Small Cells in a *Candida albicans* Culture Population: Hypothesizing a Novel Role for als1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 895068.
- Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M and Neužil P PCR past, present and future. *Biotechniques* 10.2144/btn-2020–0057.
- Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R and Guiguemdé RT (2017) Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal De Mycologie Medicale* 27 1–19.