



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENOTIPOS ALS DE
***Candida albicans* EN MUJERES CON VULVOVAGINITIS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

IVONNE RODRÍGUEZ GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ERIC MONROY PÉREZ

Los Reyes Iztacala, Estado De México, Octubre de 2015.

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA, UNAM, PAPIME PE200209.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a varias personas:

A mis padres, que siempre me han apoyado incondicionalmente en todas mis decisiones.

A mis hermanos que han sido una parte fundamental de mi vida.

A mi abuelita porque siempre ha estado al pendiente de mí, y es un pilar en mi vida.

A ti que hoy no estás conmigo, pero que me enseñaste desde muy pequeña, cuál era el camino a seguir.

A mis tíos, por su apoyo incondicional, tanto personal como profesionalmente, aun estando lejos sé que siempre cuento con cada uno de ellos.

Y a mis amigos, que durante las diferentes etapas de mi educación estuvieron compartiendo clases, problemas, risas y sueños.

A Donovan por su amistad, a lo largo de todos estos años, que en los buenos y malos momentos siempre me brindo un consejo. Y simplemente gracias por compartir momentos de alegría cada vez que nos vemos.

AGRADECIMENTOS

Especialmente agradezco a la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, por la confianza puesta en mí, para la realización de este proyecto, apoyándome con sus conocimientos y regaños, cuando era necesario.

También agradezco infinitamente al Dr. Eric Monroy Pérez que siempre tuvo la disposición y paciencia, resolviendo las dudas que iban surgiendo durante la realización de este trabajo.

De igual forma agradezco a la Biol. Susana Esther González y a la Biol. Patricia Sánchez, que durante todo el proyecto estuvieron apoyándonos con sus conocimientos en el laboratorio.

A todos mis profesores de la FESI que me brindaron sus conocimientos y algunos su amistad.

A la UNAM porque siempre será un orgullo haber concluido mis estudios en esta institución.

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Características y morfología de <i>Candida albicans</i>	7
2.2 Candidosis vulvovaginal	7
2.3 Factores de virulencia.....	8
3. ANTECEDENTES.....	11
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. OBJETIVO GENERAL	13
5.1 Objetivos específicos.....	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Selección de los pacientes y toma de los productos.	14
6.2 Identificación de las levaduras.....	14
6.3 Extracción del ADN de las levaduras para la identificación de <i>Candida albicans</i>	14
6.4 Detección de las distintas especies de <i>Candida</i> por PCR multiplex.	15
6.5 Detección de la familia <i>ALS</i> de <i>C. albicans</i> por PCR.....	17
6.6 Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante electroforesis en Geles de Agarosa.	19
6.7 Preparación del inóculo de las cepas de <i>C. albicans</i> seleccionadas para la cuantificación de la expresión de <i>ALS</i> por PCR en Tiempo Real.	19
6.8 Inoculación en el epitelio vaginal humano.	20
6.9 Extracción y purificación del ARN para la PCR en Tiempo Real.	20
6.10 Reversotranscripción con eliminación de ADN genómico.....	21
6.11 Eliminación del ADN genómico.....	21
6.12 Preparación de la master mix para la reversotranscripción.	22
6.13 Preparación de la mezcla de reacción para PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green.....	23
6.14 Análisis estadístico.	24
7. RESULTADOS	25
7.1 Identificación de <i>C. albicans</i> por PCR.	25
7.2 Detección de los genotipos <i>ALS</i> en las cepas de <i>C. albicans</i>	25
7.3 Asociación de los genotipos <i>ALS</i> en las cepas de <i>C. albicans</i>	28
7.4 Determinación de la expresión de la familia <i>ALS</i> por PCR en Tiempo Real.	30
8. DISCUSIÓN.....	36
8.1 Pacientes estudiadas	36

8.2 Distribución de los genes <i>ALS</i> en las cepas de <i>C. albicans</i>	36
8.3 Expresión de los genes <i>ALS</i> en las cepas de <i>C. albicans</i>	37
9. CONCLUSIONES.....	39
X. BIBLIOGRAFÍA	40

1. RESUMEN

Candida albicans es un hongo oportunista capaz de ocasionar infecciones en piel, en mucosas, así como enfermedades sistémicas, debido a los diferentes factores de virulencia que posee. Entre los principales factores de virulencia implicados en el establecimiento, colonización e invasión de los tejidos del hospedero por *C. albicans* se encuentra la familia de genes *ALS* (agglutinin-like sequence) que codifican para glicoproteínas de la pared celular. La familia *ALS* consta de 8 genes, que expresan adhesinas con diferentes perfiles de adhesión. El objetivo de este estudio fue cuantificar la expresión de los genes *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* y *ALS9* por PCR en Tiempo Real en cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con vulvovaginitis utilizando un modelo *in vitro* de epitelio vaginal humano reconstituido (HVE A431). Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron cuidadosamente mujeres con los síntomas de vulvovaginitis, como ardor, comezón y disuria del servicio de ginecología de un Hospital público ubicado en el Estado de México, México. La edad de las mujeres se encontró en el intervalo de 18-59 años. El 60% de las mujeres presentó menos de 59 años de edad (n=30). La identificación de las cepas de *C. albicans* se realizó por PCR multiplex y la detección de los genes de la familia *ALS* por PCR convencional. Para promover la expresión de los genes *ALS* en las cepas de *C. albicans* se seleccionaron 11 cepas portadoras de todos los genes y se inocularon sobre la superficie del epitelio vaginal humano reconstituido (RHVE A431). La extracción de ARN y la reversotranscripción a cDNA se realizó mediante los equipos de Qiagen. La cuantificación de la expresión se realizó por PCR en Tiempo Real. El gen *ALS4* se expresó en el 100% de las cepas estudiadas, seguido de *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS5* y *ALS7* con el 90.9% (n=10), en cada caso. Los genes expresados con menor frecuencia fueron *ALS6* y *ALS9* con el 72.7% (n=8), en cada caso. Los resultados encontrados en este trabajo demostraron que durante la infección del RHVE se expresaron todos los marcadores genéticos de la familia *ALS*, por lo que las combinaciones de los transcritos *ALS* jugaron un rol importante en la patogénesis de la infección del RHVE.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características y morfología de *Candida albicans*

Candida albicans es una levadura oval Grampositiva, mide de 4 a 6 micras, presenta gemación mediante la formación de blastoconidios. Es capaz de formar hifas y otras formas alargadas con restricciones a intervalos llamadas pseudohifas, que carecen de paredes paralelas y tabiques de las hifas verdaderas. Fermenta la glucosa y maltosa, produciendo ácido y gas, es miembro de la flora normal de las mucosas de los aparatos respiratorio, digestivo y genital femenino. *C. albicans* presenta morfogénesis (involucrada en la invasión de los tejidos), mediante la cual ocurre la transición de levadura a hifa (Allistair *et al.*, 1999). Puede provocar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (SIDA, quimioterapia por cáncer, tratamiento con antibióticos, diabetes mellitus, neutropenia, etc.), infecciones en piel, uñas, pulmones, boca (algodoncillo), vulvovaginitis y otros órganos (Odds *et al.*, 2006).

2.2 Candidosis vulvovaginal

La candidosis vulvovaginal (CVV) se define por los signos y síntomas de inflamación en presencia de *Candida* y en ausencia de infección de otra etiología (Sobel *et al.*, 1998). La infección vaginal causada por *Candida* produce un conjunto de signos y síntomas, de los cuales el más específico es el prurito; todos los demás pueden presentarse en infecciones causadas por otros microorganismos. En ocasiones se presenta descarga vaginal blanquecina, cuya consistencia puede ser acuosa o espesa, semejante al queso cotagge. La paciente puede experimentar dolor vaginal, irritación y ardor en la vulva. También se puede presentar eritema e inflamación de los labios y la vulva, con lesiones periféricas en forma de fisuras. Los síntomas se exacerban una semana antes de la menstruación. La CVV es una de las infecciones más comunes en mujeres de edad reproductiva (Foxman *et al.*, 1998; Reed 1992; Sobel *et al.*, 1998) por lo que la mayoría de mujeres presentarán esta infección, en al menos una ocasión a lo largo de su vida. Existen varios factores externos que predisponen a la CVV, como el embarazo,

los anticonceptivos orales, la diabetes mellitus y el uso de antibióticos (Sobel, 1985; Sobel *et al.*, 1998). En ausencia de estos factores de riesgo, la CVV ocurre frecuentemente en la fase lútea del ciclo menstrual, en la cual los niveles de estrógenos se encuentran elevados. En contraste las mujeres postmenopáusicas con bajos niveles de estrógenos raramente sufren de CVV (Fidel *et al.*, 2000).

2.3 Factores de virulencia.

C. albicans posee varios factores de virulencia que incluyen la formación de hifa (Sobel *et al.*, 1984), cambio de fenotipo (phenotypic switching) (Soll *et al.*, 1987; Hellstein *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2000), secreción de enzimas hidrolíticas (Hube, 1998; Ghannoum, 2000) y adherencia celular (Gaur & Klotz, 1997).

Factor de virulencia	Mecanismo de virulencia
Adhesinas (familia ALS, HWP1, Int1) ^a	Adhesión y colonización
Producción de Hifa	Adhesión, invasión, y destrucción de los tejidos
Enzimas hidrolíticas extracelulares (familias SAP, Plb y Lip) ^b	Adquisición de nutrientes, invasión, destrucción de los tejidos y evasión de la respuesta del hospedero.
Cambio de fenotipo	Adhesión y evasión de la respuesta del hospedero.

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *C. albicans*.

^aALS = agglutinin-like sequence; HWP1 = hyphal cell wall protein 1; Int1= integrin-like protein.

^bSAP = secreted aspartyl proteinases 1 a 10; Plb = phospholipase B1 and B2; Lip = Lipasas 1 a 10.

En la adhesión de *C. albicans* a la superficie de las células del hospedero se encuentra involucrada la familia de genes *ALS* (agglutinin-like sequence) que codifican para glicoproteínas de la pared celular (Gaur & Klotz, 1997; Hoyer, 2001). La familia de genes *ALS* está compuesta por 8 genes que expresan adhesinas (125-600 kDa) con diferentes perfiles de adhesión (Nas *et al.*, 2008). Cada gen *ALS* tiene una estructura similar de tres dominios, incluyendo el dominio 5' de 1299-1308 pb que es muy semejante (55-90%) entre la familia; un dominio central "tandem" formado por números de secuencias repetidas de 108-pb; y el dominio 3' que es relativamente variable en longitud y secuencia (Figura 1) (Hoyer 2001).

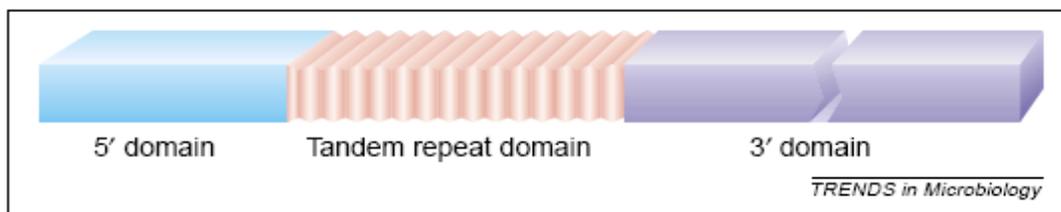


Figura 1. Estructura de los genes *ALS*. Se aprecian los 3 dominios, la longitud del dominio 5' es muy parecido en toda la familia. La longitud del tandem y el dominio 3' son altamente variables.

Los genes *ALS* en *C. albicans* son regulados diferencialmente por condiciones fisiológicas como; cambio en el medio de cultivo para su crecimiento (Hoyer, 1995; Hoyer *et al.*, 1998a), la forma morfológica del hongo (Hoyer *et al.*, 1998a; Hoyer & Hecht 2000) y el estadio de crecimiento (*ALS4*) (Hoyer, 1998b).

Se ha propuesto que los patrones de expresión de los genes de la familia *ALS* podrían encontrarse asociados con las distintas formas de candidosis (oral, vaginal o sistémica) (Hoyer, 2001). Los genotipos *ALS* codifican para glicoproteínas localizadas en la superficie de la pared celular de *C. albicans* mediante las secuencias hidrofóbicas amino y carboxilo-terminal, las cuales se ha demostrado bioquímicamente que funcionan como una secuencia de señal secretoria y como un sitio adicional de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI), respectivamente (Hoyer *et al.*, 1998; Hoyer & Hech, 2001; Kapteyn *et al.*,

2000). Las proteínas *ALS* se unen en la pared celular a α 1,6 glucano y se comportan como un módulo GPI (Kapteyn *et al.*, 2000). Las proteínas *ALS* se encuentran altamente glicosiladas predominantemente en las repeticiones del tándem y del dominio carboxilo terminal que son ricas en serina/treonina (Kapteyn *et al.*, 2000).

El tamaño de las proteínas *ALS* maduras se encuentra entre 440 (*ALS3* y *ALS8*) a 600 Kda (*ALS1*) (Hoyer, 2001), y por comparación de las proteínas se predice que las estructuras tridimensionales de los dominios N-terminal de la mayoría de las proteínas *ALS* son comunes a la estructura tridimensional de las adhesinas bacterianas (Sheppard *et al.*, 2004).

Mediante estudios de expresión heteróloga de los genes *ALS* en la no adherente *Saccharomyces cerevisiae*, se demostró que las glicoproteínas codificadas por ellos median la adherencia a la superficie de las células del hospedero y a los componentes de la matriz extracelular (Gaur & Klotz, 1997; Gaur *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 1998). Estos autores implicaron el dominio amino terminal de las glicoproteínas en las interacciones adhesivas.

3. ANTECEDENTES

Los genotipos de la familia *ALS* fueron descritos por primera vez en *C. albicans* por Hoyer *et al.*, en 1995, más tarde el mismo Hoyer describió que en la candidosis oral, vaginal y sistémica podrían existir distintos patrones de expresión de los genes de la familia *ALS* (Hoyer, 2001). A raíz de esto en los últimos años se ha tratado de establecer que genes de la familia *ALS* se expresan como proteínas de adhesión en los distintos tipos de candidosis. Para lo cual Green *et al.*, (2004) reportaron que los genes expresados en mayor porcentaje utilizando un modelo de candidosis oral y de biofilm fueron *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5* y *ALS9*. Un año después Cheng *et al.*, (2005) describieron la expresión de los ocho genes de la familia *ALS* de *Candida albicans* en muestras de fluidos vaginales y en un modelo de candidosis vaginal. Los genes expresados más frecuentemente por estos autores fueron *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* y *ALS9*. Dos años después Zhao *et al.*, (2007) analizaron la variabilidad alélica de *ALS5* y *ALS6* en una colección de cepas de *C. albicans* aisladas de diferentes zonas geográficas. Estos autores describieron que los alelos de *ALS5* tuvieron de 2-10 copias de secuencias repetidas en tándem (media= 4.82 copias) mientras que los alelos de *ALS6* presentaron de 2-8 copias (media = 4.00 copias). Nas *et al.*, (2008) describieron la expresión de los genes *ALS1*, *HWP1* y *SAP4* en cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres con vaginitis.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en nuestro país las estadísticas sobre la candidosis vulvovaginal son muy escasas, además de no se han caracterizado molecularmente la familia de genes *ALS* en las cepas de *C. albicans* que ocasionan vulvovaginitis, el propósito de este trabajo fue establecer la frecuencia de la candidosis vulvovaginal en un grupo de pacientes infectadas, y también determinar la expresión de los genotipos *ALS* en cepas de *C. albicans* de origen vaginal, utilizando un modelo *In vitro* de epitelio vaginal humano.

5. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión de los genotipos de la familia *ALS* (agglutinin-like-sequence) de *C. albicans* utilizando un modelo de epitelio vaginal humano reconstituido.

5.1 Objetivos específicos

- Establecer la frecuencia de la candidosis vaginal en un grupo de mujeres con los signos y síntomas característicos.
- Identificación de las cepas de *C. albicans* obtenidas de las mujeres con vulvovaginitis por PCR multiplex.
- Detección por PCR de los genes de la familia *ALS* en las cepas de *C. albicans*.
- Establecer la expresión de los genes involucrados en la adhesión celular de *C. albicans* por PCR en Tiempo Real.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Selección de los pacientes y toma de los productos.

Para el desarrollo de este estudio se seleccionó un grupo de 264 mujeres con los síntomas de vulvovaginitis, como ardor, comezón y/o disuria con presencia de una descarga espesa, de los servicios de ginecología del Hospital General Regional 72 (segundo nivel de atención) del IMSS, ubicado en el Municipio de Tlalnepantla, Estado de México. Se incluyeron en este estudio a mujeres adultas; con y sin vida sexual activa, y se excluyeron pacientes con cáncer cervicouterino, embarazadas, que se encontraban en tratamiento con antibióticos o que habían tomado antifúngicos en los últimos 30 días. Después de obtener el consentimiento informado de cada paciente se tomaron dos muestras del saco vaginal por medio de hisopos estériles, una se utilizó para corroborar la presencia de levaduras, pseudohifas y/o hifas por examinación directa al microscopio y la otra se depositó en el medio de medio de transporte Stuart. Las muestras vaginales fueron transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM. Posteriormente las muestras fueron sembradas en el medio líquido de BHI (infusión-cerebro-corazón, Bioxon, México) y se incubó a 37° C por 24 horas. Al término los cultivos se sembraron en agar sabouraud (Bioxon, México) que contenía 50 µg/ml de cloranfenicol y en los medios sólidos; Agar sangre (Bioxon, Mexico), eosina azul de metileno (EMB, Bioxon, México) y S-110 (Bioxon, México) y se incubaron a 37° C por 48 horas.

6.2 Identificación de las levaduras

A partir de los cultivos puros crecidos en agar sabouraud, las levaduras fueron identificadas mediante la prueba del tubo germinativo en BHI (Bioxon) suplementado con 10% de suero humano y por API 20C AUX (BioMerieux). La cepa de *C. albicans* ATCC32354 fue utilizada como control positivo.

6.3 Extracción del ADN de las levaduras para la identificación de *Candida albicans*.

El DNA genómico de las cepas de *Candida* fue extraído utilizando el Wizard genomic DNA purification kit (promega, Madison, WI), para lo cual las cepas de

Candida fueron crecidas en YPD (extracto de levadura peptona dextrosa) por 24 h a 37° C. Posteriormente 1 ml del cultivo fue transferido en un tubo eppendorf de 1.7 ml y centrifugado por 3 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante fue desechado, la pastilla celular fue resuspendida en 293 µL de EDTA (50mM) y al término se adicionaron 7.5 µL (20 mg/ml) de lyticasa (Sigma Catálogo L2524). Después de mezclar suavemente por pipeteó, la muestra fue incubada a 37°C por 1 hora (para digestión de la pared celular) y al cabo se enfrió a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada por 2 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante fue desechado y se adicionaron 300 µL de la solución de lisis. Posteriormente la muestra fue mezclada suavemente por pipeteó. Al término se adicionaron 200 µL de la solución de precipitación de proteínas, se mezcló en un vortex vigorosamente por 20 segundos y se incubó en hielo por 5 minutos. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos y el sobrenadante en donde se encontraba el ADN fue transferido a otro tubo limpio de 1.7 ml que contenía 300 µL de isopropanol. La muestra se mezcló suavemente hasta que se observó el ADN de manera visible (fibras). Posteriormente la muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos, cuidadosamente se decantó el sobrenadante sobre un papel absorbente limpio y se adicionaron 300 µL de etanol al 70%. El tubo con la muestra se invirtió varias veces para lavar el ADN. Al término la muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos, el etanol se retiró cuidadosamente y la pastilla se secó al aire por 15 minutos. Finalmente se adicionaron 50 µL de solución de rehidratación de ADN y 1.5 µL de solución de RNasa para purificar la muestra de ADN, se mezcló en un vortex por 1 segundo, posteriormente se centrifugó la muestra por 5 segundos y el líquido colectado (ADN) se incubó por 15 minutos a 37°C. Al término el ADN rehidratado se incubó 1 h a 65° C (agitando suavemente el tubo en varias ocasiones) y finalmente el ADN fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

6.4 Detección de las distintas especies de *Candida* por PCR multiplex.

La detección de las especies de *Candida* (Tabla 2) por PCR multiplex se llevó a cabo por el método descrito por Guizhen & Mitchell (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). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 μL ; 1 μL de cada oligonucleótido (TS1 y TS4), 20 μL de H_2O libre de nucleasa, 3 μL de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl_2 , 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuReTaqTMReady-To-GoTM 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 el 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) (Tabla 2). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 μL ; 1 μL de cada primer, 15 μL de H_2O libre de nucleasa, 3 μL de DNA templado, 1.5 mmol de MgCl_2 , 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuReTaqTMReady-To-GoTM PCR beads). La amplificación del ADN se realizó bajo las mismas condiciones que para ITS1 e ITS4.

Especie	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Tamaños de los amplicones (pb)
Todos los hongos	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Variable
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>Candida albicans</i>	CALB1	TTTATCAACTTGTCACACCAGA	273
	CALB2	ATCCCGCCTTACCACTACCG	
<i>Candida glabrata</i>	CGL1	TTATCACACGACTCGACACT	423
	CGL2	CCCACATACTGATATGGCCTACAA	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPA1e	TTGGTAGGCCTTCTATATGGG	320 300
	CPA3f	GCCAGAGATTAA ACTCAACCAA	
	CPA2	CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC	
<i>Candida tropicalis</i>	CTR1	CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT	357
	CTR2	TGGCCACTAGCAAATAAGCGT	

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

6.5 Detección de la familia ALS de *C. albicans* por PCR.

La detección de los genes de la familia ALS de *C. albicans* (Tabla 3) se realizó por PCR convencional conforme a lo descrito por Green *et al.*, (2004). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µL; 1 µL de cada oligonucleótido (Tabla 3), 20 µL de H₂O libre de nucleasa, 3 µL de ADN molde, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaqpolimerase 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.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)	Tamaños de los amplicones (pb)
ALS1	RTALS1F	GAC TAGTGAACCAACAAATACCAGA	318
	RTALS1R	CCAGAAGAAACAGCAGGTGA	
ALS2	RTALS2F	CCAAGTATTAACAAAGTTTCAATCACTTAT	366
	RTALS2R	TCTCAATCTTAAATTGAACGGCTTAC	
ALS3	RTALS3F	CCACTTCACAATCCCCATC	342
	RTALS3R	CAGCAGTAGTAGTAACAGTAGTAGTTTCATC	
ALS4	RTALS4F	CCCAGTCTTTCACAAGCAGTAAAT	356
	RTALS4R	GTAATGAGTCATCAACAGAAGCC	
ALS5	RTALS5F ALT	TGACTACTTCCAGATTTATGCCGAG	318
	RTALS5R ALT	ATTGATACTGGTTATTATCTGAGGGAGAAA	
ALS6	RTALS6F	GACTCCACAATCATCTAGTAGCTTGGTTT	152
	RTALS6R2	CAA TTGTCACATCATCTTTTGTGTC	
ALS7	RTALS7F	GAAGAGAACTAGCGTTTGGTCTAGTTGT	206
	RTALS7R2	TGGCATACTCCAATCATTTATTTCA	
ALS9	RTALS9F2	CCATATTCAGAAACAAAGGGTTC	198
	RTALS9R2	AACTGAAACTGCTGGATTTGG	

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la detección de la familia ALS de *C. albicans*.

6.6 Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante electroforesis en Geles de Agarosa.

Después de la amplificación del ADN, 8 µL de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

6.7 Preparación del inóculo de las cepas de *C. albicans* seleccionadas para la cuantificación de la expresión de ALS por PCR en Tiempo Real.

Para promover la expresión de los genes, las cepas de *C. albicans* (con presencia de todos 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. albicans* y se depositó en 10 ml de YPD (extracto de levadura peptona dextrosa). El medio se incubó a 37° C por 24 horas. Al término, las células del cultivo se colectaron por centrifugación (2,000 rpm por 3 minutos), se lavaron tres veces con PBS y se contaron. Cuatro millones de células se inocularon en 10 ml de YPD y se incubaron a 37° C por 24 horas. Al término las células del cultivo se colectaron nuevamente por centrifugación (2,000 rpm por 3 minutos), se lavaron tres veces con PBS y se contaron por triplicado (Green *et al.*, 2004). Un inóculo de 4×10^7 células/ml se preparó para usarse en el epitelio vaginal humano (HVE A431), de Lab. SkinEthic, Francia (Figura 2).



Figura 2. Placa con epitelio vaginal humano (HVE A431). Fotografía: Laboratorio Clínico, FES-Iztacala, UNAM.

6.8 Inoculación en el epitelio vaginal humano.

50 μ L de una suspensión de *C. albicans*/PBS (2×10^6 células en total) se depositó en la superficie del epitelio vaginal humano (HVE A431), y se incubaron a 37°C x 24 h, en 5% de CO₂ y humedad saturada.

6.9 Extracción y purificación del ARN para la PCR en Tiempo Real.

El ARN total de *C. albicans* fue extraído utilizando el kit RNeasy (Qiagen; No. de catálogo 74104) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para lo cual las levaduras se recolectaron del epitelio vaginal humano (HVE A431) y en un tubo Eppendorf se preparó una dilución en PBS para tener 7.5×10^8 células. El tubo se centrifugó a 1000 g durante a 4° C por 5 minutos. Se decantó totalmente el sobrenadante, se resuspendieron las células del hongo en 2 ml de buffer Y1 con liticasa (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 μ L de

etanol al 70% para homogeneizar el lisado, se mezcló suavemente, se transfirieron 700 μ L a una columna contenida en un tubo de 2 ml, se centrifugó a ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos y el líquido de flujo se descartó. Posteriormente se adicionaron 700 μ L de buffer 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 μ L de buffer RPE a la columna, se centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo se descartó. Nuevamente se adicionaron 500 μ L de buffer RPE a la columna, se centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 2 minutos para lavar la membrana y líquido de flujo se descartó. Al término se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml, se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto. De nueva cuenta se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 1.5 ml, se adicionaron de 30-50 μ L de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y se centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 1 minuto para obtener el ARN. La concentración y pureza total del ARN fue medida utilizando un espectrofotómetro, Nanodrop 2000. El ARN esperado fue $<$ de 30 μ g. El ARN es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a ADNc.

6.10 Reversotranscripción con eliminación de ADN genómico.

Para realizar el proceso de la reversotranscripción de ARN a ADNc se utilizó el kit QuantitecRevereTranscription (Qiagen; No. de catálogo 205311) siguiendo las instrucciones del fabricante como sigue:

6.11 Eliminación del ADN genómico.

Se descongelaron los componentes del Kit a temperatura ambiente (15-25°C). Para un volumen final por reacción de 14 μ L se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 4).

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

Tabla 4. Componentes de reacción utilizados para eliminar el ADN genómico.

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

6.12 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 µL se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 5).

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

Tabla 5. 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.

6.13 Preparación de la mezcla de reacción para PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green.

Los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión de *ALS* de *C. albicans* fueron los mismos utilizados para la detección de los genes por PCR convencional (Tabla 3). 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; 12.5 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 8.5 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 rRNA de *C. albicans* se utilizó como gen de referencia. La cepa de *C. albicans* ATCC32354 fue utilizada como control positivo y como controles negativos se utilizaron las siguientes cepas clínicas de *C. albicans*: Ca11, Ca27, Ca37, Ca13 Ca28, Ca38, Ca20, Ca39 y Ca14. En cada corrida de PCR en Tiempo Real se realizó la melting point para diferenciar los productos específicos (amplicones) de los productos inespecíficos (dímeros de olinonucleótidos).

6.14 Análisis estadístico.

Las frecuencias de los genes de la familia ALS entre las cepas de *C. albicans* aisladas de las mujeres con edades de 18-29 (n=13), 29-39 (n=14), 40-49 (n=11) y 50-57 (n=12) años fueron analizadas por la prueba de la X^2 , con $P < 0.005$.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de *C. albicans* por PCR.

C. albicans fue identificada por PCR en el 18.9% (n = 50) de los cultivos por PCR mediante la amplificación de una región interna del gen rRNA (ITS1 e ITS2) (Figura 3). En el 81.1 (n=214) se identificaron bacterias como; *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

7.2 Detección de los genotipos ALS en las cepas de *C. albicans*

Los genotipos ALS detectados con mayor frecuencia en las cepas de *C. albicans* de origen vaginal fueron ALS1, ALS5, ALS9, ALS7 y ALS2 (Tabla 6, Figura 3 y Figura 4).

Gen	Número	Porcentaje
ALS1	50	100
ALS2	30	60
ALS3	18	36
ALS4	27	54
ALS5	35	70
ALS6	28	56
ALS 7	32	64
ALS 9	33	66

Tabla 6. Distribución de los genotipos de la familia ALS en las cepas de *C. albicans*.

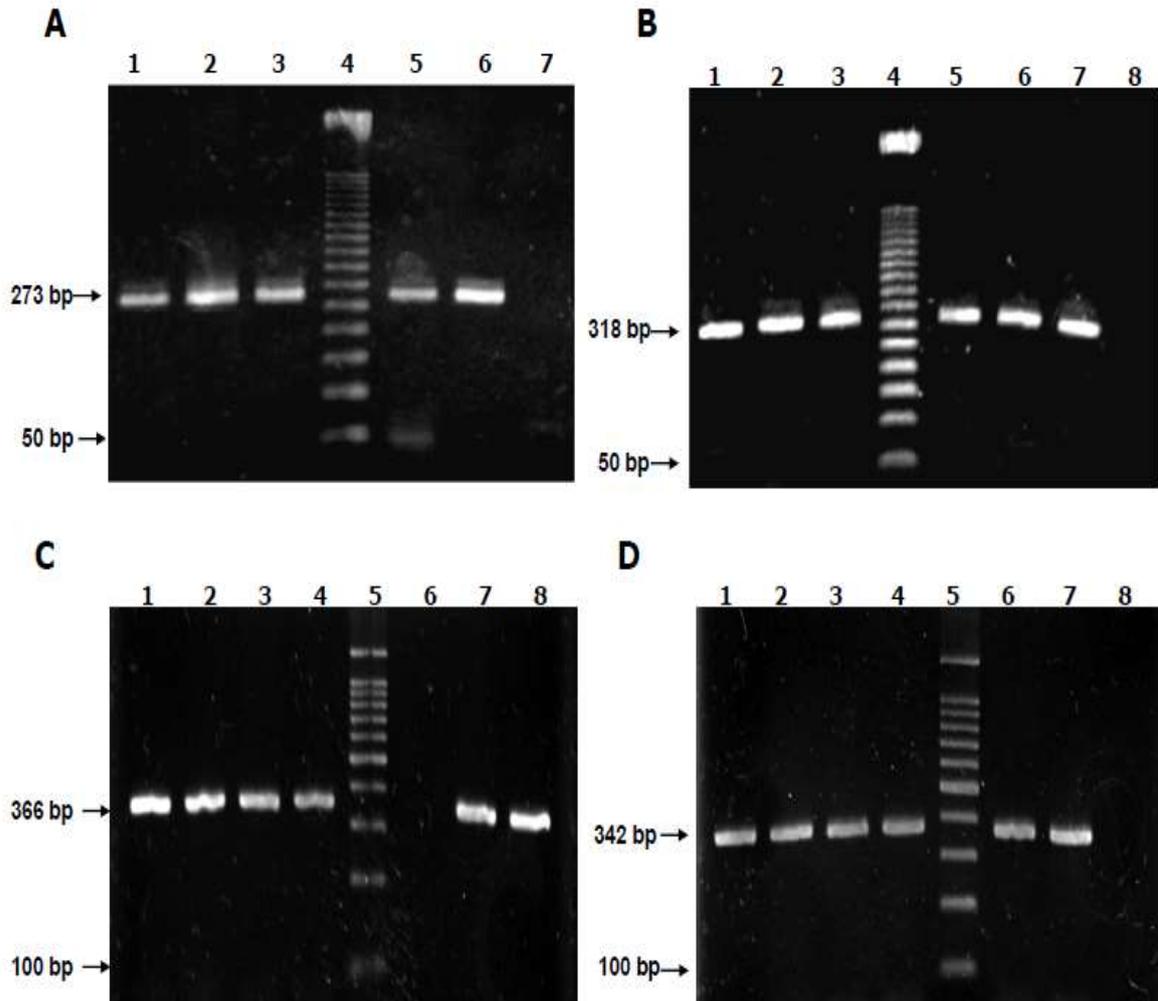


Figura 3. Identificación de *Candida albicans* y de los genotipos *ALS1-ALS3* por PCR convencional. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Control negativo (sin ADN molde). **A** (ITS1 e ITS2, amplicón de 273 pb): Carriles 1-3 y 5, cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con candidosis vaginal; Carril 4, MPM 50 pb-ladder (Invitrogen); Carril 6, Control positivo; Carril 7, Control negativo. **B** (*ALS1*, amplicón de 318 pb); Carriles 1-3 y 5-6, *ALS1* en cepas *C. albicans*; Carril 4, MPM 50 pb-ladder; Carril 7, Control positivo; Carril 8, Control negativo. **C** (*ALS2*, el amplicón de 366 pb); Carriles 1-4 y 8, *ALS2* en cepas *C. albicans*; Carril 4, MPM 100 pb-ladder (Invitrogen); Carril 6, Control negativo; Carril 7, Control positivo. **D** (*ALS3*, el amplicón de 342 pb); Carriles 1-4 y 6, *ALS3* en cepas *C. albicans*; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 7, Control positivo; Carril 8, Control negativo.1

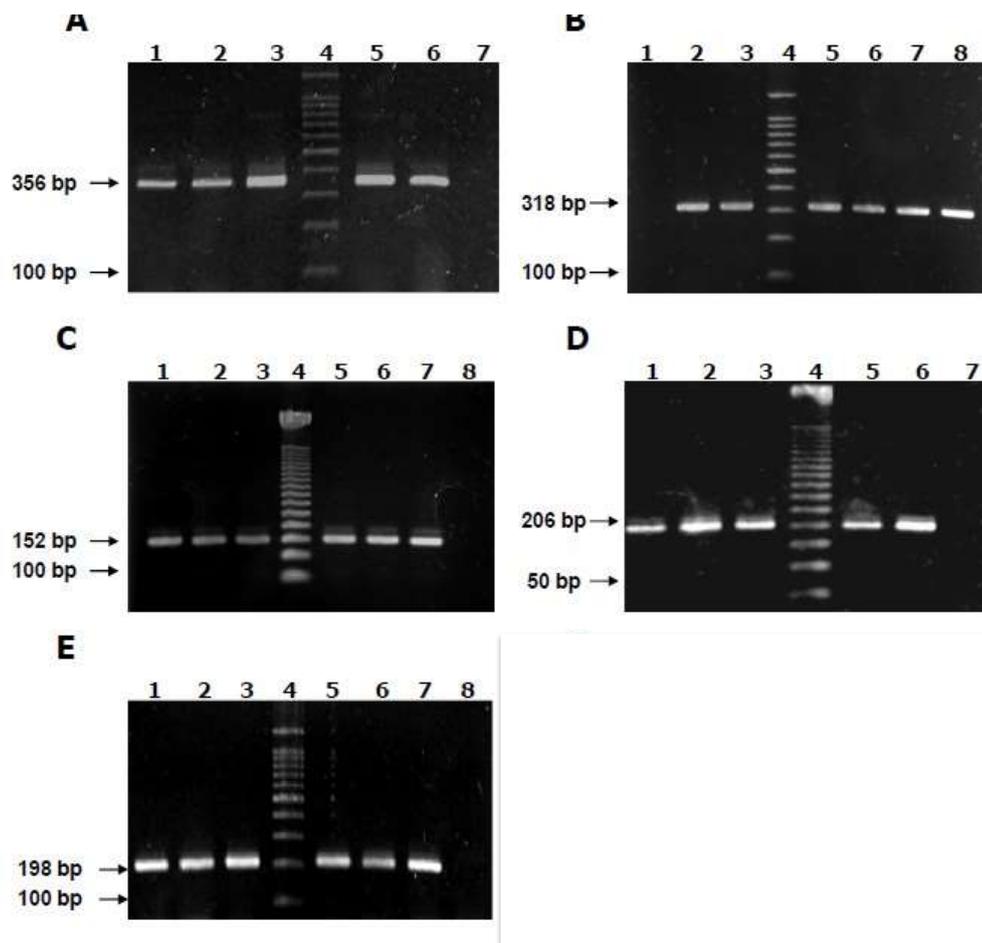


Figura 4. Identificación de los genotipos *ALS4-ALS9* de *Candida albicans* por PCR convencional. Control positivo (*C. albicans* ATCC32354). Control negativo (sin ADN molde). **A** (*ALS4*, amplicón de 356 pb); Carriles 1-3 y 5, *ALS4* en *C. albicans* de origen vulvovaginal; Carril 4, MPM 100 pb-ladder (Invitrogen); Carril 6, Control positivo; Carril 7, Control negativo. **B** (*ALS5*, amplicón de 318 pb); Carril 1, Control negativo; Carril 2, Control positivo; Carriles 3 y 5-8 *ALS5* en cepas *C. albicans*; Carril 4, MPM 100 pb-ladder. **C** (*ALS6*, 152 pb el amplicón); Carriles 1-3 y 5-6, *ALS6* en cepas *C. albicans*; Carril 4, MPM 100 pb-ladder; Carril 7, Control positivo; Carril 8, Control negativo. **D** (*ALS7*, amplicón de 206 pb); Carriles 1-3 y 5, *ALS7* en *C. albicans*; Carril 4, MPM 50 pb-ladder; Carril 6, Control positivo; Carril 7, Control negativo. **E** (*ALS9*, 198 pb el amplicón); Carriles 1-3 y 5-6, *ALS9* en *C. albicans*; Carril 4, MPM 100 pb-ladder; Carril 7, Control positivo; Carril 8, Control negativo.

No existieron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los genotipos *ALS* entre las cepas de *C. albicans* aisladas de las mujeres con edades de 18-29 (n=13), 29-39 (n=14), 40-49 (n=11) y 50-59 (n=12) años ($P < 0.005$).

7.3 Asociación de los genotipos *ALS* en las cepas de *C. albicans*

Se encontraron 24 patrones diferentes de asociación de los genes *ALS* en las cepas de *C. albicans* analizadas (Tabla 7), dentro de los cuales el patrón conformado por los ocho genes de *ALS* (*ALS1/ALS2/ALS3/ALS4/ALS5/ALS6/ALS7/ALS9*) lo presentaron 8 cepas de *C. albicans* (16%).

No. de patrón	Genotipos ALS	No. de cepas	Porcentaje
1	ALS1/ALS2/ALS3/ALS4/ALS5/ALS6/ALS7/ALS9	8	16
2	ALS1/ALS2/ALS4/ALS5/ALS6/ALS7/ALS9	6	12
3	ALS1/ALS2/ALS3/ALS4/ALS5/ALS7/ALS9	4	8
4	ALS1	4	8
5	ALS1/ALS9	3	6
6	ALS1/ALS7	3	6
7	ALS1/ALS4/ALS5/ALS6/ALS7/ALS9	2	4
8	ALS1/ALS2/ALS5/ALS9	2	4
9	ALS1/ALS6	2	4
10	ALS1/ALS5	2	4
11	ALS1/ALS2/ALS3/ALS4/ALS5/ALS6/ALS7/ALS9	1	2
12	ALS1/ALS2/ALS3/ALS4/ALS6/ALS7/ALS9	1	2
13	ALS1/ALS2/ALS3/ALS4/ALS5/ALS6/ALS9	1	2
14	ALS1/ALS3/ALS4/ALS5/ALS6/ALS7/ALS9	1	2

15	ALS1/ALS2/ALS4/ALS5/ALS6/ALS9	1	2
16	ALS1/ALS2/ALS3/ALS4/ALS5/ALS7	1	2
17	ALS1/ALS2/ALS3/ALS5/ALS6/ALS7	1	2
18	ALS1/ALS4/ALS6/ALS7/ALS9	1	2
19	ALS1/ALS5/ALS6/ALS7/ALS9	1	2
20	ALS1/ALS2/ALS 5/ALS 6/ALS7	1	2
21	ALS1/ALS2/ALS5/ALS7	1	2
22	ALS1/ALS5/ALS6/ALS9	1	2
23	ALS1/ALS2/ALS5	1	2
24	ALS1/ALS2	1	2

Tabla 7. Genotipos ALS detectados en las cepas de *C. albicans*.

7.4 Determinación de la expresión de la familia ALS por PCR en Tiempo Real.

Con el propósito de cuantificar la expresión de los genotipos ALS de *C. albicans* se crecieron en el HVE las 8 cepas que conformaron el patrón 1 (Tabla 7) dos cepas del patrón 2 y otra cepa del patrón 3. Los genes que se expresaron con mayor frecuencia fueron ALS4, ALS1, ALS2, ALS3, ALS5 y ALS7 (Tabla 8, Figuras 5 -13).

Genotipo	Expresión No. %
ALS1	10 (90.9)
ALS 2	10 (90.9)
ALS3	10 (90.9)
ALS4	11 (100)
ALS5	10 (90.9)
ALS6	8 (72.7)
ALS7	10 (90.9)
ALS9	8 (72.7)

Tabla 8. Expresión de los genotipos ALS.

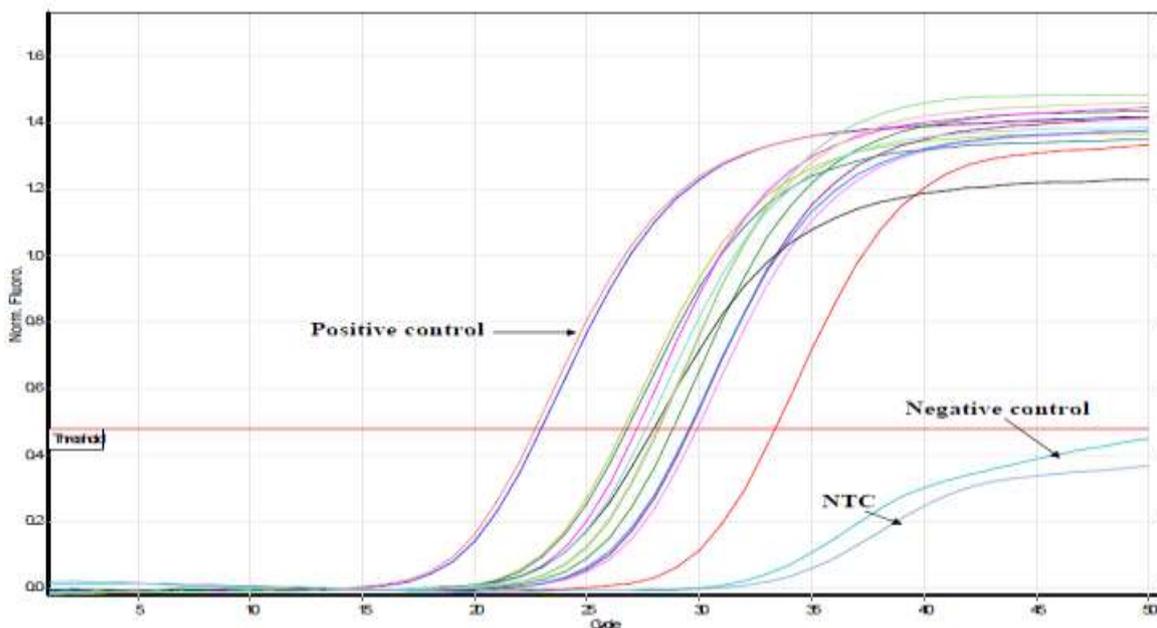


Figura 5. Determinación de la expresión de ALS1 en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca11 sin el gen ALS1.

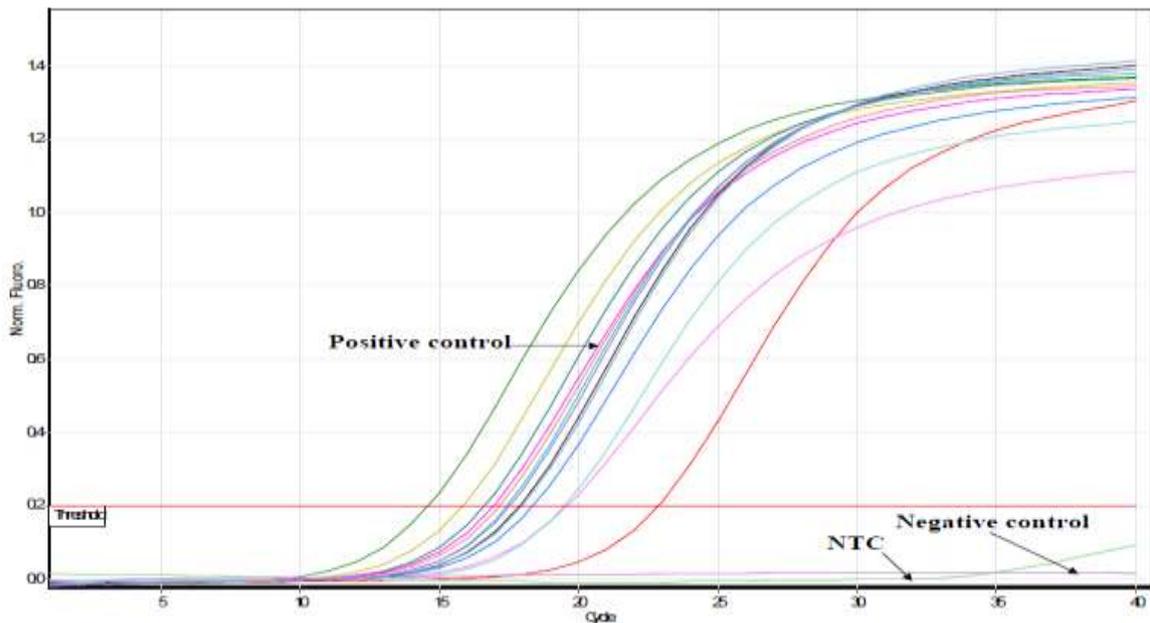


Figura 6. Determinación de la expresión del gen rRNA (ITS1 e ITS2) en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = *S. aureus* ATCC 33592.

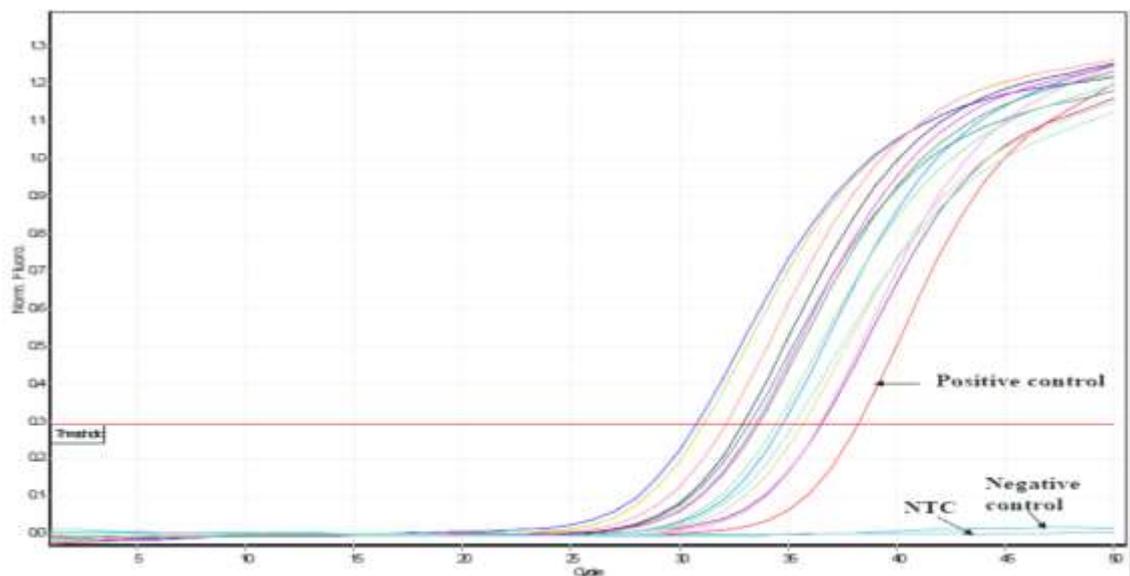


Figura 7. Determinación de la expresión de *ALS2* en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca27 sin el gen *ALS2*.

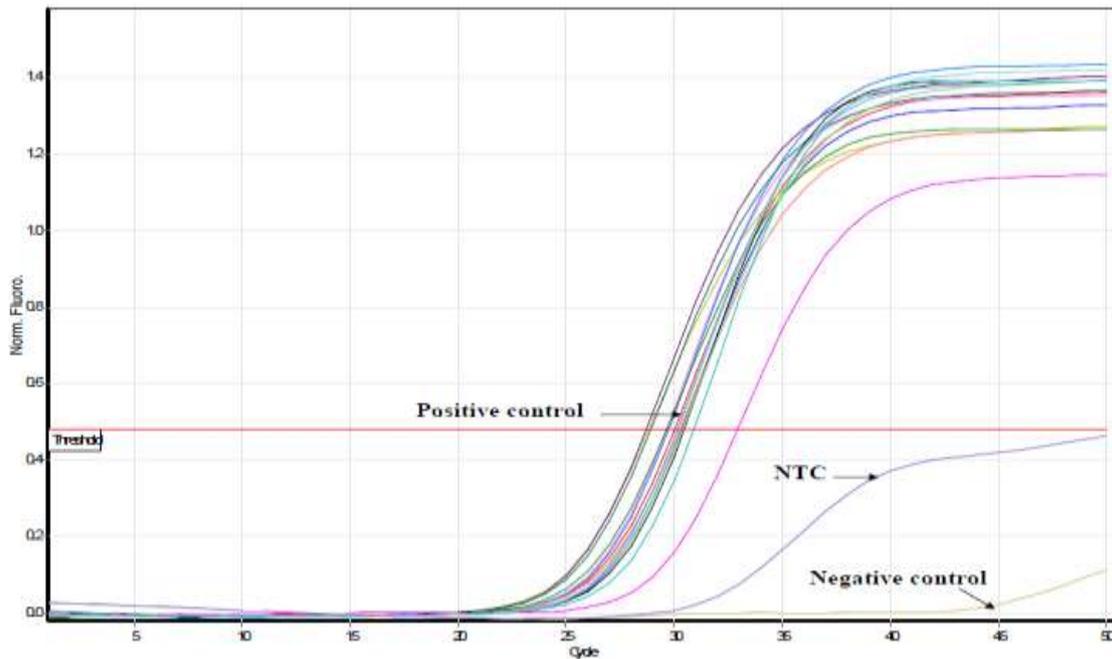


Figura 8. Determinación de la expresión de *ALS3* en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca37 sin el gen *ALS3*.

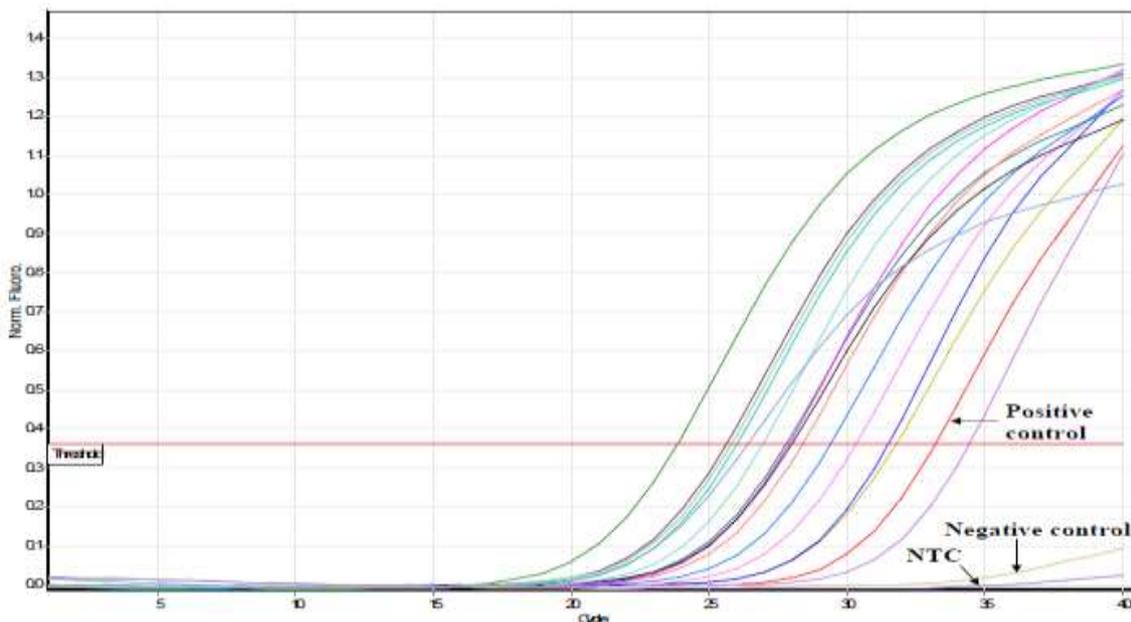


Figura 9. Determinación de la expresión de *ALS4* en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca13 sin el gen *ALS4*.

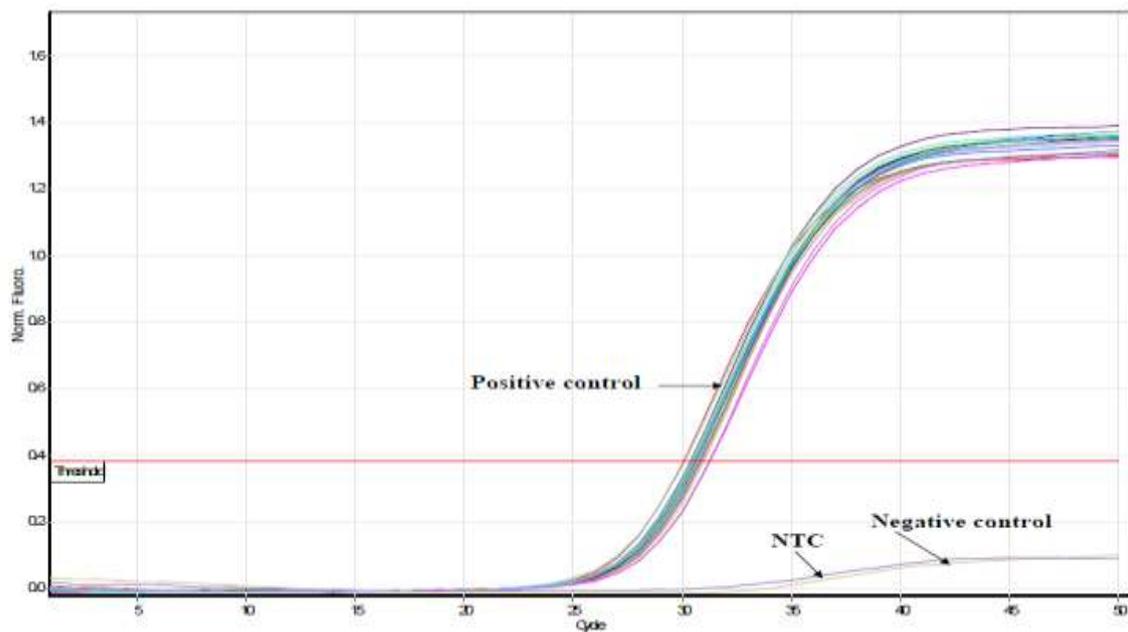


Figura 10. Determinación de la expresión de *ALS5* en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca28 sin el gen *ALS5*.

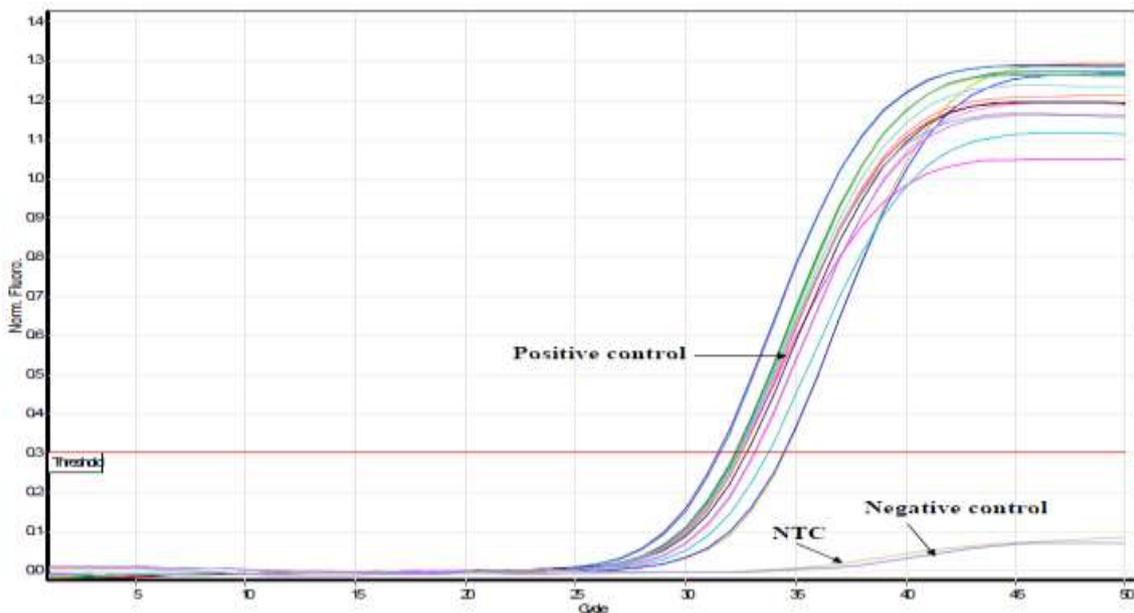


Figura 11. Determinación de la expresión de *ALS6* en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca38 sin el gen *ALS6*.

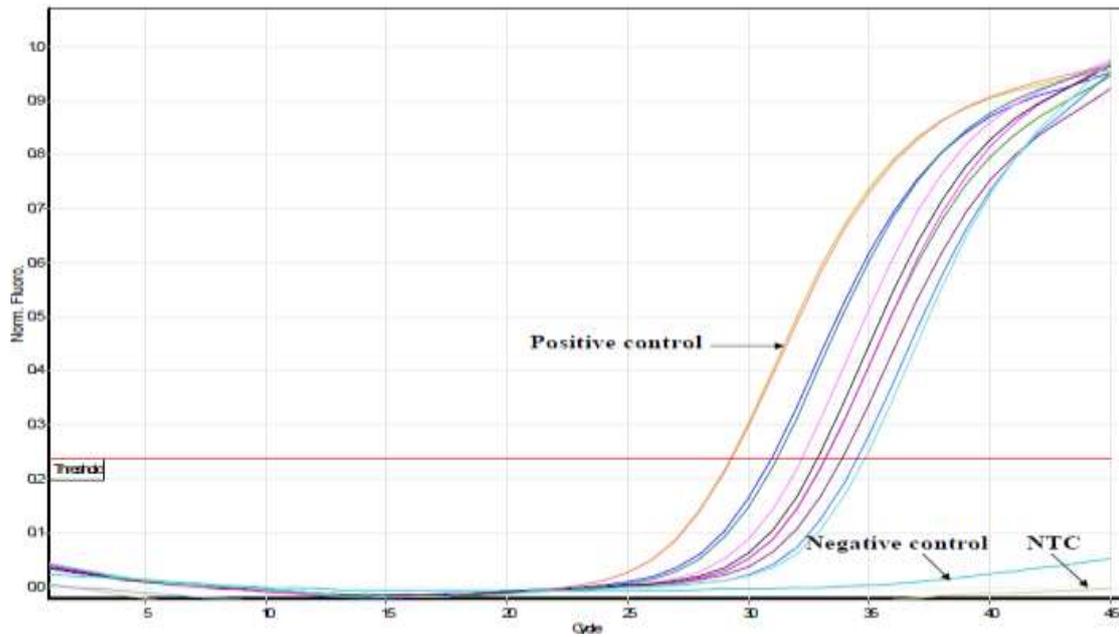


Figura 12. Determinación de la expresión de *ALS7* en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca20 sin el gen *ALS7*.

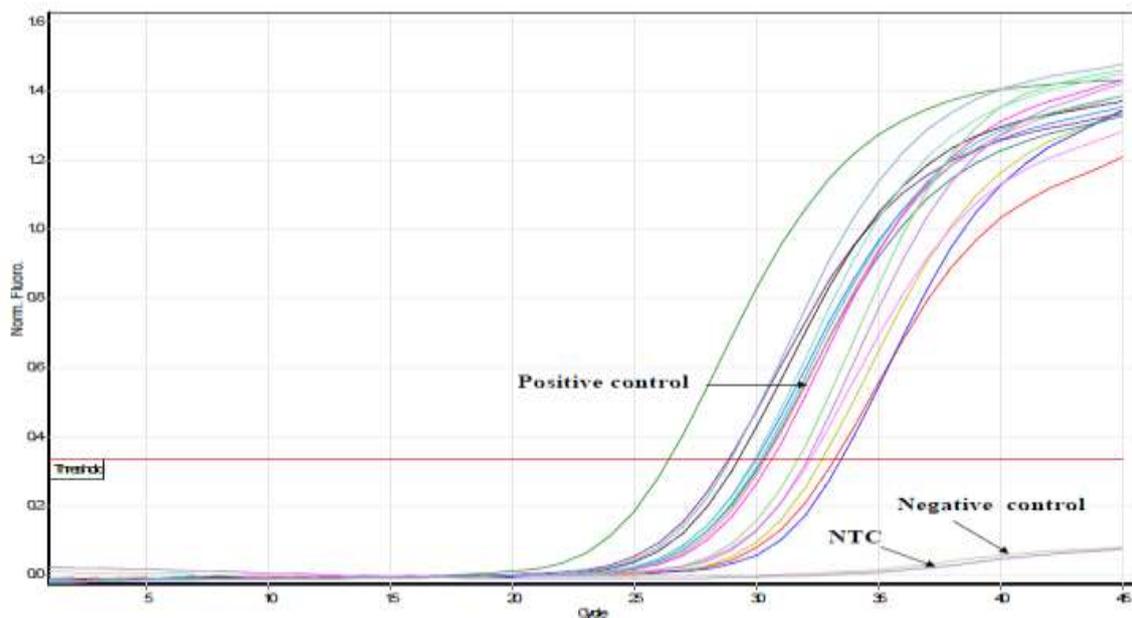


Figura 13. Determinación de la expresión de *ALS9* en las cepas de *C. albicans* aisladas de candidosis vulvovaginal por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado, Positive Control = *C. albicans* ATCC32354, Negative Control = Ca39 sin el gen *ALS9*.

8. DISCUSIÓN

8.1 Pacientes estudiadas

En este estudio se describió que la candidosis vaginal (CV) ocasionada por la especie de *C. albicans* fue detectada en el 18.9% (n=50) de las mujeres analizadas. La candidosis vaginal es un padecimiento que ocurre en el rango de 20-25% de los casos totales de vaginitis infecciosa, únicamente por abajo de los casos de vaginitis bacteriana que se encuentra entre el 40-50% (Sobel, 1997). La candidosis en la pubertad es poco frecuente, pero a la edad de 25 años la mitad de las mujeres han tenido al menos un episodio clínico diagnosticado de CV (Geiger *et al.*, 1995; Geige & Foxman, 1996). La CV es ocasionada en el 85-95% de los casos por *C. albicans* (Sobel, 1997; Sobel, 1999). Se han propuesto varios factores externos que incrementan la CV, entre los cuales se encuentra el uso de los antibióticos y los anticonceptivos orales (Sobel, 1985; Sobel *et al.*, 1998).

8.2 Distribución de los genes ALS en las cepas de *C. albicans*.

En este trabajo se reportó que los genes identificados con mayor frecuencia en las cepas de *C. albicans* fueron *ALS1* (100%), *ALS5* (70%), *ALS9* (66%), *ALS7* (64%), y *ALS2* (60%), mientras que los menos frecuentes fueron *ALS6* (56%), *ALS4* (54%) y *ALS3* (36%) (Tabla 6). Los ocho genes de la familia *ALS* detectados codifican para glicoproteínas de superficie celular, que median la adhesión a varios substratos del hospedero, incluyendo el epitelio vaginal (Fu *et al.*, 2002; Gaur & Klotz, 1997; Zhao *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004).

La elevada frecuencia de los genotipos *ALS* detectados en las cepas de *C. albicans* aisladas de las mujeres con candidosis vaginal (Tabla 6), sugiere que probablemente las cepas que poseen un mayor número de marcadores de virulencia *ALS* pueden conferir al hongo una adhesión más fuerte a las células del epitelio vaginal. Se ha demostrado que los genes *ALS* se encuentran localizados en tres de los ocho cromosomas de *C. albicans*, así, *ALS1*, *ALS2*, *ALS4*, *ALS5* y *ALS9* se encuentran en el cromosoma 6, *ALS6* y *ALS7* en el cromosoma 3 y *ALS3* en el cromosoma R (Hoyer, 1995; Hoyer, 1998a; Hoyer, 1998b; Hoyer, 2000; Hoyer, 2001).

En este estudio se identificaron 24 patrones diferentes de asociación de los genes *ALS* en las cepas de *C. albicans* (Tabla 7), dentro de los cuales ocho cepas presentaron el mismo patrón integrado por los ocho genes *ALS* y 6 cepas distintas presentaron otro patrón constituido por siete genotipos (Tabla 7). Las numerosas combinaciones de los marcadores genéticos presentes en las cepas de *C. albicans* nos hace suponer los diferentes posibles perfiles de expresión de las proteínas *ALS* durante la patogénesis de la candidosis vulvovaginal.

8.3 Expresión de los genes *ALS* en las cepas de *C. albicans*.

Con el cultivo celular utilizado (RHVE) en este estudio se pretendió relacionar las condiciones de infección vaginal que ocurren *in vivo*. La mayoría de los genes de la familia *ALS* se expresaron (Tabla 8, Figuras 5-13) en las 8 cepas que conformaron el patrón 1, dos cepas del patrón 2 y otra cepa del patrón 3 (Tabla 7). Los datos contrastan con los reportados en un estudio realizado por Chen *et al.*, (2005) por el método de RT (Reverse transcription)-PCR en cepas de *C. albicans* aisladas directamente de fluidos vaginales y utilizando un modelo de candidosis vaginal en RHVE, en donde la expresión de *ALS1*, *ALS2* y *ALS3* (100%, en cada caso) detectada por estos autores, fue mayor al encontrado en este estudio para *ALS1*, *ALS2* y *ALS3* (90.0%, en cada caso; Tabla 8), sin embargo los porcentajes de expresión de *ALS4* (100%), *ALS5* y *ALS7* (90.9%, en cada caso) y *ALS6* (72.7%) descritos en este estudio (Tabla 8), fueron más elevados a los descritos por Chen *et al.*, (2005) para *ALS4* (61%), *ALS5* (83%), *ALS7* (61%) y *ALS6* (50%). La expresión de la familia *ALS* ha sido estudiada también en otros tipos de candidosis, por ejemplo, otros autores utilizando un modelo de epitelio oral de RHE, describieron que los genes que se expresaron más consistentemente por RT-PCR fueron *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5* y *ALS9* (Green *et al.*, 2004), mientras que en un modelo de candidosis sistémica en ratón, los genes expresados en mayor porcentaje fueron *ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5* y *ALS9* (Green *et al.*, 2005).

Los resultados encontrados en este trabajo demostraron que durante la infección del RHVE se expresaron todos los marcadores genéticos de la familia *ALS*, por lo que las combinaciones de los transcritos *ALS* jugaron un rol importante en la patogénesis de la infección del RHVE.

9. CONCLUSIONES

1. *Candida albicans* fue responsable de la vulvovaginitis del 18.9% de las mujeres atendidas en el servicio de ginecología y obstetricia del HGR 72 del IMSS.
2. En este trabajo se estableció que los genes de la familia *ALS* de *C. albicans* se encontraron asociados a la vulvovaginitis de las pacientes.
3. Los distintos patrones de las familias *ALS* identificados evidenciaron la elevada variabilidad genética entre las cepas de *C. albicans* estudiadas.
4. En este trabajo se demostró que las cepas de *C. albicans* involucradas en la vulvovaginitis expresaron la mayoría de los genes *ALS* cuando se estudiaron en un modelo *in vitro* de epitelio vaginal humano.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Allistair JP, Brown AR, Gow AR. 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. Trends Microbiol 7:333-338.
- Cheng G, Wozniak K, Wallig AM, Fidel LP, Trupin SR, Hoyer LL. 2005. Comparison between *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression Patterns in Human Clinical Specimens and Models of Vaginal Candidiasis. Infect Immun 73:1665-1663.
- Fidel P, Cutrigh J, Steele C. 2000. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. Infect Immun. 68:651-657
- Foxman B, Marsh JV, Gillespie B, Sobel JD. 1998. Frequency and response to vaginal symptoms among white and African American women: results of a random digit dialing survey. J Womens Health. 7:1167–1174.
- Fu Y, Ibrahim AF, Sheppard DC, Chen YC, French SW, Cutler JE Filler SG, Edwards JE Jr. 2002. *Candida albicans* ALS1p: an adhesin that is a downstream effector of the *EFG1* filamentation pathway. Mol Microbiol 44:61-72
- Gaur NK, Klotz SA, Henderson RL. 1999. Overexpression of the *Candida albicans* *ALA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. Infect Immun 67:6040–6047
- Gaur NK, Klotz SA. 1997. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALS1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. Infect Immun 65:5289-5294.
- Geiger AM, Foxman B, Gillespie BW. 1995. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis among university students. Am J Public Health 85:1146–1148.

- Geiger M, Foxman B. 1996. Risk factors for vulvovaginal candidiasis: a case-control study among university students. *Epidemiol* 7:182–187.
- Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13:122–143.
- Green BC, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum AM, Hoyer LL. 2004. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms *Microbiol*. 150: 267-275.
- Green BC, Zhao X, Hoyer LL. 2005. Use of Green Fluorescent Protein and Reverse Transcription-PCR To Monitor *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression in a Murine Model of Disseminated Candidiasis. *Infect Immun* 73;1852-1855.
- Guizhen L, Mitchell TG. 2002. Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2860-2865.
- Hellstein J, Vawter-Hugart H, Fotos P, Schmid J, Soll DR. 1993. Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. *J Clin Microbiol* 31:3190–3199.
- Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myer M, Scherer S. 1998a. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*33:451–459.
- Hoyer LL. 1995 *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* 15;39–54.
- Hoyer LL. 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9;176-180.
- Hoyer LL, Hecht JE. 2000. The ALS6 and ALS7 genes of *Candida albicans*. *Yeast*. 16;847–855.
- Hoyer LL, Payne TL, Hecht JE. 1998b. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of ALS proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol* 180;5334–5343.

- Hube B. 1998. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infection. *Rev Iberoam Micol* 15:65–68.
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Muller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H, Klis FM. 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* 35:601–611.
- Nas T, Kalkanci, Fidan I, Hizel K, bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E. 2008. Expression of *ALS1*, *HWP1* and *SAP4* genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol* 2;179-183.
- Odds FC, Gow NAR, Brown AJ. 2006. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In: Heitman J, Filler SG, Edwards JE Jr, Mitchell AP (eds), *Molecular Principles of Fungal Pathogenicity*. Washington, DC: ASM Press. 305-19.
- Reed BD. 1992. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol Surv* 47:551- 560.
- Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, Filler SG, Zhang M, Waring AJ, Edwards JE Jr. 2004. Functional and structural Diversity in the ALS protein family of *Candida albicans*. *JBiolChem* 279:30840-30849.
- Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR. 1998. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 178:203–211.
- Sobel JD, Muller G, Buckley HR. 1984. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect Immun* 44:576–580.
- Sobel JD. 1985. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* 152:924-395.
- Sobel JD. 1997. Vaginitis. *N Engl J Med* 337:1896–1903.
- Sobel JD. 1999. Vulvovaginitis in healthy women. *Compr Ther* 25:335-346.

- Soll DR, Langtimm CJ, McDowell J, Hicks J, Galask R. 1987. High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J Clin Microbiol* 25:1611–1622.
- Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR. 2000. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 38:3595–3607.
- Zhao X, Oh S, Jajko R, Diekema DJ, Pfaller MA, Pujol C, Soll DR, Hoyer LL. 2007. Analysis of *ALS5* and *ALS6* allelic variability in a geographically diverse collection of *Candida albicans* isolates *Fun Genet Biol* 44:1298–1309.
- Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, Leng RP, Brown AJP, Hoyer LL. 2004. *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between *ALS3p* and *ALS1p*. *Microbiol* 150:2415–2428; doi:10.1099/mic.0.26943-0.
- Zhao X, Pujol C, Soll DR, Hoyer LL. 2003. Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* *ALS5*, *ALS1* and *ALS9*. *Microbiol* 149:2947–2960; doi:10.1099/mic.0.26495-0.