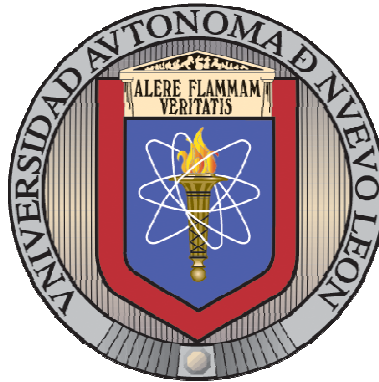


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CEPAS DE *Candida albicans*
CON DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD AL FLUCONAZOL**

Por:

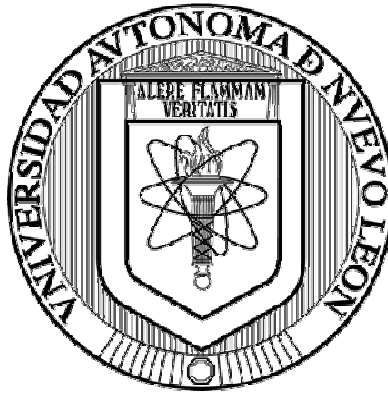
EFRÉN RICARDO ROBLEDO LEAL

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

Agosto, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CEPAS DE *Candida albicans*
CON DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD AL FLUCONAZOL**

Por:

EFRÉN RICARDO ROBLEDO LEAL

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

Agosto, 2009

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CEPAS DE *Candida albicans*
CON DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD AL FLUCONAZOL**

Comité de Tesis

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Director
(Asesor interno)

Dra. Gloria María González González
Director
(Asesor externo)

M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez
Secretario

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal

DEDICATORIA

*"Como en otro tiempo de Egipto, he regresado ahora porque la patria estaba en peligro...
No quiero hacer más la guerra. Es menester olvidar que hemos sido los amos del mundo...
Antaño, yo perseguí el fin de fundar los Estados Unidos de Europa, y para esto era necesario
permitir ciertas instituciones que debían garantizar la libertad de los ciudadanos.
Ahora, mi única mira es el afianzamiento de Francia..."*

-Napoleón Bonaparte

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez.

A la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal.

A la Dra. Gloria María González González.

Al M.C. Gerardo Ramos Alfano.

A mis compañeros de maestría: Carlos Aguirre y Eduardo Franco.

A Raul Aguirre, Patricio Zapata y José Dávila.

A Gaby Hernández, Cynthia Arredondo y Diana Palacios.

A mis Padres y Hermanos.

A Mariana Elizondo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. HIPÓTESIS.....	6
5. OBJETIVOS	7
5.1 Objetivo General.....	7
5.2 Objetivos Particulares	7
6. ANTECEDENTES	8
6.1 Mecanismo de Acción de los Azoles	8
6.2 Mecanismos de Resistencia a los Azoles.....	9
6.3 Sistema de Mutación Refractaria a Amplificación	14
7. MÉTODOS	16
7.1 Sitio de Estudio.....	16
7.2 Criterios de Inclusión.....	16
7.3 Tamaño de la Muestra.....	17
7.4 Pruebas de Susceptibilidad <i>in vitro</i>	17
7.4.1 Prueba de Macrodilución	17
7.4.2 Drop Test	18

7.4.3	E-Test.....	18
7.5	Pruebas Fenotípicas	19
7.6	Extracción de RNA.....	21
7.6.1	Electroforesis de RNA en Gel de Agarosa Desnaturalizante	21
7.6.2	Tratamiento con DNAsa	22
7.7	Extracción de DNA.....	24
7.8	Diseño de Oligonucleótidos.....	25
7.8.1	Oligonucleótidos para RT-PCR	25
7.8.2	Oligonucleótidos ARMS.....	26
7.9	RT-PCR.....	27
8	RESULTADOS.....	29
8.1	Protocolo M27-A2	29
8.2	Prueba de E-Test.....	29
8.3	Prueba de Drop Test.....	32
8.4	Selección de Cepas para Análisis	33
8.5	Curvas de Crecimiento Preliminares	34
8.6	Curvas de Crecimiento Finales	36
8.7	Detección de Mutaciones con Oligonucleótidos ARMS	37
8.7.1	Mutaciones en <i>ERG3</i>	37
8.7.2	Mutaciones en <i>TAC1</i>	39
8.8	Análisis de Expresión mediante RT-PCR.....	40
8.8.1	Expresión de <i>ERG11</i>	40

8.8.2	Expresión de <i>CDRI</i>	43
9	DISCUSIÓN	46
10	CONCLUSIÓN.....	53
11	LITERATURA CITADA	55
12	ANEXOS	62
12.1	Anexo 1: Programa de PCR para Actina	62
12.2	Anexo 2: Programa de RT-PCR.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Concentraciones Molares Usadas en las Pruebas Fenotípicas	21
2. Secuencia de Oligonucleótidos Usados para RT-PCR.....	26
3. .Números de Acceso de Secuencias Usadas para el Diseño de Oligonucleótidos ARMS	28
4. Valores de CMI Obtenidas Mediante el Protocolo M27-A2.....	30
5. Valores de CMI Obtenidas Mediante la Prueba E Test.....	31
6. Valores de CMI Obtenidos Mediante el Ensayo Drop Test	33
7. Resumen Comparativo de los Valores de CMI Obtenidos para las Cepas Seleccionadas en las 3 Pruebas de Susceptibilidad	34
8. Valores para <i>ERG11</i> Obtenidos mediante Densitometría	42
9. Valores para <i>CDR1</i> Obtenidos mediante Densitometría	45
10. Distribución de las CMIs de fluconazol para los diferentes métodos de susceptibilidad.....	44
11. Resumen de los resultados de búsqueda de mutaciones y expresión por RT-PCR.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Principales mecanismos descritos de resistencia a los azoles	11
2. Ruta bioquímica de síntesis de ergosterol	13
3. Concepto funcional de la detección de mutaciones mediante oligonucleótidos ARMS	15
4. Ilustración de la prueba E Test y el registro del punto de corte	20
5. Calidad de las muestras de DNA extraídas de cepas de <i>C. albicans</i> seleccionadas, determinada mediante visualización por electroforesis en gel de agarosa	31
6. Ilustración de la metodología del ensayo Drop Test	33
7. Curvas de crecimiento preliminares para la selección de la concentración del fármaco	34
8. Curvas de crecimiento finales para cepas susceptibles y tolerantes al fluconazol	46
9. Patrones de bandas formados empleando oligonucleótidos ARMS para detectar las posibles mutaciones T57G y T57A	38
10. Patrones de bandas formados empleando oligonucleótidos ARMS para detectar la mutación N977D del gen <i>TAC1</i>	40
11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR para <i>ERG11</i> y actina como control de carga	41
12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR para <i>CDR1</i> y actina como control de carga.	44

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
μg	Microgramos
μg	Microlitros
μg/ml	Microgramos/mililitro
ABC	Casete de unión a ATP
ARMS	Sistema de Mutación Refractaria a Amplificación
ATP	Adenosina Trifosfato
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Intitute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramo(s)
G	Gravedades
h	Hora(s)
M	Molar
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mM	Milimolar

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Royal Park Memorial Institute
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
seg	Segundo(s)
<i>sp</i>	Especie
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VIH	Virus de insuficiencia humana
YPD	Agar extracto de levadura, peptona y dextrosa

1. RESUMEN

Candida albicans es el patógeno fúngico aislado mayormente de piel y mucosas. Históricamente, *C. albicans* representa el 70 a 80% de los aislamientos obtenidos de pacientes infectados. Por ello se han empleado terapias antifúngicas con azoles que llevan al incremento en la incidencia de resistencia y en ocasiones al fracaso del tratamiento. Hoy en día en un esfuerzo por entender los mecanismos moleculares implicados en el surgimiento de la resistencia y susceptibilidad a fluconazol en *C. albicans* se han aplicado análisis de expresión génica. En el presente trabajo se identifica la presencia-ausencia de marcadores moleculares identificados para resistencia a fluconazol, en aislados clínicos de *Candida albicans*. Para caracterizar la susceptibilidad antifúngica de los aislados se utilizó el protocolo M27-A2. Inicialmente se analizó la resistencia a fluconazol de 40 cepas provenientes de pacientes con vulvovaginitis del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario. Los resultados obtenidos de la susceptibilidad antifúngica fueron comparados con los de E-Test y Drop-Test lo cual nos permitió realizar una comparación de eficiencia de los tres métodos y a partir de estos resultados se seleccionaron 8 cepas de acuerdo a sus características para realizar el análisis funcional de los marcadores *ERG3*, *TAC1*, *ERG11* y *CDR1* empleando la tecnología de nucleótidos ARMS para la búsqueda de mutaciones y el análisis de expresión por RT-PCR. Los resultados obtenidos mediante oligonucleótidos ARMS indican diferencias en las secuencias de DNA para las cepas 09 y 11 suficientes para que los oligonucleótidos diseñados no permitan la amplificación de las secuencias. El resto de las cepas se presenta sin mutación, salvo la cepa 36 que presenta un patrón diferente tanto para la secuencia normal como para el patrón esperado en presencia de la mutación T57A/G. Para *TAC1*, sólo la cepa 34 exhibe el patrón de la mutación N977D lo cual se correlaciona con su elevada expresión para *CDR1* resultante mediante RT-PCR. Las cepas 36 y 40 no resultaron en amplificación para *ERG11* mientras que para la cepa susceptible 21 se muestra una evidente reducción en la expresión de este gen. Los resultados de este trabajo indican la relación entre la expresión de factores de resistencia y el tipo de crecimiento al que se somete la célula y presenta la tecnología ARMS como un método efectivo para la búsqueda de marcadores de resistencia en aislamientos clínicos de candidosis por *Candida albicans*.

2. ABSTRACT

Candida albicans is the fungal pathogen most frequently isolated from skin and mucose. *C. albicans* represents 70 to 80% of the isolates obtained from infected patients. Thus, antifungal therapies with azoles have been employed which lead to an increase in resistance incidence and occasionally to the treatment failure. Nowadays in an effort to understand the molecular mechanisms implicated in the apparition of resistance and susceptibility in *C. albicans* gene expression analyses have been employed. In the present work the presence-absence of molecular markers for fluconazole resistance are identified in clinical isolates. To characterize the antifungal susceptibility of the isolates, M27-A2 protocol was used. Initially, fluconazole resistance of 40 isolates from vulvovaginitis patients from the department of gynecology and obstetrics from Hospital Universitario were analyzed. The results obtained from antifungal susceptibility testing were compared with those obtained with E-Test and Drop Test, which allowed us to analyze the efficiency of the 3 methods and from this results 8 strains were selected according to their characteristics and in order to proceed with the functional analysis of the markers *ERG3*, *TAC1*, *ERG11* and *CDR1*, employing the ARMS oligonucleotides technology for mutation searching and expression analysis by RT-PCR. Results obtained by ARMS nucleotides indicate differences in the DNA sequences for isolates 09 and 11 that doesn't allow amplification with the oligonucleotides that were designed. The rest of the isolated are presented without mutation, with the exception of strain 36 which shows a pattern that is different for both the wild type pattern and the T57A/G mutation. For *TAC1*, only strain 34 shows the mutation pattern for N977D which is correlated afterwards to its increased expression for *CDR1* resulted by RT-PCR. Strains 36 and 40 resulted in no amplification of *ERG11* while susceptible strain 21 showed an evidently reduced expression of this gene. Results of this work indicate the relationship between expression of resistance factors and the type of growth to which the organisms is submitted to and ARMS technology is presented as an effective method to search for resistance markers in clinical isolates of *Candida albicans*.

3. INTRODUCCIÓN

Candida albicans es el patógeno fúngico mayormente aislado clínicamente; causante de infecciones en la piel y mucosas de individuos sanos e infecciones muy severas en individuos con funciones inmunes altamente comprometidas, especialmente entre pacientes con SIDA, cáncer, transplantados y neutropénicos (Jones *et al*, 2004). Las especies de *Candida* son aisladas más frecuentemente de la cavidad oral y han sido detectadas en aproximadamente 30 – 55% de los pacientes sanos (Odds, 1988). Las tasas de colonización se incrementan con la severidad de la enfermedad y la duración de la hospitalización (Odds, 1998; Vázquez *et al*, 1997). Históricamente, *C. albicans* ha representado de 70 a 80% de los aislamientos obtenidos de pacientes infectados, con el reciente incremento en la aparición de especies de *Candida* no *albicans* tales como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (Banerjee *et al*, 1991; Beck-Sague *et al*, 1993; Komshian *et al*, 1989).

Basándose en estudios epidemiológicos, es aparente que el ser humano está expuesto de manera repetida a diferentes especies de *Candida* en la comida y otras fuentes, sin embargo, el historial de la colonización “natural” de este hongo durante semanas, meses y años es comprendido pobremente. Aún así, se puede afirmar de manera razonable que la colonización por *Candida sp.* es prácticamente universal. En México se han realizado pocos estudios clínico-epidemiológicos enfocados a determinar

la frecuencia de las infecciones micóticas, por lo que se desconoce la magnitud del problema para establecer las medidas terapéuticas y preventivas oportunas (Castañón-Olivares *et al*, 2000; Méndez-Tovar *et al*, 1999). La candidosis es responsable de 80 a 90% de las infecciones vaginales por hongos; su prevalencia va de 5 a 20% en mujeres no gestantes y gestantes asintomáticas. La infección sintomática suele aparecer sólo cuando estos organismos proliferan en grandes cantidades, quizá ante el aumento de esteroides. La candidosis sintomática aumenta durante el embarazo. Las pacientes con diabetes, las sometidas a tratamientos inmunosupresores, las afectadas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o con tratamiento de antibióticos presentan índices elevados de *Candida sp.* La mayoría de las mujeres están expuestas a candidosis esporádica e incluso aquellas con candidosis de recurrencia frecuente no suelen tener ninguno de los factores de riesgo mencionados. Sin embargo la candidosis recurrente es más frecuente durante el embarazo (Jiménez *et al*, 2004).

En el tratamiento de las infecciones producidas por *Candida sp.*, el empleo de agentes como fluconazol y otros antifúngicos azólicos han demostrado ser efectivos, sin embargo, han aparecido fracasos terapéuticos asociados a la aparición de cepas de *C. albicans* resistentes a los azoles. El empleo repetido y la larga duración de las terapias antifúngicas con este tipo de fármacos han llevado al incremento en la incidencia de resistencia a los azoles y el consecuente fracaso en el tratamiento de estos hongos patógenos. Debido a esto, es imperante el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos orientados a atacar los factores que confieren la resistencia a las especies de *Candida* (López-Ribot *et al*, 1998; Pfaller *et al*, 1994; Redding *et al*, 1994; White *et al*, 1998) y al mismo tiempo, conocer cuáles son esos factores para el desarrollo eficiente de nuevos

fármacos entre otras estrategias todas dirigidas a mejorar la detección y tratamiento de estas infecciones.

Actualmente, la expresión de genes es un tema común al hablar de resistencia antifúngica de *C. albicans* a los compuestos azólicos, sin embargo, es poca la investigación que se ha realizado en México y/o con cepas mexicanas para conocer el estatus de la expresión genética de las cepas que afectan a los habitantes de este país y de ese modo dirigir las estrategias de manera particular. La combinación del conocimiento generado por la investigación de la expresión genética de los organismos de importancia médica y las ramas de la investigación que se enfocan en el descubrimiento de nuevos fármacos o nuevos efectos en la combinación de drogas ya existentes así como el diseño de marcadores moleculares para la identificación temprana de cepas resistentes promete ser una herramienta indispensable en el combate efectivo de enfermedades infecciosas desde las perspectivas de tratamiento dirigido y prevención de las resistencias.

4. HIPÓTESIS

La fuente de resistencia a fluconazol en aislados clínicos mexicanos de *Candida albicans* se puede determinar mediante el análisis de expresión y la detección de mutaciones de genes involucrados en los mecanismos moleculares de resistencia empleando oligonucleótidos para secuencias específicas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

1. Analizar la expresión de genes comparando el perfil genético de aislamientos de *C. albicans* resistentes y susceptibles al fluconazol.

5.2 Objetivos Particulares

1. Determinar los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) del fármaco fluconazol (FLU) de aislamientos clínicos de *Candida albicans*.
2. Identificar cepas de *Candida albicans* con diferentes grados de susceptibilidad y resistencia a fluconazol.
3. Comparar diferencias entre las técnicas de macrodilución, Drop Test y E-Test para su aplicación a pruebas de susceptibilidad al fluconazol *in vitro*.
4. Evaluar la función de genes involucrados en la resistencia/susceptibilidad a fluconazol de cepas resistentes y susceptibles mediante el análisis de su expresión y el hallazgo de mutaciones frecuentes.

6. ANTECEDENTES

La resistencia antifúngica era virtualmente inexistente antes de la llegada de la infección del VIH. En el pasado, aun cuando se describía la resistencia, generalmente era asociada a imidazoles y usualmente era descubierta en pacientes con candidosis mucocutánea crónica, quienes se encontraban recibiendo terapia crónica con ketoconazol (Horsburgh *et al*, 1983). Actualmente se reportan casos de resistencia incluso a anfotericina B por parte de *C. albicans*, un fenómeno que en el pasado era inusual (Bastide *et al*, 1989; Vázquez *et al*, 1997). Para 1999 se habían demostrado al menos 3 mecanismos de resistencia: (i) cambios en la enzima P-450 lanosterol desmetilasa, (ii) cambios en la Δ^{5-6} -esterol desaturasa y (iii) un mecanismo de flujo de la droga dependiente de energía (Hitchcock, 1993; Hitchcock *et al*, 1987; Odds, 1993; Parkinson *et al*, 1995).

6.1 Mecanismo de Acción de los Azoles

El fluconazol, al igual que todos los azoles, actúa bloqueando la enzima C14 lanosterol desmetilasa codificada por el gen *ERG11* y esencial para la biosíntesis del ergosterol, uno de los principales constituyentes de la membrana del hongo. Cuando la enzima es inhibida, el ergosterol deja de ser producido y por consiguiente la membrana

se debilita incrementando la permeabilidad de la membrana y produciendo la muerte celular.

6.2 Mecanismos de Resistencia a los Azoles

Hasta hoy en día se han descrito una mayor variedad de mecanismos de resistencia a los azoles por parte de *C. albicans* debido a la detección de genes asociados a la resistencia (Franz *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 1999; López-Ribot *et al.*, 1998; Saha *et al.*, 2002; Sanglard *et al.*, 1998; Wey *et al.*, 1989; White, 1997). Entre las más interesantes, se han reportado mutaciones puntuales en el gen *ERG11*, (que codifica la C14 lanosterol desmetilasa, molécula diana de los azoles y actualmente denominada Erg11p), las cuales previenen la unión entre los azoles y su objetivo (Franz *et al.*, 1998; Kakeya *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 2000; Perea *et al.*, 2001; Sanglard *et al.*, 1995; White, 1997). Asimismo se ha podido asociar el aumento de su expresión con la resistencia a los azoles (Franz *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 1997; Morschhauser *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2001; Perea *et al.*, 2001; White, 1997) al permitir continuar con la ruta de biosíntesis a pesar de que algunas de las moléculas de la proteína Erg11p se encuentren bloqueadas. El hecho de que *ERG11* confiere resistencia a los azoles quedó claramente demostrado por Du *et al.* en 2004 incrementando el número de copias usando un vector de replicación.

El elevado flujo hacia el exterior por medio de la expresión potenciada de genes de transporte de drogas también ha sido involucrado en la resistencia a los azoles en *C. albicans*. Este mecanismo puede combinarse con mecanismos de resistencia dependientes de *ERG11*, como se demostró por el análisis secuencial de aislamientos

expuestos a azoles repetidamente en un transcurso del tiempo (Goldman *et al.*, 2004; Perea *et al.*, 2002; Sanglard *et al.*, 1998; White, 1997). Los transportadores multidrogas pertenecen a la familia de transportadores ABC (casete de unión a ATP, por sus siglas en inglés) y a la superfamilia facilitadora principal. De entre los primeros, sólo Cdr1p/Cdr2p han sido involucrados en la resistencia a azoles mediante la sobrerregulación de los genes correspondientes confiriendo resistencia al hongo ante varios azoles (White *et al.*, 1998) mediante el rápido transporte de la molécula del fármaco al exterior de la célula evitando que su mecanismo de acción se lleve a cabo (figura 1).

En muchos trabajos al respecto, se ha encontrado que la resistencia a fluconazol por *C. albicans* resulta de una combinación de varios mecanismos. En los últimos años se encontró que la sobreexpresión de las bombas de transporte de multidrogas codificadas por los genes *CDR1* y *CDR2* es causada por mutaciones en el gen *TAC1* (Coste *et al.*, 2004; Coste *et al.*, 2006; Coste *et al.*, 2007). *TAC1* es un factor de transcripción de *Candida* situado cerca del locus de tipo de apareamiento en el cromosoma 5. Los alelos silvestres median la sobrerregulación de *CDR1* y *CDR2* a partir de la exposición a sustancias inductoras como la flufenazina, mientras que los alelos hiperactivos (cuya existencia ya se ha reportado) confieren una elevada expresión constitutiva de *CDR1* y *CDR2*. En 2006, Coste *et al* demostraron el efecto de ganancia de función que tiene la mutación del aminoácido asparagina por ácido aspártico en la posición 977 de la secuencia aminoacídica de *TAC1*.

FIGURA 1

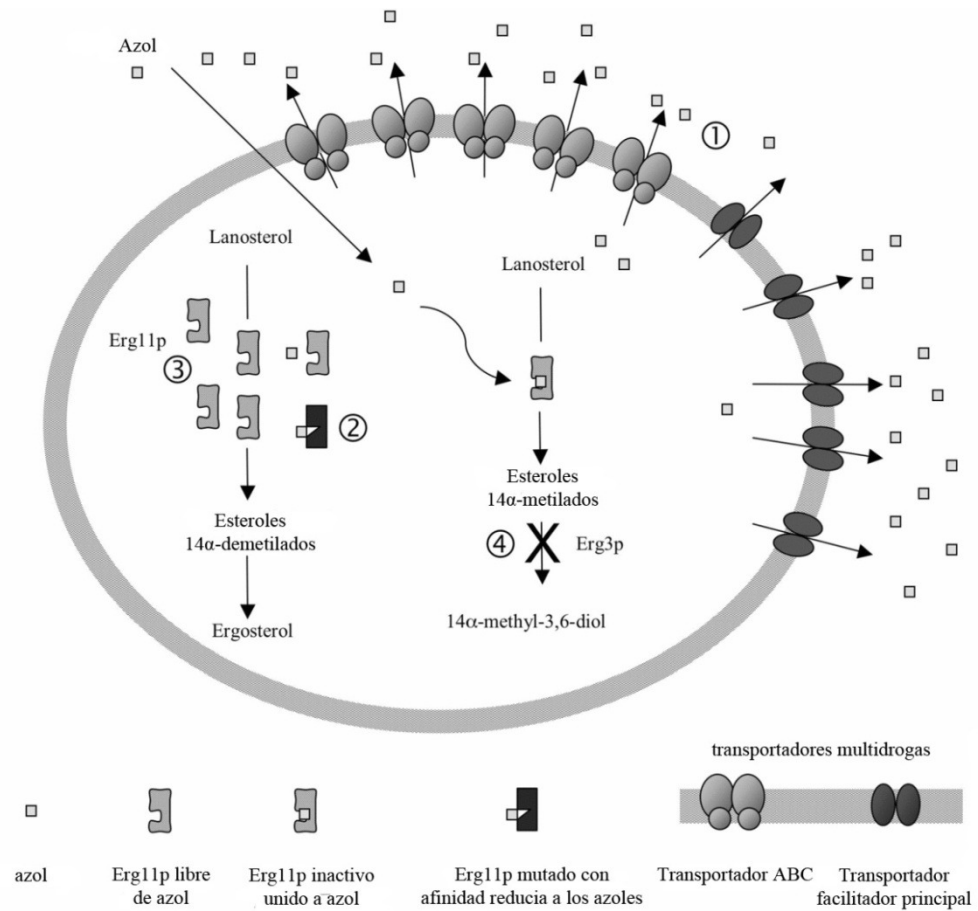


FIGURA 1. Principales mecanismos descritos de resistencia a los azoles.

Cuando se analiza la secuencia del genoma de *Candida*, esta mutación corresponde a un cambio en un solo nucleótido en el codón AAU que codifica para asparagina a GAU que codifica para ácido aspártico. En 2008, Yan *et al* encontraron que la mutación puntual de asparagina por lisina en la posición 977 también confería

hiperactividad a *TAC1* y por consiguiente la sobreexpresión de los genes *CDR1* y *2* en una cepa resistente.

El gen *ERG3* en *Candida albicans* codifica para una esteroles C5,6-desaturasa la cual es esencial para la biosíntesis de ergosterol (figura 2). Como consecuencia del efecto de los azoles se producen esteroides intermediarios que son metabolizados por la proteína Erg3p y el resultado son esteroides tóxicos que se acumulan en la célula incrementando y que terminan siendo letales para la misma.

ERG3 se ha reportado como uno de los genes involucrados en la reducción de la susceptibilidad a los azoles en cepas de *Candida* (Geber *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2008). En 2008, Yan *et al* secuenciaron *ERG3* junto con algunos otros genes para buscar mutaciones potenciales que hubieran podido ser responsables de la tolerancia de una cepa de *C. albicans* al fluconazol y encontraron una sola mutación de cambio de sentido, presentando una adenina en lugar de una timina en la posición 55 y formando así el codón GAA que codifica para ácido glutámico en lugar de asparagina (GAT) con lo que descubrieron que el cambio en un solo aminoácido podía inactivar la función de *ERG3* y producir una disminución en la susceptibilidad al fluconazol.

FIGURA 2

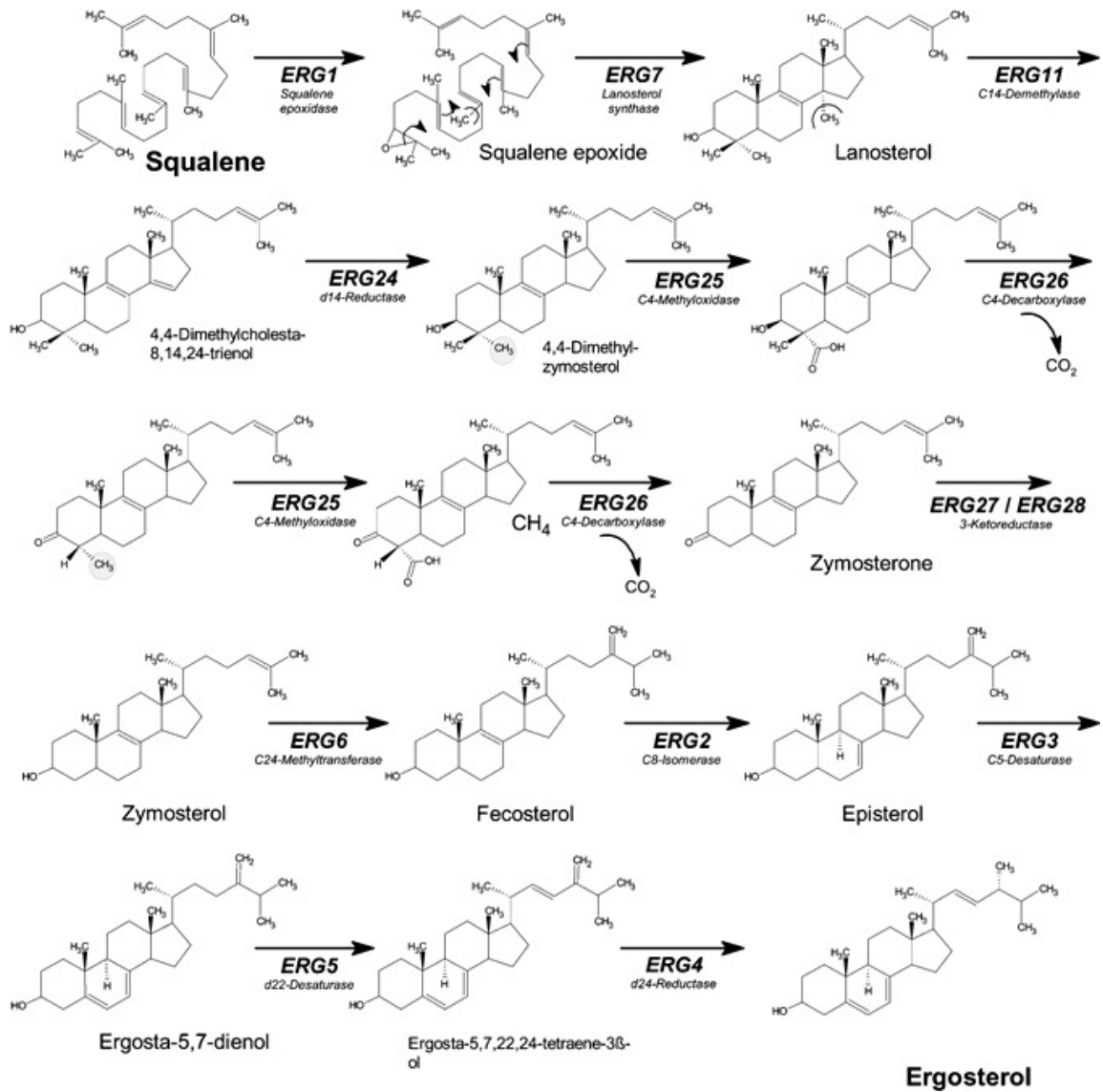


FIGURA 2. Ruta bioquímica de síntesis de ergosterol.

6.3 Sistema de Mutación Refractaria a Amplificación

El sistema de mutación refractaria a amplificación (ARMS por sus siglas en inglés) es un método simple y rápido para detectar mutaciones, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción y pequeñas inserciones o deleciones de nucleótidos. El método fue descrito por primera vez por Newton *et al* para el análisis de diferencias en bases únicas de DNA en pacientes con deficiencia de α -1-antitripsina y ha sido aplicada desde entonces al diagnóstico prenatal y la detección de portadores de fibrosis quística y β -talasemia (Newton *et al.*, 1989; Newton *et al.*, 1989; Old *et al.*, 1990).

Para detectar una mutación específica, se requieren dos oligonucleótidos que sean idénticos en la secuencia a excepción del nucleótido 3' terminal. El oligonucleótido normal tiene el nucleótido 3' terminal complementario a la secuencia de DNA normal y el oligonucleótido mutante tiene su nucleótido 3' terminal complementario a la secuencia de DNA que presenta la mutación. Bajo las condiciones adecuadas un oligonucleótido servirá de templado para la DNA polimerasa sólo cuando el nucleótido 3' terminal se encuentre perfectamente apareado a la secuencia de DNA de la muestra. Por lo tanto el oligonucleótido normal cuando es hibridado con el DNA genómico mutante y a la inversa el oligonucleótido mutante cuando hibridado con el DNA normal, no funcionarán apropiadamente como templados para la amplificación de DNA y no se observa ningún producto amplificado al término del proceso de PCR. Para la búsqueda de una mutación en particular, se requiere el oligonucleótido mutante ARMS en combinación con otros: un oligonucleótido normal y dos oligonucleótidos control.

La parte difícil de la instalación de esta técnica es el diseño de los oligonucleótidos ARMS y el probar que funcionen correctamente. La técnica por sí misma es muy simple, involucrando solamente una reacción de PCR y el examen de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa y su tinción con bromuro de etidio o alguna otra sustancia. El proceso completo toma pocas horas por lo que se pueden detectar mutaciones específicas rápidamente una vez que se ha desarrollado una batería de oligonucleótidos ARMS específicos de mutaciones. La figura 3 ilustra el concepto funcional de los oligonucleótidos ARMS con la modificación de un apareamiento incorrecto en la penúltima posición tanto para el oligonucleótido mutante como para el normal, a manera de asegurar la ausencia de amplificación y evitar falsos positivos en la reacción.

FIGURA 3

	Secuencia normal	Secuencia mutante
Oligo normal	$\begin{array}{c} \leftarrow C^C \text{ AGATAG ... 5'} \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{G} \text{CTCTATCGCGAT ... 3'} \\ 482 \end{array}$	$\begin{array}{c} X^C \text{ AGATAG ... 5'} \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{A} \text{CTCTATCGCGAT ... 3'} \\ 482 \end{array}$
Oligo mutante	$\begin{array}{c} X^T \text{ AGATAG ... 5'} \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{G} \text{CTCTATCGCGAT ... 3'} \\ 482 \end{array}$	$\begin{array}{c} \leftarrow T^C \text{ AGATAG ... 5'} \\ 5' \dots \text{GAAC} \boxed{A} \text{CTCTATCGCGAT ... 3'} \\ 482 \end{array}$

FIGURA 3. Concepto funcional de la detección de mutaciones mediante oligonucleótidos ARMS.

7. MÉTODOS

7.1 Sitio de Estudio

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina UANL y en el Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

7.2 Criterios de Inclusión

Se incluyeron cepas de *C. albicans* provenientes de pacientes con vulvovaginitis del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario para llevar a cabo la evaluación de la actividad *in vitro*. Las cepas incluidas en el estudio se obtuvieron de pacientes que cumplieron las condiciones de no estar embarazadas, no estar bajo tratamiento con antibióticos ni encontrarse en edad menopáusica de acuerdo a la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, todo esto para asegurar lo más posible que la infección no haya ocurrido debido a factores predisponentes.

7.3 Tamaño de la Muestra

Se trabajó con 40 cepas de *C. albicans* de las cuales se escogerán 8 cepas a las cuales se les realizará un estudio de expresión genética diferencial en respuesta al crecimiento a concentraciones no letales de fluconazol.

7.4 Pruebas de Susceptibilidad *in vitro*

7.4.1 Prueba de Macrodilución

Se utilizó el protocolo M27-A2 del Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) para la evaluación de la susceptibilidad antifúngica de levaduras. Previo al trabajo con las levaduras, se depositan alícuotas de 100 μ l en tubos de ensayo de 13x100 con tapón de rosca, en rangos de concentraciones de 1.25 a 640 μ g/ml obtenidas mediante diluciones seriadas de fluconazol teniendo así una serie de 10 tubos para cada cepa y se almacenan a -20°C hasta su uso. Los inóculos fúngicos utilizados fueron incubados durante 24°C en agar papa dextrosa (PDA) y después el volumen celular fue ajustado mediante espectrofotómetro para obtener un tamaño de inóculo de 1×10^3 a 5×10^3 células suspendidas en medio RPMI 1640 (Sigma). Una vez ajustados los inóculos, se depositaron 900 μ l en cada tubo del rango de concentraciones de fármaco, dando a una concentración final de los mismos de 0.125 a 64 μ g/ml. Para cada serie, se añadió un tubo sin fármaco como control positivo de crecimiento. Los tubos fueron incubados a 35°C y los registros de crecimiento fueron realizados a las 48h.

Las CMI's fueron interpretadas como la concentración a la cual hubo una reducción del crecimiento de un 80% en comparación al tubo control. Las interpretaciones fueron realizadas visualmente.

7.4.2 Drop Test

Se utilizó una versión modificada de la técnica de drop assay para tolerancia a sales, utilizando medio RPMI-1640 en formulación sólida (AB bioMérieux, 2008). El medio fue adicionado con fluconazol hasta obtener concentraciones finales de 0.5, 2, 8 y 64 µg/ml. También se prepararon placas sin fluconazol como control positivo de crecimiento. Los inóculos se obtuvieron incubando las cepas en caldo YPD por 48h. Para cada inóculo se realizaron diluciones seriadas de 10^6 - 10^3 células por mililitro aproximadamente. 5 µl de cada dilución fueron depositados de manera lineal en cada placa hasta un máximo de 4 cepas por placa. El crecimiento fúngico se registró después de 48h de incubación a 35°C. Las CMI's se definieron como la concentración a la cual el crecimiento correspondiente la dilución de 10^3 células se redujo en un 80% comparado con el control positivo y fueron determinadas visualmente. Como controles de calidad se incluyeron *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 y como control de susceptibilidad se empleó *C. albicans* ATCC 14053.

7.4.3 E Test

El ensayo E Test fue realizado conforme a las instrucciones del fabricante (AB Biodisk, 1993). Se utilizaron cultivos de 24h ajustados a una concentración celular de 1×10^3 a 5×10^3 células en solución salina estéril. El medio utilizado fue RPMI 1640 mezclado con agar base y adicionado con 2% de glucosa. Las placas fueron inoculadas

vaciando 500 µl del inóculo ajustado y estriando en 4 direcciones con un aplicador de algodón para cubrir totalmente la superficie de la placa. Se dejaron secar las placas a temperatura ambiente por 20 minutos antes de la aplicación de la tira del E Test y una vez aplicada la misma, se incubaron a 35°C por 48h. La CMI se determinó como la concentración de fármaco a la cual el borde de la zona de inhibición elíptica intersecó la escala en la tirilla de la prueba antifúngica (Figura 5). Se ignoró cualquier crecimiento ulterior a una elipse de inhibición discernible. Como control de calidad se empleó *C. parapsilosis* ATCC 22019.

7.5 Pruebas Fenotípicas

Se realizaron pruebas fenotípicas para evaluar la salud celular en las cepas que exhibieron alta susceptibilidad al fluconazol con el fin de corroborar que la susceptibilidad corresponda a efectos de cambios en la regulación génica y no por defectos genotípicos/fenotípicos. Se probó la capacidad de miceliación en respuesta a diferentes estímulos y la resistencia a estrés osmótico e hiperosmótico. Se diseñó un medio mínimo para el crecimiento del hongo el cual contenía la siguiente formulación:

- Yeast nitrogen base w/o a.a. 1.45 g
- AmSO₄ 5.0 g
- Agua 950 ml
- Agregar 2% glucosa. Solidificar con agar base.

La tabla 1 muestra las diferentes pruebas y concentraciones de solutos de las mismas. De forma paralela, se probó el crecimiento del hongo en medio mínimo ajustado a valores de pH en el rango de 4-7.

FIGURA 4

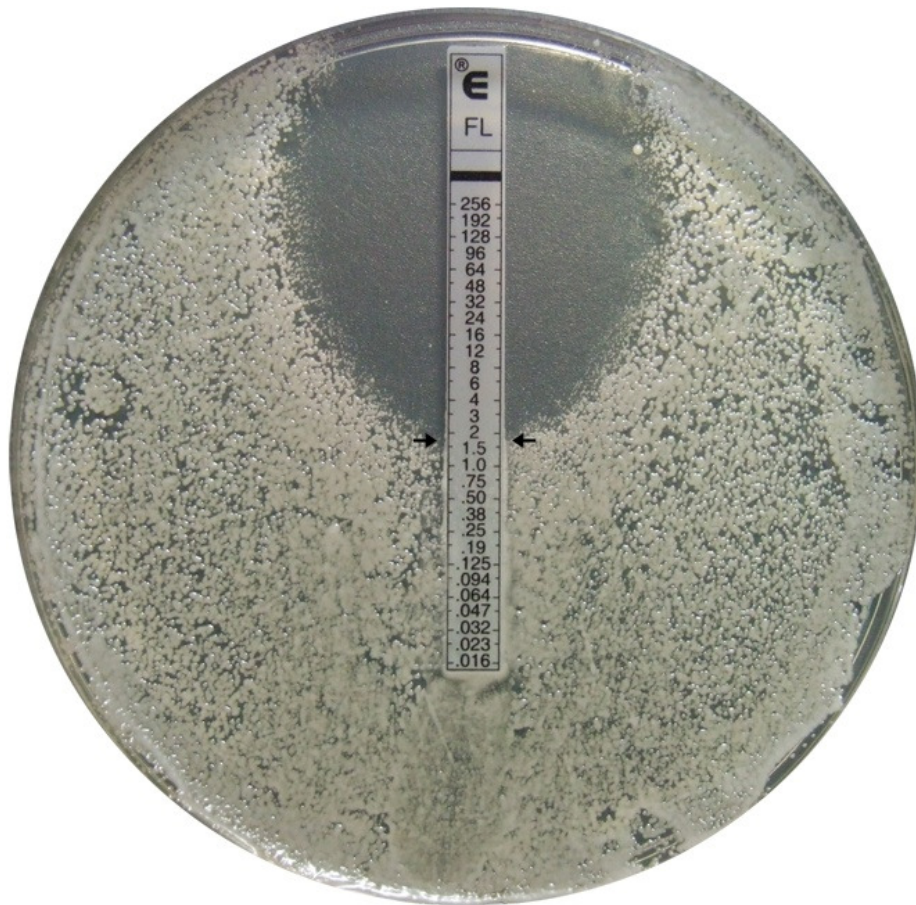


FIGURA 4. Ilustración de la prueba E Test y el registro del punto de corte. Cuando la intersección no coincide de forma exacta con el valor de concentración, se eleva al inmediato superior. En la figura, se toma 2 como el punto de corte por presentar intersección entre 1.5 y 2.

TABLA 1

Concentraciones Molares Usadas en las Pruebas Fenotípicas

Prueba	Concentraciones (Molar)
Cloruro de Sodio	0.5, 1 y 1.5
Cloruro de Potasio	0.3, 0.6 y 0.9
Cloruro de Litio	0.025, 0.05 y 0.1

7.6 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se empleó TRIzol® (Invitrogen) y se siguieron las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones. Cada pellet celular fue macerado usando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino el cual se mezcló con trizol en volúmenes equivalentes. Se mezcló por agitación suave hasta homogenizar y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de de trizol empleado, se agitó por 15 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12,000×G por 15 minutos a 4°C y al término se transfirió la capa acuosa superior a un nuevo tubo. Una vez hecho esto, se adicionaron 0.5 ml de isopropanol por cada mililitro de trizol empleado durante la homogenización inicial. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugaron nuevamente a 12,000×G durante 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el pellet de RNA se lavó con etanol al 75% preparado con agua libre de nucleasas, agregando al menos 1

mililitro de etanol por cada mililitro de trizol empleado en la homogenización inicial. La muestra se mezcla por vortex y se centrifuga por 5 minutos a 7,500×G. a 4°C. Posteriormente el sobrenadante se descarta y se deja secar la pastilla al aire por alrededor de 15 minutos para después resuspenderse en agua libre de nucleasas y almacenarse a -80°C hasta su uso.

7.6.1 Electroforesis de RNA en Gel de Agarosa Desnaturalizante

Para verificar la extracción de RNA se empleó un gel de agarosa al 1.5% al cual se le añadió buffer MOPS (0.1M MOPS, 5MNaOH) a 1x y formaldehído al 1%. Antes de cargar la muestra (20 µg), ésta fue mezclada con 7.5 µl de formamida desionizada, 1.5 µl de MOPS 10x, 2.4 µl de formaldehído y se aforó a 30 µl. La mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos e inmediatamente al terminar se colocó en hielo. En el gel se cargaron los 30 µl y se corrió en buffer MOPS 1x a 70V por 1 hora. Una adecuada extracción de RNA se observa como un par de bandas compactas correspondientes a las fracciones 28S y 18S.

7.6.2 Tratamiento con DNAsa

Los aislados de RNA se sometieron a PCR empleando oligonucleótidos dirigidos a una sección del gen de actina. Como templados se utilizaron 2 µl de RNA, incluyendo un control positivo con 2 µl de DNA y un control negativo de reacción el cual no llevó templado. El programa de PCR empleado fue el de actina (ver anexo 1).

Los productos de la amplificación fueron visualizados por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% preparado en buffer TAE y corrido a 70V por

40 minutos. Los resultados observados mostraron la presencia de contaminación con DNA en todas las muestras a excepción de la 34 y 40. Debido a lo anterior se estandarizó un protocolo para el tratamiento con DNAsa I y para ello se escogió una muestra al azar de entre las que presentaron contaminación con DNA. La muestra se incubó en la siguiente mezcla:

- 20 μ g de RNA
- 10 μ l de buffer de reacción 10x (100mM Tris pH 7.5, 25mM MgCl₂, 5mM CaCl₂)
- 10 μ l de DNAsa I (Novagen, 1 u/ μ l)
- Agua libre de nucleasas a 100 μ l

La mezcla se incuba a 37°C por 30 minutos e inmediatamente después se incuba a 70°C por 5 minutos para inactivar la DNAsa. Al terminar se enfría en hielo por 5 minutos y se almacena a -80°C hasta su uso. Para probar la eficiencia de la digestión con DNAsa se preparó un PCR que incluyó un control negativo de reacción, un control positivo usando DNA como templado, una muestra de RNA sometido a las condiciones de tratamiento de DNAsa pero sin DNAsa I agregada y finalmente la muestra tratada con Dnasa I. El programa empleado fue el de Actina. Los productos de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% preparado en buffer TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA) y corrido durante 40 minutos a 70V. Después de teñir con bromuro de etidio y observar bajo luz UV se corroboró que la digestión con DNAsa I fue eficiente en la eliminación de la contaminación de DNA por lo que se sometieron posteriormente todas las muestras de RNA al mismo tratamiento (datos no mostrados).

7.7 Extracción de DNA

El protocolo de extracción de DNA empleado se obtuvo de Sambrook y Russell (Sambrook *et al.*, 2001). Los inóculos se obtuvieron de cultivo líquido en caldo YPD de 24h de incubación a 35°C con agitación (~150rpm). Las células fueron concentradas mediante centrifugación para obtener un pellet. 200 µl del pellet se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se resuspendieron en 500 µl de buffer STES (0.2M Tris-Cl pH 7.6, 0.5M NaCl, 0.1% SDS y 0.01M EDTA) y se agregaron 50 µl de perlas de vidrio. Se agitaron en vortex por 1 minuto y posteriormente se agregaron 200 µl de buffer TE (pH 7.6) a cada tubo. Se agregaron 600 µl de fenol:cloroformo (1:1) y se homogenizó la muestra mediante vortex por 1 minuto. Después se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 15 minutos y la fase acuosa superior se transfirió a otro tubo. Se agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló por inversión varias veces para después incubarlo a -20°C por 20 minutos para precipitar el DNA. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Una vez terminado esto, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 75% preparado con agua libre de nucleasas. La muestra se mezcló por agitación y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire durante 15 a 20 minutos. Se resuspendió cada pastilla en 40 µl de buffer TE pH 7.6 (1mM EDTA, 10mM Tris-HCL) y se agregaron 5 µl de RNAsa a la muestra.

Para verificar el aislamiento del DNA se preparó un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE y se sometió a electroforesis a 70V por 45 minutos. La presencia de DNA

sin degradar debe presentarse como una única banda compacta en la parte superior del gel (Figura 5).

FIGURA 5

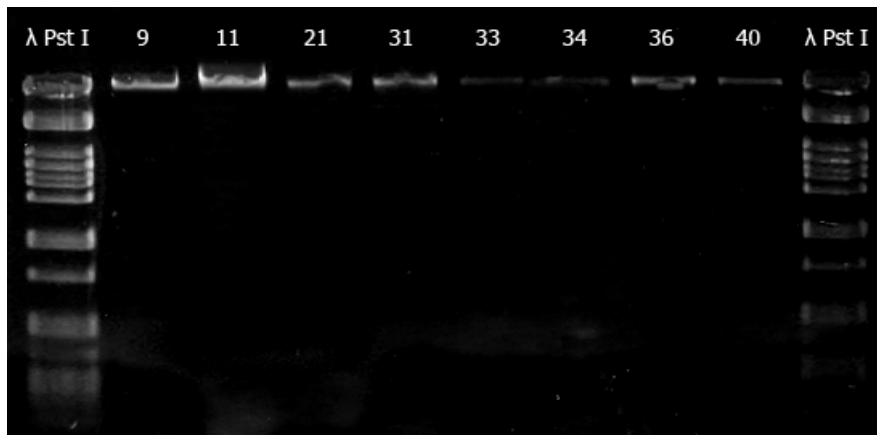


FIGURA 5. Calidad de las muestras de DNA extraídas de cepas de *C. albicans* seleccionadas, determinada mediante visualización por electroforesis en gel de agarosa.

7.8 Diseño de Oligonucleótidos

7.8.1 Oligonucleótidos para RT-PCR

Los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes ERG11 y CDR1 se diseñaron empleando la herramienta Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y las secuencias de los genes fueron obtenidas de la base de datos del genoma de *Candida*

(<http://www.candidagenome.org/>). La tabla 2 muestra las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados.

TABLA 2

Secuencia de Oligonucleótidos Usados para RT-PCR

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del Amplicón
prERG11F	TGGATTCCTTGGTTTGGTTC	420 pb
prERG11R	TGGTTGAGTTTTTCATAACATTGG	
prCDR1F	TGGTGTTTTAGCTGGTCCTG	231 pb
prCDR1R	CCGAAATTTCTCCATCTTTCAC	

7.8.2 Oligonucleótidos ARMS

Los oligonucleótidos ARMS fueron diseñados de manera conjunta a un par de oligonucleótidos que flanquearan la zona donde se presenta la mutación, de manera que al amplificar se obtuviera un patrón de bandas dependiente de la presencia o ausencia de la mutación y además un patrón de bandas constante como referencia y control de amplificación. Para el diseño de los oligonucleótidos cuya secuencia termina en el sitio de la mutación buscada, se realizaron alineamientos de secuencias de los genes *ERG3* y *TAC1* respectivamente, empleando secuencias reportadas en la base de datos de nucleótidos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>) y empleando el software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>). Los números de

acceso de las secuencias ubicadas en la base de datos de nucleótidos del GenBank se indican en la tabla 3.

En lugar de crear secuencias consenso y buscar los oligonucleótidos a partir de ellas, los oligonucleótidos se diseñaron de acuerdo a las secuencias que coincidieran en la mayoría de los reportes para así tener más probabilidad de crear un oligonucleótido que hibridara completamente. Para el gen *ERG3* fue necesario el diseño de oligonucleótidos 5' que hibridaran en sitios río arriba de la secuencia debido a que la mutación buscada se encuentra al inicio del mismo y no era posible diseñar un oligonucleótido químicamente funcional que hibridara en la región inicial de la secuencia del gen.

Contrario al concepto original del diseño de los oligonucleótidos ARMS se decidió dejar un nucleótido extra mal apareado tanto en el oligonucleótido mutante como en el normal, de manera que según fuera el caso, el oligonucleótido tuviera dos nucleótidos continuos sin aparear y fuera más difícil la polimerización, esto con el fin de evitar falsos positivos en las reacciones de amplificación.

7.9 RT-PCR

Para las reacciones de retrotranscripción se empleó el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver anexos) y empleando los oligonucleótidos señalados en la tabla 2.

TABLA 3

**Números de Acceso de Secuencias
Usadas para el Diseño de
Oligonucleótidos ARMS**

No. de Acceso	Gen
68488507	ERG3
orf19.767*	ERG3
68485021	ERG3
68484946	ERG3
4091928	ERG3
158131951	TAC1
158131949	TAC1
158131947	TAC1
158131945	TAC1
158131943	TAC1
158131941	TAC1
158131939	TAC1
158131937	TAC1
158131935	TAC1
158131933	TAC1
158131931	TAC1
158131929	TAC1
158131927	TAC1
158131925	TAC1
158131923	TAC1
158131921	TAC1
158131919	TAC1
90102181	TAC1
90102179	TAC1
90102177	TAC1
orf19.3188*	TAC1

* Nombre genérico en *Candida* Genome Database

8. Resultados

8.1 Protocolo M27-A2

Los valores de CMI arrojados por la prueba de macrodilución del protocolo M27-A2 se muestran en la tabla 4.

De acuerdo a los lineamientos del CLSI en cuanto a la interpretación de los puntos de corte (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002), solamente las cepas 35 y 40 caen dentro de la categoría de resistente, y las 38 cepas restantes caen en la categoría de susceptible.

8.2 Prueba de E-Test

Los valores de CMI de la prueba de E-Test fueron interpretados como la concentración de fármaco con la cual el halo elíptico de inhibición hizo intersección en la tirilla de la prueba. Cuando la intersección no fue exacta, se tomó el valor inmediato superior y para facilitar la comparación, debido a que la prueba de E-Test maneja un gradiente continuo en lugar de un esquema de diluciones \log_2 , los valores de CMI del E-Test fueron elevados a la siguiente concentración que era equivalente al esquema de macrodilución.

TABLA 4**Valores de CMI Obtenidas Mediante el Protocolo M27-A2**

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
01	0.25	21	0.125
02	0.5	22	0.5
03	0.25	23	1
04	0.25	24	1
05	0.25	25	0.125
06	0.25	26	0.125
07	0.25	27	0.125
08	0.25	28	0.125
09	0.125	29	0.125
10	0.25	30	0.125
11	2	31	0.125
12	2	32	0.5
13	0.5	33	2
14	0.5	34	0.125
15	0.5	35	64
16	2	36	8
17	0.25	37	0.5
18	0.5	38	0.5
19	0.25	39	0.5
20	0.125	40	64

La tabla 5 muestra los puntos de corte registrados por medio de la prueba E-Test para las 40 cepas. Empleando los lineamientos del CLSI para la interpretación de los puntos de corte se obtiene la solamente la cepa 40 como resistente, la 35 como susceptible dependiente de dosis y el resto de las cepas como susceptibles.

TABLA 5

Valores de CMI Obtenidas Mediante la Prueba E Test

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
01	0.125	21	0.125
02	1	22	0.25
03	0.25	23	2
04	0.125	24	0.5
05	0.25	25	0.125
06	0.25	26	0.125
07	0.125	27	0.125
08	0.25	28	0.125
09	0.125	29	0.25
10	0.5	30	0.125
11	2	31	0.125
12	1.5	32	0.5
13	0.5	33	1
14	0.25	34	0.125
15	0.25	35	32
16	1	36	4
17	0.125	37	0.25
18	0.5	38	0.5
19	0.25	39	0.5
20	0.125	40	64

8.3 Prueba de Drop Test

Los valores de CMI para la prueba de Drop Test se interpretaron como la concentración a la cual al menos la alícuota correspondiente a 10^3 células mostró una disminución de 80% en el crecimiento en comparación con la placa control sin fármaco (Figura 6).

FIGURA 4

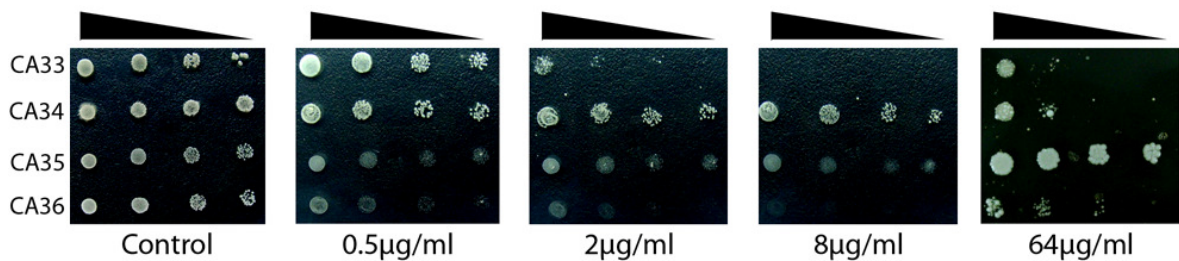


FIGURA 6. Ilustración de la metodología del ensayo Drop Test. Se colocaron 4 cepas como máximo en cada placa en alícuotas de 10^5 a 10^3 células. Los valores en la parte inferior indican la concentración de fluconazol en cada placa.

La tabla 6 muestra los valores de CMI obtenidos mediante Drop Test. A diferencia de los dos ensayos anteriores, la técnica de Drop Test arrojó una gran cantidad de cepas en la categoría de resistente, contando con 15 cepas dentro de esa categoría y el resto de ellas en la categoría de susceptible.

TABLA 6**Valores de CMI Obtenidos Mediante
el Ensayo Drop Test**

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
01	0.5	21	64
02	2	22	0.5
03	0.5	23	64
04	2	24	64
05	8	25	64
06	2	26	64
07	64	27	0.5
08	2	28	0.5
09	0.5	29	2
10	8	30	2
11	8	31	0.5
12	0.5	32	2
13	64	33	2
14	64	34	64
15	64	35	64
16	64	36	0.5
17	0.5	37	2
18	64	38	2
19	0.5	39	2
20	64	40	64

8.4 Selección de Cepas para Análisis

Para el análisis de expresión se seleccionaron cepas que exhibieran resistencia y susceptibilidad en los puntos más extremos posible incluyendo cepas que mostraran comportamientos contrastantes previa comparación de sus CMIs entre las diferentes pruebas. De este modo, se seleccionaron las cepas 9, 21, 31 y 34 como susceptibles y las

cepas 11, 33, 36 y 40 como resistentes. La tabla 7 resume los valores de CMI para las cepas seleccionadas en las diferentes pruebas de susceptibilidad realizadas.

TABLA 7

Resumen Comparativo de los Valores de CMI Obtenidos para las Cepas Seleccionadas en las 3 Pruebas de Susceptibilidad

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$) obtenida por:		
	M27-A2	E-Test	Drop Test
9	0.125	0.125	0.5
21	0.125	0.125	64
31	0.125	0.125	0.5
34	0.125	0.125	64
11	2	2	8
33	2	1	2
36	8	4	0.5
40	64	64	64

8.5 Curvas de Crecimiento Preliminares

Las gráficas de las curva de crecimiento preliminares pare seleccionar la concentración de fármaco que permitiera el mayor crecimiento celular indicaron que la concentración de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ de fluconazol fue la que mayor crecimiento permitió obtener (Figura 7). Una vez obtenido esto, se procedió a realizar las curvas finales.

FIGURA 5

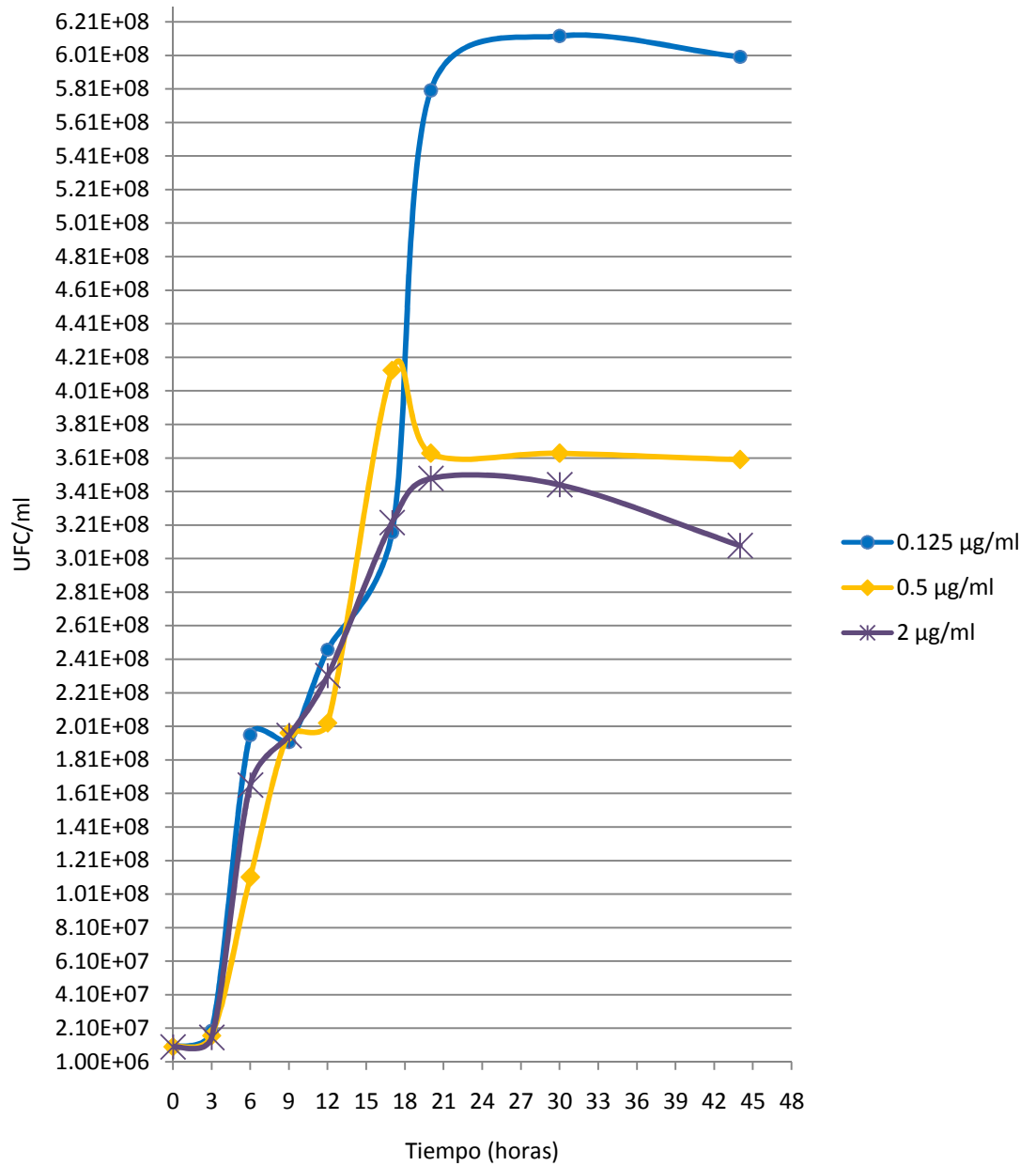


FIGURA 7. Curvas de crecimiento preliminares para la selección de la concentración del fármaco.

8.6 Curvas de Crecimiento Finales

Las gráficas del crecimiento de las cepas tolerante y susceptible indicaron que la hora a la cual la fase logarítmica de crecimiento era alrededor de las 9 horas, con una pequeña diferencia entre ellas, sin embargo se estableció ese tiempo como el indicado para detener el crecimiento de las cepas por no considerar esta diferencia significativa (Figura 8).

FIGURA 6

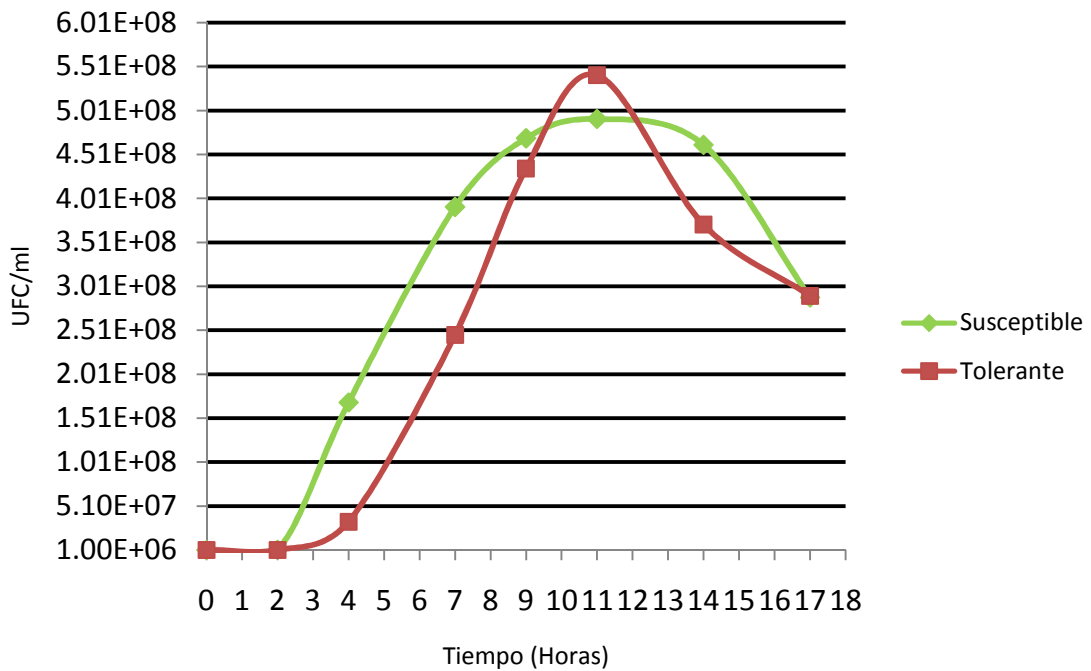


FIGURA 8. Curvas de crecimiento finales para cepas susceptibles y tolerantes al fluconazol. El crecimiento se interrumpió a las 9 horas para todas las cepas y se formó el pellet celular por centrifugación para almacenar a -80°C hasta su uso.

8.7 Detección de Mutaciones con Oligonucleótidos ARMS

8.7.1 Mutaciones en *ERG3*

Debido a una amplificación deficiente en presencia de los cuatro oligonucleótidos en la misma reacción, se elaboró un par de reacciones para cada muestra de DNA que incluyeron los oligonucleótidos de la banda control de 740pb y el oligonucleótido normal y mutante respectivamente. Los productos de amplificación mediante PCR empleando los oligonucleótidos ARMS para la detección de las mutaciones T57G y T57A se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% preparado en buffer TAE, durante 45 minutos a 70V. El gel resultante se muestra en la figura 9.

Las muestras de DNA de las cepas 9 y 11 no resultaron en amplificación. En el resto de las amplificaciones el patrón de bandas indica la ausencia de mutaciones en la posición analizada, a excepción de la muestra de la cepa 36, la cual exhibe un patrón de bandas que no corresponde a la ausencia de mutación pero que sin embargo tampoco coincide con alguno de los patrones de bandas esperado para las mutaciones señaladas.

FIGURA 7

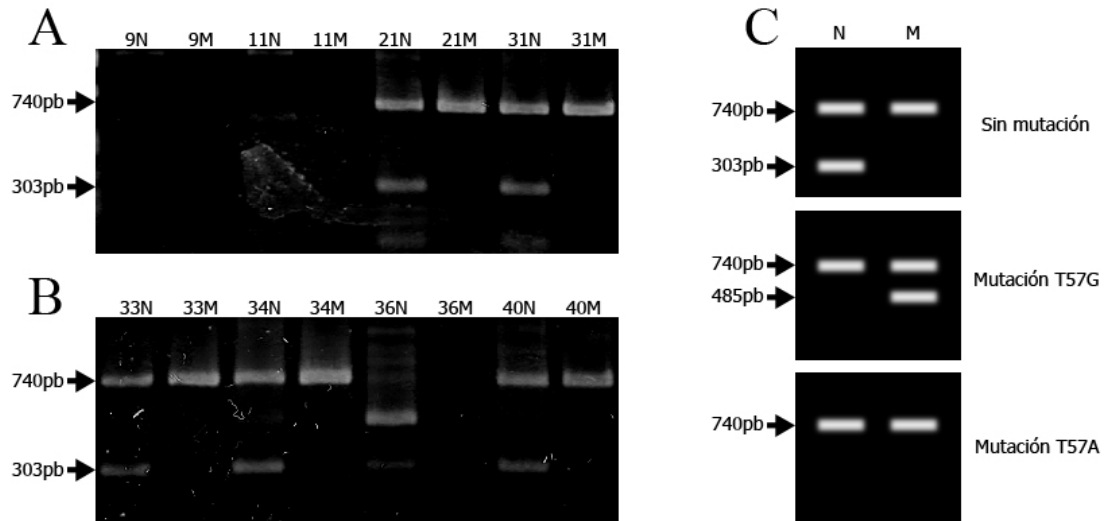


FIGURA 9. Patrones de bandas formados empleando oligonucleótidos ARMS para detectar las posibles mutaciones T57G y T57A. A. Muestras de DNA de las cepas 9, 11, 21, y 31. B. Muestras de DNA de las cepas 33, 34, 36 y 40. C. Proyección virtual de las bandas esperadas en presencia y ausencia de mutaciones.

8.7.2 Mutaciones en *TAC1*

De forma similar a las reacciones para detectar mutaciones en *ERG3*, las muestras de DNA de las cepas 9 y 11 resultaron en una amplificación inespecífica o ausencia de la misma. (Figura 10).

FIGURA 8

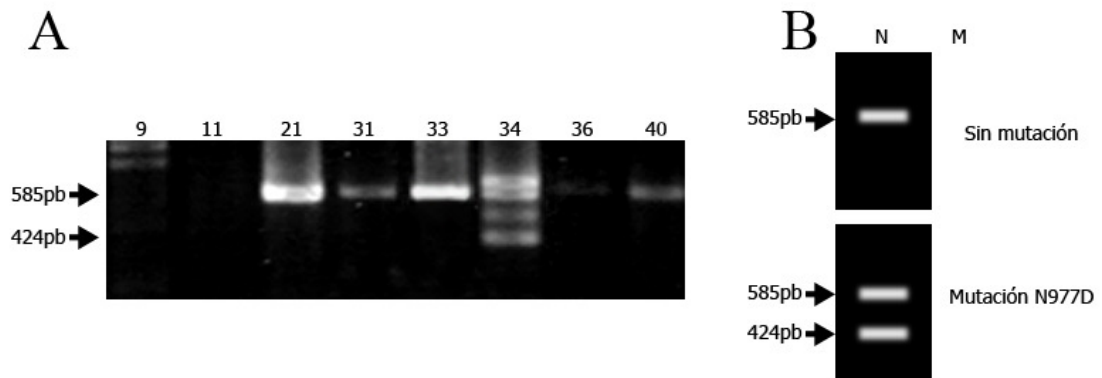


FIGURA 10. Patrones de bandas formados empleando oligonucleótidos ARMS para detectar la mutación N977D del gen *TAC1*. A. Bandas visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. B. Proyección virtual de las bandas esperadas en presencia y ausencia de la mutación.

8.8 Análisis de Expresión mediante RT-PCR y Densitometría

8.8.1 Expresión de *ERG11*

Los productos de retrotranscripción y su posterior amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% preparado en buffer TAE durante 45 minutos a 70V. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en luz UV (Figura 11). El gel fue fotografiado mediante una cámara digital y la imagen fue analizada mediante el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Se analizaron las bandas de actina y se normalizaron los valores generados dividiendo los valores de la banda de la cepa 09 entre los valores de cada una de las cepas restantes para obtener un factor de normalización. Una vez obtenido este valor, los valores obtenidos para las bandas de *ERG11* de cada una de las cepas fueron multiplicados por el factor respectivo de su banda de actina. Una vez normalizados los valores de *ERG11* se ponderaron con referencia al valor de la primera banda y se generaron valores porcentuales (Tabla 8). Los valores obtenidos mediante los cálculos mencionados indican que existe una considerable reducción en la expresión de *ERG11* en la cepa 21, mostrando un 70% menos que la banda de referencia, lo cual sugiere fuertemente que dicha cepa contiene una cantidad disminuida de moléculas blanco para fluconazol, en comparación al resto de las cepas empleadas en este trabajo.

FIGURA 11

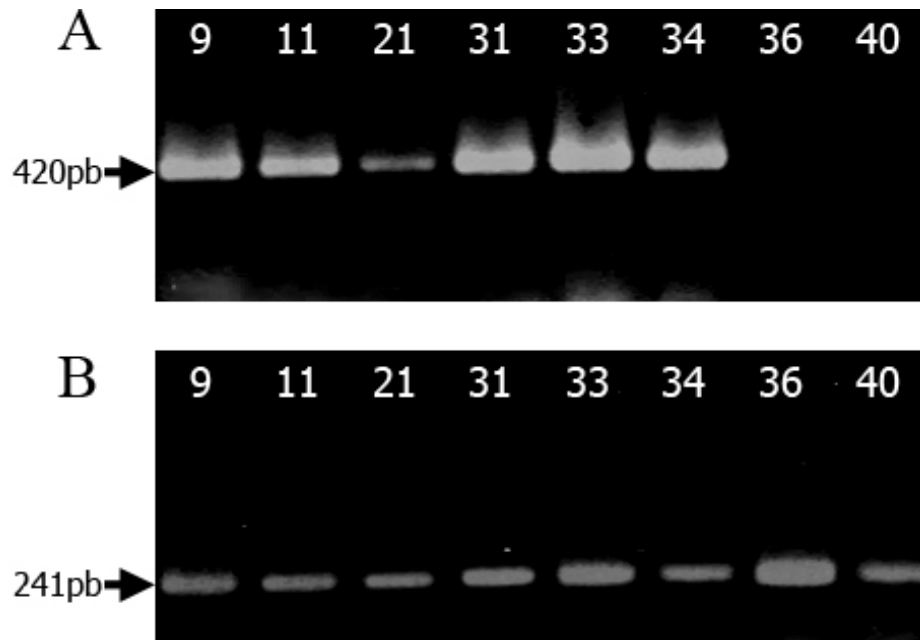


FIGURA 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR para *ERG11* (A) y actina como control de carga (B).

TABLA 8**Valores para *ERG11* Obtenidos mediante Densitometría**

Cepa	Valor de ERG11	Valor de Actina	Factor de Normalización (2472.92/x)	ERG11 Normalizado	ERG11 Ponderado contra 09	Porcentual
09	6197.426	2472.92	1	2472.92	1	100%
11	4627.062	1915.263	1.291	5974.299	0.964	96%
21	1291.092	1718.556	1.439	1857.820	0.300	30%
31	6251.305	2608.678	0.948	5925.981	0.956	96%
33	7659.912	3503.042	0.706	5407.400	0.873	87%
34	5985.012	2023.971	1.222	7312.583	1.180	118%
36	0	4954.284	n/a	n/a	n/a	n/a
40	0	2400.506	n/a	n/a	n/a	n/a

8.8.2 Expresión de *CDRI*

Los productos de amplificación por RT-PCR usando los oligonucleótidos específicos para *CDRI* fueron examinados de la misma manera que para *ERG11*. Se analizaron las bandas de actina y se normalizaron los valores generados dividiendo los valores de la banda de la cepa 11 entre los valores de cada una de las cepas restantes para obtener un factor de normalización. Una vez obtenido este valor, los valores obtenidos para las bandas de *CDRI* de cada una de las cepas fueron multiplicados por el factor respectivo de su banda de actina. Una vez normalizados los valores de *CDRI* se ponderaron con referencia al valor de la primera banda (cepa 11) y se generaron valores porcentuales (Tabla 9). Los valores resultantes exhiben una disminución considerable en la expresión de *CDRI* en las cepas 31 y 40, contando con 83 y 77% menos expresión en comparación con la cepa 11 empleada como referencia. Por otro lado, la cepa 34 muestra un aumento muy considerable en la expresión del este gen, contando con una banda 267% más intensa que la cepa 11.

FIGURA 12

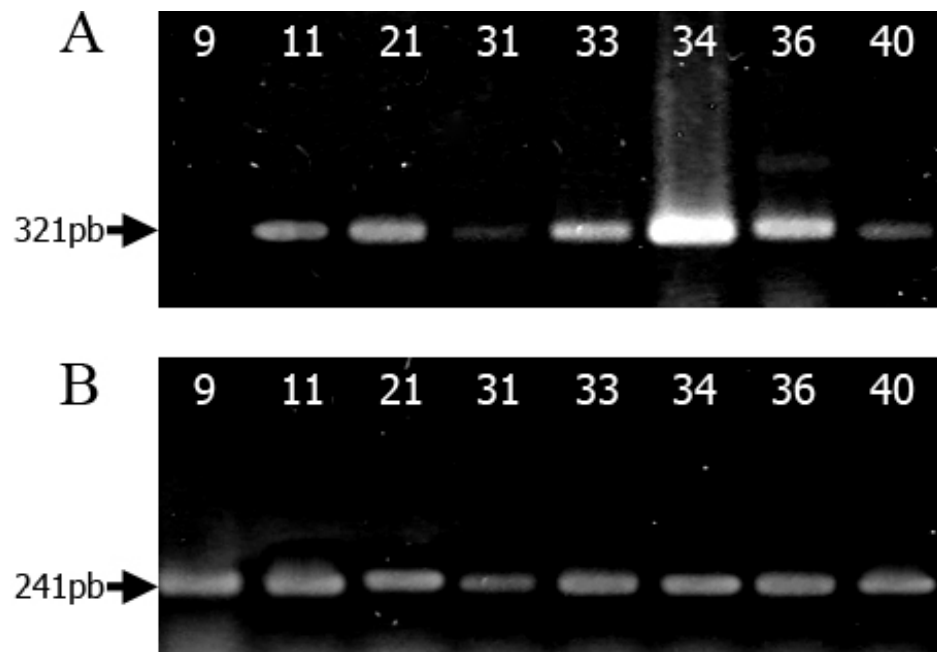


FIGURA 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR para *CDRI* (A) y actina como control de carga (B).

TABLA 8**Valores para *CDRI* Obtenidos mediante Densitometría**

Cepa	Valor de <i>CDRI</i>	Valor de Actina	Factor de Normalización (2472.92/x)	<i>CDRI</i> Normalizado	<i>CDRI</i> Ponderado contra 09	Porcentual
09	n/a	4428.113	n/a	n/a	n/a	n/a
11	1245.678	3886.577	1.000	3886.577	1.000	100%
21	1951.749	3071.506	1.265	2469.675	0.635	64%
31	268.556	1571.678	2.473	664.108	0.171	17%
33	2233.406	3065.627	1.268	2831.494	0.729	73%
34	10821.731	2945.092	1.320	14281.215	3.674	367%
36	3249.648	2943.92	1.320	4290.201	1.104	110%
40	661.678	2859.042	1.359	899.484	0.231	23%

9. DISCUSIÓN

Existen numerosos estudios que refieren las fuentes moleculares de resistencia en cepas de *Candida albicans*, pero la mayoría de estos reportes se han realizado en cepas cuya resistencia ha sido inducida en condiciones de laboratorio, por lo que en muchos de los casos no se conoce cuál es la fuente de resistencia natural en los procesos infecciosos que se están llevando a cabo en casos clínicos. Es por ello que se considera de gran relevancia analizar entre varias cosas, la frecuencia de resistencia en aislamientos clínicos de *C. albicans* caracterizados a nivel especie por pruebas microbiológicas estándar como el sistema API 20C AUX así como filamentación y producción de clamidosporas, y verificar de entre esas cepas caracterizadas cuales presentan factores moleculares de resistencia que ya han sido caracterizados.

En el presente trabajo se realizó una caracterización de la resistencia a fluconazol de 40 cepas aisladas de cuadros clínicos de candidosis utilizando tres diferentes métodos: I) Prueba de macrodilución del protocolo M27-A2, en el cual se someten inóculos de 1×10^3 a 5×10^3 células a la presencia de un rango de concentraciones de fluconazol que van desde 0.125 a 64 $\mu\text{g/ml}$ en medio líquido RPMI-1640. II) Ensayo E-Test, en el cual inóculos de 1×10^3 a 5×10^3 células sembrados de forma de cubran al 100% la superficie del medio de cultivo (RPMI-1640 sólido) se exponen a una tirilla que contiene un gradiente de concentración el cual forma una elipse de inhibición del crecimiento del hongo. III) Drop Test, donde alícuotas de diluciones del inóculo que van

desde 10^6 hasta 10^3 se someten al crecimiento en placas con medio YPD adicionadas con diferentes concentraciones de fluconazol y su crecimiento en cada concentración se compara con su crecimiento en placas sin fármaco. Los resultados globales de las tres pruebas se muestran en la tabla 8.

TABLA 10

Distribución de las CMI de fluconazol para los diferentes métodos de susceptibilidad

Método	No. de aislamientos para los cuales la CMI ($\mu\text{g/ml}$) indicada fue:									
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
M27-A2	11	10	10	2	4		1			2
E Test	14	10	7	3	3	1			1	1
Drop Test			11		11		3			15

Como puede observarse y a pesar de ser conceptualmente equivalentes, los valores de CMI contrastan significativamente cuando se aplica la prueba de Drop Test lo cual generó una serie de discusiones y conclusiones que permitieron la elaboración de un documento sometido a publicación (Robledo *et al*, 2009, en evaluación).

A partir de los valores de CMI obtenidos individualmente (tabla 7) se escogieron las cepas 9, 21, 31, y 34 como cepas susceptibles teniendo para 21 y 34 valores contrastantemente altos obtenidos mediante Drop Test. Como cepas tolerantes se

eligieron las cepas 11, 33, 36 y 40, siendo la 40 la única que categóricamente se denomina resistente e incluyendo el peculiar comportamiento de la cepa 36 que de forma contraria a la tendencia, presenta mayor susceptibilidad antifúngica mediante Drop Test que para cualquiera de las otras técnicas.

Para verificar que la susceptibilidad no se debiera a una falta de “salud” celular general, se comprobó que las células crecieran de igual forma que las tolerantes en diversas condiciones de estrés osmótico y salino en presencia de NaCl (0.5, 1 y 1.5M), CaCl (0.3, 0.6 y 0.9M) y LiCl (0.025, 0.05 y 0.1M) además de su crecimiento en un rango de pHs de 4 a 7.

Una vez comprobada la salud celular general de los aislamientos, se realizaron curvas de crecimiento en diferentes concentraciones de fluconazol para determinar las condiciones adecuadas de extracción de RNA resultando la concentración más adecuada la de 0.125 µg/ml y deteniendo el crecimiento a las 9 horas (término de la fase logarítmica). De esta manera nos aseguramos que los factores de resistencia y susceptibilidad estuviesen siendo expresados en ambas cepas sin comprometer su viabilidad.

En la tabla 9 se resumen los resultados de la búsqueda de mutaciones y el análisis de expresión.

Se analizó la presencia de dos mutaciones reportadas para el gen *ERG3* (Coste *et al.*, 2006) que fueron asociadas a la susceptibilidad de dos cepas y no se encontró en las

cepas de estudio esas mutaciones específicas, sin embargo la falta de amplificación en el DNA de las cepas 9 y 11, reportadas como susceptibles, indican una posible relación entre ambos hechos.

TABLA 9

Resumen de los resultados de búsqueda de mutaciones y expresión por RT-PCR

Cepa/Seleccionada como:	Gen							
	<i>ERG3</i>				<i>TAC1</i>		<i>ERG11</i>	<i>CDR1</i>
	wt	T57G	T57A	Otro	wt	N977D		
09/S	∅	∅	∅	∅	∅	∅	100%	∅
11/R	∅	∅	∅	∅	∅	∅	96%	100%
21/S	•				•		30%	64%
31/S	•				•		96%	17%
33/R	•				•		87%	73%
34/S	•					•	118%	367%
36/R				•	•		∅	110%
40/R	•				•		∅	23%

S = susceptible, R = resistente

• = patrón presente

∅ = ausencia de amplificación

De igual manera se analizó la presencia de la mutación N977D en el genoma de las cepas seleccionadas, la cual confiere hiperactividad a la regulación de las bombas de flujo Cdr1p y Cdr2p y convierte su expresión en constitutiva aumentando su tolerancia al fármaco. Las cepas 9 y 11 resultaron nuevamente en una ausencia de amplificación lo cual indica que su resistencia no se debe a esta modificación, y de manera independiente al nivel de expresión el patrón de bandas exhibido por el resto de las cepas es el de una secuencia normal sin mutación (factor de resistencia ausente), a excepción de la cepa 34, la cual muestra un patrón de presencia de mutación (factor de resistencia presente)

además de algunas aparentes amplificaciones inespecíficas. Este resultado contradice los valores de CMI obtenidos mediante los protocolos M27-A2 y E-Test los cuales la clasifican como susceptible, aunque para la prueba de Drop Test su comportamiento fue de tolerancia al fluconazol, lo cual estaría justificado por la presencia de esta mutación.

Por otro lado se analizó también el nivel de expresión de los genes *ERG11* y *CDR1*. Al analizar los productos amplificados mediante RT-PCR del gen *ERG11*, se hizo evidente la ausencia de amplificación para las cepas 36 y 40 (seleccionadas como resistentes) y llama la atención también la disminuida expresión en la cepa 21 (seleccionada como sensible). Para el resto de las cepas no existe en apariencia una diferencia muy significativa. El bajo nivel de expresión para la cepa 21 indica que puede ser al menos uno de los factores involucrados en la susceptibilidad al fluconazol, pues una producción disminuida de la enzima codificada por el gen *ERG11* significa que la acción del fármaco es más efectiva aún y con un menor número de moléculas atacando el blanco en la célula. La cepa 21 sin embargo exhibió un comportamiento de tolerancia al fluconazol cuando se ensayó mediante Drop Test, lo cual podría indicar que a pesar de su baja expresión de Erg11p cuando crece de forma planctónica, existan factores de resistencia inducidos por crecimiento sésil y/o densidad celular basados en mecanismos moleculares o por arquitectura celular (Perunal *et al.*, 2007, Seneviratne *et al.*, 2008).

También se analizaron los niveles de expresión del gen *CDR1*, que codifica para la bomba de transporte de membrana Cdr1p. Para la cepa 9 no hubo amplificación, lo que provoca pensar que se trate de una cepa con cambios notables en su secuencia y que por consiguiente no corresponda a la especie *albicans*. Es posible también sin embargo que

la ausencia de amplificación se deba a sustituciones sinónimas en la secuencia del gen, pero que puedan afectar la eficiencia del alineamiento de los oligonucleótidos. Del resto de los resultados, se puede resaltar el nivel de expresión mostrado correspondiente a las cepas 31, 34 y 40. Para la cepa 31, la expresión disminuida de *Cdr1p* podría ser uno de los factores que hagan susceptible a la célula provocando en ella la incapacidad de transportar el fármaco al exterior a la misma velocidad que una cepa “normal”, lo cual explicaría su susceptibilidad *in vitro*. También es factible que la regulación de al menos esta bomba de transporte no esté siendo inducida a pesar de la presencia del fármaco por alguna alteración en los factores de regulación y, pues como se mostró en los antecedentes, se ha comprobado que las bombas de flujo son inducibles y su nivel de expresión aumenta cuando se exponen al fluconazol.

En el caso de la cepa 34, existe claramente una expresión elevada de *CDRI* en comparación al resto de las muestras. Si relacionamos este resultado con la presencia de la mutación N977D para *TAC1* la cual hace confiere a este factor de transcripción hiperactividad, se puede decir que el aumento en su expresión se debe al alelo hiperactivo de *TAC1* y por lo tanto le confiere tolerancia al fármaco (Coste *et al.*, 2006). Sin embargo, la cepa 34 fue seleccionada como susceptible al fluconazol, aunque mediante Drop Test su comportamiento fue de tolerante. Debido a lo anterior se encuentra que la susceptibilidad de la cepa 34 es dependiente del tipo de crecimiento significando la posibilidad de que el aumento en la expresión de *CDRI* confiera resistencia particularmente cuando la cepa crece en medio sólido y a una proporción de concentración celular por área de contacto mayor a la de E-Test. Si se presentaran los resultados actuales en el contexto de valores de susceptibilidad para las tres pruebas, se

podría pensar que existe alguna alteración que provoque que a pesar de una elevada expresión de *CDR1*, su traducción a Cdr1p pudiese no estarse realizando adecuadamente, pero este no es el caso. Debido a esto se puede inferir que nuevamente el tipo de crecimiento y/o la densidad celular afectan la respuesta de las cepas frente al fármaco promoviendo el desarrollo de otro tipo de mecanismos y/o arquitecturas confieran protección a la célula frente a la acción del fluconazol.

10. CONCLUSIÓN

Se han reportado genes cuya sobreexpresión confiere resistencia al fluconazol pero en la mayoría de los casos la resistencia se determina mediante alguna de las versiones del protocolo M27-A del CLSI. Los resultados presentados en el presente trabajo permiten deducir que es posible que ciertos factores confieran resistencia únicamente en condiciones de crecimiento sésil y de densidad celular particular. En trabajos reportados previamente esta particularidad no ha sido estudiada por lo que el uso de la técnica de Drop Test permite la evaluación de esta posibilidad. Además, existen numerosos reportes de mutaciones y características moleculares que confieren resistencia a fluconazol en *Candida albicans* pero en realidad son pocos o ninguno los estudios que determinen la frecuencia de aparición de estas mutaciones como marcadores de resistencia en aislamientos clínicos. El actual trabajo presenta un esfuerzo inicial por determinar en cepas directamente aisladas de pacientes y sin ningún acondicionamiento inducido si estas modificaciones genómicas se están presentando.

También en la presente investigación se han generado cepas con un alto nivel de caracterización que van a servir como modelos de estudio de estos mecanismos permitiendo generar una gran cantidad de información sobre el estado actual y real de la presencia de marcadores de resistencia reportados y comprobados experimentalmente en aislamientos clínicos que provocan infecciones en pacientes reales más allá de las resistencias generadas y/o surgidas en el laboratorio.

Por otro lado se presenta la tecnología ARMS como una técnica sencilla y rápida que permite encontrar mutaciones específicas que confieren resistencia o susceptibilidad en cepas de *Candida albicans*, sin embargo, es deseable la fabricación de un conjunto más amplio de oligonucleótidos específicos para diferentes marcadores y mutaciones de modo que sea posible el análisis de una mayor cantidad de factores en una menor cantidad de tiempo, lo cual representa una inversión inicial moderada pero que a la larga retribuye en la generación de información de inmenso valor para todas las entidades que buscan atacar el problema de las candidosis y el rápido desarrollo de las resistencias antifúngicas.

11. LITERATURA CITADA

1. AB bioMérieux, 2008. E-Test technical manual. Dalvägen 10, S-169 56 Solna, Sweden.
2. Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, and T. Horan. 1991. Secular trends in nosocomial primary blood stream infections in the United States. *Am. J. Med.* 91:86S–89S.
3. Bastide, M., M. Mallie, B. Montes, and J. M. Bastide. 1989. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Pathol. Biol.* 37:694–699.
4. Beck-Sague, C. M., and T. R. Jarvis. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *J. Infect. Dis.* 167:1247–1251.
5. C. J. Seneviratne, L. J. Jin, Y. H. Samaranayake, and L. P. Samaranayake. Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sept; 52(9):3254-66.
6. Castañón-Olivares LR, Arreguín-Espinosa R, Ruiz-Palacios SG, López-Martínez R. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in Mexico and their comparison with some Latin American countries. 2000. *Rev Latinoam Microbiol*; 42:35-40.
7. Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, et al. 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell*.;6:1889–1904.
8. Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhauser J, Forche A, et al. 2006. A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss

of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*.;172:2139–2156.

9. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. 2004 TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC Transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell*.;3:1639–1652.
10. Du, W., M. Coaker, J. D. Sobel, and R. A. Akins. 2004. Shuttle vectors for *Candida albicans*: control of plasmid copy number and elevated expression of cloned genes. *Curr. Genet.* 45:390–398.
11. Franz, R., M. Ruhnke, and J. Morschhäuser. 1999. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses* 42:453–458.
12. Franz, R., S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly, M. Ruhnke, and J. Morschhäuser. 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3065–3072.
13. Franz, R., S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly, M. Ruhnke, and J. Morschhäuser. 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3065–3072.
14. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1995. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec;39(12):2708-17.
15. Goldman, G. H., M. E. da Silva Ferreira, E. dos Reis Marques, M. Savoldi, D. Perlin, S. Park, P. C. Godoy Martinez, M. H. Goldman, and A. L. Colombo. 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50:25–32.
16. Hitchcock, C. A. 1993. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem. Soc. Trans.* 21:1039–1047.

17. Hitchcock, C. A., K. J. Barrett-Bee, and N. J. Russell. 1987. Inhibition of 14 α -sterol demethylase activity in *Candida albicans* Darlington does not correlate with resistance to azole. *J. Med. Vet. Mycol.* 25:329–333.
18. Horsburgh, C. R., Jr., and C. H. Kirkpatrick. 1983. Long-term therapy of chronic mucocuta
19. neous candidiasis with ketoconazole: Experience with 21 patients. *Am. J. Med.* 74:23–29.
20. Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. 2004. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7329–7334.
21. Kakeya, H., Y. Miyazaki, H. Miyazaki, K. Nyswaner, B. Grimberg, and J. E. Bennett. 2000. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2985–2990.
22. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H, Schumacher U et al. 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol Δ 5,6-desaturation. *FEBS Lett*, 400: 80–82.
23. Kelly, S. L., D. C. Lamb, and D. E. Kelly. 1999. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol. Lett.* 180:171–175.
24. Kelly, S. L., D. C. Lamb, J. Loeffler, H. Einsele, and D. E. Kelly. 1999. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:174–179.
25. Koletar, S. L., H. G. Raimundo, and M. B. Raimundo. 1994. Thrush unresponsive to treatment with fluconazole in HIV-positive patients, abstr. 35, p. 61. In *Proceedings of the First National Conference on Human Retroviruses.*

26. Komshian, S. V., A. K. Uwaydah, and J. D. Sobel. 1989. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev. Infect. Dis.* 11:379–390.
27. Lamb, D. C., D. E. Kelly, T. C. White, and S. L. Kelly. 2000. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:63–67.
28. Lamb, D. C., D. E. Kelly, W. H. Schunck, A. Z. Shyadehi, M. Akhtar, D. J. Lowe, B. C. Baldwin, and S. L. Kelly. 1997. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J. Biol. Chem.* 272:5682–5688.
29. Lan Yan, Jundong Zhang, Miaohai Li, Yongbing Cao, Zheng Xu, Yingying Cao, Pinghui Gao, Yan Wang, y Yuanying Jiang. 2008. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. *Acta Biochim Biophys Sin.* 12:1048–1060.
30. López-Ribot, J. L., R. K. McAtee, L. N. Lee, W. R. Kirkpatrick, T. C. White, D. Sanglard, and T. F. Patterson. 1998. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2932–2937.
31. Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Macotella-Ruiz E, Manzano-Gayosso P, Serrano-Jaen L, Carmona-Castañón A, Mondragón-González R. 1999. Variación en la frecuencia de micosis en México. *Rev Argen Microbiol.* 31:107-113.
32. Morschhauser, J. 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1587:240–248.
33. Nakayama, H., N. Nakayama, M. Arisawa, and Y. Aoki. 2001. In vitro and in vivo effects of 14 α -demethylase (ERG11) depletion in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3037–3045.

34. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed. M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
35. Newton, C. R, Graham, A., Heptmstall L. E., Powell, SJ, Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C., and Markham, A. F. 1989 Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503-2516.
36. Newton, C. R, Heptinstall, L. E., Summers, C., Super, M, Schwartz, M, Anwar, R., Graham, A., Smith, J. C, and Markham, A. F. 1989 Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Luncefii*, 1481-1483.
37. Odds, F. C. 1988. Ecology and epidemiology of candidiasis, p. 89. In *Candida and candidosis*. University Park Press, Baltimore, Md.
38. Odds, F. C. 1993. Resistance to azole-derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.* 31:463-471.
39. Old, J. M., Varawalla, N. Y, and Weatherall, D. J. 1990. Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassaemia: Studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Luncefii*, 834-837.
40. Palani Perumal, Satish Mekala, and W. LaJean Chaffin. Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jul;51(7):2454-63.
41. Parkinson, T., D. J. Falconer, and C. A. Hitchcock. 1995. Fluconazole resistance due to energy dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1696-1699.
42. Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, B. L. Wickes, W. R. Kirkpatrick, O. P. Dib, S. P. Bachmann, S. M. Keller, M. Martinez, and T. F. Patterson. 2002. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1695-1703.

43. Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez, D. Calabrese, D. Sanglard, and T. F. Patterson. 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2676–2684.
44. Pfaller, M. A., J. Rhine-Chalberg, S. W. Redding, J. Smith, G. Farinacci, A. W. Fothergill, and M. G. Rinaldi. 1994. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 32: 59–64.
45. Polyak K, Riggins GJ. Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research. 2001. *J Clin Oncol.* 19:2948–2958.
46. Redding, S., J. Smith, G. Farinacci, M. Rinaldi, A. Fothergill, J. Rhine-Chalberg, and M. Pfaller. 1994. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin. Infect. Dis.* 18:240–242.
47. Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volume 1, Chapter 6, pp. 6.31-6.33.
48. Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille. 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:241–253.
49. Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille. 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:241–253.
50. Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille. 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contributing to the resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:241–253.

51. Tomasa de los Ángeles Jiménez Pirrón, Jorge Alberto Ramírez Matús, Karla Guillén Gómez, José Domingo Martínez Moguel; Benjamín Tondopó Domínguez, Sonia Roblero Ochoa, Teresa Dávila Esquivel, Jorge Ricárdez Esquinca, Maricruz González Gómez, Gladys Alfonso Aparicio. 2004. Prevalencia de candidiasis en mujeres usuarias del Hospital General de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 24:2.
52. Vázquez, J. A., and J. D. Sobel. 1997. Epidemiologic overview of resistance to oral antifungal agents in the immunocompromised host. *Excerpta. Med. Int. Congr. Ser.* 1997:1–11.
53. Vázquez, J. A., L. M. Dembry, V. Sanchez, M. A. Vazquez, J. D. Sobel, C. Dmuchowski, and M. J. Zervos. 1998. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J. Clin. Microbiol.* 36:421–426.
54. Wey, S. B., M. Motomi, M. A. Pfaller, R. F. Wolsen, and R. P. Wenzel. 1989. Risk factors for hospital-acquired candidemia: a matched case control study. *Arch. Intern. Med.* 149:2249–2253.
55. White, T. C. 1997. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1482–1487.
56. White, T. C. 1997. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1488–1494.
57. White, T. C., K. A. Marr and R. A. Bowden. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:382–402.

12. ANEXOS

12.1 Anexo 1: Programa de PCR para Actina

Temperatura (°C)	Ciclos	Tiempo	Concepto
95	1	5min	Desnaturalización
95		30seg	Desnaturalización
50	28	30seg	Alineamiento
70		30seg	Extensión
70	1	5min	Extensión

12.2 Anexo 2: Programa de RT-PCR

Temperatura (°C)	Ciclos	Tiempo	Concepto
94	1	30min	Síntesis de cDNA
94	1	2min	Desnaturalización
95		30seg	Desnaturalización
46	28	30seg	Alineamiento
70		1min	Extensión
70	1	5min	Extensión

